

Untersuchungen zur Bindung des sekundären Akzeptors in Photosystem I mit Methoden der EPR-Spektroskopie

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Christian Bork Teutloff
aus Potsdam

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Grohmann

Berichter: Prof. Dr. Wolfgang Lubitz

Berichter Prof. Dr. Robert Bittl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. August 2003

Berlin 2004

D83

Zusammenfassung

Christian Teutloff:

Untersuchungen zur Bindung des sekundären Akzeptors in Photosystem I mit Methoden der EPR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die besonderen Eigenschaften des sekundären Akzeptors in PS I, einem Phyllochinon, untersucht und in Beziehung zu dessen Proteinumgebung gesetzt. Hierbei kamen Verfahren der EPR- und ENDOR-Spektroskopie zum Einsatz, mit denen selektiv ungepaarte Elektronenspins, wie sie infolge des lichtinduzierten Ladungstransfers in PS I auftreten, beobachtet werden können. Gegenstand der Untersuchungen war das Semichinon-Radikalanion $A_1^{\bullet-}$ bzw. das nach Lichtenregung intermediär auftretende sekundäre Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$.

Die Interpretation der Ergebnisse für $A_1^{\bullet-}$ basierten auf Messungen an Chinonen *in vitro* und DFT-Rechnungen, die sowohl an Chinonen als auch an einem Teil der Bindungstasche von A_1 durchgeführt wurden.

Das niedrige Reduktionspotential des im Protein gebundenen Phyllochinons, $A_1/A_1^{\bullet-}$, konnte durch cyclovoltammetrische Messungen des Chinons in einer Reihe von Lösemitteln unterschiedlicher Polarität auf eine sehr apolare Bindungstasche zurückgeführt werden. Dabei erwies sich der *g*-Tensor des Anionradikals als empfindliche Sonde der Polarität der Umgebung.

Die spezielle, asymmetrische Spindichteverteilung in $A_1^{\bullet-}$ konnte über DFT-Rechnungen an einem Modell der Bindungstasche durch eine einseitige Wasserstoffbrücke erklärt werden. Mittels ENDOR Messungen an einem in die A_1 -Bindungstasche inkorporierten, deuterierten Chinon konnte die starke H-Brücke nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen am Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ mit EPR- und ENDOR-Spektroskopie zeigten, daß ausschließlich die Bindungstasche die für effizienten Vorwärtselektronentransfer notwendigen Redox Eigenschaften des Chinons bestimmt und dadurch sogar ein funktionaler PS I-Komplex mit Plastochinon-9 als sekundärem Akzeptor möglich ist. Mit Messungen an PS I-Punktmutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* war es möglich, den bei tiefen Temperaturen am Elektronentransfer beteiligten PsaA-Zweig der C_2 -symmetrisch aufgebauten Kofaktorenkette über die Wechselwirkung des Tryptophans A693 zu identifizieren. Erstmals wurden ENDOR-Messungen an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I-Einkristallen durchgeführt, mit denen die genauen Hyperfeintensorhauptwerte der 2-Methylgruppe des Semichinonanions und die Orientierung zur kristallographischen *c*-Achse bestimmt wurden.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht**Wissenschaftliche Publikationen**

1. Ch. Teutloff, F. MacMillan, R. Bittl, F. Lenzian, W. Lubitz
The Phylloquinone Acceptor Radical Anion in Photosystem I. A Multifrequency EPR and ENDOR Study
in: *Magnetic Resonance and Related Phenomena* (D. Ziessow, W. Lubitz and F. Lenzian, Hrsg.); Bd. II; S. 806–807; Technische Universität Berlin, 1998
2. F. MacMillan, Ch. Teutloff, A. W. Rutherford, W. Lubitz
An EPR and pulsed ENDOR study of the electron acceptor anion radicals in photosystem I
in: *Magnetic Resonance and Related Phenomena* (D. Ziessow, W. Lubitz and F. Lenzian, Hrsg.); Bd. II; S. 802–803; Technische Universität Berlin; 1998
3. Ch. Teutloff, F. MacMillan, R. Bittl, F. Lenzian, W. Lubitz
A Comparative Study of $A_1^{\bullet-}$ in Photosystem I from Cyanobacteria, Green Plants and Algae using EPR and ENDOR Spectroscopy
in: *Photosynthesis: Mechanism and Effects, Proceedings of the 11th International Congress of Photosynthesis* (G. Garab, Hg.); Bd. 1; S. 607–610; Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Niederlande; 1998
4. R. Bittl, S. G. Zech, Ch. Teutloff, L. Krabben, W. Lubitz
Structural Information on Components of the Electron Transfer Chain in Photosystem I from Time-resolved EPR spectroscopy
in: *Photosynthesis: Mechanism and Effects, Proceedings of the 11th International Congress of Photosynthesis* (G. Garab, Hg.); Bd. 1; S. 509–514; Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Niederlande; 1998
5. B. Zybailov, A. van der Est, S. G. Zech, Ch. Teutloff, T. W. Johnson, G. Shen, R. Bittl, D. Stehlik, P. Chitnis, J. H. Golbeck
Recruitment of a Foreign Quinone into the A_1 Site of Photosystem I
II. Structural and Functional Characterization of Phylloquinone Biosynthetic Pathway Mutants by Electron Paramagnetic Resonance and Electron-Nuclear Double Resonance Spectroscopy
J. Biol. Chem. 275; 8531–8539 (2000)

6. B. Boudreaux, F. MacMillan, Ch. Teutloff, R. Agalarov, F. Gu, S. Grimaldi, R. Bittl, K. Brettel, K. Redding
Mutations in Both Sides of the Photosystem I Reaction Center Identify the Phylloquinone Observed by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy
J. Biol. Chem. 276; 37299–37306 (2001)
7. Ch. Teutloff, R. Bittl, M. Stein, P. Jordan, P. Fromme, N. Krauß, W. Lubitz
Structure based analysis of the magnetic resonance parameters of the phylloquinone acceptor A₁ in PS I
in: *PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis*; Melbourne: CSIRO Publishing (2001); www.publish.csiro.au; S6-030
8. K. Redding, R. Bittl, F. MacMillan, Ch. Teutloff, F. Gu, S. Grimaldi, B. Boudreaux
Mutational analysis of the binding sites of the phylloquinones in PS I
in: *PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis*; Melbourne: CSIRO Publishing (2001); www.publish.csiro.au; S6-029
9. Ch. Teutloff, W. Hofbauer, S. G. Zech, M. Stein, R. Bittl, W. Lubitz
High-Frequency EPR Studies on Cofactor Radicals in Photosystem I
Appl. Magn. Reson. 21; 363–379 (2001)
10. C. E. Fursman, Ch. Teutloff, R. Bittl
Pulsed ENDOR Studies of Short-Lived Spin-Correlated Radical Pairs in Photosynthetic Reaction Centers
J. Phys. Chem. B 106; 9679–9686 (2002)
11. W. Xu, P. Chitnis, A. Valieva, A. van der Est, J. Pushkar, M. Krzystyniak, Ch. Teutloff, S. G. Zech, R. Bittl, D. Stehlik, B. Zybailov, G. Shen, J. H. Golbeck
Electron Transfer in Cyanobacterial Photosystem I
I. Physiological and Spectroscopic Characterization of the Site-Directed Mutants in a Putative Electron Transfer Pathway from A₀ through A₁ to F_X
J. Biol. Chem. 278; 27864–27875 (2003)

Konferenzbeiträge

1. Ch. Teutloff, S. G. Zech, W. Lubitz, R. Bittl
The A₁ Question: News from EPR/ENDOR
Gordon Research Conference on Biochemical Aspects of Photosynthesis, 13.–18.6. 1999,
New Hampshire, USA
2. Ch. Teutloff, M. Stein, R. Bittl, W. Lubitz
The Quinone Acceptor in Photosystem I and Its Model *in vitro*: a High Field EPR and DFT
Study
Workshop in the Priority Programme „High-Field EPR in Biology. Chemistry and Physics“,
Caputh, 16.–19.9. 2001

Weitere Publikationen

1. A. Uhlig, E. Lindner, Ch. Teutloff, U. Schnakenberg, R. Hintsche
Miniaturized Ion-Selective Chip Electrode for Sensor Application
Anal. Chem. 69, 4032–4038 (1997)
2. H. Witt, E. Schlodder, Ch. Teutloff, J. Niklas, E. Bourdignon, D. Carbonera, S. Kohler, A.
Labahn, W. Lubitz
Hydrogen bonding to P700 – Site-directed mutagenesis of threonine A739 of photosystem I
in *Chlamydomonas reinhardtii*
Biochemistry 41, 8557–8569 (2002)
3. H. Witt, E. Bourdignon, D. Carbonera, J. P. Dekker, N. Karapetyan, Ch. Teutloff, A. Web-
ber, W. Lubitz, E. Schlodder
Species specific differences of the spectroscopic properties of P700 – analysis of the influ-
ence of non-conserved amino acid residues by site-directed mutagenesis of photosystem I
from *Chlamydomonas reinhardtii*
J. Biol. Chem. (2003), im Druck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Photosynthese	3
1.1.1	Einführung	3
1.1.2	Geschichte der Photosyntheseforschung	3
1.1.3	Aufbau und Funktion des Photosyntheseapparates	4
1.1.4	Photosystem I	8
2	Theorie und Methoden	11
2.1	Cyclovoltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie	11
2.2	Grundlagen der EPR- und ENDOR-Spektroskopie	15
2.2.1	Spin-Hamiltonoperator	15
2.3	ENDOR-Spektroskopie	19
2.4	EPR und ENDOR Spektroskopie in gefrorener Lösung	21
2.5	Spinpolarisierte Radikalpaare	22
3	Experimentelles	27
3.1	Präparation der Semichinonanionen	27
3.2	Photosystem I Proben	30
3.2.1	Präparation von PS I-Partikeln aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	30
3.2.2	Photoakkumulation des Radikalanions $A_1^{\bullet-}$ in PS I	33
3.3	Verwendete Geräte und Meßapparaturen	34
4	Untersuchungen an Modellchinonen	37
4.1	Redoxpotential	37
4.2	EPR- und ENDOR-Spektroskopie	45
4.2.1	Naphthochinon	46
4.2.2	2-Methylnaphthochinon (Vitamin K_3)	50
4.2.3	2-Ethyl-naphthochinon	57

4.2.4	2-Methyl-3-Phytylnaphthochinon (Vitamin K ₁)	64
4.2.5	Zusammenfassung	77
5	DFT-Rechnungen an Chinonen	79
5.1	Rechnungen an Modellchinonen	80
5.2	Rechnungen an einem Modell der A ₁ -Bindungstasche	89
5.3	Zusammenfassung	94
6	EPR- und ENDOR-Spektroskopie am sekundären Akzeptoranion, A₁^{•-}	97
6.1	EPR-Spektroskopie im X-, Q- und W-Band	98
6.2	ENDOR-Spektroskopie	102
6.2.1	Temperaturabhängigkeit der Hyperfeinkopplungen	106
6.2.2	A ₁ ^{•-} in verschiedenen Spezies	111
6.3	Diskussion und Zusammenfassung	114
7	Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie am sekundären Radikalpaar P₇₀₀^{•+}A₁^{•-}	117
7.1	Vergleich von P ₇₀₀ ^{•+} A ₁ ^{•-} mit A ₁ ^{•-}	118
7.2	Vergleich der TR-ENDOR-Spektren von P ₇₀₀ ^{•+} A ₁ ^{•-} in <i>S. elongatus</i> und <i>C. reinhardtii</i>	125
7.3	Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie an Deletionsmutanten von <i>Synechocystis</i> <i>sp.</i> PCC 6803	127
7.3.1	<i>menA</i> und <i>menB</i>	127
7.3.2	<i>menG</i>	132
7.4	TR-ENDOR an P ₇₀₀ ^{•+} A ₁ ^{•-} aus PS I-Punktmutanten von <i>C. reinhardtii</i>	135
7.4.1	Diskussion	138
7.5	ENDOR-Spektroskopie an P ₇₀₀ ^{•+} A ₁ ^{•-} in PS I-Einkristallen	140
7.5.1	Auswertung der Spektren	141
7.6	Zusammenfassung	146
8	Zusammenfassung und Ausblick	149

Abkürzungen

A_0, A_1	primärer, sekundärer Akzeptor in Photosystem I
a_{iso}	isotrope Hyperfeinkopplung
\mathbf{A}, A_{ii}	Hyperfeintensor, Hauptwerte
\mathbf{A}', A'_{ii}	dipolarer Anteil des Hyperfeintensors, Hauptwerte
ADP, ATP	Adenosin <i>d</i> i, <i>tr</i> iphosphat
A_N	acceptor number
B_0, B_1, B_2	statisches Magnetfeld, Mikrowellenfeld, Radiofrequenzfeld
β_e, β_N	Bohrsches Magneton, Kernmagneton
$\beta\text{-DM}$	n-Dodecyl- $\beta\text{-D}$ -Maltosid
Chl <i>a/b</i>	Chlorophyll <i>a/b</i>
CV	Cyclovoltammetrie
\mathbf{D}, D_{ii}	Feinstrukturtenor, Hauptwerte
DEAE	di-Ethylaminoethyl- (Anionenaustauscher)
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E_M	Redoxpotential, hier als Synonym mit dem aus der Polarographie bekannten Halbstufenpotential verwendet
E_T	Solvenspolaritätsparameter nach Dimroth/Reichardt
ENDOR	Electron Nuclear Double Resonance
EPR, ESR	Elektronen-Paramagnetische Resonanz, Elektron-Spin-Resonanz
ESEEM, OOP-ESEEM	Electron Spin Echo Envelope Modulation, Out-Of-Phase ESEEM
EtOH	Ethanol
Fc	Ferrocen
Fd	Ferredoxin
F_X, F_A, F_B	[4Fe-4S]-Zentren der Elektronentransferkette in PS I
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
FSE	Field Swept Echo
\mathbf{g}, g_{ii}	g -Tensor, Hauptwerte
g_N	nuklearer g-Faktor
$\mathcal{H}; \hat{H}_{eZ}, \hat{H}_{NZ}, \hat{H}_{HFC},$ \hat{H}_{ee}	Spin-Hamiltonoperator; Elektron-Zeeman-, Kern-Zeeman-, Hyperfein-, Spinkopplungsterm des Spinhamiltonoperators

HFC	Hyperfeinkopplung
HSA	Hochsalzmedium mit Acetat
\hat{I}	Kernspindrehimpulsoperator
IP	Isopropanol
J	(isotrope) Austauschkopplung
K_1	Vitamin K_1 oder Phyllochinon (2-Methyl-3-Phytyl-Naphthochinon)
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
m_s, m_i	Magnetquantenzahl des Elektrons und Kerns
MTHF	2-Methyltetrahydrofuran
$\hat{\mu}_e, \hat{\mu}_N$	magnetisches Moment des Elektrons, Kerns
ν_{rf}	Radiofrequenz
ν_H	Larmorfrequenz der Protonen
NADP ⁺ , NADPH	Nikotinamadenindinukleotidphosphat oxidiert, reduziert
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NMR	Kernmagnetische Resonanz
P_{700}	primärer Donator des Photosystem I
P_{MW}, P_{RF}	Mikrowellen-, Radiofrequenzleistung
PC	Plastocyanin
PS I, PS II	Photosystem I, II
PsaA-X	Untereinheiten von Photosystem I
PQ(-9)	Plastochinon(-9)
Q_A, Q_B	primärer, sekundärer Chinonakzeptor in Photosystem II
ρ	Spindichte
\hat{S}, S	Spindrehimpulsoperator des Elektrons, Spinquantenzahl
SCE	gesättigte Kalomelektrode
SCRP	spinkorreliertes Radikalpaar
SWV	Square-Wave-Voltammetrie
THF	Tetrahydrofuran
TR-ENDOR	Time-Resolved ENDOR
Tricin	N-tris(Hydroxymethyl)-methylglycin

Kapitel 1

Einleitung

Der wichtigste Prozeß auf der Erde zur Nutzung der Sonnenenergie und ihrer Umwandlung in chemische Energie ist die Photosynthese. Sie gehört zu den ältesten biochemischen Vorgängen auf der Erde und ist eng mit der Entstehung der vielfältigen Lebensformen auf der Erde verknüpft. Die oxygene Photosynthese ist der Prozeß, bei dem unter Ausnutzung der Sonnenenergie Kohlendioxid in Kohlenhydrate umgewandelt wird. Ein Nebenprodukt dabei ist durch die Oxidation von Wasser freigesetzter Sauerstoff. Beide Produkte der Photosynthese bilden die Grundlage der höheren Lebensformen auf der Erde. Das Beiproduct Sauerstoff, im Laufe der Evolution von verschwindend geringen Mengen zu $\approx 20\%$ in der Atmosphäre akkumuliert, öffnete erst den Weg für die Entwicklung Sauerstoff atmender Lebewesen. Die Photosynthese ist auch der einzige natürliche Prozeß, welcher durch die Umwandlung in Kohlenhydrate einen Gegenpol zur CO_2 -Emission unserer Zivilisation bildet. Daher ist es beinahe selbstverständlich, daß die Photosynthese seit mehr als zweihundert Jahren Gegenstand intensiver Forschung ist.

Von der Entdeckung der Sauerstoffentwicklung von Grünpflanzen über die Lokalisierung des Prozesses in den Chloroplasten bis zur Isolierung der beteiligten Enzyme führte die Photosyntheseforschung zu einem detailliertem Verständnis über das komplizierte Zusammenwirken verschiedener Enzymkomplexe, die den Photosyntheseapparat bilden. Die heutige Forschung beschäftigt sich unter anderem mit den Einzelschritten der Photosynthese unter Verwendung von verschiedenen spektroskopischen Methoden. In den letzten 30 Jahren konnten einzelne an den Primärreaktionen beteiligte Kofaktoren identifiziert werden. Einen bedeutenden Beitrag lieferte hierbei die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des bakteriellen Reaktionszentrums [1] der anoxygenen Photosynthese und kürzlich der beiden Photosysteme I [2] und II [3]. Ein wichtiger Schwerpunkt der Forschung ist (neben der Lokalisierung in der Kristallstruktur) die Einbettung der am Redoxprozeß beteiligten Pigmente in das Enzym und spezifische Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung. Mit einem der Akzeptorpigmente des Photosystem I und seinen besonderen Eigenschaften im

Protein beschäftigt sich diese Arbeit. Die Primärreaktion des Photosystem I umfaßt die Absorption eines Photons, eine dadurch initiierte Ladungstrennung und den Transfer eines Elektrons über eine Kette von Kofaktoren. Dabei treten intermediäre radikalische Zustände auf. Das mit dem ungepaarten Elektron verbundene magnetische Moment ermöglicht es der Elektronen Paramagnetischen Resonanz (EPR) Spektroskopie, diese Intermediate zu untersuchen. Damit können Beiträge zur Funktionsweise des Photosystems I geliefert werden, die der statischen Kristallstruktur nicht entnehmbar sind.

Mittels Untersuchungen am stabilisierten Radikalanion des sekundären Akzeptors des Photosystem I, $A_1^{\bullet-}$ und am transienten sekundären Radikalpaar, $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ soll die Wechselwirkung des Akzeptorchinons mit dem Protein aufgeklärt werden.

Die Arbeit gliedert sich in vier Teile:

Im ersten Teil werden Untersuchungen an einer Reihe von Modellchinonen mittels elektrochemischer Methoden, EPR- und ENDOR-Spektroskopie präsentiert, die die Grundlagen für einen Vergleich mit dem Chinon *in vivo* bilden. Ein wichtiger Punkt dabei war zu untersuchen, wie sich die Polarität des Lösemittels auf spektroskopische Meßgrößen auswirkt.

Der zweite Teil befaßt sich mit quantenchemischen Rechnungen an einem Modell für das Phyllochinon *in vitro*. Insbesondere wurden hier die Einflüsse von Wasserstoffbrückenbindungen auf das Chinon und die mit EPR-Spektroskopie zugänglichen Parametern untersucht.

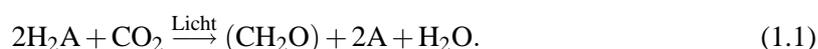
Der dritte Teil behandelt Untersuchungen am photoakkumulierten Radikalanion des sekundären Akzeptors $A_1^{\bullet-}$ in PS I mittels EPR-Spektroskopie in mehreren Frequenzbändern und ENDOR-Spektroskopie. Hierbei werden die besonderen spektroskopischen Eigenschaften von $A_1^{\bullet-}$ in Relation zu den Messungen an Modellchinonen gesetzt.

Im vierten Teil wird die Anwendung von ENDOR-Spektroskopie auf das transiente sekundäre Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ beschrieben. Durch die speziellen Eigenschaften wie die Spinpolarisation sind zusätzliche Informationen über relative Vorzeichen von Hyperfeinkopplungen zugänglich. Außerdem kann die ENDOR-Spektroskopie am Radikalpaar zeigen, ob sich der photoakkumulierte Zustand vom (bei kryogenen Temperaturen) aktiven Zustand, $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ unterscheidet. Messungen an Deletionsmutanten, mit denen eine unbesetzte A_1 -Bindungstasche geschaffen werden sollte, zeigen, daß stattdessen ein in der Zellmembran in großer Menge vorkommendes Plastochinon eingebaut wird. Schließlich sollte mit Messungen an PS I-Präparationen, in denen mit gezielten Mutationen die Proteinumgebung des Akzeptorchinons verändert wurde, die Bindungstasche von A_1 identifiziert und die Frage geklärt werden, ob der Elektronentransfer bei tiefen Temperaturen unidirektional verläuft.

1.1 Photosynthese

1.1.1 Einführung

Durch die Photosynthese wird die Lichtenergie der Sonne in chemische Energie umgewandelt. Sie gehört zu den ältesten biochemischen Prozessen auf der Erde und wird von Organismen seit 3.5–4 Milliarden Jahren (seit der Entstehung des Lebens auf der Erde) genutzt¹. Für die Gesamtreaktion der Photosynthese läßt sich allgemein formulieren:



Hierbei steht H_2A für ein oxidierbares Substrat wie H_2O , H_2 , H_2S oder einfache organische Verbindungen wie Weinsäure und Isopropanol. Mit (CH_2O) ist organisch gebundener Kohlenstoff, also Kohlenhydrate gemeint. Je nach verwendetem Substrat wird zwischen oxygener, sauerstoffentwickelnder ($\text{H}_2\text{A} = \text{H}_2\text{O}$) und nichtoxygener Photosynthese unterschieden. In höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien findet man die oxygene Photosynthese.

Die Prozesse der Photosynthese finden in bestimmten Zellorganellen von Grünalgen und höheren Pflanzen, den Chloroplasten statt. Diese bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran, die einen schmalen Intermembranraum umschließen. Die innere Membran umgibt das Stroma, einen Raum gefüllt mit löslichen Enzymen und membranartigen Strukturen, den Thylakoiden. Die Thylakoidmembran, ein System aus Lipiddoppelmembranen wiederum umschließt eine wäßrige Innenphase, das Thylakoidlumen.

Die Photosynthese besteht aus einer Licht- und einer Dunkelreaktion. Im Stromaraum finden die Prozesse der Dunkelreaktion statt, die Lichtreaktionen laufen in und an der Thylakoidmembran ab. Die Lichtreaktion umfaßt den Aufbau eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran und die Reduktion von NADP^+ zu NADPH . Dieser Protonengradient und der damit verbundene Potentialgradient über die Membran wird vom Enzym ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt. NADPH und ATP dienen als Energielieferanten für die Dunkelreaktion zur Fixierung von CO_2 und dem Aufbau von Zuckern.

1.1.2 Geschichte der Photosyntheseforschung

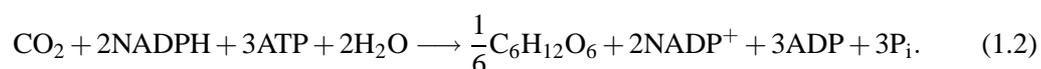
Die Photosyntheseforschung begann mit der Entdeckung Priestleys [9], daß Grünpflanzen in der Lage sind, Sauerstoff zu entwickeln. Ingenhousz konnte daraufhin zeigen, daß die grünen Teile

¹Eine weitergehende Einführung in die Photosynthese und die ihr zugrundeliegenden Prozesse ist in Lehrbüchern der Biochemie zu finden [4–6], weiterführende Literatur in [7, 8].

von Pflanzen und Sonnenlicht für die „Reinigung und Erfrischung“ der Luft benötigt werden und daß bei Dunkelheit die Pflanzen einen Teil der Luft wieder verbrauchen [10]. 1782 fand Senebier heraus, daß CO_2 der Teil der Luft ist, den Pflanzen aufnehmen und fixieren. Mayer stellte 1842 erstmals die These auf, daß Lichtenergie in Form von chemischer Energie gebunden wird [11]. Um 1900 wurde entdeckt, daß Chlorophylle die grünen Pigmente in Pflanzen sind. Mit Beginn des 20. Jahrhunderts setzte eine rasante Entwicklung der Photosyntheseforschung ein. Daß die Photosynthese in Licht- und Dunkelreaktionen eingeteilt werden kann, entdeckte Warburg 1919 [12, 13]. Wurmser formulierte 1925 die Bruttoreaktionsgleichung der oxygenen Photosynthese, die 1929 van Niel unter Einbeziehung der anoxygenen Prozesse verallgemeinerte (siehe Gl. 1.1). Den Nachweis, daß die Licht- und Dunkelreaktionen in den Chloroplasten ablaufen, erbrachte Hill 1937 [14]. Die Notwendigkeit von zwei Photosystemen für die oxygene Photosynthese entdeckten 1957 Emerson et al. [15]. Wenige Jahre später wurde von Hill und Bendall das sogenannte Z-Schema entwickelt [16] und von Witt et al. [17] und Kok und Hoch [18] experimentell bestätigt. Die Grundlage für detaillierte Untersuchungen war die Isolierung der einzelnen Photosysteme [19] sowie des bakteriellen Reaktionszentrums [20]. Die nachfolgende Fülle der in den folgenden Jahren erlangten Erkenntnisse würden den Rahmen dieses kurzen historischen Abrisses sprengen². Es soll abschließend ein Meilenstein in der Photosyntheseforschung genannt werden: Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des bakteriellen Reaktionszentrums wurde mittels Röntgenstrukturanalyse möglich, da es gelang, zum ersten Mal einen Membranproteinkomplex zu kristallisieren [1]. Die später folgende Kristallisation von PS I [2] und kürzlich auch PS II [3] vervollständigten diese Serie der Strukturaufklärung von Membranproteinkomplexen.

1.1.3 Aufbau und Funktion des Photosyntheseapparates

Wie schon in der Einführung erwähnt worden ist, findet die Photosynthese bei Pflanzen und Grünalgen in den Chloroplasten statt, in prokariotischen Cyanobakterien sind keine speziellen Zellorganellen ausgebildet. Hier sind die Thylakoide direkt ins Zellplasma eingelagert und stellen Ausstülpungen der cytoplasmatischen Membran dar. Die innere Chloroplastenmembran und die Thylakoidmembran umschließen das Stroma. Im Stroma sind unter anderem die löslichen Enzyme des Calvinzyklus enthalten. Der Calvinzyklus beschreibt die lichtunabhängigen Reaktionen, in denen CO_2 zu Kohlenhydraten reduziert wird (eine eingehendere Behandlung dieses Themas kann in Lehrbüchern der Biochemie gefunden werden [5, 6]):



Die für diese Reaktion benötigte Energie in Form von NADPH und ATP wird durch die Licht-

²Eine ausführliche Darstellung zur Geschichte der Photosynthese kann in [21] gefunden werden.

reaktionen bereitgestellt. Die an diesen Prozessen beteiligten Enzyme sind in und an der Thylakoidmembran zu finden. Eine schematische Schnittdarstellung der Thylakoidmembran mit den Proteinkomplexen der Lichtreaktion ist in Abb. 1.1 dargestellt.

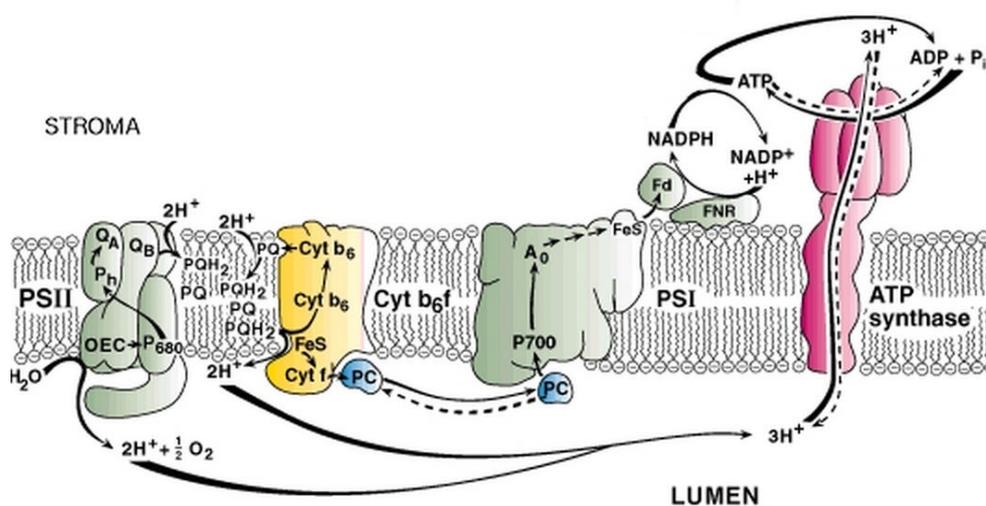


Abbildung 1.1: Schnitt durch die Thylakoidmembran, die für die Lichtreaktion benötigten Enzyme sind dargestellt: Nach Absorption von zwei Photonen wird im Photosystem II (PS II) durch transmembranen Elektronentransfer Q_B zum Hydrochinon reduziert. Dieses verläßt das Protein und wird durch den Cytochrom b_6/f -Komplex (Cyt b_6) reoxidiert. Das $P_{680}^{+\bullet}$ -Kation oxidiert die Wasseroxidase (OEC, oxygen evolving complex), an welcher Wasser zu Sauerstoff und Protonen gespalten wird. Die bei der Reoxidation des Q_B freiwerdenden Protonen werden ins Lumen abgegeben, die Elektronen auf Plastocyanin (PC) übertragen. Das PC wird zur Rereduktion des nach Lichtanregung oxidierten $P_{700}^{+\bullet}$ im Photosystem I (PS I) genutzt. Im PS I wird nach transmembranem Elektronentransfer das Elektron auf Ferredoxin (Fd) übertragen, welches $NADP^+$ zu $NADPH$ reduziert (katalysiert durch Ferredoxinreduktase, FNR). Der zwischen Lumen und Stroma aufgebaute Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP genutzt. Quelle: www.life.uiuc.edu/pru/labs/ort.html

Vier Proteinkomplexe sind an den Lichtreaktionen der Photosynthese beteiligt:

1. **Photosystem II** ist ein transmembraner Proteinkomplex, welcher nach Lichtanregung Elektronen über eine Kette von Kofaktoren (gebunden durch ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten D_1 und D_2 [22, 23]) durch die Membran transferiert. Der terminale Akzeptor Q_B , ein Plastochinon-9, verläßt nach zweifacher Reduktion und Protonierung als Hydrochinon die Bindungsstelle und diffundiert in den Plastochinonpool der Membran. Das bei der primären Ladungstrennung auf der Donatorseite entstehende $P_{680}^{+\bullet}$ -Kation oxidiert den luminal gebundenen Wasseroxidasekomplex. Dieser spaltet Wasser in einer schrittweise ablaufenden Reaktion in Sauerstoff, Protonen und Elektronen.

2. Der **Cytochrom b_6f** -Komplex (bestehend aus Cytochrom b_6 , Cyt. f , einem Rieske-[2Fe-2S]-Protein, und einer weiteren Untereinheit [24]) reoxidiert das in den Plastochinonpool gewanderte Hydrochinon unter Reduktion von Plastocyanin. Die in diesem sogenannten Q-Zyklus [25] freiwerdenden Protonen werden in das Thylakoidlumen abgegeben.
3. Im **Photosystem I** wird (ähnlich wie in PS II) nach Absorption eines Photons und Ladungstrennung ein Elektron über eine Elektronentransferkette von Kofaktoren durch die Membran transportiert. Auf der Akzeptorseite wird Ferredoxin bzw. Flavodoxin vom terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum reduziert, und danach von Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase genutzt, um NADP⁺ zu NADPH zu reduzieren. Das P₇₀₀-Kation auf der Donatorseite wird von Plastocyanin oder Cytochrom c_6 rereduziert. Eine ausführliche Beschreibung dieses Proteinkomplexes und seiner Kofaktoren folgt in Abschn. 1.1.4.
4. **ATP-CF₀F₁-Synthase** besteht aus einem transmembranen (CF₀) Protein, welches einen Protonentranslokationskanal enthält, und einem peripheren (CF₁) Protein [26]. ATP-Synthase nutzt den aufgebauten Protonengradienten zwischen Lumen und Stroma zur Bildung von ATP aus ADP und Pyrophosphat.

Die Anregungsenergie der eingestrahltten Photonen wird durch die (in Abb. 1.2 nicht eingezeichneten) Lichtsammelkomplexe (LHC, Übersicht in [27]) absorbiert und durch Exzitonentransfer auf die Photosysteme übertragen. Durch die beiden Photosysteme wird also die Sonnenenergie genutzt, um über eine Kette von Pigmenten bzw. Kofaktoren Elektronen über die Thylakoidmembran zu transportieren. Wasser dient hierbei als Elektronenquelle, NADP⁺ ist der finale Elektronenakzeptor. PS I und PS II sind durch den Plastochinonpool, den Cytochrom b_6f -Komplex und Plastocyanin/Cytochrom c_6 miteinander gekoppelt. Mit dem Elektronentransport ist der Aufbau eines Protonengradienten über die Membran gekoppelt. Das damit verbundene elektrochemische Potential treibt die Synthese von ATP, katalysiert von ATP-Synthase, an.

Die an den Lichtreaktionen beteiligten Pigmente und die die Systeme koppelnden Komponenten sind in Abb. 1.2 (dem Z-Schema [16]) unter Berücksichtigung ihres Redoxpotentials dargestellt.

Durch die in Serie arbeitenden Photosysteme wird eine Redoxpotentialdifferenz von $E_M = 1,15$ V geschaffen, die ausreicht, sowohl Wasser zu oxidieren ($E_M = +0,84$ V, pH 7) als auch NADP⁺ zu reduzieren ($E_M = -0,34$ V). Neben dem linearen Elektronentransfer von Wasser zu NADP⁺ ist auch ein zyklischer Elektronentransfermechanismus beobachtet worden, an dem nur PS I beteiligt ist [28–30]. Hierbei wird das nach Lichtanregung von PS I translozierte Elektron über den Cytochrom b_6f -Komplex zurück ins Lumen geführt und reduziert dort wieder über Plastocyanin P₇₀₀^{•+}. Im Ergebnis dieses zyklischen Elektronenflusses pumpt der Cyt. b_6f -Komplex Protonen ins Lumen und treibt damit zusätzlich die ATP-Synthase an. Diese zyklische Photophosphorylie-

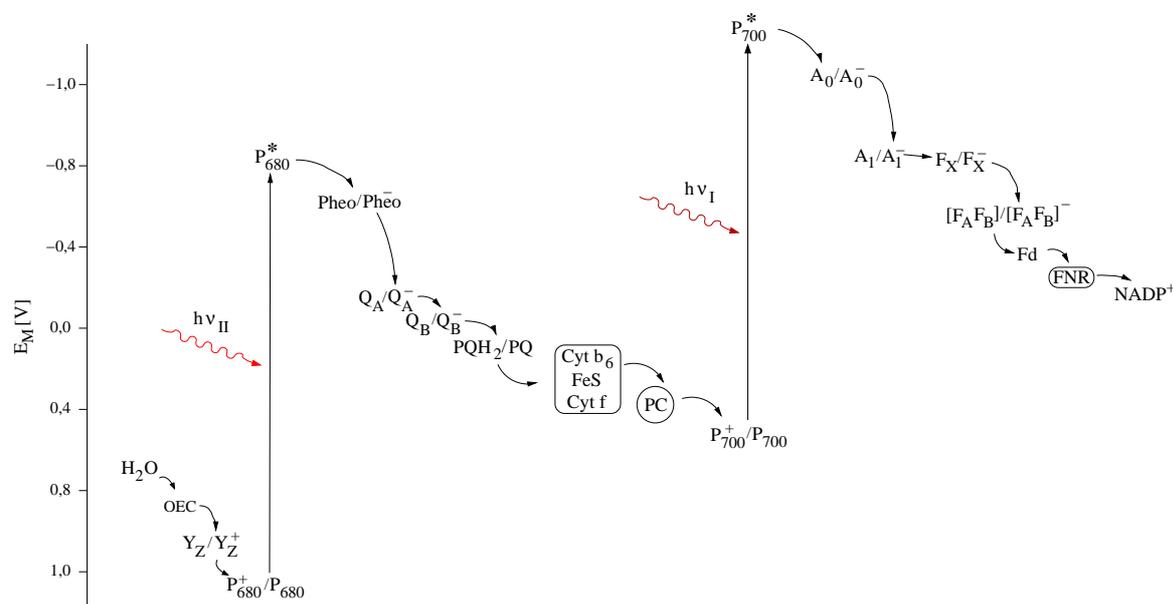


Abbildung 1.2: Am Elektronentransfer durch die Thylakoidmembran beteiligte Kofaktoren angeordnet nach ihrem Redoxpotential

Die Photosynthese kommt vermutlich dann zum Einsatz, wenn ein erhöhter Bedarf an ATP besteht oder hohes NADPH/NADP⁺ Verhältnis im Stroma besteht [31].

Wie in Abb. 1.2 zu erkennen ist, ähneln sich die beiden Photosysteme in der Art und Abfolge ihrer am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren. Dies und die Art der Einbettung der Pigmente in das Protein, nämlich durch zwei Untereinheiten, die einen dimeren Kern im Komplex bilden, ist ein wiederkehrendes Motiv in allen bisher bekannten photosynthetisch aktiven Organismen. Dazu zählen neben den hier näher beschriebenen Photosystemen I und II das Reaktionszentrum aus Purpurbakterien, grünen Schwefelbakterien und Heliobakterien. Der Kern, Reaktionszentrum genannt, besteht aus einem primären Donator, einem primären und einem sekundären Akzeptor, welche eine Elektronentransferkette durch die Membran bilden. Der primäre Akzeptor besteht aus einem Dimer parallel angeordneter (Bakterio-)Chlorophylle, der primäre Akzeptor ist ein Chlorophyllmonomer oder ein (Bakterio-)Pheophytin, bei dem sekundären Akzeptor schließlich handelt es sich um ein Chinon. Die Pigmente sind doppelt angelegt und sind derart in das Protein eingebaut, daß das aus den Untereinheiten gebildete Dimer eine zweizählige Symmetrieachse aufweist. Die Homologie zwischen den Reaktionszentren reicht sogar bis in die Tertiärstruktur der beiden dimerbildenden Untereinheiten [32], wo fünf transmembrane Helices die Kofaktoren der Elektronentransferkette umgeben (siehe dazu die Kristallstrukturen vom bakteriellen Reaktionszentrum [33], PS I [34] und PS II [3]).

Nach der Art ihrer terminalen Akzeptoren lassen sich jedoch photosynthetische Reaktionszentren

in zwei Klassen einteilen:

- Typ I oder FeS-Typ-Reaktionszentren:
Reaktionszentren mit drei Fe_4S_4 -Zentren vom Cubantyp als terminale Akzeptoren. Zu dieser Art zählen das Photosystem I, das photosynthetische Reaktionszentrum von grünen Schwefelbakterien und Heliobakterien (Übersichten zu den letztgenannten in [35,36])
- Typ II oder Chinontyp-Reaktionszentren:
Reaktionszentren mit einem Chinon als terminalem Akzeptor;
hierzu gehören das bakterielle Reaktionszentrum aus Purpurbakterien und Photosystem II aus höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien

1.1.4 Photosystem I

Struktur

Photosystem I ist in Prokaryonten und Eukaryonten nahezu identisch aufgebaut. Es ist ein Multiproteinkomplex mit 12 (in Eukaryonten 13) Untereinheiten. Detaillierte Informationen zur räumlichen Struktur liegen durch Röntgenstrukturanalyse an Kristallen von PS I aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* (*S. elongatus*) vor. Die aktuelle Auflösung beträgt 2.5 \AA [34]. In den Kristallen liegt das PS I in trimerer, kleeblattähnlicher Form vor. Vermutlich ist dies auch die Form, in der es in Cyanobakterien in der Thylakoidmembran vorkommt [38,39]. In Eukaryonten hingegen sind bisher nur Monomere in der Membran gefunden worden [40,41].

PS I aus *S. elongatus* enthält neun Untereinheiten mit transmembranen α -Helices, drei stromale Untereinheiten und 127 Kofaktoren (96 Chlorophylle, 2 Phyllochinone, 3 Fe_4S_4 -Zentren, 22 Karotenoide und vier Lipide). Der Kern des Proteinkomplexes besteht aus dem obengenannten Heterodimer der beiden Untereinheiten PsaA und PsaB (Nomenklatur nach den Genen, die die Untereinheiten kodieren). PsaA und PsaB enthalten je 11 transmembrane Helices, von denen je fünf die Kernstruktur mit der Elektronentransferkette bilden. Je sechs umgeben diesen Kern und einen enthalten einen großen Teil der Antennenchlorophylle. Die lumenale Seite wird hauptsächlich von Loop-Regionen gebildet. Diese schirmt die Kofaktoren des Elektronentransfersystems von der wässrigen Phase ab. Eine Eindellung nahe der pseudo- C_2 -Achse wurde als Andockposition für Cytochrome c_6 oder Plastocyanin vorgeschlagen [42] und durch Mutagenesestudien bestätigt [43].

Die Untereinheit PsaF ist an der lumenalen Seite gebunden und spielt in höheren Pflanzen eine Rolle bei der Bindung von Plastocyanin [44,45], aber nicht in Cyanobakterien [46].

Auf der stromalen Seite sind die Untereinheiten PsaC, PsaD und PsaE nahe beieinander gebunden. Die Untereinheit PsaC enthält die terminalen Akzeptoren, die beiden Fe_4S_4 -Zentren F_A und

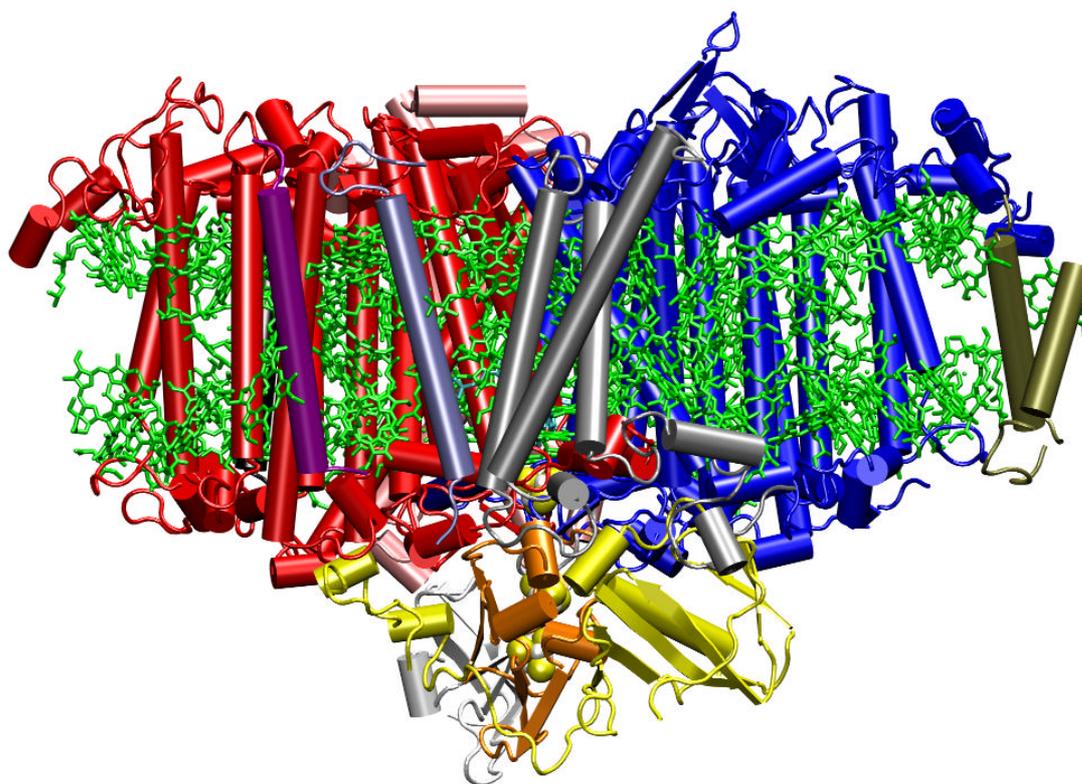


Abbildung 1.3: Darstellung des PS I-Proteinkomplexes und aller Antennenpigmente mit Blick „durch die Membran“, oben ist die lumenale Seite, unten die stromale Seite; die Antennenchlorophylle sind in grün abgebildet, Untereinheiten) blau: PsaA, rot: PsaB, orange: PsaC, gelb: PsaD, weiß: PsaE, rosa: PsaF, grün: PsaI, hellgrün: PsaJ, braun: PsaK, grau: PsaL, purpur: PsaM, schwarz: PsaX, erstellt mit VMD [37]

F_B . Beide Akzeptoren werden durch je vier Cysteine ligandiert, ihre Zuordnung ist durch Mutagenesexperimente bekannt ([47, 48], Übersicht zu Eisen-Schwefel-Proteinen in [49]) und in der Kristallstruktur wohldefiniert. Ungebundenes PsaC ist ein wasserlösliches Protein. Seine Struktur in Lösung wurde mittels NMR im oxidierten [50] und reduzierten Zustand [50] aufgeklärt und zeigt sich weitaus flexibler als im an PS I gebundenen Zustand. PsaC spielt eine wichtige Rolle für die Bindung von PsaD und Pse [51, 52], in *C. reinhardtii* ist es für den Aufbau von intaktem PS I notwendig [53].

Die PsaD-Untereinheit ist für die Ankopplung von Ferredoxin an den PS I-Komplex bedeutend [54] und für den Elektronentransfer von $F_{A/B}$ zu Ferredoxin essentiell [55, 56]. PsaE ist ebenfalls an der Anbindung von Ferredoxin beteiligt [57, 58]. Die Untereinheit spielt eine Rolle beim zyklischen Elektronentransport [59]. Für das Protein in wässriger Lösung existiert eine der gebundenen Form sehr ähnliche Struktur, welche mittels NMR-Spektroskopie bestimmt wur-

de [60]. Die übrigen Untereinheiten mit transmembranen Helices (PsaI-PsaM, PsaX) tragen zur Bindung und Stabilisierung des Antennensystems bei. Diese Untereinheiten können in zwei Domänen eingeteilt werden:

PsaI, PsaL und PsaM befinden sich in der Region, wo die Monomere im Trimer zueinander gewandt sind. PsaF, PsaJ, PsaK und PsaX liegen an der Außenseite des trimeren Komplexes. PsaL trägt zu den meisten Kontakten zwischen den Monomeren bei und ist wahrscheinlich für die Stabilisierung der Trimere von cyanobakteriellem PS I verantwortlich [61]. Abb. 1.3 zeigt die Struktur eines monomeren PS I-Komplexes von *S. elongatus*.

Funktion

Die allgemeine Funktion von PS I als lichtgetriebene Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase ist bereits in Abschn. 1.1.3 beschrieben. Hier soll detaillierter auf die Teilschritte des Elektronentransfers eingegangen werden (Übersichten zu funktionellen und strukturellen Aspekten von Photosystem I in: [62–67]).

Nach Absorption eines Photons durch die Antennenpigmente wird die Anregungsenergie durch Excitonentransfer auf den primären Donator P_{700} übertragen. Daß es sich hierbei um ein Dimer von Chl a Molekülen handeln muß, zeigten EPR-spektroskopische Untersuchungen an PS I-Einkristallen [68] und die Temperaturabhängigkeit des EPR-Spektrums des Triplettzustandes [69]. Die Elektronendichtekarten bei 4,5 Å [70] und 4,0 Å [2] bestätigten diese Zuordnung, zwei Chlorine mit parallel zueinander Molekülebenen konnten identifiziert werden. Die hochaufgelöste Kristallstruktur von 2,5 Å [34] zeigte zusätzlich, daß P_{700} als ein Heterodimer aus einem Chl a und Chl a' (13^2 Epimer von Chl a) konstituiert wird.

Nach Ladungstrennung wird das Elektron auf den primären Akzeptor transferiert. Der primäre Akzeptor ist optischen [71] und EPR-Experimenten [72, 73] am photoakkumulierten $A_0^{\bullet-}$ zufolge ein monomeres Chl a Molekül. Die Kristallstruktur bei 2,5 Å Auflösung lieferte das überraschende Resultat, daß A_0 durch das Schwefel-Atom eines Methionins ligandiert wird, eine bisher einzigartige Chlorophyll-Koordinierung in Proteinen.

Der sekundäre Akzeptor A_1 ist ein Phyllochinon (Vitamin K_1). In wieweit beide durch die pseudo- C_2 -Achse verknüpfte Chinone am Elektronentransfer beteiligt sind, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Optische Experimente favorisieren einen Elektronentransfer [74, 75] über beide Zweige, EPR-Untersuchungen liefern widersprüchliche Ergebnisse [76, 77].

Von $A_1^{\bullet-}$ wird das Elektron auf F_X übertragen, einem Fe_4S_4 -Zentrum. F_X verknüpft die beiden Untereinheiten PsaA und PsaB, da von den vier ligandierenden Cysteinen jeweils zwei aus PsaA und PsaB stammen. F_X weist für ein FeS-Zentrum ungewöhnliche ESR-Eigenschaften und ein bemerkenswert negatives Redoxpotential auf [66, 78]. Die beiden terminalen durch PsaC gebundenen Akzeptoren sind auch Fe_4S_4 -Zentren.

Kapitel 2

Theorie und Methoden

2.1 Cyclovoltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie

Die Cyclovoltammetrie (CV) ist die elektrochemische Meßmethode zur routinemäßigen Charakterisierung von redoxaktiven Verbindungen (eine Einführung in die Thematik ist in [79, 80] zu finden). Mit ihr lassen sich einfache thermodynamische Parameter wie das Redoxpotential oder auch kinetische Parameter wie Geschwindigkeitskonstanten für Elektronentransferprozesse bestimmen. Bei der Cyclovoltammetrie wird in Abhängigkeit von der zwischen Arbeits- und Gegenelektrode angelegten Spannung der fließende Strom detektiert. Hierzu wird zwischen beiden Elektroden, ausgehend von einem möglichst stromlosen Potential, eine Dreiecksspannung mit linearem Spannungsvorschub angelegt. Die Ober- und Untergrenze der Dreiecksspannung werden durch die Zersetzungsspannung des Lösemittels begrenzt.

Beim Erreichen eines Redoxpotentials findet ein Ladungstransfer zwischen Elektrode und redoxaktiver Spezies statt. Liegt eine oxidierbare Substanz vor, tritt ein anodischer Strom bei Erreichen des Redoxpotentials an der Arbeitselektrode auf, das Vorliegen einer reduzierbaren Spezies macht sich durch einen kathodischen Strom bei Erlangen und Unterschreiten des Redoxpotentials bemerkbar. Der an der Arbeitselektrode gemessene Strom ist von der Konzentration der redoxaktiven Moleküle an der Elektrodenoberfläche abhängig.

Bei Überschreiten des Halbstufenpotentials $E_{1/2}$ des Edukts durch das an der Elektrode angelegte Potential E sinkt das Konzentrationsverhältnis von Edukt zu Produkt gemäß der Nernstschen Gleichung ab. Unter der Annahme gleicher Aktivitätskoeffizienten von Edukt und Produkt gilt die Nernst-Gleichung bei kathodischer Reduktion in folgender Form:

$$\left(\frac{c_{Red}}{c_{Ox}}\right)_{x=0} = e^{\frac{nF}{RT}(E-E_{1/2})}, \quad (2.1)$$

mit c_{Red}/c_{Ox} der Konzentration reduzierter und oxidierter Spezies, n Zahl der bei der Reaktion übertragenen Ladungen, F der Faradaykonstante, E dem angelegten Potential und $E_{1/2}$ dem Halbstufenpotential. In ruhender Lösung bildet sich an der Elektrodenoberfläche nach dem 2. Fickschen Gesetz ein Konzentrationsgradient aus. Gemäß dem 1. Fickschen Gesetz ist der Stofftransport zur Elektrode dem Konzentrationsgradienten $\frac{\delta c}{\delta x}$ an der Elektrodenoberfläche proportional, sodaß auch die Stromdichte i diesem Gradienten proportional ist:

$$-i = nFD\left(\frac{\delta c}{\delta x}\right)_{x=0} \quad (2.2)$$

Bei weiterem Spannungsvorschub wird die Oberflächenkonzentration des Edukts Null und der Konzentrationsgradient an der Elektrodenoberfläche erreicht seinen Maximalwert. Bei weiterem Spannungsvorschub dehnt sich die Diffusionsschicht nur noch aus, der Konzentrationsgradient flacht ab und wird kleiner. Man erhält also eine Strom-Spannungskurve, die ein Ansteigen bis zu einem Maximalwert und anschließendes Abfallen zeigt. Im weiteren Verlauf erreicht die Spannung das Umschaltpotential E_U , bei dem sich der Spannungsvorschub umkehrt. Bei einer reversiblen Redoxreaktion erhält man beim Zurückfahren des Potentials einen Strompeak mit umgekehrten Vorzeichen und gleicher Intensität, resultierend aus der Rückreaktion (Abb. 2.1).

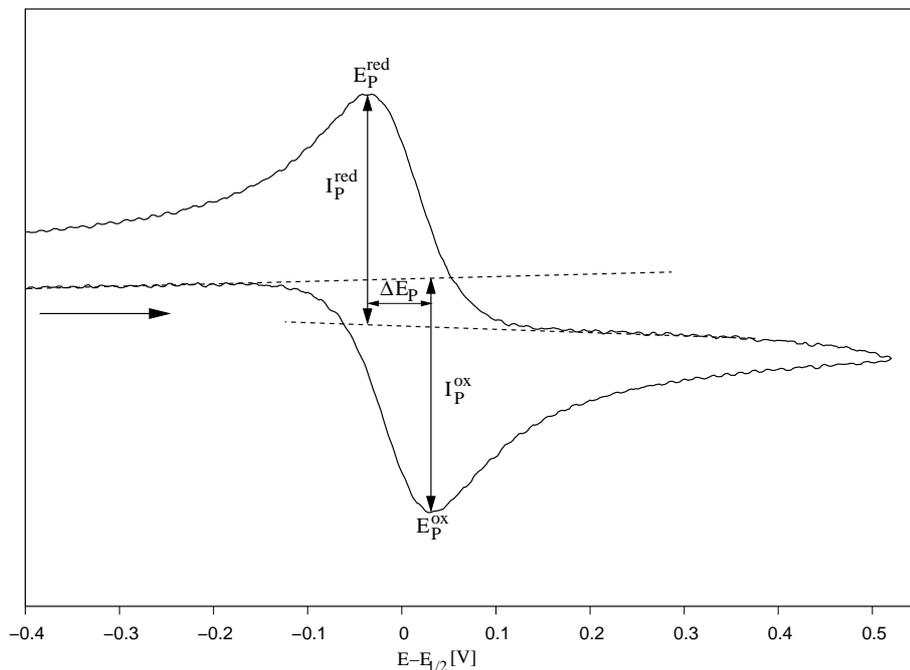


Abbildung 2.1: Cyclicvoltammogramm für anodische Oxidation mit nachfolgender kathodischer Reduktion, I_p^{ox} ; anodischer Spitzenstrom, I_p^{red} ; kathodischer Spitzenstrom, E_p^{ox} ; anodisches Peakpotential, E_p^{red} , kathodisches Peakpotential, ΔE_p ; Peak-Separation, im Falle einer reversiblen Redoxreaktion ist $\Delta E_p = \frac{58}{n}$ mV

Der theoretische Verlauf der Strom-Spannungskurve ist von Randles [81] und Sevcic [82] erstmals beschrieben worden. Allgemein werden drei Fälle in der Cyclovoltammetrie unterschieden:

1. Reversible Redoxreaktionen:

In diesem Fall sind Peakpotential E_p^{Red} der kathodischen Reduktion und E_p^{Ox} der anodischen Oxidation in einem Abstand von 58 mV/n separiert und vom Spannungsvorschub v unabhängig. Das Halbstufenpotential ergibt sich demnach aus dem Mittelwert der Peakpotentiale. Das Peakstromverhältnis I_p^{Ox}/I_p^{red} ist 1.

2. Quasi- bis irreversible Redoxreaktionen:

Hier ist $E_p^{Ox} - E_p^{Red}$ größer und vom Spannungsvorschub abhängig. Das Peakstromverhältnis ist kleiner 1, im irreversiblen Fall gleich 0, jedoch unabhängig von v .

3. Elektrochemische Reaktion mit vor- oder nachgelagerter Reaktion:

$E_p^{Red} - E_p^{Ox}$ und I_p^{Ox}/I_p^{red} sind abhängig vom Spannungsvorschub.

Ein weiteres auffälliges Kriterium für eine irreversible Reaktion ist das Fehlen des Peaks für die Rückreaktion. Für sich allein genommen ist diese Beobachtung nicht signifikant für Irreversibilität, da das Fehlen des Peaks auch durch reversible Folgereaktionen hervorgerufen werden kann. Folgereaktionen sind insbesondere in dem Potentialbereich zu erwarten, in dem sich das Lösemittel zu zersetzen beginnt und reaktive Spezies bildet. Daher muß das Umschaltpotential E_U so gewählt werden, daß es außerhalb des Zersetzungsereichs des Lösemittels liegt. Im quasireversiblen Fall kann man durch Absenken der Rate des Spannungsvorschubs eine dem reversiblen Fall entsprechende Kurvenform erhalten. In Abb. 2.1 ist ein Cyclovoltammogramm für eine reversible Redoxreaktion zu sehen.

Die Square-Wave-Voltammetrie (SWV) gehört zu den sogenannten Pulstechniken. Sie ermöglicht wie die Cyclovoltammetrie die Ermittlung von Redoxpotentialen und die Charakterisierung von Elektronentransferreaktionen [83, 84]. Die SWV wird häufig als Ergänzung zur CV eingesetzt, wenn mehrere Redoxreaktionen sich nicht mehr in der CV auflösen lassen oder die Verbindung nur in geringer Konzentration vorliegt und im CV durch die Überlagerung mit den Hintergrundströmen (kapazitive Ströme) keine Redoxpeaks mehr erkennbar sind. Hier wird dem linearen Spannungsvorschub eine Rechteckspannung aufgeprägt und die Stromstärke wird jeweils am Ende eines Rechteckpulses gemessen, (Abb. 2.2). Durch die Messung der Stromstärkepaare I_{ox} und I_{red} am Ende des jeweiligen Pulses wird erreicht, daß lediglich der Faradaysche Strom gemessen wird. Der Anteil des kapazitiven Stroms hingegen ist vernachlässigbar klein. Daraus resultiert die im Vergleich zur Cyclovoltammetrie höhere Empfindlichkeit der Square-Wave-Voltammetrie. Durch

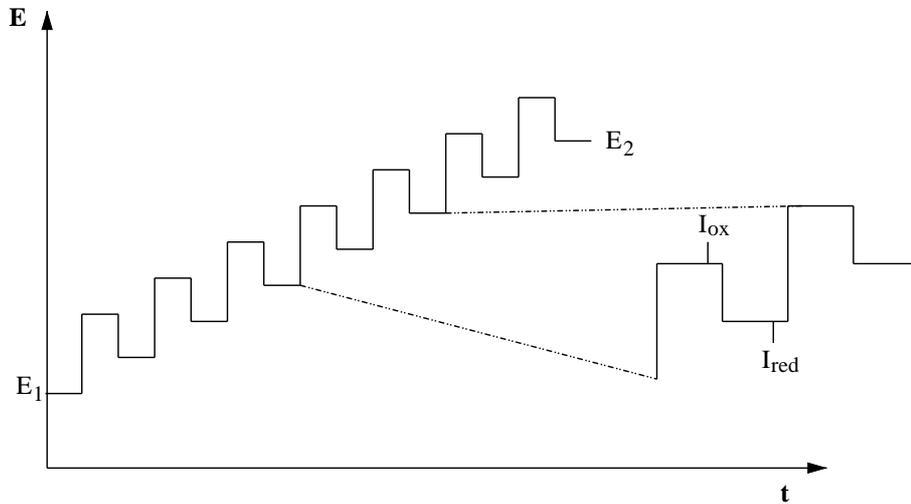


Abbildung 2.2: Potential-Zeit-Verlauf bei der Square-Wave-Voltammetrie von Startpotential E_1 nach Endpotential E_2 , I_{ox} und I_{red} ; gemessene Strompaare pro Pulszyklus

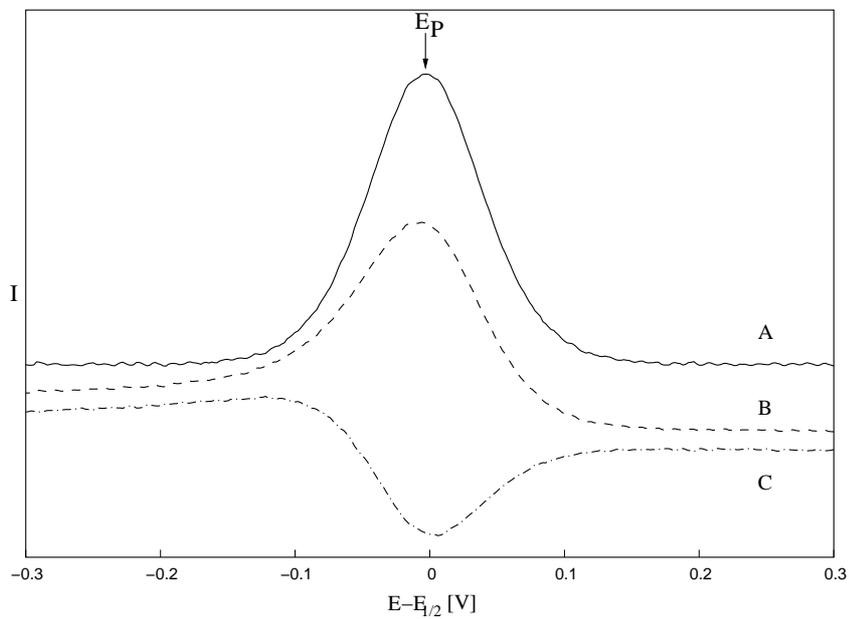


Abbildung 2.3: Beispiel eines Square-Wave-Voltammogramms, A; SWV aus der Differenz von B und C, $E_p = E_{1/2}$ bei reversiblen Reaktion B; anodische Oxidation I_{ox} vs. t , C; kathodische Reduktion I_{red} vs. t

Differenz von $I_{ox} - I_{red}$ und Auftragung gegen das Potential erhält man ein Peakvoltammogramm, dessen Peakpotentiale den polarographischen Halbstufenpotentialen entsprechen (Abb. 2.3).

2.2 Grundlagen der EPR- und ENDOR-Spektroskopie

In diesem Kapitel soll eine kurze Einführung in die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der EPR- und ENDOR-Spektroskopie gegeben werden. Wie der Name schon impliziert, werden mit der Electron-Paramagnetic-Resonance Systeme untersucht, in denen mindestens ein ungepaarter Elektronenspin vorliegt, also Radikale (frei oder als Intermediat auftretend), paramagnetische Metalle und Metallkomplexe und Triplettzustände. Daraus ergibt sich insbesondere für große biologische Moleküle der Vorteil der Selektivität, da das ungepaarte Elektron als Sonde im Molekül nur die Wechselwirkungen mit seiner Umgebung wahrnimmt.

Dieses Kapitel hat nicht den Anspruch, eine Einführung in die EPR-Spektroskopie zu geben, es sollen nur die für das Verständnis der hier durchgeführten Messungen notwendigen Grundlagen erläutert werden. Die theoretischen Grundlagen der EPR-Spektroskopie können in zahlreichen Lehrbüchern nachgelesen werden [85–90].

2.2.1 Spin-Hamiltonoperator

Mit dem Hamiltonoperator werden die Beiträge zur Energie eines Systems beschrieben. Das Konzept des Spin-Hamiltonoperators ist nun, daß der Gesamthamiltonoperator in einen Teil separiert werden kann, der nur auf den Spinanteil der elektronischen Gesamtwellenfunktion des Systems wirkt, und einen Teil, der nur Funktion der Raumkoordinaten ist. Der nur auf die Spinfunktion wirkende Teil des Gesamthamiltonoperators faßt die zum magnetischen Resonanzspektrum beitragenden Wechselwirkungen zusammen und wird Spin-Hamiltonoperator genannt.

Für zwei ungepaarte Elektronen im äußeren Magnetfeld und der umgebenden Kerne kann der Spin-Hamiltonoperator so formuliert werden:

$$\mathcal{H} = \hat{H}_{eZ} + \hat{H}_{NZ} + \hat{H}_{HFC} + \hat{H}_{ee} \quad (2.3)$$

, wobei die einzelnen Terme bedeuten:

\hat{H}_{eZ} , Zeeman-Wechselwirkung der Elektronen mit dem äußeren Magnetfeld

\hat{H}_{NZ} , Zeeman-Wechselwirkung der Kerne mit dem äußeren Magnetfeld

\hat{H}_{HFC} , Hyperfeinwechselwirkung zwischen jedem Elektron und den Kernen

\hat{H}_{ee} , Spin-Spin-Wechselwirkung zwischen den beiden Elektronen

Elektron-Zeeman-Wechselwirkung

Mit jedem ungepaarten Elektronenspin ist ein magnetisches Moment verbunden:

$$\hat{\mu}_e = -g_e \beta_e \hat{S}. \quad (2.4)$$

Analog zur klassischen Wechselwirkung eines magnetischen Moments in einem äußeren Magnetfeld wird der Hamiltonoperator formuliert:

$$\hat{H}_{eZ} = g_e \beta_e \hat{S} B_0 \quad (2.5)$$

mit dem äußeres Magnetfeld B_0 , dem Elektronspindrehimpulsoperator \hat{S} , dem g-Wert g_e , der die Proportionalität zwischen \hat{S} und $\hat{\mu}_e$ angibt und dem Bohrsches Magneton β_e .

Für ein freies Elektron mit der Spinquantenzahl $S = 1/2$ gibt es im Magnetfeld nur zwei mögliche Einstellungen, die durch die Magnetquantenzahl $m_s = (-S, \dots, +S)$ beschrieben werden. Die zugehörigen Eigenfunktionen $|S, m_s\rangle$ des Elektronenspins sind $|\alpha_e\rangle = |1/2, +1/2\rangle \equiv |+\rangle$ und $|\beta_e\rangle = |1/2, -1/2\rangle \equiv |-\rangle$. Durch Anwendung des Hamiltonoperators auf die Spinfunktionen findet man die Energieeigenwerte $E = \pm 1/2 g_e \beta_e B_0$. Im EPR-Experiment werden durch resonantes Einstrahlen elektromagnetischer Strahlung Übergänge zwischen den beiden Niveaus induziert:

$$\Delta E = h\nu = g_e \beta_e B_0 \quad (2.6)$$

Im EPR-Experiment zeigt sich, daß der g-Wert von dem des freien Elektrons abweicht. Außerdem findet man, daß die Elektronzeemanaufspaltung von der Orientierung des Moleküls im Magnetfeld abhängt. Die Abweichung von g_e hängt damit zusammen, daß auch das Bahnmoment \mathbf{L} ein magnetisches Moment erzeugt ($\hat{\mu}_L = \beta_e \hat{L}$). Sobald dieses Bahnmoment nicht mehr Null ist, führt die Kopplung von \hat{S} und \hat{L} ($\lambda \hat{L} \hat{S}$) zu zusätzlichen Beiträgen zum g-Wert. λ ist die Spin-Bahn-Kopplungs-Konstante, welche in vierter Potenz von der Kernladungszahl abhängig ist. Die Abweichungen von g_e werden im g-Wert zusammengefaßt, die Richtungsabhängigkeit wird durch Einführung einer Wechselwirkungsmatrix, dem sogenannten **g**-Tensor berücksichtigt. Der Elektron-Zeeman-Wechselwirkungsterm lautet dann:

$$\hat{H}_{eZ} = \beta_e B_0 \mathbf{g} \hat{S} \quad (2.7)$$

Für organische Radikale ist die Abweichung nur gering (im Promillebereich), in metallzentrierten Komplexen kann sie jedoch signifikant werden.

Kern-Zeeman-Wechselwirkung

Analog wie im vorigen Abschnitt lässt sich für die Wechselwirkung eines Kerns (mit Kernspin $I \neq 0$) mit dem äußeren Magnetfeld formulieren:

$$\hat{H}_{NZ} = \beta_N g_N B_0 \hat{I} \quad (2.8)$$

Hierbei ist β_N das Kernmagneton, g_N der Kern-g-Faktor und \hat{I} der Kernspindrehimpulsoperator. Die Anisotropie des Kern-g-Faktors kann in der EPR vernachlässigt werden, daher wird g_N nur skalar berücksichtigt.

Hyperfeinwechselwirkung

Die Hyperfeinwechselwirkung beschreibt die Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Elektronspins mit dem eines Kernspins mit $I \neq 0$. Das magnetische Moment des Kernspins $\hat{\mu}_N = g_N \beta_N \hat{I}$ ist im Vergleich zum magnetischen Moment des Elektrons wesentlich kleiner ($\mu_N/\mu_e = 1/658$ für ein Proton) und hat ein positives Vorzeichen. Für die Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektron- und Kernspin gilt:

$$\hat{H}_{HFC} = \hat{S} \mathbf{A} \hat{I} \quad (2.9)$$

Die Größe dieser Wechselwirkung wird durch den Hyperfeintensor \mathbf{A} angegeben. Die Hyperfeinwechselwirkung wird in zwei Wechselwirkungsmechanismen unterschieden:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{HFC} &= a_{iso} \hat{S} \hat{I} + \hat{S} \mathbf{A}_{dip} \hat{I} \\ &= -\frac{8\pi}{3} \hat{\mu}_e \hat{\mu}_N |\Psi(\vec{r}=0)|^2 + \left[\frac{\hat{\mu}_e \hat{\mu}_N}{r^3} - 3 \frac{(\hat{\mu}_e \hat{r})(\hat{\mu}_N \hat{r})}{r^5} \right] \end{aligned} \quad (2.10)$$

Der erste Term in Gl. 2.10 wertet die Elektronenspindichte am Kernort aus. Dies setzt für den elektronischen Grundzustand Orbitale mit s-Charakter voraus.

Diese sogenannte **Fermikontaktwechselwirkung** ist isotrop. Sie liefert die Größe der Elektronenspindichte am Kernort und damit Informationen über die Spindichteverteilung im Molekül.

Der zweite Term in Gl. 2.10 beschreibt die **Dipol-Dipol-Wechselwirkung** zwischen elektronischem Dipol μ_e und Kerndipol μ_N in einem Abstand r . \hat{r} ist der Ortsoperator des Verbindungsvektors zwischen den beiden Dipolen. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist anisotrop, ihre Größe hängt von der Orientierung des Dipols im Magnetfeld ab. Aus ihr lassen sich Informationen über Abstand und Orientierung von Kernspins zum Elektronenspin gewinnen. Bei ausreichendem Abstand des Kerns vom Elektron, wenn beide Spins als punktförmig angenommen werden können, ergibt sich für den dipolaren Hyperfeintensor folgender einfacher Ausdruck:

$$\mathbf{A}_{dip} = -\mu_e \mu_N \rho \frac{3 \cos^2(\theta) - 1}{r^3}. \quad (2.11)$$

Hierbei ist ρ die Spindichte am paramagnetischen Zentrum (für den Fall, daß der Elektronenspin nicht insgesamt als punktförmig genähert werden kann) und θ der Winkel zwischen Elektron-Kern-Verbindungsvektor und dem äußeren Magnetfeld. Nach diesem Punkt-Dipol-Modell lassen sich einfach Abstände zwischen Protonen und paramagnetischen Spezies berechnen, wie zum Beispiel bei Wasserstoffbrücken. Das Punkt-Dipol-Modell liefert einen axialsymmetrischen Tensor mit den Hauptwerten $-A_{dip}, -A_{dip}, 2A_{dip}$.

Da die Dipol-Dipol-Wechselwirkung einen symmetrischen, spurlosen Tensor liefert, kann aus der Spur des gesamten Tensors die isotrope Hyperfeinkopplung erhalten werden:

$$\frac{1}{3}Tr\mathbf{A} = a_{iso} \quad (2.12)$$

In aromatischen Radikalen ist die ungepaarte Spindichte über das π -Elektronensystem delokalisiert. Für die isotrope Hyperfeinkopplung der α - und β -Ringprotonen existieren empirische Beziehungen, die den Zusammenhang zur π -Spindichte beschreiben:

Die Proportionalität zwischen isotroper Hyperfeinkopplung eines α -Protons und der π -Spindichte ρ_C^π des benachbarten Kohlenstoffs ist in der McConnell-Gleichung:

$$a_{iso}^H = Q\rho_C^\pi \quad (2.13)$$

zusammengefaßt. Q ist die Proportionalitätskonstante und ist für Semichinonanionen ≈ -27 G.

Die isotrope HFC der β -Protonen hängt vom Diederwinkel zwischen β -CH und $2p_z$ -Orbital des Ringkohlenstoffs ab (Heller-McConnel-Gleichung):

$$a(\beta H)_{iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho_C^\pi \quad (2.14)$$

mit B_0 und B_2 den Beiträgen zu a_{iso} aus Spinpolarisation und Hyperkonjugation. B_0 ist gewöhnlich sehr klein, $B_2 = 50$ G für Chinonanionradikale.

Elektronische Spin-Spin-Wechselwirkung

Die magnetische Wechselwirkung zwischen zwei Elektronen kann analog zur Hyperfeinwechselwirkung eingeführt werden. Sie setzt sich aus einem isotropen und einem orientierungsabhängigen dipolaren Teil zusammen:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{ee} &= \hat{H}_J + \hat{H}_D \\ &= -2J \cdot \hat{S}_1 \hat{S}_2 - \hat{S}_1 \mathbf{D} \hat{S}_2. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Hierbei beschreibt \hat{H}_J die Austauschwechselwirkung und \hat{H}_D die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei magnetischen Momenten, wie sie schon für die dipolare Hyperfeinwechselwirkung formuliert wurde (2. Teil in Gl. 2.10). Alternativ kann die Dipol-Dipol-Wechselwirkung in

Analogie zur Nullfeldaufspaltung durch zwei Parameter D und E beschrieben werden:

$$\hat{H}_D = D(\hat{S}_{1z}\hat{S}_{2z} - \frac{1}{3}\hat{S}_1\hat{S}_2) + E(\hat{S}_{1y}\hat{S}_{2y} - \hat{S}_{1x}\hat{S}_{2x}). \quad (2.16)$$

Der symmetrische, spurlose Tensor der dipolaren Kopplung \mathbf{D} lautet dann:

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} \frac{1}{3}D - E & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{3}D + E & 0 \\ 0 & 0 & -\frac{2}{3}D \end{pmatrix} \quad (2.17)$$

In der Punkt-Dipol-Näherung wird \mathbf{D} axialsymmetrisch und somit $E=0$.

2.3 ENDOR-Spektroskopie

Das Prinzip der ENDOR-Spektroskopie soll kurz an dem einfachsten denkbaren System mit einem Elektronenspin $S = 1/2$ und einem Kernspin $I = 1/2$ erklärt werden. Die relevanten Terme im Spin-Hamilton-Operator sind die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung \hat{H}_{eZ} , Kern-Zeeman-Wechselwirkung \hat{H}_{NZ} und Hyperfeinwechselwirkung \hat{H}_{HFC} . Werden alle Wechselwirkungen als isotrop betrachtet und soll die Hochfeldnäherung (\hat{H}_{eZ} dominiert alle Wechselwirkungen und damit sind alle Spins entlang der Magnetfeldrichtung quantisiert) gelten, so lautet der Spin-Hamilton-Operator:

$$\mathcal{H}_{ENDOR} = g_e\beta_e\mathbf{B}_0\hat{S}_z - g_N\beta_N\hat{I}_z + a_{iso}\hat{S}_z\hat{I}_z \quad (2.18)$$

mit den Eigenwerten:

$$E = g_e\beta_e\mathbf{B}_0m_s - g_N\beta_Nm_I + a_{iso}m_sm_I \quad (2.19)$$

Ein Energieniveauschema mit $a_{iso} > 0$ ist in Abb. 2.4 links gezeigt. Die ENDOR-Spektroskopie ist eine Doppelresonanzmethode, bei der Kernspinübergänge über die EPR-Übergänge detektiert werden. Die ursprünglich von Feher *et al.* [91] eingeführte Methode ist ein *continuous wave*, *cw*-Verfahren, bei der ein EPR-Übergang gesättigt wird (z. B. EPR I in Abb. 2.4 rechts). Beim gleichzeitigen Durchfahren der Radiofrequenz wird bei Erreichen der Frequenz NMR I das Niveau $|\alpha_e\beta_N\rangle$ entvölkert und damit ist der Übergang EPR I (partiell) entsättigt. Das wird als Änderung der EPR-Amplitude detektiert.

Die Puls-ENDOR-Verfahren, von Mims [92] und Davies [93] eingeführt, bieten den Vorteil, weitgehend unabhängig von den Relaxationsraten zu sein. Das Davies-ENDOR-Verfahren, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde, beruht auf dem Transfer von Spinpolarisation. Die bei diesem Verfahren eingesetzte Pulssequenz ist in Abb. 2.5 dargestellt.

Beim Davies-ENDOR wird durch einen selektiven Mikrowellenpuls die Besetzung eines EPR-Übergangs invertiert. Darauf folgt ein Radiofrequenz- π -Puls, der bei Resonanz einen der beiden

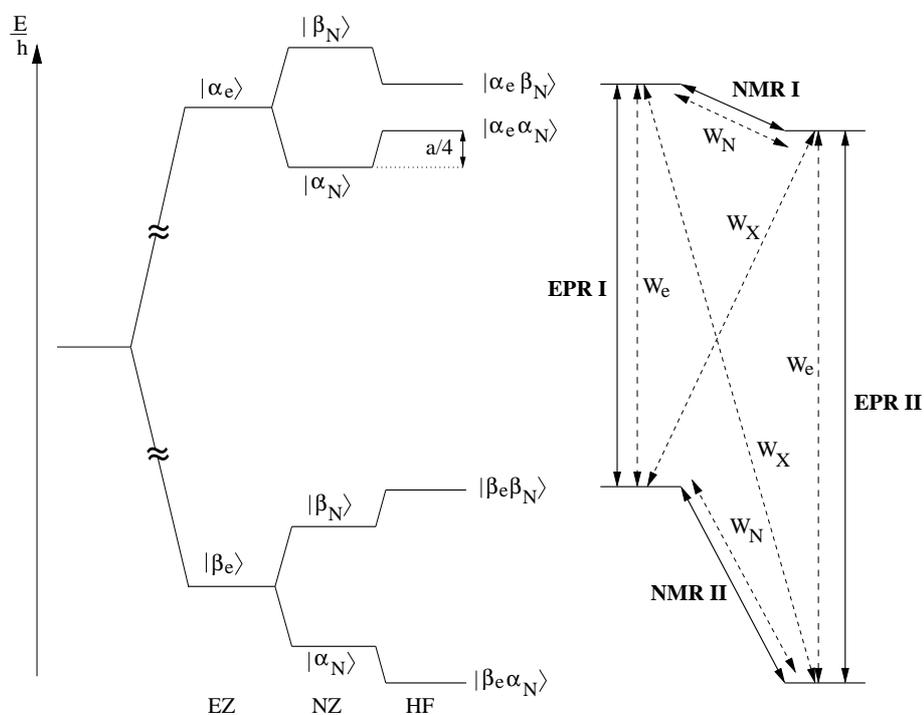


Abbildung 2.4: links: Energieniveauschema für ein $S = 1/2$, $I = 1/2$ System und $a_{\text{iso}} > 0$, die Elektron-Zeeman-Aufspaltung dominiert die Kern-Zeeman- (NZ) und Hyperfeinaufspaltung (HFC), rechts: erlaubte EPR- ($\Delta m_s = \pm 1$, $\Delta m_I = 0$) und NMR-Übergänge ($\Delta m_s = 0$, $\Delta m_I = 1$, mit gestrichelten Pfeilen sind die Elektronenrelaxationsraten W_e , Kernrelaxationsraten W_N und Kreuzrelaxationsraten W_X eingezeichnet

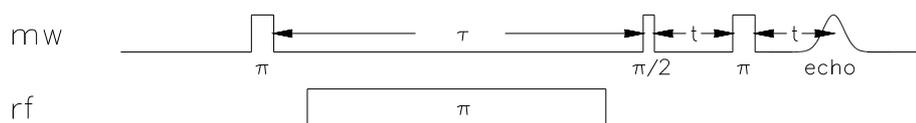


Abbildung 2.5: Davies-ENDOR-Sequenz, die obere Spur zeigt die Mikrowellenpulse (MW), die untere den Radiofrequenzpuls (rf)

NMR-Übergänge invertiert. In der Detektionsphase wird mit einer Hahn-Echo-Sequenz die Polarisation des EPR-Überganges abgefragt. Es wird also beim Davies-ENDOR-Experiment die Echo-Amplitude des invertierten Echos in Abhängigkeit von der Radiofrequenz beobachtet.

2.4 EPR und ENDOR Spektroskopie in gefrorener Lösung

In gefrorener Lösung liegen alle Molekülorientierungen statistisch verteilt vor. Die Linienposition im EPR Spektrum liegt bei einer richtungsabhängigen Wechselwirkung wie dem \mathbf{g} -Tensor von der Orientierung des paramagnetischen Zentrums im äußeren Magnetfeld ab. In flüssiger Lösung kommt es durch die Molekülrotation zum Ausmitteln aller richtungsabhängigen Wechselwirkungen, wenn die Rotation schneller als die Zeitskala des EPR- oder ENDOR-Experimentes ist [85]. In gefrorener Lösung wird eine Überlagerung aller Linienpositionen beobachtet, die eine Verteilung der Molekülorientierungen widerspiegelt. Wenn in einem paramagnetischen Molekül beispielsweise die \mathbf{g} -Anisotropie die Linienbreite des EPR-Spektrums dominiert (Abb. 2.6), so können die Hauptwerte des \mathbf{g} -Tensors direkt aus dem Spektrum entnommen werden. Dies ist bei den hier untersuchten Semichinonanionen erst im W-Band der Fall. Zusätzliche anisotrope Hyperfeinwechselwirkungen führen zu komplexeren Linienmustern, eine Simulation des EPR-Spektrums mit zusätzlichen Informationen über den Hyperfeintensor (aus ENDOR-Messungen) ist dann für die Ermittlung der \mathbf{g} -Hauptwerte notwendig. Für Semichinonanionen zeigt sich generell [94, 95], daß die Lage der g_{zz} -Achse parallel zur Molekülnormalen liegt und g_{xx} entlang der Carbonylgruppen orientiert ist. Nach Stone [96] ist zudem $g_{zz} = g_e$, dem Wert des freien Elektrons, die Komponenten in der Chinonebene sind zu höheren Werten verschoben. Es gilt weiterhin [94]:

$$g_{xx} > g_{yy} > g_{zz}. \quad (2.20)$$

Die Zuordnung der \mathbf{g} -Hauptachsen zur molekularen Struktur des Chinons ist in Abb. 2.6 links dargestellt.

Die ENDOR-Spektroskopie an Systemen mit ausgeprägter \mathbf{g} -Anisotropie bietet entscheidende Vorteile. Durch das Festlegen der Feldposition, an der die Messung durchgeführt werden soll, wird eine Auswahl an Molekülorientierungen getroffen, die an diesem Feld einen Übergang aufweisen. An den Kanten des EPR-Spektrums auf g_{xx} oder g_{zz} tragen nur die Moleküle zum ENDOR Spektrum bei, die mit ihrer g_{xx} - bzw. g_{zz} -Achse parallel zum Magnetfeld orientiert sind (im Spektrum in Abb. 2.6 rechts also hauptsächlich A_{\perp} des axialen Hyperfeintensors, dessen Hauptachsen links im Molekül gekennzeichnet sind). Eine derartige Orientierungsselektion ist sonst nur in Einkristallen möglich. Auf Feldpositionen zwischen g_{xx} und g_{zz} überlagern sich molekulare Orientierungen mit gleichem effektivem g -Wert. Diese Orientierungsselektion kann genutzt werden, um über ENDOR

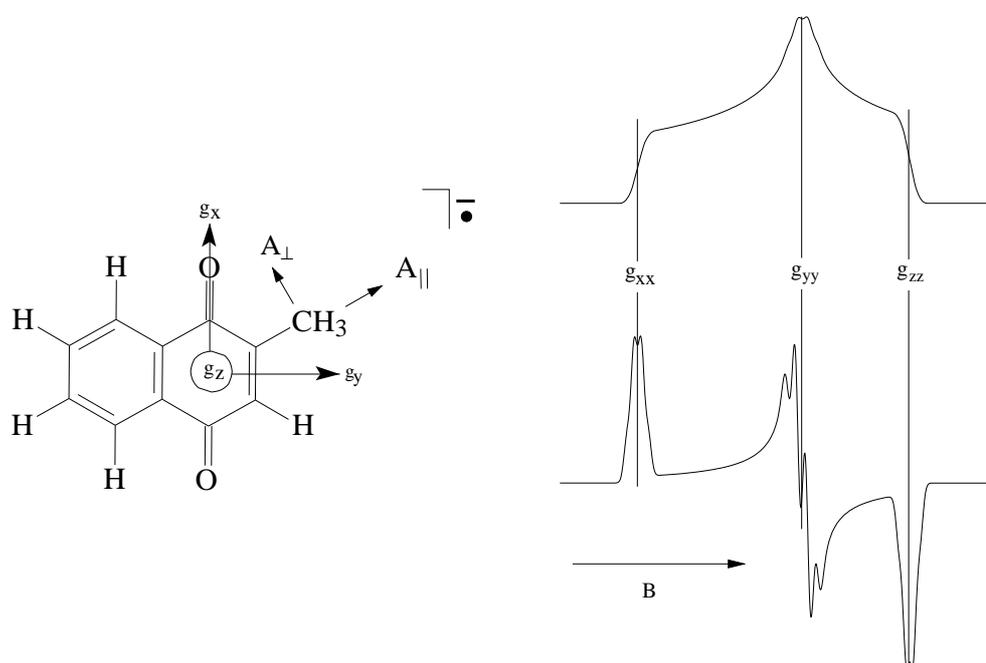


Abbildung 2.6: links: Zuordnung der g -Tensorachsen zur Molekülstruktur eines Chinonradikalanions (hier VK_3), zusätzlich ist die Orientierung der Hauptachsen eines axialsymmetrischen Hyperfeintensors gekennzeichnet; rechts: Die statistische Verteilung aller Molekülorientierungen führt zu einem Pulverspektrum, daß hier in Absorption und in 1. Ableitung dargestellt ist. Der axialsymmetrische Hyperfeintensor führt zu der in 1. Ableitung gut erkennbaren Hyperfeinaufspaltung.

Messungen an verschiedenen Feldpositionen die Hauptwerte und Lage des Hyperfeintensors im Hauptachsensystem des g -Tensors zu bestimmen [97, 98].

2.5 Spinpolarisierte Radikalpaare

Das zu betrachtende System besteht aus zwei Elektronen mit festem Abstand und definierter Orientierung zueinander und der sie umgebenden Kernspins in einem äußeren Magnetfeld. Dieses Spinsystem kann mit dem Modell spinkorrelierter Radikalpaare (SCRPM-Modell) beschrieben werden [99–102]. Die relevanten Wechselwirkungen, die in den zu verwendenden Spin-Hamiltonoperator eingehen, sind:

- Die Zeemanwechselwirkung der Elektronen \hat{H}_{eZ} und der Kerne \hat{H}_{NZ}
- Die Hyperfeinwechselwirkung der Elektronen mit den Kernen \hat{H}_{hf}
- Die Spin-Spinwechselwirkung zwischen den Elektronen \hat{H}_{ee}

Der daraus resultierende Spin-Hamiltonoperator läßt sich dann so formulieren:

$$\hat{H}_0 = \hat{H}_{eZ} + \hat{H}_{NZ} + \hat{H}_{ee} \quad (2.21)$$

Im Folgenden soll das System durch ein Paar spin-spin-gekoppelter Elektronen (beschrieben durch einen axialen spurlosen Tensor \mathbf{D} mit der z-Komponente D_{zz} und einer isotropen Austauschkopplung J) A, B; und einem Kern N (mit Kernspin $I=\frac{1}{2}$), welcher mit Elektron A über eine Hyperfeinwechselwirkung gekoppelt ist, genähert werden. Für die Behandlung von EPR-Experimenten ist es üblich, den Hamiltonoperator in ein System zu transformieren, welches mit der eingestrahlten Mikrowellenfrequenz rotiert. Der Spin-Hamiltonoperator für das genäherte System lautet dann:

$$\begin{aligned} \hat{H}_0 = \omega_A \hat{S}_{Az} + \omega_B \hat{S}_{Bz} - \omega_N \hat{S}_{Nz} - 2J \hat{S}_A \hat{S}_B + D_{zz} (3 \hat{S}_{Az} \hat{S}_{Bz} - \hat{S}_A \hat{S}_B) \\ + \mathbf{A}_{zz} \hat{S}_{Az} \hat{I}_{Nz} \end{aligned} \quad (2.22)$$

mit den effektiven Präzessionsfrequenzen der Spins $\omega_i = g_i \beta_i B_0 - \omega_{mw}$ im rotierenden Koordinatensystem. Besteht das zu betrachtende System aus zwei Elektronen, ergeben sich vier Spinzustände, bei Berücksichtigung eines koppelnden Kerns mit $I=\frac{1}{2}$ sind es acht. Eine mögliche Repräsentation sind die direkten Produktfunktionen der individuellen Spins :

$$\begin{aligned} |\alpha_e \alpha_e \beta_N\rangle \quad |\alpha_e \alpha_e \alpha_N\rangle \quad |\alpha_e \beta_e \beta_N\rangle \quad |\alpha_e \beta_e \alpha_N\rangle \\ |\beta_e \alpha_e \beta_N\rangle \quad |\beta_e \alpha_e \alpha_N\rangle \quad |\beta_e \beta_e \beta_N\rangle \quad |\beta_e \beta_e \alpha_N\rangle, \end{aligned} \quad (2.23)$$

welche auch die Eigenzustände des Hamiltonoperators bilden, solange keine Kopplung zwischen den Spins existiert. Da diese aber explizit berücksichtigt wird, sind nur noch die Produktfunktionen $|\alpha_e \alpha_e \alpha_N\rangle$ und $|\beta_e \beta_e \beta_N\rangle$ Eigenfunktionen. In dem hier gewählten Modell wird zusätzlich die Mischung der Kernspinzustände nicht berücksichtigt, sodaß $|\alpha_e \alpha_e \gamma\rangle$, $|\beta_e \beta_e \gamma\rangle$ ($\gamma = \alpha, \beta$) Eigenfunktionen sind, da hier alle Außerdiagonalelemente des gewählten Hamiltonoperators verschwinden. Die verbleibenden Funktionen können als Linearkombinationen ausgedrückt werden. Gewöhnlich werden die Spinfunktionen in der Basis der Singulett- ($|S\rangle$) und Triplettfunktionen ($|T_+\rangle$, $|T_0\rangle$, $|T_-\rangle$) ausgedrückt:

$$\begin{aligned} |1\gamma\rangle &= |T_+\rangle \\ |2\gamma\rangle &= \cos \phi_\gamma |S\rangle + \sin \phi_\gamma |T_0\rangle \\ |3\gamma\rangle &= -\sin \phi_\gamma |S\rangle + \cos \phi_\gamma |T_0\rangle \\ |4\gamma\rangle &= |T_-\rangle, \end{aligned} \quad (2.24)$$

wobei $\gamma = \alpha, \beta$ sich auf die Spinzustände des Kerns beziehen. Die Singulett-/Triplett-Mischungswinkel ϕ_γ sind definiert durch:

$$\sin 2\phi_\gamma = \frac{q_\gamma}{\Omega_\gamma} \quad \cos 2\phi_\gamma = \frac{j}{\Omega_\gamma} \quad (2.25)$$

Hierbei ist Ω_γ die Singulett-Triplett-Mischfrequenz:

$$\Omega_\gamma = \sqrt{\left(\frac{a}{2} \pm \Delta\omega\right)^2 + j^2} \quad q_\gamma = \frac{a}{2} \pm \Delta\omega \quad (2.26)$$

mit $\Delta\omega = \omega_A - \omega_B$ und $j = D_{zz} + 2J$.

In der Hochfeldnäherung (alle Beiträge im Spin-Hamiltonoperator in Gl. 2.22 sind klein gegenüber den Elektron-Zeemantermen) haben die acht Eigenzustände folgende Energien [103]:

$$\begin{aligned} E_{1\alpha} &= \omega + d + \frac{\omega_+}{2} & E_{1\beta} &= \omega + d - \frac{\omega_+}{2} \\ E_{2\alpha} &= -\frac{\omega_N}{2} - d + \frac{\Omega_\alpha}{2} & E_{2\beta} &= \frac{\omega_N}{2} - d + \frac{\Omega_\beta}{2} \\ E_{3\alpha} &= -\frac{\omega_N}{2} - d - \frac{\Omega_\alpha}{2} & E_{3\beta} &= \frac{\omega_N}{2} - d - \frac{\Omega_\beta}{2} \\ E_{4\alpha} &= -\omega + d - \frac{\omega_+}{2} & E_{4\beta} &= -\omega + d + \frac{\omega_+}{2} \end{aligned} \quad (2.27)$$

mit $\omega = (\omega_A + \omega_B)/2$, $d = (D_{zz} - J)/2$. Die reinen Triplettzustände $|1\gamma\rangle, |4\gamma\rangle$ sind jeweils durch die NMR-Frequenz des mit dem Elektron koppelnden Kerns aufgespalten:

$$\omega_+ = a/2 - \omega_N \quad \omega_- = a/2 + \omega_N. \quad (2.28)$$

Die Energien der Zustände mit Singulett- und Triplettcharakter sind von $\Omega_\alpha, \Omega_\beta$ und damit auch von der Größe von j und d abhängig. In Abb. 2.7 ist das Energieniveauschema für das 3-Spin-System dargestellt. Durch die Generierung von $P_{700}^{*\bullet+} A_1^{\bullet-}$ aus P_{700}^* im Singulettzustand und schnellen Ladungstransfer über A_0 sind nur die Niveaus mit Singulettcharakter bevölkert. Dies führt zu einem charakteristischen EPR-Spektrum mit sowohl absorptiven als auch emissiven Übergängen wie in Abb. 2.7 dargestellt.

Im Allgemeinen können in einem ENDOR Experiment Übergänge zwischen Energieniveaus mit $\Delta m_I = 1$ und $\Delta m_S = 0$ auftreten. Damit ergeben sich zwei erlaubte Übergänge zwischen den reinen Triplettzuständen ($|1_\alpha\rangle \leftrightarrow |1_\beta\rangle$ und $|4_\alpha\rangle \leftrightarrow |4_\beta\rangle$). Diese beiden Übergänge haben dieselben Frequenzen wie die Übergangsfrequenzen eines mit einem $I=1/2$ -Kern gekoppelten Elektrons. Im Unterschied zu diesem „klassischen“ Fall führt die Mischung von $|S\rangle$ und $|T_0\rangle$ zu vier zusätzlichen teilweise erlaubten Übergängen:

$$\begin{aligned} t_1 &= |2_\alpha\rangle \leftrightarrow |2_\beta\rangle & t_3 &= |2_\alpha\rangle \leftrightarrow |2_\beta\rangle \\ t_2 &= |3_\alpha\rangle \leftrightarrow |3_\beta\rangle & t_4 &= |4_\alpha\rangle \leftrightarrow |4_\beta\rangle \end{aligned} \quad (2.29)$$

Die ENDOR-Frequenz und deren Übergangswahrscheinlichkeit jedes dieser Übergänge wird nicht nur durch die Hyperfeinkopplung sondern auch durch die Stärke der Spin-Spin-Kopplung zwischen den Elektronen bestimmt. Die ENDOR-Frequenzen dieser teilerlaubten Übergänge ergeben

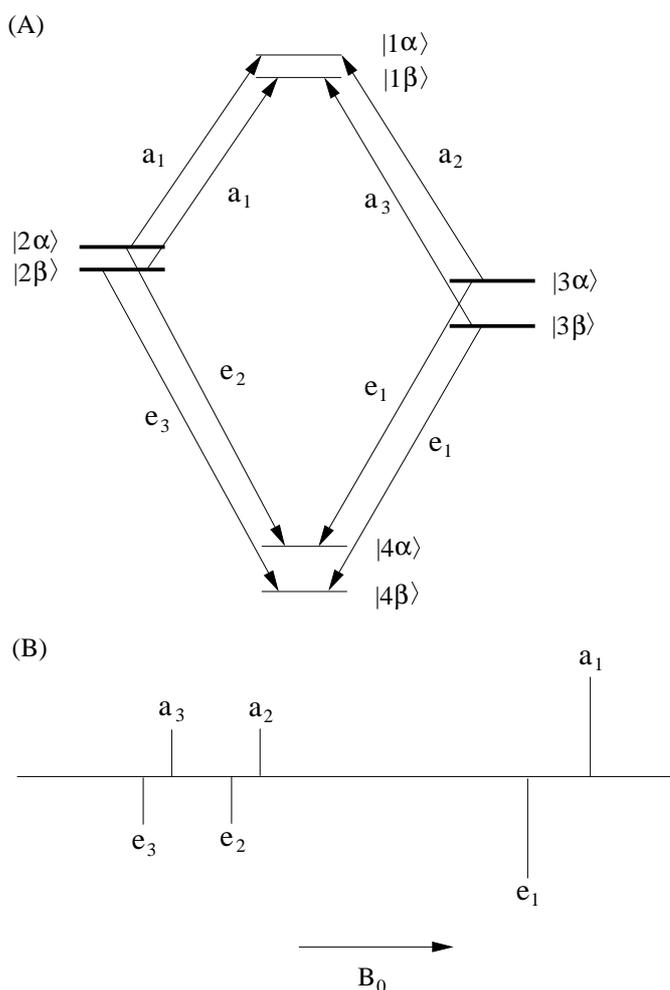


Abbildung 2.7: (A) Energieniveauschema eines schwach gekoppelten Radikalpaares, durch den schnellen Elektronentransfer von einem Singulettzustand sind nur die Niveaus mit Singulettcharakter bevölkert; (B) Strichdiagramm eines EPR-Spektrums mit den sechs erlaubten Übergängen

sich aus den Eigenzuständen des Spinhamiltonoperators (Gl. 2.27):

$$\begin{aligned}
 t_1 &= \omega_N - \frac{(\Omega_\alpha - \Omega_\beta)}{2} & t_3 &= \omega_N - \frac{(\Omega_\alpha + \Omega_\beta)}{2} \\
 t_2 &= \omega_N + \frac{(\Omega_\alpha - \Omega_\beta)}{2} & t_4 &= \omega_N + \frac{(\Omega_\alpha + \Omega_\beta)}{2}
 \end{aligned} \tag{2.30}$$

Die Absorptions/Emissions-Polarisation der TR-ENDOR Spektren (Abb. 2.8 C) kann mit Hilfe von Abb. 2.7 und Abb. 2.8 erklärt werden.

Wird beispielsweise Übergang a_2 in Abb. 2.7 durch einen Mikrowellenpuls angeregt, gelangt man zu der in Abb. 2.8(A) dargestellten Bevölkерung der einzelnen Eigenzustände. Bei Einstrahlen einer variablen Radiofrequenz werden drei Übergänge der sechs Übergänge resonant angeregt. Neben der normalen ENDOR-Linie bei $\nu_{RF} = \omega_+$ sind das die Übergänge t_2 und t_3 . Im Allgemeinen liegen diese nicht bei ω_- , sondern infolge ihrer Abhängigkeit von der Spin-Spin-Kopplung

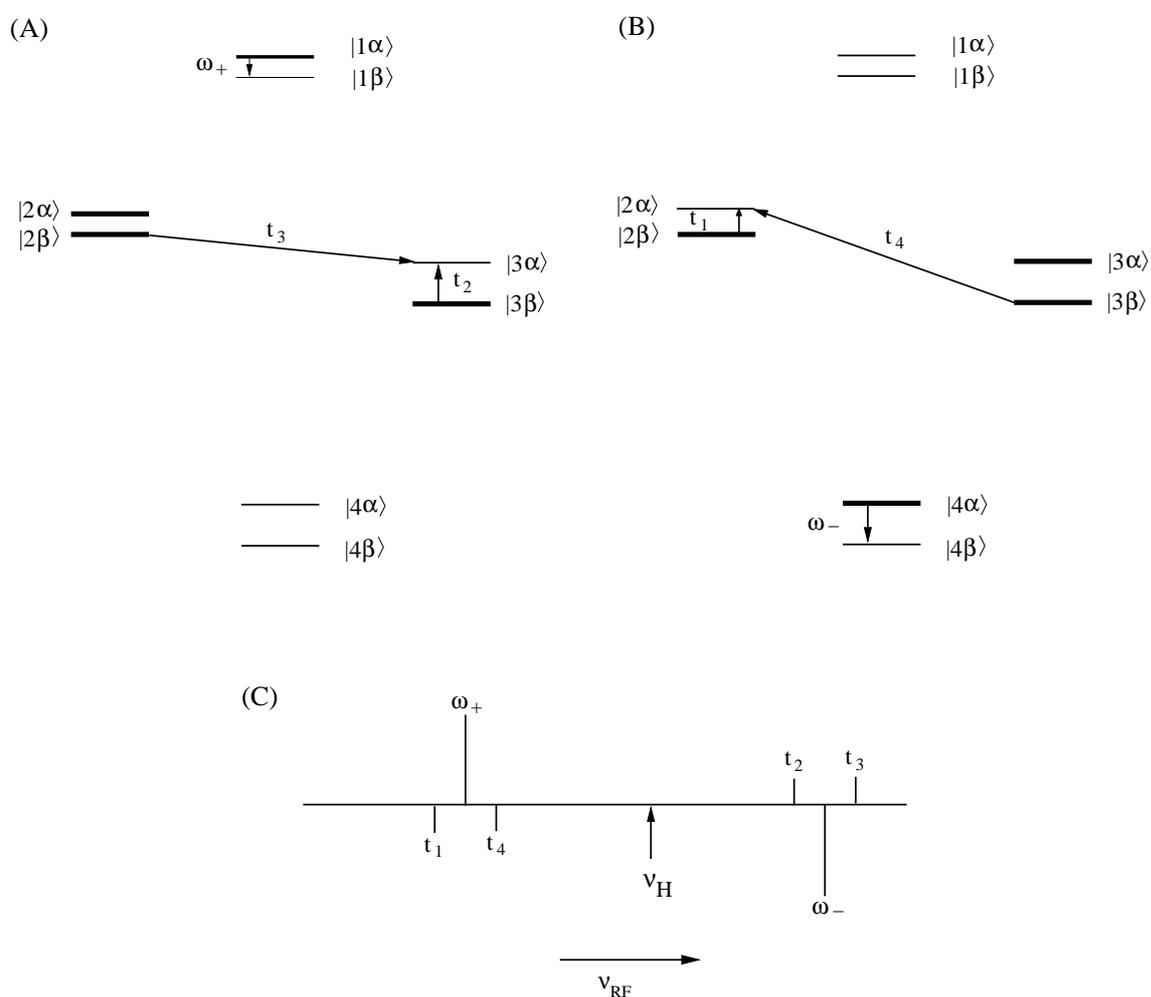


Abbildung 2.8: (A) Niveauschema nach Anregung des Überganges a_2 (Abb. 2.7) (B) des Überganges e_2 und die daraus resultierenden ENDOR-Übergänge, (C) entsprechendes ENDOR-Strichspektrum

der Elektronen (siehe Gl. 2.30) versetzt dazu. Da die angeregte EPR-Linie absorptiv ist, sind alle betreffenden ENDOR-Übergänge auch absorptiver Natur. Wird EPR-Übergang e_2 in Abb. 2.7 angeregt, so werden im ENDOR Experiment die drei möglichen emissiven Linien ω_- , t_1 und t_4 detektiert (Abb. 2.8(B)), wobei die beiden letztgenannten wieder im Allgemeinen versetzt zu ω_+ liegen. Ist die Spin-Spin-Kopplung zwischen den Elektronen klein im Vergleich zur inhomogenen Linienbreite (respektive Hyperfeinkopplung), wie es beim sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ der Fall ist, so überlappen die Übergänge a_2 und e_2 . Dadurch werden auch mit selektiven Mikrowellenpulsen beide Übergänge angeregt und im TR-ENDOR sind alle sechs Linien detektierbar. Ein solches Spektrum ist in Abb. 2.8(C) dargestellt. Im schwach gekoppelten Fall tragen die Übergänge t_1 – t_4 aufgrund ihres kleinen Übergangsmomentes kaum zum Spektrum bei [103].

Kapitel 3

Experimentelles

3.1 Präparation der Semichinonanionen

Alle elektrochemischen Untersuchungen (Cyclovoltammetrie, Square-Wave-Voltammetrie) wurden mit entgasten und wasserfreien Lösemitteln in einer geschlossenen Zelle durchgeführt. Die Meßlösung wurde vor Beginn jeder Messung 10 min mit Argon durchperlt. Als Elektrolyt wurde Tetrabutylammonium-tetrafluoroborat (für Messungen in Acetonitril, DMF, DME, MTHF), Tetrabutylammonium-hexafluorophosphat (in DMSO, CHCl_3) oder Tetrabutylammoniumchlorid (in IP, EtOH, MeOH) verwendet. Die Konzentration richtete sich nach der jeweiligen Leitfähigkeit der Elektrolytlösung, für die Messungen war eine Leitfähigkeit von ≈ 1 mS/cm erforderlich. Die untersuchten Chinone wurden vor Verwendung sublimiert. Vitamin K_1 wurde wie von Merck bezogen verwendet. Das selektiv ^{17}O -markierte Vitamin K_3 wurde von Claude Boullais (CEA Saclay, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Für die Generierung der Radikalanionen wurden alle Lösemittel in hoher Reinheit verwendet, wenn möglich „Uvasol“ (Merck) oder „Für die Spektroskopie“. Dimethoxyethan und Methyltetrahydrofuran wurden in der Reinheitsstufe „GC“ (für die Gaschromatographie) benutzt. Die Lösemittel wurden am Hochvakuumpumpstand in einen ausgeheizten Rundkolben mit 3 Å Molekularsieb destilliert.

Die Präparation der Radikalanionen unterscheidet sich je nach dem verwendeten Lösemittel. Da die Radikalanionen sehr reaktiv sind, muß jede Lösemittelverunreinigung vermieden werden. Die Präparation der Semichinonanionen erfolgte daher unter striktem Ausschluß von Sauerstoff, als Schutzgas wurde Argon 5.0 (99.9999 %), gereinigt über eine Oxisorb-Kartusche (Messer-Griesheim), verwendet.

Protisches Solvens

In protischem Lösemittel liegt immer durch Disproportionierung des Chinons ein Gleichgewicht zwischen Hydrochinon und Chinon (mit dem Semichinonanion/Hydrosemichinon als Zwischenstufe) vor. Durch Zusetzen einer Base wird dieses Gleichgewicht von Hydrochinon in Richtung Semichinonanion verschoben.

Die Proben für die EPR- und ENDOR-Spektroskopie wurden direkt im EPR-Röhrchen hergestellt. Dazu wurde eine Lösung des Chinons im jeweilig verwendeten Solvens ($c = 10^{-4}$ mol/l für Messungen in flüssiger Lösung, $c = 10^{-3}$ mol/l für Messungen in gefrorener Lösung) über eine ausgezogene Glaskapillare für 10–15 min mit durchperlendem Argon begast. Danach wurden ca. 3 μ l einer konzentrierten Lösung von Kalium-tert.-Butylat (K.-t.-But.) im gleichen Solvens unter Argongegenstrom zugegeben und ein Farbumschlag (grün bis grünblau, je nach untersuchtem Chinon) abgewartet. Die Messungen in flüssiger Lösung erfolgten sofort nach Generierung des Radikalanions in mit Schliffstopfen gasdicht verschlossenen EPR-Röhrchen (3.6 mm Außendurchmesser, MGW Heinrich), die Proben für Messungen in gefrorener Lösung wurden in Standard-EPR-Röhrchen (X-Band 4 mm, Q-Band 3 mm Quarzröhrchen, Wilmad) generiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben in den dünnen W-Bandkapillaren (0.87 mm Außendurchmesser, Vitrocom) wurden am Hochvakuumpumpstand in einer selbstgebauten Apparatur präpariert, die das Austauschen des W-Bandröhrchens über einen durchbohrten Teflonstopfen ermöglicht (siehe Abb. 3.1). In einem Seitengefäß der Apparatur wurde die Lösung

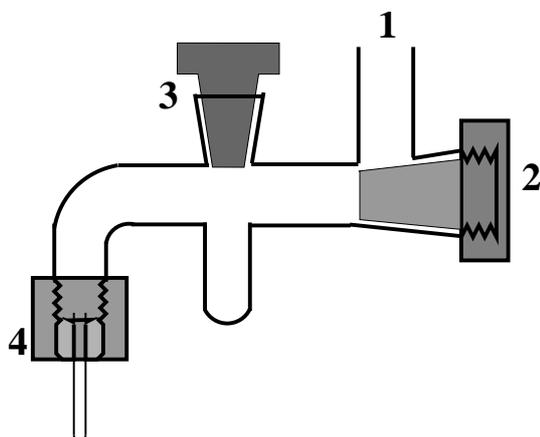


Abbildung 3.1: Für die Präparation der Radikalanionen in protischen Lösemitteln verwendete Apparatur, 1; Anschluß an den Hochvakuumpumpstand, 2; Quetschhahn, 3; mit Schliffstopfen verschließbarer Schliff, über den die Chinon- und die K.-t.-But.-Lösung in das darunterliegende Seitengefäß zugegeben werden, 4; Gewindeanschluß, an den mit Teflonstopfen eine W-Band-Kapillare angeschlossen ist

des Phyllochinons vorgelegt und durch mehrere Gefrier- / Pump- / Auftauzyklen (5x) und Begasung mit Argon von gelöstem Sauerstoff befreit. Danach wurde über den Glasstopfen ca.

3 μl einer konzentrierten Lösung von K.-tert.-But. im Argongegenstrom zugefügt und die Probe sofort im Seitengefäß eingefroren. Nach Wiederholung des Entgasungszyklus (5x) wurde die Probe in die W-Bandkapillare transferiert und nach Einfrieren abgeschmolzen und bei 77 K (fl. N₂) gelagert.

Aprotisches Solvens

Im aprotischen Lösemittel (3 Teile DME, 1 Teil MTHF) wurde das Semichinonanion elektrochemisch via potentiostatische Elektrolyse am Hochvakuumstand unter Argon hergestellt. Hierzu wurde das im DME/MTHF-Gemisch gelöste Vitamin K₁ (Phyllochinon) im Argongegenstrom in die vorher evakuierte und mit einem Gasbrenner ausgeheizte Elektrolysezelle (dargestellt in Abb. 3.2) gegeben (Endkonzentration 3 mM) und Tetrabutylammonium-tetrafluoroborat als Leitsalz in zehnfachem Überschuß hinzugefügt. Die Elektrolysezelle wurde wieder evakuiert und das Lösemittel abdestilliert, um möglichst alle Wasserreste zu entfernen. Danach wurde das über ei-

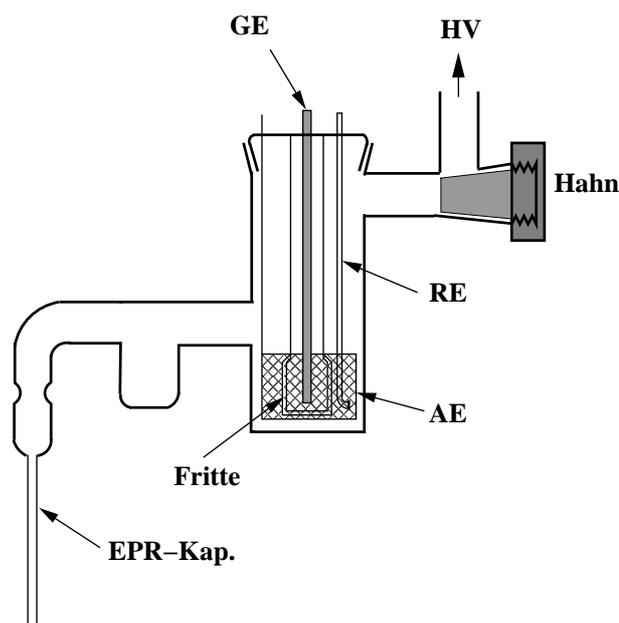


Abbildung 3.2: Elektrolysezelle nach Lenzian *et al.* [104] für die Erzeugung von Semichinonanionradikalen in aprotischem Solvens mit Seitengefäß und angesetzter, an der Verjüngung abschmelzbarer EPR-Kapillare, AE: Arbeitselektrode (aus einem Platinnetz), GE: Gegenelektrode (aus Edelstahl), RE: Referenzelektrode (Ag/AgCl), HV: Anschluß an den Hochvakuumstand

ner Natrium/Kaliumlegierung getrocknete Lösemittel in die Elektrolysezelle bis zu einem Volumen von 10 ml eindestilliert (DME/MTHF im Verhältnis 2:1). Als Elektrolysepotential wurde das aus den Cyclovoltammetrie- und Square-Wave-Voltammetrie-Messungen bestimmte Halbstufenpotential der ersten Reduktionsstufe des Vitamin K₁ gewählt. Die Elektrolyse der mit Rührfisch

gerührten Lösung wurde nach der (theoretischen) Hälfte des Stoffumsatzes abgebrochen. Nach Evakuieren der Zelle wurde die Lösung mit dem Semichinonanion in den Seitenarm mit Seitengefäß gegossen und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Elektrolysezelle wurde nochmals evakuiert und vom Pumpstand abgehängt. Nach Auftauen der Lösung mit dem Semichinonanion wurde ein Teil in eine entweder angeschmolzene Kapillare (für EPR/ENDOR-Spektroskopie in flüssiger Lösung) oder durch einen durchbohrten Teflonstopfen gasdicht angeschraubte Kapillare (4 mm Kapillaren für Puls-EPR/ENDOR-Spektroskopie oder 0.87 mm Kapillaren für EPR im W-Band) überführt. Die überführte Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, die Zelle nochmals evakuiert und die Kapillare dann abgeschmolzen.

Die Messungen in flüssiger Lösung wurden sofort im Anschluß an die Elektrolyse durchgeführt, das Radikalanion war für ca. 2–3 h stabil. Die Proben in gefrorener Lösung wurden bei 77 K gelagert.

3.2 Photosystem I Proben

Photosystem I Partikel aus *S. elongatus* in trimerer Form wurden in der AG Fromme/Witt isoliert und gereinigt wie in Ref. [105] berichtet. Die Einkristalle wurden von Prof. Dr. Petra Fromme hergestellt [105, 106]. Die Kristallnadeln wurden wie in Ref. [107] beschrieben, in Quarzkapillaren mit 3 mm Außen- und 1 mm Innendurchmesser montiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Als Gefrierschutzmittel wurde ein Puffer mit 1.5 M Sucrose verwendet.

Die PS I-Proben von *Synechocystis* sp. PCC6803 (Wildtyp, Punkt- und Deletionsmutanten) stammten aus der Kooperation mit den AG's Bryant, Chitnis und Golbeck. Die Biosynthese von Phyllochinon sowie die Konstruktion der Deletionsmutanten sowie die Präparation der PS I-Partikel ist detailliert in Ref. [108] beschrieben.

Die für den Speziesvergleich von photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ (Kap. 6 verwendeten PS I-Proben aus Spinat und *Synechocystis* PCC 6803 wurden von Dr. F. MacMillan (CEA Saclay, jetzt Uni Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Die PS I Proben von Punktmutanten aus *C. reinhardtii* wurden in der AG Redding präpariert. Die Aufreinigung dieser Proben erfolgte durch Ultrazentrifugation über einen Sucrosedichtegradienten [109].

3.2.1 Präparation von PS I-Partikeln aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Für die Präparation von PS I wurde die durch Mutation erzeugte Zelllinie CC2696 verwendet. Dieser Stamm akkumuliert aufgrund eines Defektes in der Chl *b*-Synthese nur etwa 10 % an Antennenproteinen im Vergleich zu Stämmen ohne diese Mutation [110, 111]. Durch den geringeren

Antennengehalt vereinfachte sich die Reinigung der PS I-Komplexe und es war möglich, eine größere Menge an Ausgangsmaterial zu verarbeiten. Darüber hinaus zeichnet sich das hier verwendete Verfahren durch eine schnelle Anreicherung an PS I und eine hohe Ausbeute aus. Ein weiterer Vorteil dieser Zelllinie ist die fehlende Akkumulation von PS II, was sich auch auf die Ausbeute und Anreicherung an PS I bei der Präparation positiv auswirkt.

Präparation der Thylakoide

Die Zellen wurden unter Dauerkunstlicht mit geringer Intensität ($\leq 1 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) und Begasung mit Raumluft über einen Sterilfilter im Sueoka-Hochsalz-Medium (HSA) bei 27 °C bis zum Ende der logarithmischen Phase ($3 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml) angezogen. Die Flüssigkultur wurde dann mit einer kontinuierlichen Durchflußzentrifuge (CEPA) abgeerntet. Aus 15 l Flüssigkultur konnten 30 g Zellpaste gewonnen werden. Alle folgenden Präparationsschritte wurden unter Grünlicht und auf Eis durchgeführt.

Die Präparation der Thylakoide erfolgte in Anlehnung an Ref. [112–114]. Die Zellpaste wurde in 50 mM Tricin-HCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, pH 7.5 aufgenommen, abzentrifugiert und noch einmal im gleichen Puffer gewaschen. Das im gleichen Puffer resuspendierte Zellpellet (Puffer / Zellpellet im Verhältnis 4:1) wurde durch eine Ultraschallbehandlung (Branson-450 Sonifier) aufgeschlossen. Bei 0 °C wurde die Zellsuspension für 2 min bei einer Pulsfrequenz von 0.5 Hz, Pulsdauer 1 s auf Leistungsstufe 8 beschallt. Der Aufschluß wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, bei weniger als 90% Aufschluß wurde noch einmal für 1 min beschallt. Die aufgeschlossene Zellsuspension wurde 20 min bei 200000 g zentrifugiert. Vom dreibandigen Sediment (oberste Schicht: Zellmembran, mittlere Schicht: Stärke, untere Schicht: unaufgeschlossene Zellen) wurde die oberste Schicht vorsichtig mittels Pinsel in 50 mM Tricin-HCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 M NaCl, pH 7.5 aufgenommen. Es folgte ein nochmaliges Waschen in 20 mM Tricin-HCl, 50 mM EDTA, pH 7.5 und nach Abzentrifugieren (20 min, 50000 g, $1 \text{ g} = 9.81 \text{ m/s}^2$) wurde das Zellpellet in 20 mM Tricin-HCl, 50 mM EDTA, pH 7.5 gewaschen und in 50 mM Tricin-HCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, pH 7.5 resuspendiert und auf eine Konzentration von 0.1 mM Chlorophyll eingestellt. Die Thylakoide wurden entweder für die Präparation von PS I-Komplexen weiterverarbeitet oder bei -80 °C für die spätere Verarbeitung aufbewahrt.

Solubilisierung und Reinigung von Photosystem I

Die Solubilisierung der Thylakoide bewirkt das Herauslösen des PS I-Komplexes aus der Membran und seine Einbettung in eine Detergenzmizelle. Als Detergenz wurde ausschließlich β -n-Dodecylmaltosid (β -DM) verwendet. Dieses nichtionische Detergenz zeichnet sich als schonendes Amphiphil aus, ohne bei der Anlagerung an den PS I-Proteinkomplex einzelne Untereinheiten

abzulösen. Die Kristallisation von Photosystem I aus *S. elongatus* ist ein Nachweis für diese Eigenschaften [105, 106].

Die Thylakoidsuspension wurde bei 0 °C mit 1% β -DM unter Zusatz eines Proteaseinhibitorgemisches (1mM Pefabloc, Fluka) für 30 min unter Rühren solubilisiert und dann 20 min bei 50000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch eine Ultrazentrifugation aufkonzentriert: Der Überstand wurde einer 40% Sucroselösung überschichtet und 90 min bei 360000 g zentrifugiert. Dadurch sammelt sich das solubilisierte PS I direkt über dem Sucrosekissen, während freies Chlorophyll und Karotenoide in den oberen Bereichen des Zentrifugenröhrchens verbleiben.

Die weitere Aufreinigung erfolgte nach einem von Krabben/Fink (TU Berlin) [115] ausgearbeiteten Verfahren. Dieses Verfahren hatte gegenüber der sonst üblichen Auftrennung der solubilisierten Membrankomponenten über einen Sucrosedichtegradienten den Vorteil, daß große Mengen an PS I bei hoher Ausbeute verarbeitet werden konnten. Das einkonzentrierte Solubilisat über dem Sucrosekissen wurde abgenommen, auf eine Gelfiltrationssäule (Sepharose CL6B, Pharmacia) aufgetragen und bei einer Flußrate von 8 ml/min bei 8 °C mit 20 mM MES, 1mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 0.02 % β -DM, pH 6.5 eluiert. Das Elutionsprofil wies drei Fraktionen auf: die erste Fraktion war orange und bestand vermutlich aus Protein-Karotenoid-Aggregaten, die zweite, grüne Fraktion enthielt den überwiegenden Anteil an PS I, die dritte Fraktion bestand aus Antennenkomplexen (die Identifikation der Proteine in den Fraktionen erfolgte über Western-Blots mit Antikörpern und Vergleich mit PS I aus *S. elongatus*, siehe [115]).

Die mit PS I angereicherte zweite Fraktion wurde in eine Fritte mit (in 8 °C mit 20 mM Tricin-HCl, 1mM EDTA, 0.02 % β -DM, pH 7.5 equilibrierter) DEAE-Zellulose gegeben. Nach dem Auftragen auf den schwachen Anionenaustauscher wurde mit 20 mM Tricin-HCl, 30 mM NaCl, 0.02 % β -DM, pH 7.5 gespült und durch Erhöhen der Salzkonzentration auf 100 mM NaCl eluiert. Durch diesen Reinigungsschritt wurde ein Großteil enthaltener Lipide und Karotenoide abgetrennt, die ansonsten bei der folgenden Reinigung mit einem starken Anionenaustauscher die Säule irreversibel blockierten.

Das Eluat wurde 1:1 verdünnt (mit 20 mM Tricin-HCl, 1mM EDTA, 0.02 % β -DM, pH 7.5) und auf die Anionenaustauschersäule (Q-HP-Sepharose, Pharmacia) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml 20 mM MES, 1mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 0.02 % β -DM, pH 6.5 gespült. Darauf folgend wurde das Protein mit einem flachen Salzgradienten (1–90 mM $MgSO_4$ über 180 ml bei 2.5 ml/min Flußrate) eluiert.

Die Reinheit des Proteins wurde durch Bestimmung des Chl *a/b* Verhältnisses in 80% Aceton (nach Porra *et al.* [116]) und der Konzentration an P_{700}^{*+} (durch Differenzabsorptionsspektroskopie) kontrolliert. Zur Bestimmung der P_{700}^{*+} -Konzentration wurde eine Chlorophyllkonzentration

von 10 μM eingestellt und als artifizieller Elektronendonator und -akzeptor 2 μM N-Methyl-Phenazoniummethylsulfat (mit 5 mM Ascorbat vorreduziert) zugesetzt. Nach dem letzten Reinigungsschritt betrug das Chl *a/b* Verhältnis 12–13 und die Zahl der Chlorophylle pro PS I-Komplex (welche sich aus der Chlorophyllgesamtkonzentration und der $\text{P}_{700}^{+\bullet}$ -Konzentration ergibt) 65–70. In PS I-Kristallen aus *S. elongatus* ist ein Wert von 96 Chlorophyllen pro PS I-Komplex berichtet worden [34], in der PS I-Präparation von *C. reinhardtii* kann demnach von einer vollständigen Abtrennung von Antennenkomplexen ausgegangen werden.

3.2.2 Photoakkumulation des Radikalanions $\text{A}_1^{\bullet-}$ in PS I

Die Erzeugung des Radikalanions folgte im Wesentlichen einem in Ref. [117] ausgearbeiteten Verfahren (siehe auch Ref. [118]). Diese Methode basiert auf dem Vermögen von Natriumdithionit, bei Temperaturen über 200 K $\text{P}_{700}^{+\bullet}$ zu reduzieren [119]. Bei der Belichtung von PS I reduziert dann das Dithionit in Konkurrenz zur Rekombination von $\text{P}_{700}^{+\bullet}\text{A}_1^{\bullet-}$ das $\text{P}_{700}^{+\bullet}$, dadurch wird die Photoakkumulation von $\text{A}_1^{\bullet-}$ erreicht. Eine weitere Voraussetzung für die Photoakkumulation von $\text{A}_1^{\bullet-}$ ist die Blockade des Vorwärtselektronentransfers nach A_1 , dies ist durch die Vorreduktion der Eisen-Schwefel-Zentren F_A , F_B mit Dithionit und bei Temperaturen bei 200 K gewährleistet. PS I-Proben von *S. elongatus* und *C. reinhardtii* (2–10 mM Chlorophyllkonzentration, 200 mM Glycin, 50 mM MgCl_2 , 0.02% β -DM, pH 10) wurden im Argongegenstrom bei Grünlicht mit einer entgasten Natriumdithionitlösung bis zu einer Endkonzentration von 30 mM Dithionit versetzt und bei 4 °C für 30 min equilibriert, um das für die Reduktion von F_A , F_B erforderliche Redoxpotential einzustellen. Danach wurden die Proben in tiefkaltem EtOH (–90 °C) eingefroren und bei 77 K aufbewahrt. Um eine unerwünschte Akkumulation von Radikalen zu vermeiden, wurden die Proben danach (außer bei der Photoakkumulation) unter gedämpftem Grünlicht behandelt.

Die PS I-Proben wurden nun in einem beleuchtbaren Dewar bei 205 K von zwei Seiten mit 150 W Halogenlampen, gefiltert mit 4 cm Wasserfiltern und 750 nm Kantenfiltern, belichtet. Für PS I aus *S. elongatus* stellte sich als optimale Belichtungszeit 5 min heraus, in der kein $\text{A}_0^{\bullet-}$ zusätzlich photoakkumuliert wurde (siehe auch [118]). Die PS I-Proben aus *C. reinhardtii* und Spinat wiesen, wie sich durch EPR-Messungen im Q-Band (vgl. Kap. 6.2.2) zeigte, auch bei kurzen Photoakkumulationszeiten von 30 s immer eine Kontamination von $\text{A}_0^{\bullet-}$ (oder zumindest einem Chlorophyllanionenradikal) auf.

3.3 Verwendete Geräte und Meßapparaturen

Elektrochemie

Die Cyclovoltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie wurden mit einem computergesteuerten Potentiostaten der Firma EG&G Princeton Applied Research (Modell 273A) durchgeführt unter Verwendung eines Dreielektrodenaufbaus (Arbeits Elektrode: Glassy-Carbon, Gegenelektrode: Pt, Referenzelektrode: in Acetonitril equilibrierte SCE, über einen doppelten Stromschlüssel mit der Meßlösung verbunden) in der AG von Dr. Bothe (MPI für Strahlenchemie, Mülheim) durchgeführt. Zur Steuerung der Elektrolyse wurde auch ein Potentiostat von EG&G (Modell 163) mit angeschlossenem x-t-Schreiber benutzt.

Bestimmung der $P_{700}^{\bullet+}$ - und Chlorophyllkonzentration

Die Aufnahme der optischen Spektren zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurde mit einem UV-VIS-Zweistrahlspektrometer (Cary 05E, Varian) mit Luft als Referenz durchgeführt. Die Bestimmung der $P_{700}^{\bullet+}$ -Konzentration erfolgte an einem in der AG Schlodder (MVI, TU Berlin) aus Einzelkomponenten aufgebauten Blitzlichtspektrometer [120]: Hierzu wurde die Probe mit einem sättigenden Blitz einer Xenonblitzlampe (gefiltert durch ein Blauglas CS96-4 von Corning) angeregt. Der Nachweis der blitzinduzierten Absorptionsänderung erfolgte mit einem monochromatischen Meßlichtstrahl (55 W Halogenlampe, gefiltert durch einen Monochromator mit 1 nm Bandbreite) im Maximum der $P_{700}^{\bullet+}$ -Hauptausbleichung (Q_y -Bande, $\lambda = 696$ nm), welche mit einem Photomultiplier (EMI 9558BQ) als Spannungsdifferenz gemessen und mit einem Transientenrekorder (Tektronix TDS 320) aufgenommen wurde. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für kleine Absorptionsänderungen:

$$\Delta A(t) = A(t) - A_0 = -\frac{1}{\ln(10)} \frac{\Delta U(t)}{U_0} = \Delta \epsilon \cdot \Delta c_B(t) \cdot d \quad (3.1)$$

mit der Absorptionsänderung vor A_0 und nach $A(t)$ dem Blitz, der detektierten Spannungsdifferenz $\Delta U(t)$, U_0 der Arbeitsspannung des Photomultipliers, $\Delta \epsilon$ dem molaren Differenzabsorptionsexkoeffizienten ¹, $\Delta c_B(t)$ der Änderung der Konzentration des Produktes der photochemischen Reaktion (hier das Kation des primären Donators $P_{700}^{\bullet+}$) und der optischen Weglänge d durch die Probe. Bei sättigender Anregung läßt sich die $P_{700}^{\bullet+}$ -Konzentration absolut bestimmen und bei einer Probe definierter Chlorophyllkonzentration das Chl/ P_{700} -Verhältnis bestimmen. Die aufgenommenen Transienten wurden durch eine Fitroutine mit biexponentieller Anpassung ausgewertet, um die Absorptionsamplitude zum Zeitnullpunkt zu ermitteln.

¹ $\Delta \epsilon = \epsilon_B - \epsilon_A$; Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten bei der Meßlichtwellenlänge, $\Delta \epsilon_{696} = 110000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für *C. reinhardtii* und $70000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für PS I-Trimere aus *S. elongatus* [121]

EPR- und ENDOR-Spektroskopie

Die *cw*-EPR- und ENDOR-Messungen im X-Band wurden an einem Spektrometer der Firma Bruker (ESP300) mit Mikrowellenbrücke ER 041 XK und einem TM₁₁₀ ENDOR-Resonator mit Mikrowelleneinkopplung über eine Antenne ² und Stickstofftemperierung (Bruker ER 4121 VT, T ≥ 130 K) durchgeführt. Für die ENDOR-Experimente wurde der Aufbau durch einen Radiofrequenz-Synthesizer (SMT02, Rohde&Schwarz) und RF-Verstärker (ENI 3200 L) ergänzt. Die Messungen im Q-Band erfolgten am gleichen Spektrometer, nur hierbei mit einer entsprechenden Q-band-Mikrowellenbrücke (ER 051 QG, Bruker) und TE₀₁₁-Zylinderresonator (ER 5106 QT, Bruker). Für die Messung der Mikrowellenfrequenz kam ein HP5352b (Hewlett-Packard) zum Einsatz.

Die Messungen im W-Band wurden mit einem *cw*- und gepulsten EPR-Spektrometer (Elexsys E 680, Bruker) durchgeführt. Die gesamte Manipulation der Meßparameter und auch die Detektion erfolgt mit einem X-Band-Aufbau, die 94 GHz werden durch Mischen mit einer Quelle fester Frequenz erreicht. Der Magnet besteht aus einem zweigeteilten System: Feldsweeps von max. 800 G werden mit einem Elektromagneten ermöglicht, größere Feldbereiche werden mit dem um den Raumtemperaturmagneten gebauten, heliumgekühlten, supraleitenden Magneten durch eine spezielle Ansteuerung mit dem Magnetnetzteil ermöglicht. Die Frequenz ergibt sich aus der (durch internen Frequenzzähler meßbaren) X-Band-Frequenz und der Festfrequenz von 84.5 GHz. Eine Feldkalibrierung (wie auch für die Q-Band Messungen) wurde mit einer Li:LiF-Probe [123] bei zwei verschiedenen Frequenzen durchgeführt.

Transiente EPR-Experimente und Puls-EPR- und ENDOR-Messungen im X-Band wurden an einem ESP 380-E FT-EPR Spektrometer (Bruker) mit einem dielektrischen Saphirring-Resonator (ER4118X-MD-5W1 für EPR bzw. ESP 380-1052 DLQ-H für ENDOR), Heliumkryostat (CF935 mit Temperatursteuerung ITC4, Oxford) und RF-Verstärker (ENI A 500) durchgeführt. Zur Optimierung der Aufnahmeparameter (Mikrowellenleistung, Phasenlage des Signals und der Pulse) wurde ein Digitaloszilloskop (LeCroy 9450A) benutzt. Typische Mikrowellenpulslängen für eine Hahn-Echo-Sequenz ($\pi/2 - \tau - \pi$) waren 64 ns - 600 ns - 128 ns. Die Lichtanregung erfolgte mit einem gütegeschalteten, frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (GCR 130, Spectra Physics, $\lambda = 532$ nm, Halbwertsbreite 8 ns, Pulsenergie 200 mJ/Puls). Der Laser wurde mit einer Wiederholrate von 10 Hz betrieben, die Einstellung der Anregungsenergie auf ca. 40 mJ/Puls vor dem Kryostaten erfolgte mit Graufiltern im Strahlengang.

²Eigenbau in der AG Lubitz, siehe Ref. [122]

Kapitel 4

Untersuchungen an Modellchinonen

Die Untersuchung von Modellsystemen trägt wesentlich zum Verständnis der Eigenschaften eines Kofaktors und seinen Wechselwirkungen mit seiner Proteinumgebung bei. Diese *in vitro* Untersuchungen sind insbesondere vorteilhaft, wenn es möglich ist, die Modelle in verschiedenen Umgebungen zu betrachten. Der Einfluß auf spektroskopische Parameter beispielsweise durch verschiedene Lösemittel erlaubt Rückschlüsse auf spezifische Wechselwirkungen zwischen untersuchtem Modellsystem und dem jeweiligen Lösungsmittel.

Der sekundäre Akzeptor in PS I, Vitamin K₁, gehört zur Klasse der Naphthochinone. Die im folgenden Kapitel dargestellten Messungen umfassen daher die Naphthochinone mit verschiedenem Substitutionsgrad. Neben der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten EPR- und ENDOR-Spektroskopie wurde die Cyclovoltammetrie und die ihr verwandte Square-Wave-Voltammetrie angewendet, um das Redoxpotential der 1. und 2. Reduktionsstufe von Vitamin K₁ zu bestimmen.

4.1 Bestimmung des Redoxpotentials E_M :

Cyclovoltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie

In diesem Kapitel soll die Abhängigkeit des Redoxpotentials von Vitamin K₁ in verschiedenen Lösemitteln dargestellt werden. Inspiration dafür war der Befund, daß das Redoxpotential von Chinonen stark vom Lösemittel abhängt. In Tab. 4.1 sind exemplarisch einige Reduktionspotentiale von Benzo- und Naphthochinonen in H₂O und DMF aufgeführt, die dies gut dokumentieren. Für die Redoxpotentialmessungen an VK₁ wurde eine Reihe von Lösemitteln ausgewählt, welche die gesamte Polaritätsskala von apolar und aprotisch über polar bis hin zur Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, repräsentieren sollten.

Zur Beschreibung der Polariät eines Lösemittels sind molekulare Parameter wie das Dipolmoment ungeeignet, da sie nicht die Wechselwirkung der Lösemittelmoleküle untereinander berücksichtigen.

Tabelle 4.1: Redoxpotentiale der 1. und 2. Reduktionsstufe von Chinonen (vs. NHE) in mV

Chinon	$E_M(Q/Q^{\bullet-})^a$	$E_M(Q^{\bullet-}/Q^{2-\bullet})$	Referenz
Vitamin K_1 in H_2O^b	-170	-60	[125]
Vitamin K_3 in H_2O	-203	-5	[125]
1,4-Naphthochinon-2-sulfonat in H_2O	-60	+120	[125]
1,4-Benzochinon in H_2O	+99	+286	[125]
1,4-Naphthochinon in DMF	-339	–	[126]
Vitamin K_3 in DMF	-414	–	[126]
1,4-Benzochinon in DMF	-156	–	[126]
2,3-Dimethylbenzochinon (PQ-0) in DMF	-299	-1025	[127]
Plastochinon-1 in DMF	-396	–	[127]
Plastochinon-9 in DMF	-375	–	[127]
2-Methyl-3-undecylnaphthochinon in DMF	-486	-1196	[127]
Menachinon-2 in DMF	-465	–	[127]
Menachinon-7 in DMF	-469	–	[127]

^aUmrechnung nach SCE: -250 mV, Fc/Fc+: -630 mV, siehe [124] für die Umrechnung zwischen diversen Referenzelektroden

^b+ 5M 2-Propanol+ 2M Aceton

sichtigen. Auch die Dielektrizitätskonstante ist nicht gut geeignet, da sie zwar die Ensembleigenschaften des Lösemittels beschreibt, aber nicht die Wechselwirkung des gelösten Reagens mit dem Solvens. Zur Charakterisierung der Polarität eines Lösemittels werden die Elektronen-Paar-Donor/Elektronen-Paar-Akzeptor (EPD/EPA) Wechselwirkungen benutzt. Ein empirisches semiquantitatives Maß für die nukleophilen (EPD-) Eigenschaften wurde von Gutmann [128, 129] eingeführt. Diese sogenannte „donor number“ DN (oder „donicity“) ist definiert als die negative Reaktionsenthalpie ΔH für die Bildung eines 1:1 Adduktes von $SbCl_5$ und dem EPD-Solvens in verdünnter Lösung in dem nicht koordinierenden Lösemittel 1,2-Dichlorethan. Ein analoges Maß für die elektrophilen (EPA-) Eigenschaften eines Lösemittels ist von Gutmann *et al.* [130] aus den ^{31}P -NMR chemischen Verschiebungen von Et_3PO abgeleitet worden, bezogen auf ein Referenzlösemittel. Referenzlösemittel für diese „acceptor number“ (AN) sind n-Hexan (AN=0) und $SbCl_5$ (AN=100).

Tabelle 4.2: Empirische Parameter, die die Polarität von Lösemitteln beschreiben

Lösemittel	AN ^a	E _T ^{Nb}
n-Hexan	0	0.006
MTHF	7.9 ^c	0.179
THF	8.0	0.207
DME	10.2	0.231
DMF	16.0	0.404
CH ₃ CN	18.9	0.460
DMSO	19.3	0.444
CHCl ₃	23.1	0.259
IP	33.5	0.546
EtOH	37.1	0.654
MeOH	41.3	0.762

^a *acceptor number* aus Mayer [132]

^b normierter Dimroth-Reichardt Parameter [133]

^c abgeschätzt nach [132], S. 1248

Ein anderes, über einen sehr großen Polaritätsbereich einsetzbares Maß ist der von Dimroth und Reichardt eingeführte Solvens-Polaritätsparameter E_T^{30} [131]. Dieser basiert auf der Übergangsenergie der langwelligsten solvatochromen Absorptionsbande eines Betainfarbstoffs.

In Tabelle 4.2 sind die Polaritätsparameter der benutzten Lösemittel aufgeführt.

Die Ordnung nach steigender Polarität zeigt eine gute Korrelation zwischen AN und E_T^{30} mit Ausnahme von Chloroform. Nach Gutmanns AN gehört Chloroform zu den stärker polaren Lösemitteln, während es nach Dimroth/Reichardt noch vor DMF einzuordnen ist. Mayer *et al.* [132] begründen dies durch dielektrische Polarisierungseffekte, die wohl zur Polarisierung der P–O Bindung in Et_3PO führen, aber durch den stark ionischen Charakter des Betainfarbstoffes einen geringeren Einfluß auf dessen Absorptionsbande haben.

Abb. 4.1 zeigt einen Vergleich von Cyclovoltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie an Vitamin K_1 in DME. Als Referenzsubstanz wurde Ferrocen benutzt, welches aufgrund seines gut separierten Potentials (E_M der 1. Oxidationsstufe bei +140 mV) zur Probe zugesetzt werden und somit als interne Referenz dienen konnte. In den Voltammogrammen sind die zwei Reduktionsstufen des

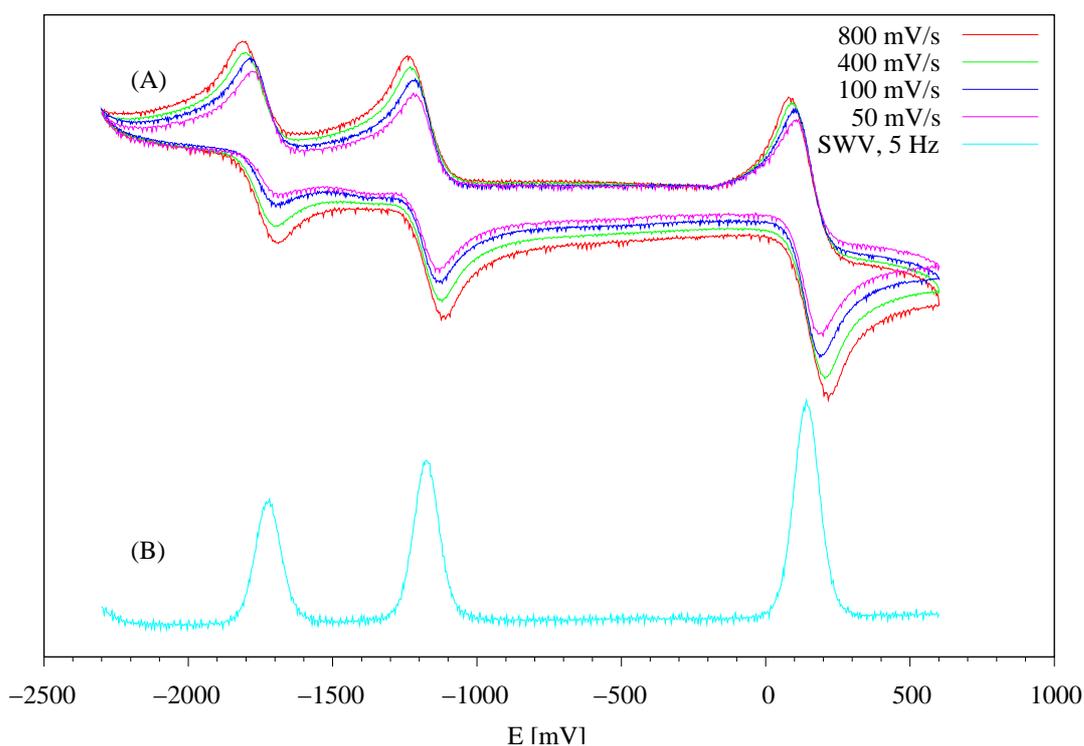


Abbildung 4.1: (A) Cyclo- und (B) Square-Wave-Voltammogramme von Vitamin K_1 in DME bei verschiedenen Abtastgeschwindigkeiten, Referenz: Ferrocen, $E_M(\text{Fc}/\text{Fc}^+) = +140$ mV

Chinons zum Radikalanion (bei $E_M = -1320$ mV) und dann zum Dianion (bei $E_M = -1870$ mV) zu erkennen. Die Cyclovoltammogramme zeigen auch die Reversibilität der Reduktion und kei-

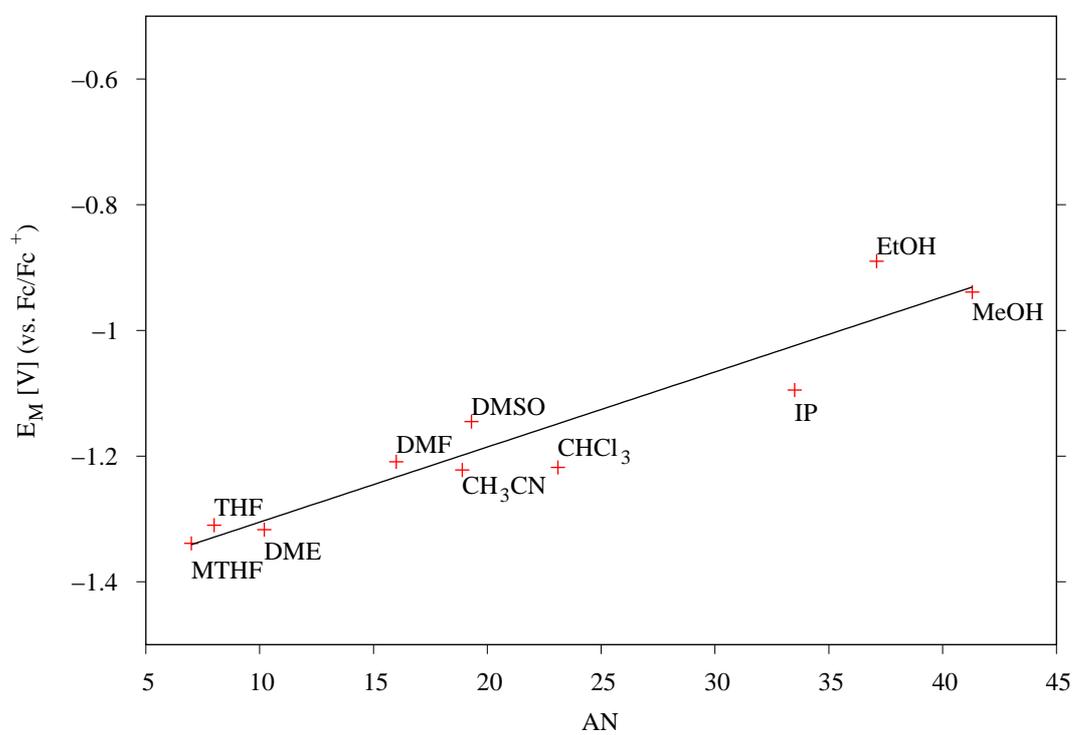


Abbildung 4.2: Abhängigkeit des Redoxpotentials $E_M(K_1/K_1^{\bullet-})$ von der Polarität des Solvens, hier anhand der *acceptor number* AN als Polaritätsparameter, Regressionsgerade: $E_M = 0.011951 * AN - 1.4246$

ne Folgereaktionen. Dies ist Voraussetzung für die Erzeugung eines stabilen Radikalanions mittels potentiostatischer Elektrolyse. Der Vergleich der Cyclovoltammogramme (A) weist eine Verschiebung der einzelnen Halbwellenpotentiale auf, und zwar eine Verringerung der Differenz zwischen kathodischer Reduktionsstufe und anodischer Oxidationsstufe. Diese Verringerung der Differenz ist auf einen hohen Zellinnenwiderstand zurückzuführen, welcher wegen der begrenzten Löslichkeit des Leitsalzes (und der damit verbundenen unzureichenden Dissoziation) nicht weiter gesenkt werden konnte. Die mit 50 mV/s (bzw. 5 Hz mit Square-Wave-Voltammetrie) aufgenommenen Voltammogramme weisen ein annähernd Nernst'sches Verhalten für Einelektronenreaktionen auf und wurden für die Ermittlung der Redoxpotentiale benutzt. In Tab. 4.3 sind die mit Square-Wave-Voltammetrie ermittelten Redoxpotentiale für die Reduktion von Vitamin K₁ zum Semichinonanion aufgeführt. In Abb. 4.2 sind die mittels Square-Wave-Voltammetrie ermittelten Redoxpotentiale von Vitamin K₁^{•-} in einer Reihe von Lösemitteln gegen AN aufgetragen.

Tabelle 4.3: Mittels Square-Wave-Voltammetrie gemessene Redoxpotentiale der 1. Reduktionsstufe von Vitamin K₁, Referenz: Ferrocen (Fc/Fc⁺), Meßgenauigkeit 5 mV

Solvens	MTHF	THF	DME	CHCL ₃	DMF	DMSO	CH ₃ CN
E _M	-1340	-1310	-1320	-1220	-1210	-1145	-1220

Solvens	IP	EtOH	MeOH
E _M	-1095	-890	-940

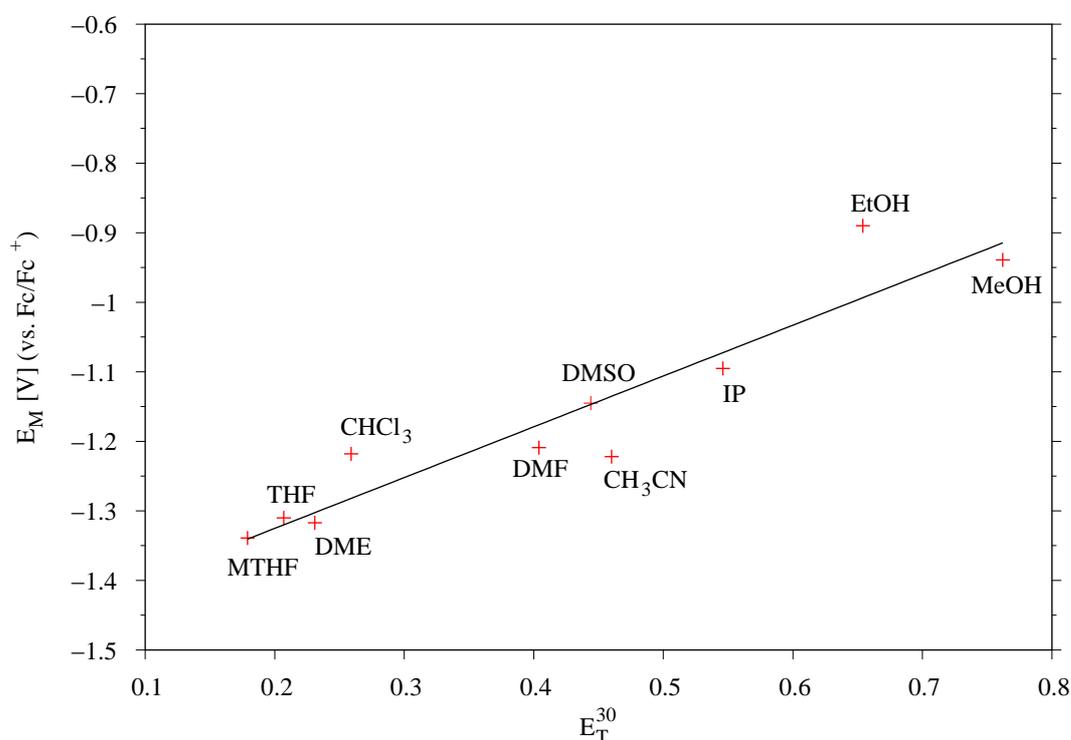


Abbildung 4.3: Abhängigkeit des Redoxpotentials $E_M(K_1/K_1^{\bullet-})$ vom normierten Dimroth-Reichardt-Parameter E_T^N , Regressionsgerade: $E_M = 0.73067 * E_T^N - 1.4713$

In Abb. 4.3 ist das Redoxpotential von $K_1/K_1^{\bullet-}$ gegen den Dimroth-Reichardt-Parameter E_T^N dargestellt. Beide Auftragungen zeigen das Absinken des Redoxpotentials mit zunehmender Polarität des Solvens. Wie die angepaßten Regressionsgeraden zeigen, ist die gefundene Abhängigkeit von der Solvenspolarität linear.

Der Einfluß des Lösemittels auf das Semichinonanion kann in einem molekularen Bild veranschaulicht werden:

Die zunehmend polaren Lösemittelmoleküle stabilisieren durch Ausbildung einer Hülle aus orientierten Dipolen die negative Ladung des Radikalanions und senken damit die aufzuwendende Energie zur Reduktion des Chinons. Lösemittel mit –OH-Funktion haben den stärksten Einfluß, Ether wie DME vermögen das Chinonanion kaum noch zu stabilisieren. Die protischen Lösemittel stabilisieren durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Carbonylsauerstoffen das Chinonanion zusätzlich. Aus der ermittelten linearen Abhängigkeit des Redoxpotentials von der Lösemittelpolarität für die erste Reduktionsstufe von Vitamin K_1 läßt sich die Polarität der Umgebung von A_1 , dem sekundären Akzeptor in PS I, abschätzen. Dazu werden Literaturwerte für das Redoxpotential $E_M(A_1/A_1^{\bullet-})$ benutzt, mit denen auf die Polaritätsparameter

AN bzw. E_T^N extrapoliert wird. Das Redoxpotential wurde von Vos *et al.* über die Kinetiken der E-Feld-induzierten Elektronentransferraten zu -1430 mV abgeschätzt [134], ein Wert von -1440 mV wurde über die $P_{700}^{\bullet+}$ -Triplettausbeute von Sétif *et al.* berechnet [135]. Iwako *et al.* schätzten das Redoxpotential von Phyllochinon in der A_1 -Bindungstasche zu -1384 mV ab [136]. In Tab. 4.4 sind die erwähnten Redoxpotentiale und die daraus extrapolierten Werte für AN und E_T^N aufgeführt. Die ermittelten Polaritätsparameter für A_1 liegen am unteren Ende der Polaritätsskala, für die *acceptor number* AN wird der mit n-Hexan definierte Nullpunkt unterschritten. Daß die Bindungstasche von A_1 apolarer als n-Hexan sein soll, ist allerdings unwahrscheinlich. Selbst eine (hypothetische) Helix aus Glycin weist durch das Amidgerüst besser polarisierbare funktionelle Gruppen auf als die C–H oder C–C Bindungen in n-Hexan. Dabei muß jedoch die Streuung der Literaturwerte für $E_M(A_1/A_1^{\bullet-})$ beachtet werden, die eine Variation von $\Delta AN = 4.7$ bedeutet. Eine Fehlerabschätzung aus der Streuung der einzelnen Meßwerte liefert $\Delta AN = 3.9$. Die Abschätzung der Polarität der A_1 -Bindungstasche über E_T^N bestätigt, daß der sekundäre Akzeptor in einer stark apolaren Umgebung eingebettet sein muß.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

Es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen dem Redoxpotential von Chinonen (in diesem untersuchten Fall VK_1) und der Polarität des Lösemittels, wenn als Maß für die polaren Eigenschaften die *acceptor number* AN und der Dimroth-Reichardt Parameter E_T^N gewählt werden.

Die Proteinumgebung des sekundären Akzeptors in PS I ist im Rahmen der Genauigkeit der Literaturwerte für $E_M(A_1/A_1^{\bullet-})$ in ihrer Polarität vergleichbar mit der von etherischen Lösemitteln und reicht bis an die des sehr apolaren n-Hexan heran.

Tabelle 4.4: Abschätzung der Polarität des sekundären Akzeptors in PS I, A_1 , anhand von Redoxpotentialen $E_M(A_1/A_1^{\bullet-})$ aus der Literatur und der ermittelten Regressionsgeraden (Abb. 4.2 und Abb. 4.3)

$E_M(A_1/A_1^{\bullet-})$ [mV] ^a	AN	E_T^N
-1384^b	3.4	0.119
-1430^c	-0.4	0.056
-1440^d	-1.3	0.043

^aumgerechnet vs. Fc/Fc^+ , die in der Literatur angegebenen Werte sind meist gegen NHE angegeben ($E_M(NHE) = E_M(Fc/Fc^+) + 630$ mV)

^bRef. [136]

^cRef. [134]

^dRef. [135]

4.2 EPR- und ENDOR-Spektroskopie an Modellchinonen

In diesem Teil sollen Untersuchungen an den Radikalanionen der Modellchinone in protischen und aprotischen Lösemitteln dargestellt werden. Hierbei standen die Naphthochinone als Modellverbindungen für den Chinonakzeptor in PS I im Mittelpunkt des Interesses. In der Literatur sind Vergleichsdaten zu einigen Chinonen vorhanden und gerade Chinone wurden früh als dankbare Spezies für die EPR entdeckt [137, 138]. Trotzdem fand es der Autor erforderlich, einen kompletten Satz an Parametern für Naphthochinone unterschiedlicher Substitution mit EPR- und ENDOR-Spektroskopie zu messen. Dies war insbesondere im Hinblick auf Solut-Solvens Wechselwirkungen notwendig, wo die Literatur sich als sehr lückenhaft erwies.

Die EPR- und ENDOR-Spektroskopie in flüssiger Lösung liefert die isotropen Hyperfeinkopplungen der untersuchten Spezies und gibt damit Aufschluß über die Spindichteverteilung im Molekül. In gefrorener Lösung sind zusätzlich die anisotropen Anteile der magnetischen Wechselwirkungen detektierbar, die in den EPR-Spektren zu unaufgelösten Linien führen. Mithilfe der ENDOR-Spektroskopie können diese jedoch meist aufgelöst werden.

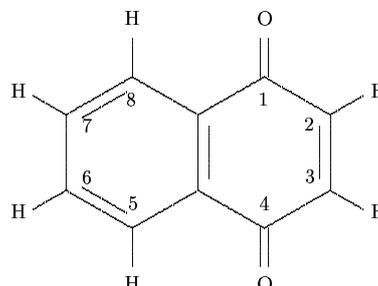
Durch Untersuchungen in protonierten und deuterierten Lösemitteln ist es möglich, austauschbare Protonen zu identifizieren. Hierzu zählen bei den Chinonen die zu den Carbonylsauerstoffen ausgebildeten Wasserstoffbrücken.

Die Auflösung des g -Tensors der Semichinonanionen ist durch EPR bei höheren Frequenzen (Q-Band 34 GHz, W-Band 94 GHz) möglich, diese Ergebnisse sind in einem eigenen Abschnitt aufgeführt.

Der so erhaltene Satz an magnetischen Parametern ermöglicht es, die Modellchinone mit dem Semichinonanion *in vivo* zu vergleichen und Rückschlüsse auf die Bindungstasche des Vitamin K₁ im Protein zu ziehen.

4.2.1 Naphthochinon

Aufgrund seiner Symmetrieachse im Molekül sind die Protonenhyperfeinkopplungen im Naphthochinonanion paarweise äquivalent. Daher sind nur drei verschiedene Hyperfeinkopplungen zu erwarten. Jedes Paar magnetisch äquivalenter Protonen (2/3,6/7,5/8) führt zu einer 1:2:1-Aufspaltung, das EPR-Spektrum setzt sich damit aus einem Triplett von Triplets zusammen.



Das EPR-Spektrum in Abb. 4.4(A) weist alle 27 Linien auf, wobei schon zu erkennen ist, daß zwei Kopplungen ähnlich groß sind. Das korrespondierende ENDOR-Spektrum (Abb. 4.4(B)) bestätigt drei unterschiedliche Hyperfeinkopplungen, wovon die zwei kleineren (2–2', 3–3') vergleichbare Größe aufweisen. Hierbei ist die große HFC (1–1') den Protonen an C-2 und C-3, die kleineren HFC's (2–2', 3–3') den Ringprotonen des annellierten Phenylringes zugeordnet worden. Die Zuordnung der Protonenhyperfeinkopplungen zu C-6/C-7 und C-5/C-8 ist mittels semiempirischen MO-Rechnungen getroffen worden [139,140], welche später auch mit genaueren

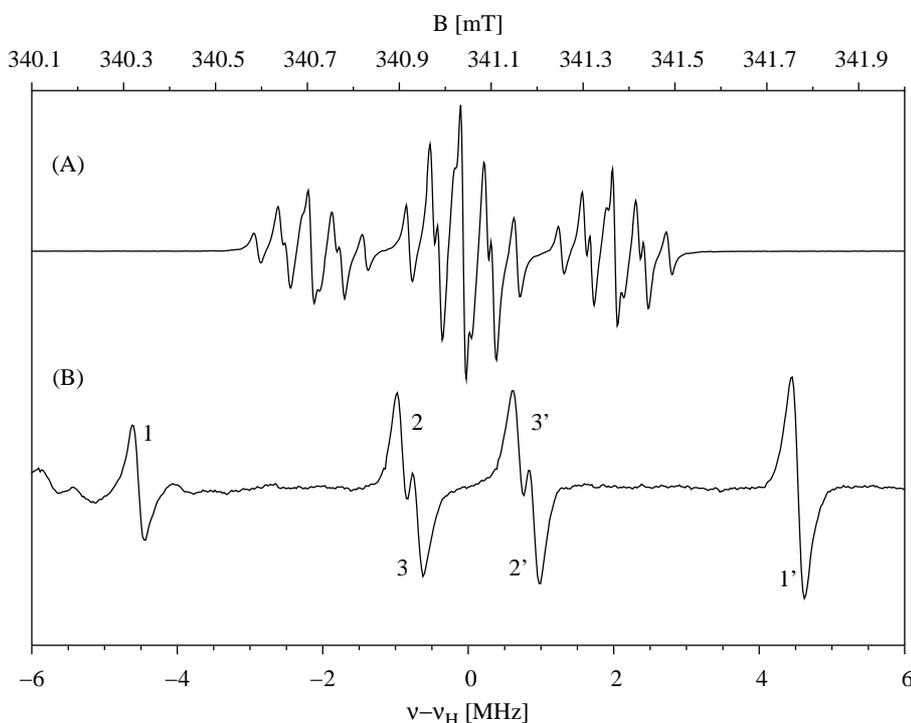


Abbildung 4.4: (A) EPR- und (B) ENDOR-Spektrum von $\text{NQ}^{\bullet-}$ in IP, $T = 270 \text{ K}$, $P_{MW} = 0.1 \text{ mW}$, Mod.-Amp. = 0.1 G, $t_c = 41 \text{ ms}$, $t_{scan} = 41 \text{ s}$, 1024 Pkte., ENDOR: $P_{MW} = 8 \text{ mW}$, $P_{RF} = 70 \text{ W}$, Mod.-Hub = 100 kHz, $t_c = 82 \text{ ms}$

Tabelle 4.5: Hyperfeinkopplungen von $\text{NQ}^{\bullet-}$ (in MHz) in IP

Position	A'_X	A'_Y	A'_Z	a_{iso}	Referenz
2, 3	-4.30	(6.40)	-2.10	-9.05	hier
6, 7				-1.78	hier
5, 8				-1.42	hier
H-Brücke	+5.30	-2.65	-2.65	0.27	hier
2, 3	-4.37	(6.34)	-1.97	-9.072	[143]
6, 7				-1.875	[143]
5, 8				-1.424	[143]
H-Brücke	+5.58	-2.38	-2.38	0.27	[143]

DFT-Methoden bestätigt wurden [141]. Die Zuordnung basiert einerseits darauf, daß die dem elektronegativen Carbonylsauerstoffen benachbarten Protonen eine höhere Spindichte haben. Der größere Anteil an Spindichte ist im chinoiden Ring lokalisiert, wobei sich ca. 40 % der Spindichte an den Sauerstoffen befindet (siehe Kap. 4.2.2 zur Bestimmung der Spindichte an den Carbonylsauerstoffen mittels EPR an ^{17}O -markiertem $\text{VK}_3^{\bullet-}$). Eine einfache Abschätzung mittels der McConnell-Gleichung (Gl. 2.13) ergibt eine Spindichte von 12 % (mit $Q_{CH} = 75.67$ MHz, Ref. [142]) an C-2 und C-3.

Über die Carbonylwasserstoffatome sind Chinone in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen mit protischen Lösemitteln auszubilden. In flüssiger Lösung ist das aufgrund der geringen Bindungsenergie der Wasserstoffbrücken ein dynamischer Prozeß und damit ist nur ein gemittelter Zustand zwischen H-Brücken-gebundenem und ungebundenem Anion meßbar. Der dipolare Anteil der Kopplung wird durch Molekülrotation in flüssiger Lösung ausgemittelt. Der isotrope Anteil ist im Allgemeinen in der Größenordnung von 100 kHz. Daher ist kein großer Einfluß der Wasserstoffbrücken auf die isotropen Kopplungen im Chinonanion zu erwarten. In gefrorener Lösung werden die anisotropen Anteile der Hyperfeinkopplungen nicht mehr ausgemittelt und man erhält die vollständigen Tensoren. Dadurch erhält man in der EPR ein inhomogen verbreitertes, unaufgelöstes Spektrum. Mittels ENDOR-Spektroskopie können die anisotropen Hyperfeinkopplungen jedoch aufgelöst werden. Dadurch ist es möglich auch die rein dipolaren Hyperfeintensoren der Wasserstoffbrückenprotonen zu detektieren und durch Vergleich der Spektren in protoniertem und deuteriertem Lösemittel zu identifizieren.

Abb. 4.5 zeigt das Puls-EPR-Spektrum (Field Swept Echo, FSE) von $\text{NQ}^{\bullet-}$ in gefrorenem d_1 -Isopropanol und in H- sowie d_1 -Isopropanol aufgenommene Puls-ENDOR-Spektren und deren Differenz. Die ENDOR-Spektren zeigen als größte Kopplungen zwei Komponenten eines

stark anisotropen Tensors (Abb. 4.5 (D)). Diese können der A_{xx} - und der A_{zz} -Komponente des Hyperfeintensors der Protonen an C-2/C-3 zugeordnet werden. Die in Abb. 4.5 (D) getroffene Kennzeichnung von A_{zz} erscheint auf den ersten Blick willkürlich, ist aber symmetrisch zum gut erkennbaren niederfrequenten Übergang. In Spektrum (B) ist auch der hochfrequente Übergang von A_{zz} gut zu erkennen.

Die A_{yy} -Komponente kann nicht direkt identifiziert werden, sie ist durch die Matrix überlagert. Die Form des Tensors ist damit nicht mit der allgemeinen Form eines Tensors für ein $\bullet\text{CH}$ -Fragment vergleichbar. O'Malley *et al.* [144] haben im Benzochinon, ausgehend von einem Punkt-Dipol-Modell, aus den Spindichten der vier zum α -H benachbarten Atome einen effektiven dipolaren Hyperfeintensor berechnet. Der berechnete Tensor zeigte eine nahezu axiale Symmetrie mit $A'_X \approx A'_Z < 0$ und $A'_Y > 0$. Dieser Fall ist mit den α -Protonen an C-2/C-3 im Naphthochinon gut vergleichbar. Daher wurde A'_Y aus A_X , A_Z und a_{iso} berechnet und als vorläufige Zuordnung angegeben.

Weiterhin ist ein zweiter Hyperfeintensor zu erkennen, welcher durch Vergleich der ENDOR-Spektren in protoniertem und deuteriertem IP (Abb. 4.5 B,D) der Wasserstoffbrücke zugeordnet werden kann. Zur Auswertung wurde auch die 1. Ableitung (bzw. eine Pseudomodulation) der ENDOR-Spektren genutzt (nicht abgebildet), da in dieser die charakteristischen Umkehrpunkte und Maxima der Tensorhauptwerte genauer bestimmt werden können. Zum Test der Hauptwerte wurden diese zur Simulation der EPR- und ENDOR Spektren verwendet und die so simulierten Spektren mit dem Experiment verglichen und gegebenenfalls die HFC-Tensoren angepaßt. Die so erhaltenen Hyperfeintensorhauptwerte sind in Tab. 4.5 zusammengefaßt. Die Hyperfeinkouplungen der α -Protonen des annellierten Phenylringes überlagern sich im zentralen Bereich des ENDOR Spektrums und konnten daher nicht zugeordnet werden.

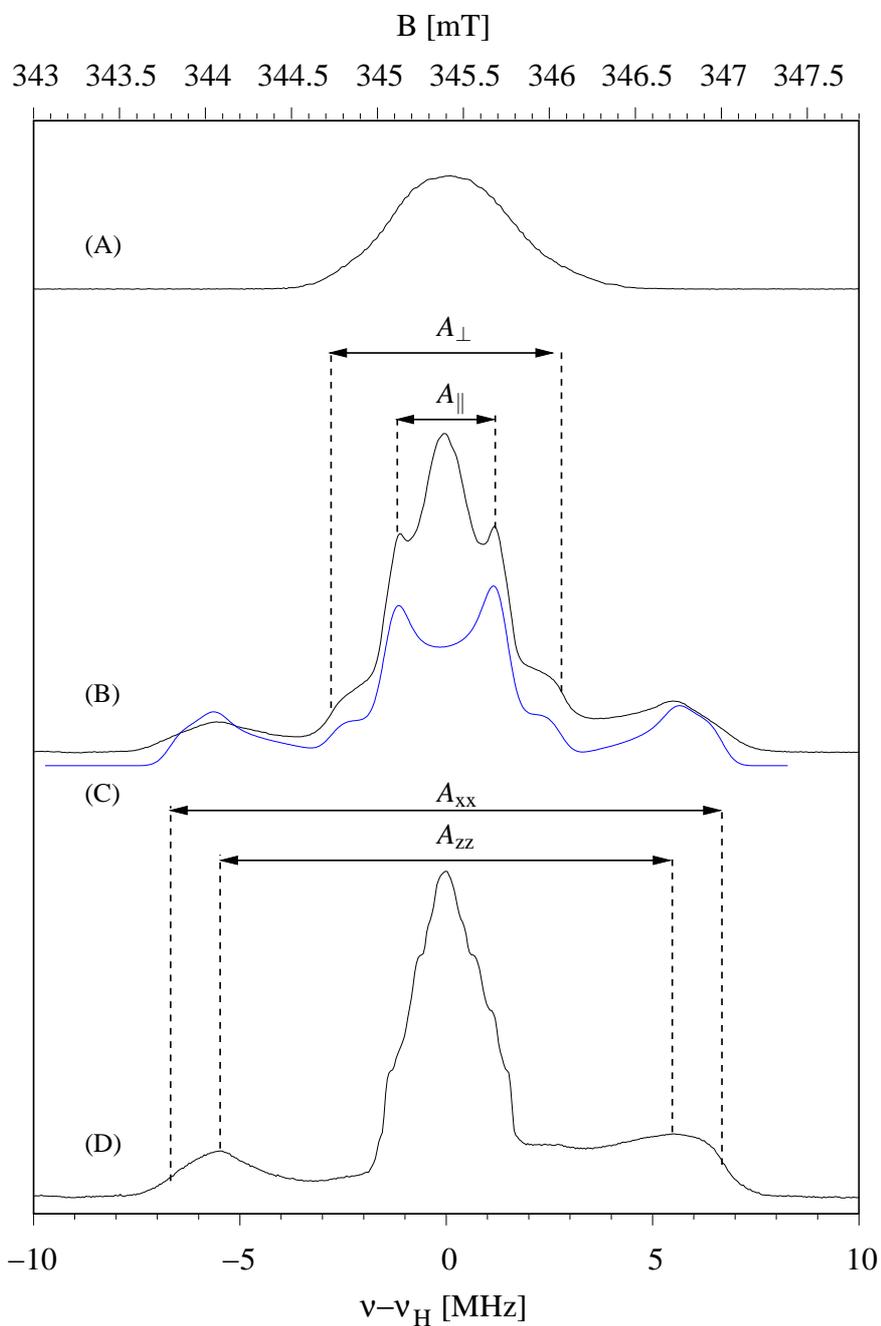


Abbildung 4.5: EPR- (A) und ENDOR-Spektren (B,C,D) von $\text{NQ}^{\bullet-}$ in gefrorener Lösung, A,B: H-Isopropanol, C: Simulation, D: d_1 -Isopropanol, in (B) sind A_{\perp} und A_{\parallel} der H-Brücke gekennzeichnet, in (D) die A_{xx} -, A_{zz} -HF-Tensorkomponenten des α -Protons an C-2, Davies-ENDOR, $T = 80 \text{ K}$

4.2.2 2-Methylnaphthochinon (Vitamin K₃)

Die Einführung einer Methylgruppe an C-2 führt zum Verlust der C_{2v} -Symmetrie. Dies spiegeln EPR- und ENDOR-Spektrum wider:

Das EPR-Spektrum von $VK_3^{\bullet-}$ ist weitaus komplizierter als das vom Naphthochinonanion, es ist mit geübtem Auge ein Dublett von Quartetts zu erkennen (Intensitätsverhältnis

1:4:6:4:1, Abb. 4.6 (A)). Im ENDOR-Spektrum sind fünf statt drei Hyperfeinkopplungen identifizierbar, wobei die Kopplungen von H5/H7 (siehe Kennzeichnung der Kopplungen in Abb. 4.6 (B)) nicht aufgelöst sind. Die Simulation des ENDOR- und EPR-Spektrums und ein Vergleich mit den experimentellen Spektren bestätigt aber eine Zuordnung von zwei leicht unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen, im EPR-Spektrum als Schultern auf den äußeren Linien zu erkennen. Die Simulation des EPR-Spektrums gestattet auch die Zuordnung der größten HFC zur Methylgruppe, da diese die oben erwähnte Quartettstruktur hervorrufen. Die zweitgrößte HFC, in Abb. 4.6 als

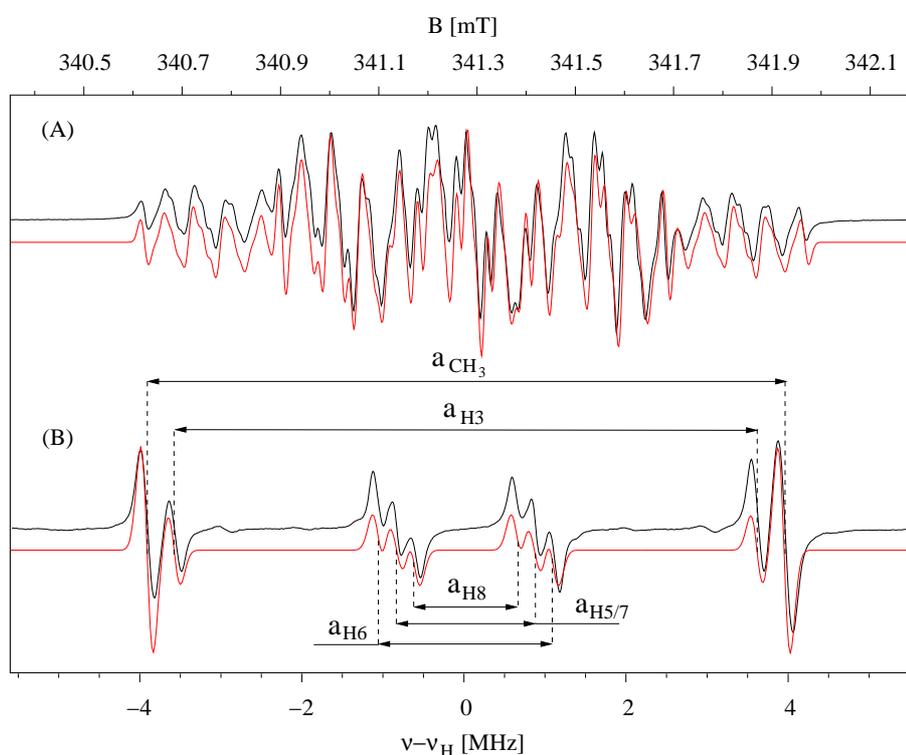
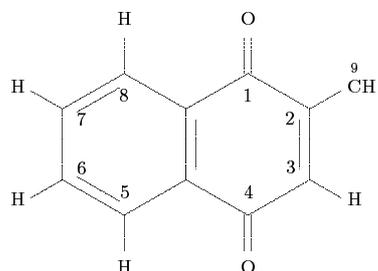


Abbildung 4.6: (A) EPR- und (B) ENDOR-Spektrum von Vitamin K₃^{•-} in IP, schwarz: Experiment, rot: Simulation, T = 250 K, P_{MW} = 0.5 mW, Mod.-Amp. = 0.1 G, t_c = 41 ms, t_{scan} = 41 s, 1024 Pkte., ENDOR: P_{MW} = 8 mW, P_{RF} = 70 W, Mod.-Hub = 100 kHz, t_c = 82 ms

a_{H3} gekennzeichnet, ist in Analogie zum Naphthochinon dem α -H an Position 3 zugeordnet. Die Zuordnung der kleineren Hyperfeinkopplungen zu den Molekülpositionen im annellierten Phenylring ist aus den Spektren nicht möglich. Die hier getroffene Zuordnung (in Klammern) basiert auf Hartree-Fock-MO- und DFT-Rechnungen [141]. Die ermittelten isotropen Hyperfeinkopplungen sind in Tab. 4.6 aufgeführt und stimmen gut mit Literaturdaten überein (siehe auch [145, 146]).

Tabelle 4.6: Isotrope Hyperfeinkopplungen von Vitamin $K_3^{\bullet-}$ (in MHz)

Pos.	9	3	6	7	5	8	Ref.
	+7.86	-7.20	(-2.15)	(-1.83)	(-1.61)	(-1.27)	hier
	+7.862	-7.192	-2.148	-1.812	-1.596	-1.272	[143]
	8.21	6.96	2.19 ^a	1.97 ^a	1.58 ^a	1.35 ^a	[147] ^b
	8.15	6.91	2.18	1.57	1.34	1.96	[148] ^c

^ain Ref. [147] keine Zuordnung der α -Protonen, hier nur in ihrer Größe passend zu den anderen Messungen geordnet

^bin n-Butanol

^cin EtOH

Das EPR-Spektrum von $VK_3^{\bullet-}$ in gefrorener Lösung ist unaufgelöst und unterscheidet sich nicht von dem Spektrum von $NQ^{\bullet-}$, daher ist es nicht abgebildet. Das ENDOR-Spektrum von $VK_3^{\bullet-}$ in gefrorener Lösung ist im Vergleich zum Spektrum von Naphthochinonanion durch das Aufheben der Molekülsymmetrie wesentlich komplizierter. Die vergleichbare Größe der HFC von Methylgruppe und α H3 führt zur Überlappung der Tensoren und erschwert eine Zuordnung der Hauptwerte. In Abb. 4.7 sind die Puls-ENDOR-Spektren von $VK_3^{\bullet-}$ in H- und d_1 -Isopropanol dargestellt. Hilfreich für die Zuordnung der HF-Tensoren ist auch hier die Messung im deuterierten Lösemittel. Sie ermöglicht die Identifizierung der Hyperfeinkopplung eines austauschbaren Protons und vereinfacht das ENDOR-Spektrum (B), sodaß große Hyperfeinkopplungen gut vom inneren Bereich (± 2 MHz) getrennt sind.

Der Vergleich der Puls-ENDOR-Spektren in protoniertem IP mit dem Spektrum in d_1 -IP zeigt eine Kopplung von axialer Symmetrie mit $A_{\parallel} = 5.60$ MHz und $A_{\perp} = -2.78$ MHz, die einer Wasserstoffbrücke zugeordnet wird (Simulation in Abb. 4.7 A, blau dargestellt).

Im Puls-ENDOR-Spektrum in d_1 -Isopropanol ist ein weiterer axialsymmetrischer Hyperfeintensor gut zu erkennen. Die Hauptwerte von $A_{\parallel} = 10.32$ MHz und $A_{\perp} = 6.24$ MHz ergeben eine isotrope Kopplung von $a_{iso} = 7.60$ MHz. Ein Vergleich mit den in flüssiger Lösung gemessenen Werten, die erkennbare Axialsymmetrie und die geringe Anisotropie des Hyperfeintensors rechtfertigen die Zuordnung zur Methylgruppe. Für eine schnell rotierende Methylgruppe ist ein axialer Hy-

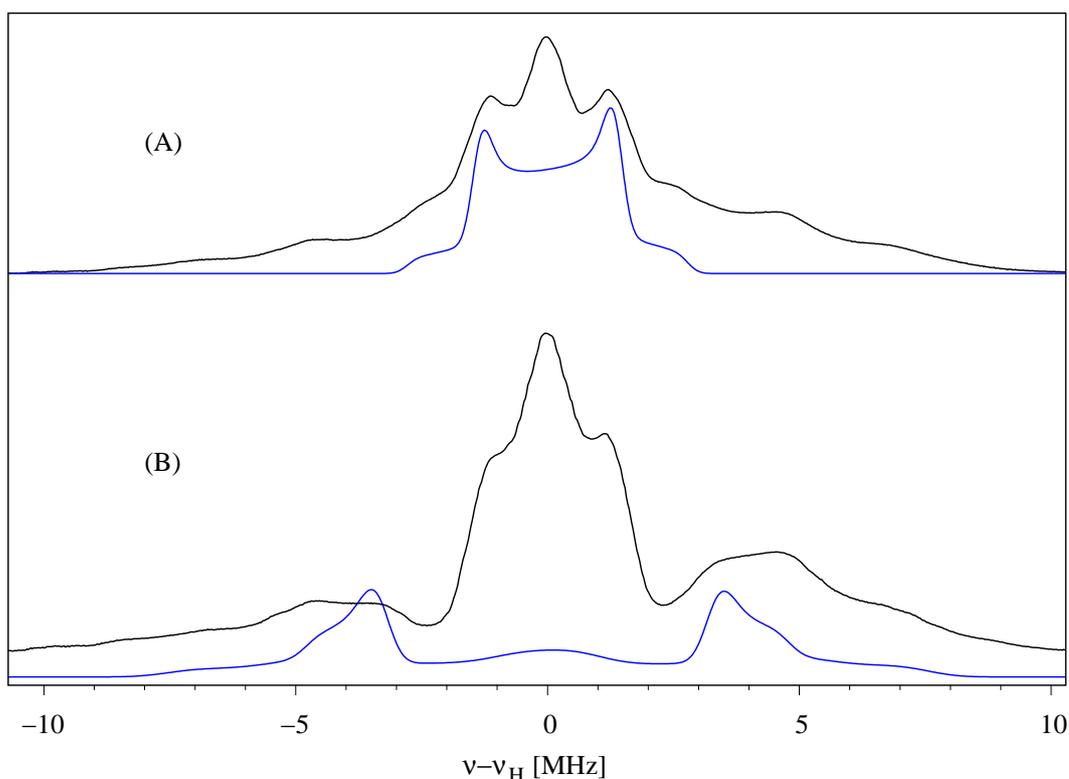


Abbildung 4.7: Davies-ENDOR Spektrum von $VK_3^{\bullet-}$ in gefrorener Lösung, (A) protoniertes IP schwarz: Experiment, blau: Simulation der H-Brücke (B) d_1 -deutertes IP, schwarz Experiment, blau Simulation von CH_3 -Gruppe und α -H an C-3, $T = 80$ K, Davies-ENDOR Sequenz wie in Kap. 3 beschrieben

perfeintensor zu erwarten [85, 149]. Die sonst vom Diederwinkel zum π -System des Chinonrings abhängigen Hyperfeinkopplungen der einzelnen Protonen werden über alle Orientierungen gemittelt, es sind nur noch die Komponenten senkrecht und parallel zur Bindungsachse beobachtbar.

Durch die Überlappung mit dem Hyperfeintensor der Methylgruppe ist die Zuordnung der HFC des α -Protons an C-3 erschwert. Es ist jedoch eine ähnliche Situation wie die der chinoiden α -Protonen im Naphthochinon zu erwarten. In den ENDOR-Spektren sind auch im Bereich von -8 bis -6 MHz und 6 bis 8 MHz die Abrißkanten eines stark anisotropen Tensors zu erkennen. In Analogie zum $NQ^{\bullet-}$ -Anion wird diese Komponente A_{xx} zugeordnet. Komponente A_{zz} ist mit $A_{||}$ der Methylgruppe überlagert. A_{yy} ist wie im Falle des $NQ^{\bullet-}$ -Anion im Matrixbereich von den α -Protonen des annellierten Phenylringes überlagert. Die Simulation der Methyl-HFC und des α -H an C-3 unter Verwendung eines spurlosen dipolaren Hyperfeintensors ist in Abb. 4.7 in blau dargestellt. Insgesamt erhält man einen weniger axialen Hyperfeintensor für das α -Proton als im Radikalanion des Naphthochinons. Die aus der Simulation erhaltenen Tensorhauptelemente sind in Tab. 4.7 aufgelistet. Die Diskrepanz zwischen den von MacMillan [143] gemessenen Kopp-

lungen des α -Proton an C-3 mit den hier und von Elsässer [145] aufgeführten Werten läßt sich darauf zurückführen, daß die von MacMillan verwendete cw-ENDOR Methode unempfindlicher für stark anisotrope Kopplungen ist als die hier und in [145] angewandte Puls-ENDOR Methode.

Tabelle 4.7: ^1H -Hyperfeinkopplungen von $\text{VK}_3^{\bullet-}$ (in MHz) in gefrorener Lösung (IP)

Position	A_x	A_y	A_z	a_{iso}	Referenz
9	10.32	6.24	6.24	7.60	hier
3	-15.00	(+2.10)	-9.60	-7.50	hier
H-Brücke	+5.60	-2.78	-2.78	0.01	hier
9	9.89	6.55	6.55	7.66	[143]
3	(-)11.23	–	(-)9.45		[143]
9	11.0	6.2	6.2	7.8	[145]
3	-14.9	+1.7	-9.3	-7.5	[145]
H-Brücke	+5.6	-2.8	-2.8	0	[145]

Q-Band-EPR an ^{17}O -markiertem VK_3

Die Messung der Hyperfeinkopplungen von ^{17}O an markiertem Vitamin K_3 ermöglichte die Abschätzung der Spindichte an den Carbonylsauerstoffatomen. Aufgrund eines Kernspins von $5/2$ sind 6 Übergänge im EPR-Spektrum zu erwarten. Abb. 4.8 zeigt die Q-Band-Spektren von selektiv markiertem $\text{VK}_3^{\bullet-}$. Der Anreicherungsgrad beträgt ca. 5 % (aus dem Integral der Spektren abgeschätzt). Die partielle Auflösung des \mathbf{g} -Tensors ist in Spektrum (A) zu erkennen. Während die g_{zz} -Komponente gut separiert ist, überlagern sich g_{xx} und g_{yy} . Der vergrößerte Ausschnitt von (A), Spektrum (B), zeigt eine sechsfache Aufspaltung von g_{zz} . Diese Hyperfeinaufspaltung kann der A_{zz} -Komponente des ^{17}O -Hyperfeintensors zu geordnet werden. Da die ungepaarte Spindichte des Semichinonanions im π -System des Chinons delokalisiert ist und die p_z -Orbitale der Carbonylsauerstoffe am π -System beteiligt sind, ist ein beträchtlicher Teil der Spindichte im p_z -Orbital zu erwarten. Daher ist A_{zz} die größte Tensorkomponente der ^{17}O -Hyperfeinkopplung. Eine Aufspaltung der g_{xx} - oder g_{yy} -Komponente ist nicht zu beobachten, daher kann aus der Linienbreite des Spektrums auf g_{xx}/g_{yy} abgeleitet werden, daß A_{xx} und A_{yy} kleiner als 8 MHz sind.

Die Simulation der ^{17}O -HFC erfolgte unter Annahme eines axialen ^{17}O -Hyperfeintensors. Das ist gerechtfertigt, wenn angenommen werden kann, daß die ungepaarte Spindichte hauptsächlich in einem axialsymmetrischen Orbital lokalisiert ist. Da es sich bei den Chinonradikalanionen um π -Radikale handelt, ist dies eine adäquate Näherung. Als Startwert in der Simulation für die isotrope Kopplung des ^{17}O -Hyperfeintensors wurde ein Mittelwert von -26 MHz aus einer Serie von Messungen an markierten Benzochinonanionradikalen gewählt (siehe [150]). Für die \mathbf{g} -Tensorhauptwerte wurden die für $\text{VK}_1^{\bullet-}$ in IP bestimmten Werte benutzt (Tab. 4.14), die im Rahmen der Meßgenauigkeit der Q-Band-Spektren nicht angepaßt werden mußten.

Ein bemerkenswertes Ergebnis der Simulation der Pulver-EPR-Spektren ist, daß unabhängig von der Substitutionsstelle die Hyperfeinparameter konstant sind. Die durch die Methylgruppe an C-2 eingeführte Asymmetrie wirkt sich also im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht auf die Spindichteverteilung an den Carbonylsauerstoffen aus. Bei einer möglichen Asymmetrie der Wasserstoffbrückenlängen oder ihrer Konformation (H-Brücke nicht mehr in der Ebene) im VK_3 wäre dies denkbar.

Aus dem rein dipolaren Anteil des ^{17}O -Hyperfeintensors (Tab. 4.8) läßt sich die Spindichte an den Carbonylsauerstoffen abschätzen. Für ein ^{17}O -Radikal mit einer Spindichte von eins im p_z -Orbital läßt sich ein axialer Hyperfeintensor mit $A'_{\parallel} = -288$ MHz und $A'_{\perp} = +144$ MHz berechnen [151]. Daraus ergibt sich eine Spindichte an den Carbonylsauerstoffen im Vitamin $\text{K}_3^{\bullet-}$ von $\rho_{\text{O}} = 0.19$. Über die A'_{zz} Komponente des dipolaren ^{17}O -Hyperfeintensors wurde die Spindichte auch in Benzochinon- und Durochinonradikalanion von MacMillan *et al.* [150] abgeschätzt, siehe Tab. 4.8. Die im Vergleich zum Benzosemichinonanion verringerte Spindichte am Sauerstoff im $\text{VK}_3^{\bullet-}$ ist

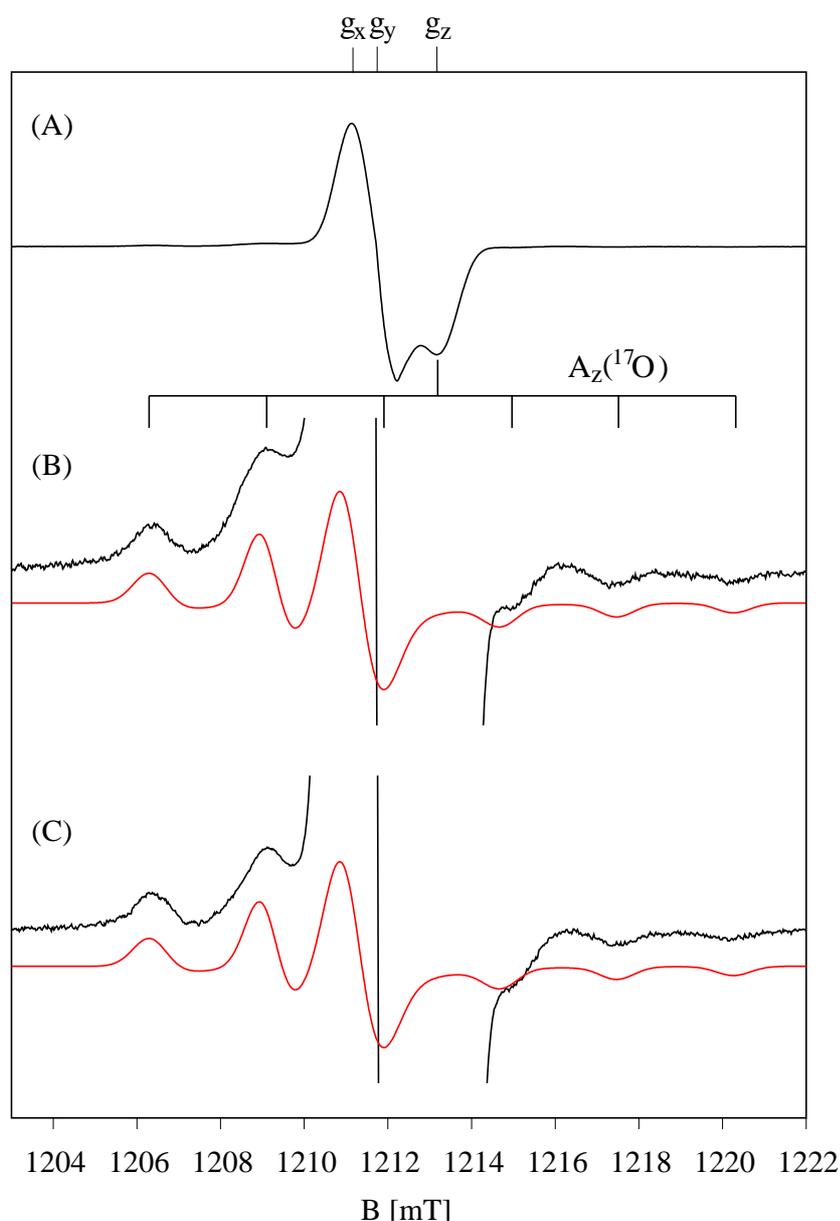


Abbildung 4.8: Q-Band EPR-Spektrum von selektiv ^{17}O -markiertem $\text{VK}_3^{\bullet-}$ in IP, (A) gesamtes Spektrum, an O-1 markiert, (B) Vergrößerung von (A), (C) an O-4 markiert (vergrößerter Ausschnitt), schwarz: Experiment, rot: Simulation der ^{17}O -HFC, $T=80\text{ K}$, $f = 34\text{ GHz}$, $P_{MW} = 5\ \mu\text{W}$, Mod.-Amp. = 5 G , $t_c = 40\text{ ms}$, $t_{scan} = 42\text{ s}$, 1024 Pkte.

auf die Delokalisierung in den annellierten Phenylring zurückzuführen. Die überraschende Verringerung der p_z -Spindichte im Durochinonanion kann an der besonderen Bindungsorientierung der H-Brücken im Durochinon liegen, so argumentierten MacMillan *et al.* [150]. Die durch die sperrigen Methylsubstituenten aus der Chinonebene gedrehten H-Brückenbindungen könnten zu

einer Umverteilung der Spindichte am Sauerstoff in andere Orbitale führen und daher A'_{zz} reduzieren. Dieser Effekt wird hier nicht beobachtet, sonst wäre eine kleinere ^{17}O -HFC im Falle des an O-1 markierten $\text{VK}_3^{\bullet-}$ zu erwarten. Die sterische Hinderung der H-Brücken durch die Protonen H5/H8 des annellierten Ringes ist also nicht so groß wie die einer Methylgruppe in α -Position zum Carbonylsauerstoff und führt nicht zu einer Umorientierung der H-Brücken. Dieses Ergebnis konnte auch durch DFT-Rechnungen bestätigt werden (Kap. 5.1).

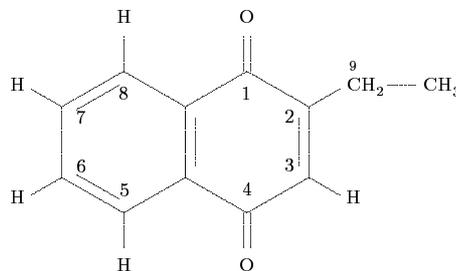
Aus der Unabhängigkeit der ^{17}O -HFC von der Lage der Methylsubstitution wird geschlossen, daß Seitenketten am Chinonring die Carbonylspindichten nicht beeinflussen. Daher wird diese Spindichte auch für die anderen hier untersuchten Chinone verwendet. Mit der Spindichte am Carbonylsauerstoff lassen sich die Längen der Wasserstoffbrücken aus den dipolaren Anteilen der Hyperfeinkopplungen nach dem Punkt-Dipol-Modell (Gl. 2.11 in Kap. 2.2.1) abschätzen. Dies wird für alle untersuchten Chinone in Abs. 4.2.5 behandelt.

Tabelle 4.8: ^{17}O -Hyperfeinkopplungen (in MHz) und Spindichten von Benzochinon, Durochinon und Vitamin $\text{K}_3^{\bullet-}$

Chinon	A'_{xx}	A'_{yy}	A'_{zz}	a_{iso}	ρ_{O}	Ref.
Vitamin K_3	27.5	27.5	-55	-23	0.19	hier
Benzochinon			-66	-26	0.22	[150]
Durochinon			-55	-26	0.19	[150]

4.2.3 2-Ethyl-naphthochinon

Im 2-Ethyl-naphthochinon (EthNQ) ist durch die Substitution der Methylgruppe keine neue Asymmetrie eingeführt worden. Trotzdem wirkt sich die Ethylgruppe auf die Form des EPR-Spektrums (Abb. 4.9 A) aus. Das Spektrum hat sich durch zwei sehr ähnliche Hyperfeinkopplungen für die Methylenprotonen an C-9 und das α -Proton an C-3 scheinbar vereinfacht.



Das ENDOR-Spektrum in Abb. 4.9 B zeigt diese zwei überlappenden großen Hyperfeinkopplungen im Bereich von 7 MHz. Weiterhin sind vier kleine Kopplungen unterscheidbar, die den α -Protonen im annellierten Phenylring zuzuordnen sind. Da alle Hyperfeinkopplungen jeweils dicht beieinander liegen, konnte durch General TRIPLE in keine Linie separat eingestrahlt und somit keine Zuordnung der großen Kopplungen zu den Molekülpositionen 2 oder 3 getroffen werden. Dies gelang mit an Position C-9 selektiv deuteriertem EthNQ.

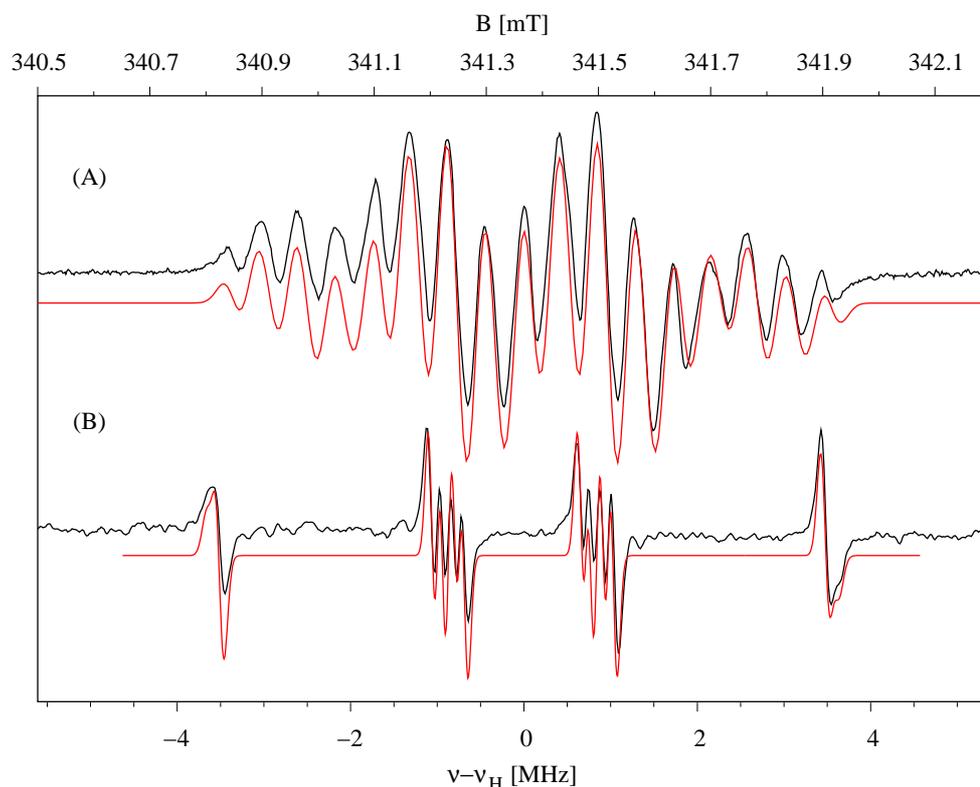
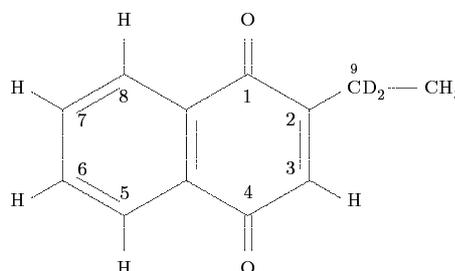


Abbildung 4.9: (A) EPR- und (B) ENDOR-Spektrum von 2-Ethyl-naphthochinon $^{\bullet-}$ in IP, schwarz: Experiment, rot: Simulation, $T = 270$ K, $P_{MW} = 0.5$ mW, Mod.-Amp. = 0.1 G, $t_c = 41$ ms, $t_{scan} = 41$ s, 1024 Pkte., ENDOR: $P_{MW} = 4$ mW, $P_{RF} = 70$ W, Mod.-Hub = 50 kHz, $t_c = 82$ ms

2-Ethyl(d₂)naphthochinon

Durch die selektive Deuterierung an C-9 verringert sich die Kopplung im EPR-Spektrum ($\gamma_H/\gamma_D = 6.51$), sie verschiebt sich im ENDOR-Spektrum zur Larmorfrequenz des Deuterons ($\nu_D = 2.25$ MHz bei 345 mT). Schon im EPR-Spektrum (Abb. 4.10 A) ist die Deuterierung deutlich. Nur noch das Dublett des α -Protons ist als größte Kopplung aufgelöst. Das ENDOR-Spektrum in flüssiger Lösung zeigt das Verschwinden der HFC bei 6.99 MHz und komplementär dazu eine Kopplung von 1.029 MHz im Deuteriumbereich (Einschub in Abb. 4.10, welche einer ^1H -Hyperfeinkopplung von 6.70 MHz entspricht). Zur Verdeutlichung ist der hochfrequente Teil aus dem ENDOR-Spektrum von 2-EthNQ $^{\bullet-}$ in blau eingblendet. Die Hyperfeinkopplung von 6.99 MHz kann den Methylenprotonen im Ethylrest zugeordnet werden.



Bei Vergleich mit den Hyperfeinkopplungen im Vitamin K₃ $^{\bullet-}$ ist mit Ausnahme der β -Protonen

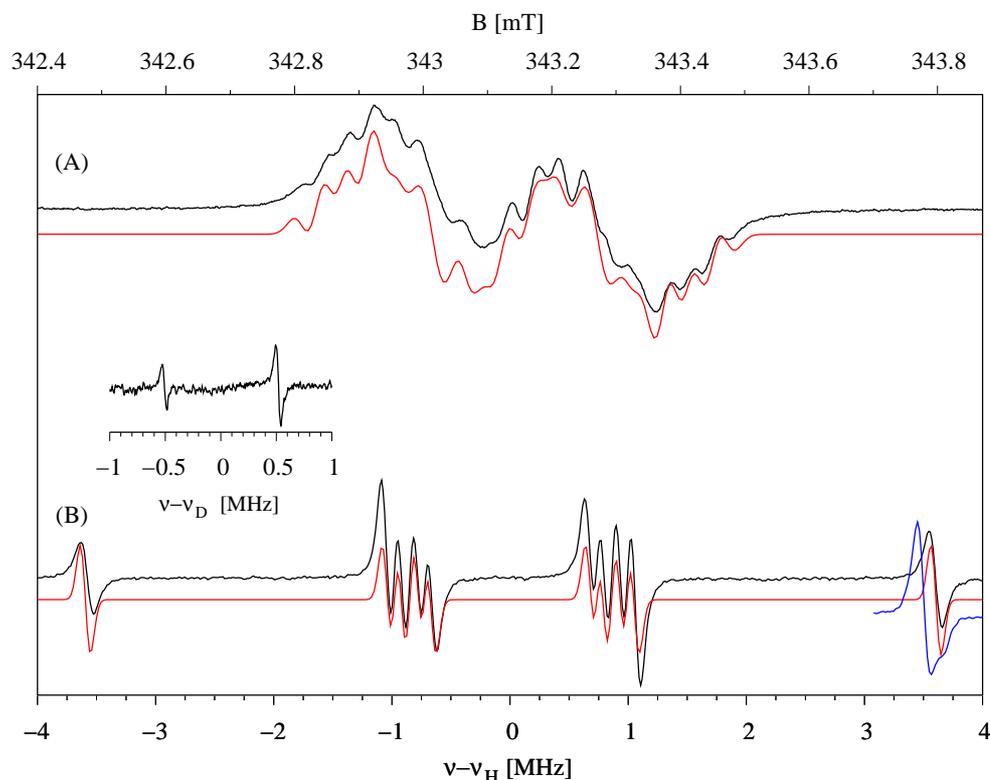


Abbildung 4.10: (A) EPR- und (B) ENDOR-Spektrum von 2-Ethyl(d₂)naphthochinon $^{\bullet-}$ in IP, Parameter wie in Abb. 4.9, schwarz: Experiment, rot: Simulation, blau: hochfrequenter Teil des ENDOR-Spektrums aus Abb. 4.9, linker Einschub: Deuteriumbereich

des Ethylrestes Übereinstimmung festzustellen. Die Spindichteverteilung hat sich demnach durch die Substitution nicht geändert. Die kleinere Kopplung der Methylenprotonen bedeutet wahrscheinlich ein „Abfließen“ von Spindichte in den längeren Rest in 2-EthNQ^{•-}. Es konnte jedoch keine kleinere Kopplung von einem γ -Proton detektiert werden.

Tabelle 4.9: Isotrope Hyperfeinkopplungen von 2-EthNQ^{•-} (MHz), gemessen in flüssigem Isopropanol

Position	C-3	C-9	α -H	α -H	α -H	α -H
a_{iso} (H)	-7.20	+6.99	-2.09	-1.85	-1.57	-1.35
a_{iso} (D)	1.029					

Die cw-ENDOR-Spektren von 2-EthNQ^{•-} und d₂-2-EthNQ^{•-} in gefrorenem IP sind in Abb. 4.11 dargestellt. Die β -Methylenprotonen zeigen keinen der Methylgruppe im VK₃ vergleichbaren axialen Hyperfeintensor, die Rotation der Ethylgruppe ist eingefroren. Im Spektrum des 2-EthNQ^{•-} ist dennoch eine klar zu unterscheidende Struktur im Bereich von (-)1.5-3 MHz zu erkennen, welche nicht im Spektrum des partiell deuterierten Chinonanions zu sehen ist. Wenn der Ethylrest in gefrorener Lösung keine bevorzugte Konformation einnimmt, so wären durch das Einfrieren des Ethylrestes in allen möglichen Orientierungen die Kopplungen über das gesamte Spektrum verteilt und nicht mehr sichtbar. Das scheint hier nicht der Fall zu sein.

Das in Abb. 4.11 (C) gezeigte Differenzspektrum kann so interpretiert werden, daß die beiden erkennbaren Kopplungen der A_{\perp} - und der A_{\parallel} -Komponente eines axialen Hyperfeintensors zugeordnet wird. Aus $A_{\perp} = 2.8$ MHz und $A_{\parallel} = 5.6$ MHz ergibt sich eine isotrope Kopplung von 3.7 MHz. Aufgrund der Abhängigkeit der isotropen Kopplung der β -Protonen vom Winkel zwischen der C-H-Achse und dem π -Orbital des aromatischen Ringkohlenstoffs läßt sich die Orientierung des Ethylrestes bestimmen:

Für die frei rotierende Ethylgruppe wurde eine isotrope Kopplung von 6.99 MHz bestimmt (Tab. 4.9). Über alle Orientierungen mittelt sich die Winkelabhängigkeit eines β -Protons (Heller-McConnel-Gleichung, Gl. 2.14 in Kap. 2.2.1) zu 1/2. Die maximale zu erwartende Hyperfeinkopplung für die β -Protonen in 2-EthNQ^{•-} wäre demnach 13.98 MHz (bei einer Konformation eines Protons senkrecht zur Chinonebene). Mit der aus dem Differenzspektrum in Abb. 4.11 bestimmten isotropen Kopplung erhält man einen Winkel $\theta = 59^{\circ}$, was eine Konformation des Ethylrestes senkrecht zur Chinonebene bedeutet (vgl. Abb. 4.12 links).

Ein „Einfrieren“ der Rotation des Isoprenylrestes wurde von Zheng *et al.* [152] am Plastochinon-9-Radikalanion schon in flüssiger Lösung berichtet. Dort wurde ein axialer Hyperfeintensor den β -Methylen-Protonen in einer Konformation des Isoprenylrestes in der Ebene des Chinonrings

zugeordnet. Diese spezielle Konformation wurde mit der geringen sterischen Hinderung durch das α -Proton an der benachbarten C-3 Position begründet.

Gardiner *et al.* [153] berichteten für das Menachinon(4)anionradikal in gefrorener Lösung auch eine definierte Orientierung, hier jedoch steht die Kette des Restes senkrecht zur Ringebene. Das ist in Übereinstimmung mit der Argumentation von Zheng *et al.* [152], da C-3 im Menachinon(4) durch eine Methylgruppe substituiert ist. Folgt man dieser Interpretation, so sollten die bevorzugten Konformationen des Ethylrestes im 2-Ethyl-NQ senkrecht zur oder in der Chinonebene sein (Abb. 4.12). Himo *et al.* [154] berechneten mit DFT-Methoden die Energie von verschiedenen substituierten Chinonen bei Rotation ihres Restes an C-2. Sie stellten fest,

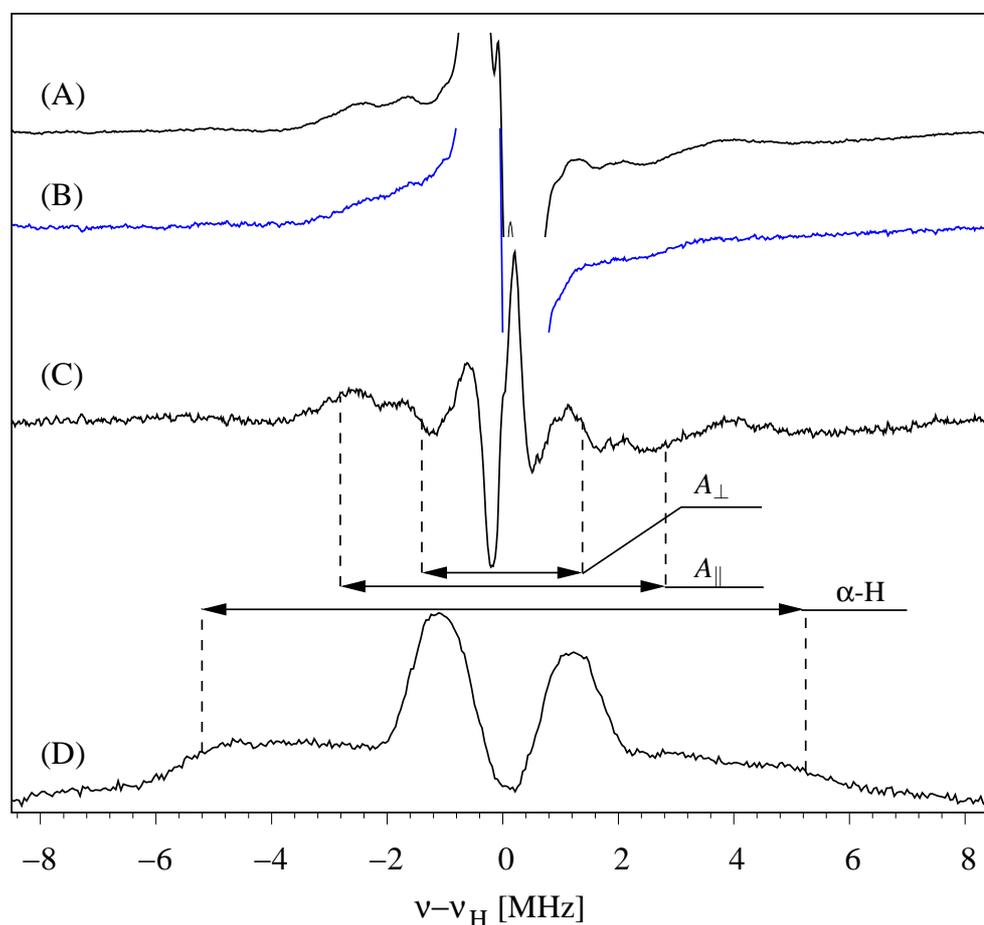


Abbildung 4.11: cw- und Puls-ENDOR Spektren von 2-EthNQ \bullet^- in H-Isopropanol, (A) C₂H₅-2-EthNQ \bullet^- , (B) CD₂CH₃-2-EthNQ \bullet^- , (C) Differenz, markiert ist der axiale HF-Tensor der β -CH₂-Protonen, (D) Puls-ENDOR Spektrum von 2-EthNQ \bullet^- , markiert ist die größte Tensorkomponente des α -H an C-3; A, B: T = 150 K, P_{MW} = 10 mW, P_{RF} = 70 W, Mod.-Hub = 100 kHz, t_c = 82 ms, 1024 Pkte., D: Davies-ENDOR, 80 K

daß für am benachbarten C-Atom substituierte Chinone die Konformation mit der Kette an C-2 senkrecht zur Chinonebene energetisch am günstigen ist. Für an C-3 unsubstituierte Chinone gibt es hingegen auch ein lokales Minimum für die Konformation des Restes in Ebene liegend (Abb. 4.12 rechts).

Abschließend muß darauf hingewiesen werden, daß die direkte Identifizierung der β -CH₂-Protonen von substituierten Naphthochinonen in Anbetracht der hier beobachteten Linienintensitäten erschwert sein wird. Der im Differenzspektrum in Abb. 4.11 den β -CH₂-Protonen zugeordnete Tensor weist, wie anfangs schon erwähnt wurde, nicht die typische Intensität eines axialen Tensors auf, die HFC-Komponenten zeigen eine höhere Linienbreite als beispielsweise die der Methylgruppe in VK₃. Beide Effekte lassen sich auf die hohe Empfindlichkeit der HFC vom Diederwinkel zum π -System im Bereich von 60° zurückführen. Schon der hier festgestellte geringe Unterschied der beiden β -Protonen von 2° bedeutet einen Unterschied in ihrer isotropen Kopplung von 0.4 MHz. Im Fall des Vitamin K₁^{•-} zum Beispiel konnten die β -CH₂-Protonen des Phitylrestes nicht identifiziert werden, (siehe Kap. 4.2.4).

Der Hyperfeintensor des α -Protons konnte nicht in den cw-ENDOR-Spektren identifiziert werden. In einem mit Davies-ENDOR aufgenommenem Spektrum (nicht abgebildet) konnte die größte Tensorkomponente (11 MHz) eines stark anisotropen Hyperfeintensors detektiert werden, welche in Analogie zu den bisher diskutierten Chinonen einem α -Protons zugeordnet wird (Tab. 4.10).

d₁₀-2-EthNQ^{•-} Die Messung von volldeutertem d₁₀-2-EthNQ^{•-} in H-Isopropanol liefert exklusiv die Hyperfeinkopplungen der Wasserstoffbrücken. Das ENDOR-Spektrum in Abb. 4.13 (B) weist einen axialsymmetrischen Tensor auf. Übernimmt man die in der Abbildung im cw-ENDOR Spektrum angedeuteten Werte, so erhält für A_{\parallel} = 4.60 MHz und für A_{\perp} = 0.75 MHz. Das entspricht einer isotropen Hyperfeinkopplung von +1.03 MHz. Dieser Wert ist für eine Wasserstoffbrücken-HFC ungewöhnlich groß, besonders im Vergleich mit der Wasserstoffbrücke im Vitamin K₃, wo ein rein dipolarer Tensor mit verschwindend geringer isotroper Kopplung von a_{iso} = 0.01 MHz gemessen wurde (Tab. 4.7 in Kap. 4.2.2). Allerdings sind die angegebenen Tensorkomponenten von d₁₀-2-EthNQ^{•-} für eine Wasserstoffbrücke mit definierter Orientierung zu breit (ΔA_{\parallel} = 3.2 MHz, ΔA_{\perp} = 1.8 MHz). Im Naphthochinonanionradikal weist die H-Brücke eine Linienbreite für A_{\perp} = 0.5 MHz und für A_{\parallel} = 1 MHz auf. Offenbar liegen im 2-EthNQ^{•-}, bedingt durch die längere Kette



Abbildung 4.12: Konformationen der Seitenkette im Chinon senkrecht zur und in der Molekülebene

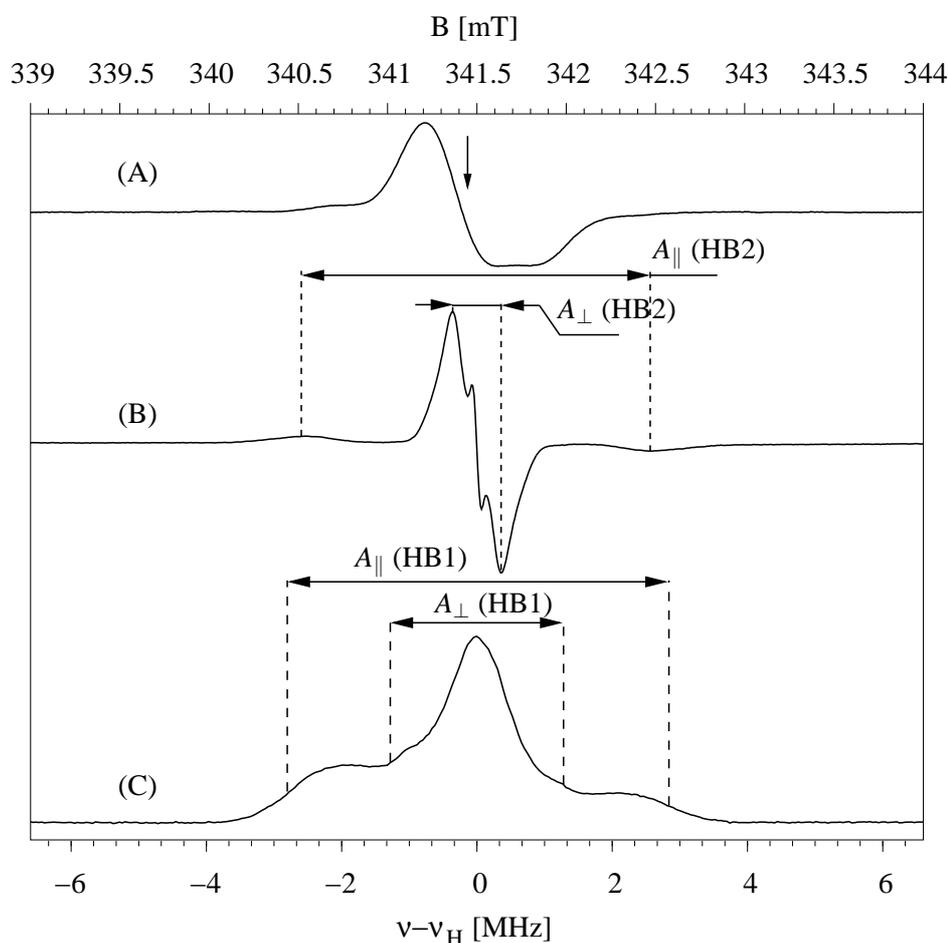


Abbildung 4.13: cw-EPR-, cw-ENDOR und Puls-ENDOR Spektrum von d_{10} -2-EthNQ \bullet^- in H-Isopropanol, (A) cw-EPR, (B) cw-ENDOR, (C) Puls-ENDOR, Feldposition für ENDOR in (A) mit Pfeil markiert, die A_{\perp} - und A_{\parallel} -Komponenten der zwei H-Brücken sind in (B) und (C) gekennzeichnet; (B): $P_{MW}=10$ mW, $P_{RF} = 70$ W, Mod.-Hub = 100 kHz, $t_c = 82$ ms, 1024 Pkte., (C): Davies-ENDOR, 80 K

an C-2, H-Brücken verschiedener Länge und Orientierung vor. Die Ethylgruppe an C-2 verhindert die Ausbildung einer H-Brücke in der Chinonebene und führt zu einer längeren Bindung. MacMillan *et al.* [150] haben die Ausbildung solcher H-Brücken an substituierten Benzochinonen untersucht und Hyperfeintensoren mit einem signifikanten Anteil isotroper Kopplung nachgewiesen. Dieser Anteil isotroper Kopplung wurde einer aus der Chinonebene gedrehten Wasserstoffbrücke zugewiesen. Eine derartige Situation ist im 2-EthNQ \bullet^- auch denkbar. Es lassen sich allerdings nicht zwei definierte unterschiedliche H-Brücken im Spektrum festlegen, eher liegt eine Verteilung von Wasserstoffbrücken vor. Ein mittels Puls-ENDOR aufgenommenes ENDOR-Spektrum (Abb. 4.13 (C)) wies eine bessere Auflösung auf. Hier konnte klar eine weitere Wasserstoffbrücke

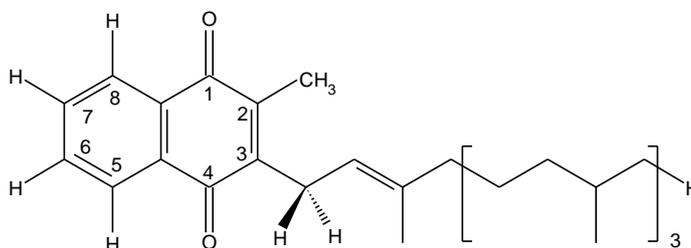
Tabelle 4.10: Hyperfeinkopplungen von 2-EthNQ \bullet^- (MHz) in gefrorener Lösung

Position	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	$\frac{1}{3}\text{Tr}(\mathbf{A})$
9	5.6	2.8	2.8	3.7
3	11	n. d.	n. d.	
H-Brücke-1	5.60	-2.60	-2.60	0.13
H-Brücke-2	4.60	-0.75	-0.75	1.03

zugeordnet werden. Eine Zusammenfassung der in 2-EthNQ \bullet^- detektierten Kopplungen ist in Tab. 4.10 zu finden.

4.2.4 2-Methyl-3-Phytylnaphthochinon (Vitamin K₁)

2-Methyl-3-Phytyl-Naphthochinon (oder auch Phyllochinon) ist der höchstsubstituierte Vertreter unter den hier untersuchten Chinonen. An Stelle des α -Protons an C-2 im Vitamin K₃



ist ein Phytylrest gebunden. Die zu erwartenden 192 HF-Kopplungen sind im EPR-Spektrum nicht mehr aufgelöst, es sind noch 21 Komponenten zu erkennen (Abb. 4.14 oben). Im cw-

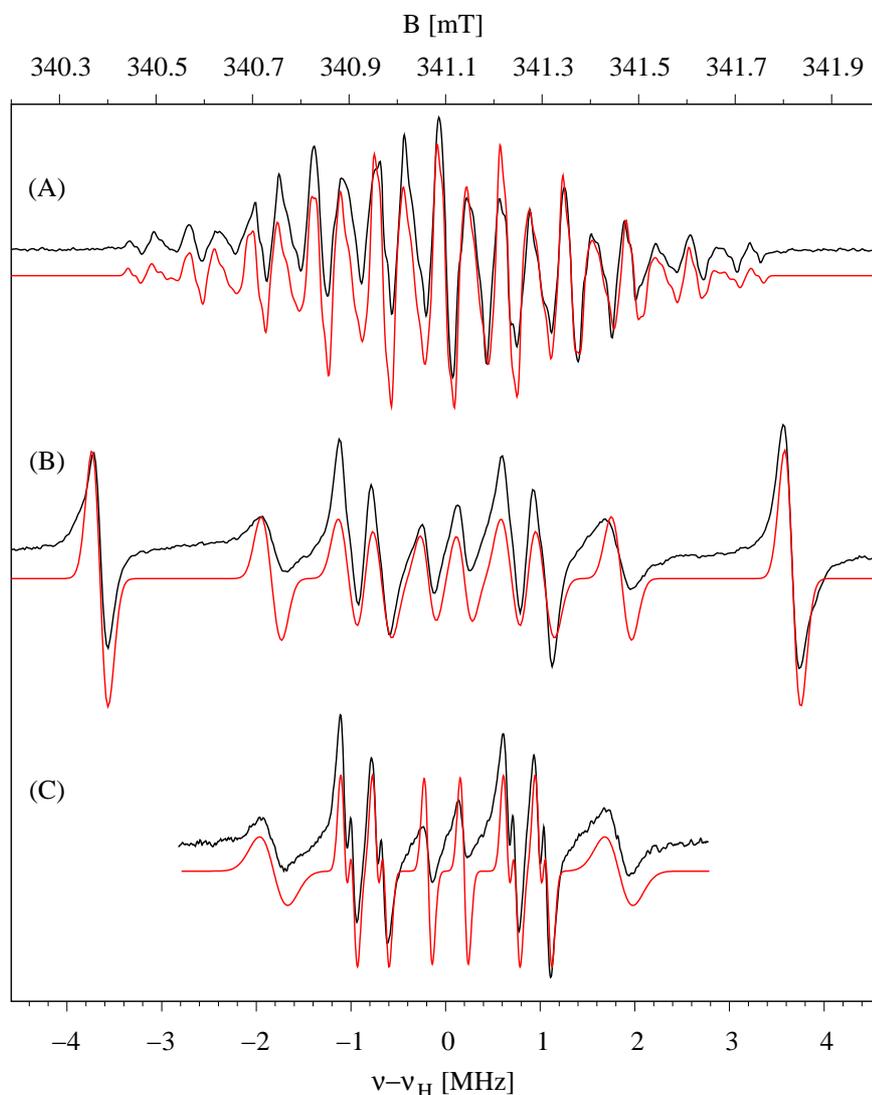


Abbildung 4.14: (A) EPR- und (B),(C) ENDOR-Spektrum von $K_1^{\bullet-}$ in IP, schwarz: Experiment, rot: Simulation, (A) $P_{MW}=0.5$ mW, Mod.-Amp. = 0.1 G, $t_c = 41$ ms, $t_{scan} = 41$ s, 1024 Pkte., (B): $P_{MW} = 4$ mW, $P_{RF} = 70$ W, Mod.-Hub = 50 kHz, $t_c = 82$ ms, (C): wie (B) nur Mod.-Hub = 25 kHz, Simulation der Methylenprotonen mit größerer Linienbreite (50 kHz)

ENDOR Spektrum werden sieben Kopplungen detektiert, die sehr ähnlichen Kopplungen der α -Protonen vom annellierten Phenylring sind bei geringerer Modulationsamplitude aufgelöst (Abb. 4.14 unten). Abb. 4.15 zeigt cw-ENDOR-Spektren bei zwei verschiedenen Temperaturen. Die Kopplung von 3.64 MHz weist eine ausgeprägte Abhängigkeit der Linienbreite von der Temperatur auf. Das ist ein Beispiel dafür, daß ENDOR-Spektroskopie nicht nur statische molekulare Eigenschaften detektiert, sondern auch Einblicke in Molekulardynamik liefern kann. Die Phytlykette des Vitamin K_1 rotiert bei 280 K so schnell, daß ein schnelles Ausmitteln der magnetisch inequivalenten β -CH₂-Protonen eintritt. Bei Abkühlen der Temperatur unter 270 K beginnt die Hyperfeinkopplung aufzuspalten. Durch die Zunahme der Viskosität des Solvens verlangsamt sich die Rotation und das „slow-motion limit“ wird erreicht. Dieser Effekt wurde von Das *et al.* [148] für VK₁ als alternierender Linienbreiteneffekt in der EPR festgestellt, für Ubichinon konnten Das *et al.* [148] und Feher *et al.* [155] eine ähnliche temperaturabhängige Dynamik mittels ENDOR-Spektroskopie beobachten.

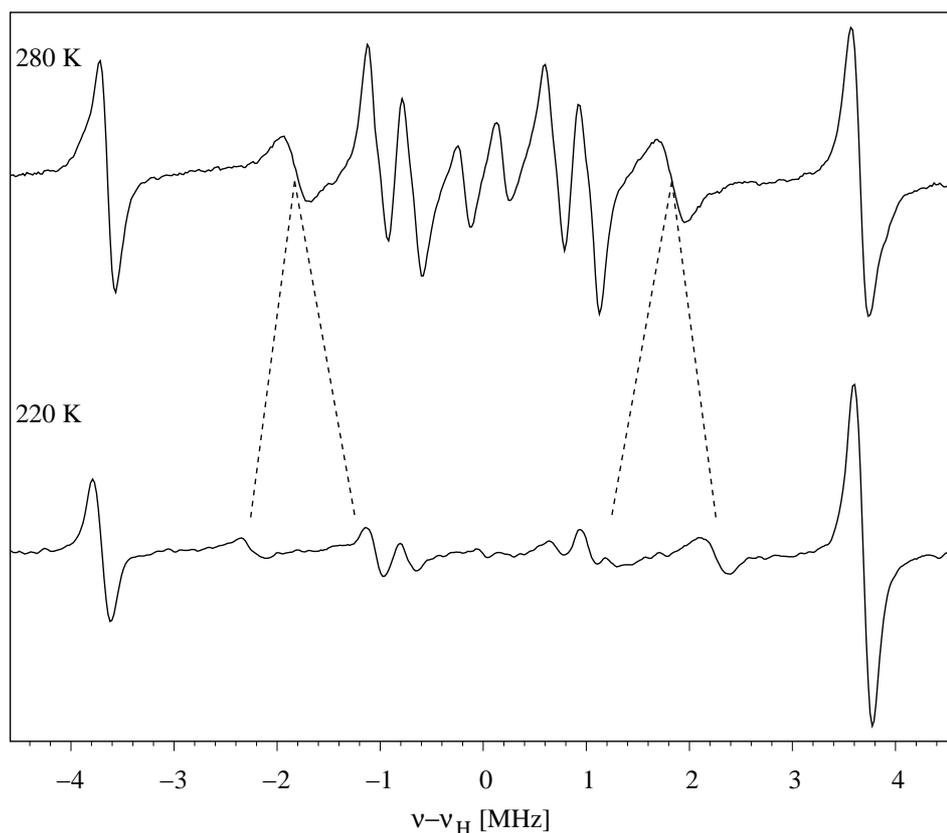


Abbildung 4.15: cw-ENDOR-Spektren von Vitamin $K_1^{\bullet-}$ bei zwei verschiedenen Temperaturen

Die kleinste HF-Kopplung von 0.38 MHz wird dem γ -Proton im Phytlyrest zugeordnet, was durch die mit DFT-Rechnungen ermittelten Spindichten (Kap. 5.1) bestätigt werden kann. Die Zuord-

nung der HF-Kopplungen wurde mit Hilfe der durchgeführten DFT-Rechnungen getroffen und ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten [143, 145, 156]. Ein weiterer Test für die Richtigkeit der Zuordnung ist auch hier die Simulation des EPR-Spektrums. Die ermittelten HF-Kopplungen und ein Vergleich mit Literaturwerten sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Die von Bowman *et al.* [147] angegebene Zuordnung für die Methylgruppe und die β -CH₂-Protonen weicht von der hier und von der in anderen Referenzen getroffenen ab. Der Wechsel des Lösemittels von Isopropanol zu n-Butanol müßte demnach aus unbekanntem Ursachen eine drastische Umverteilung der Spindichte im Chinonring verursachen. Wie im nächsten Kapitel gezeigt wird, kann eine solche Spindichtverschiebung selbst bei einem Wechsel zu Ethern als Lösemittel nicht beobachtet werden. Die in Kap. 5.1 dargestellten DFT-Rechnungen an 2-Methyl-3-Propenyl-Naphthochinon als Modell für Vitamin K₁ stützen im Übrigen die hier getroffene Zuordnung.

Tabelle 4.11: Hyperfeinkopplungen von Vitamin K₁^{•-} (MHz), gemessen in flüssiger Lösung, protisches Lösemittel

Ref.	CH ₃	CH ₂	H-6	H-7	H-8	H-5	γ -H
hier (IP, 280 K)	+7.32	+3.65	-2.15	-1.96	-1.48	-1.29	-0.38
hier (IP, 220 K)		4.52/2.47					
[143] (IP, 263 K)	7.282	3.701	2.162	1.946	1.309	1.466	0.366
[156] (IP, 273 K)	7.273	3.711	2.124	1.993	1.135	1.528	-
[145] (IP, 280 K)	7.32	3.7	2.17	1.96	1.27	1.48	0.38
[147] (n-ButOH, RT)	5.84 ^a	6.26/2.88 ^a	2.23 ^b	1.83 ^b	1.13 ^b	0.34 ^b	-

^awahrscheinlich fehlzugeordnet

^bin Ref. [147] keine Zuordnung der HFC zu den Molekülpositionen

Abb. 4.16 zeigt die ENDOR-Spektren von $VK_1^{\bullet-}$ in gefrorenem d_8 -Isopropanol. Es wurde versucht, mittels Orientierungsselektion die einander überlagernden Tensoren zu entwirren und durch Simulation der ENDOR Spektren zuzuordnen. Dazu wurde der im W-Band ermittelte g -Tensor von $VK_1^{\bullet-}$ in Isopropanol verwendet (Tab. 4.14) und die restliche Linienbreite durch eine Gaußlinienform berücksichtigt.

Im X-Band reicht die g -Anisotropie nicht aus, um eine vollständige Selektion der Hyperfeintensorhauptwerte zu erreichen. Die g -Anisotropie beträgt im X-Band 6.1 G/17.2 MHz ($\Delta g_{xx-zz} = 3.55 \cdot 10^{-3}$, siehe Tab. 4.14 für im W-Band ermittelte g -Tensorhauptwerte), wobei die spektrale Trennung von g_{xx} zu g_{yy} 1.3 G (3.6 MHz) und von g_{yy} zu g_{zz} 4.8 G (13.5 MHz) beträgt. Bei einer maximalen Hyperfeinkopplung von 9.8 MHz (siehe Spektrum B in Abb. 4.16) reicht gerade noch die spektrale Trennung zwischen g_{yy} und g_{zz} aus, um auf g_{zz} teilweise eine Orientierungsselektion in bezug auf das g -Hauptachsensystem zu erreichen.

Berücksichtigt man, daß auf Feldposition A in Abb. 4.16 sowohl A_{xx} als auch A_{yy} zum ENDOR-Spektrum beitragen, so lassen sich die Hyperfeinkopplungen den α -Protonen H6/H7, H5/H8 und der Methylgruppe zuordnen. Die α -Protonen lassen sich aufgrund ihrer sehr ähnlichen isotropen Kopplung nur paarweise zuordnen. Die HFC's der Protonen H5/H8 weisen wie die α -Protonen H2/H3 im Naphtochinon eine axiale Verzerrung des Hyperfeintensors durch die Nähe zum Carbonylsauerstoff auf. Die α -Protonen H6/H7 haben A-Hauptwerte analog denen eines \bullet CH-Fragmentes. Eine Zuordnung der β -CH₂-Protonen konnte nicht getroffen werden. Das liegt einerseits daran, daß die wahrscheinlich günstigste Konformation des Phitylrestes senkrecht zur Ebene ist, wie für 2-Ethyl-naphthochinon festgestellt werden konnte (siehe Abschn. 4.2.3). Bedingt durch die große Empfindlichkeit der isotropen Kopplung der β -CH₂-Protonen in einem Diederwinkelbereich um 60° zur Chinonebene genügen schon geringe Konformationsunterschiede der Seitenkette, um zur Verbreiterung der Linien zu führen.

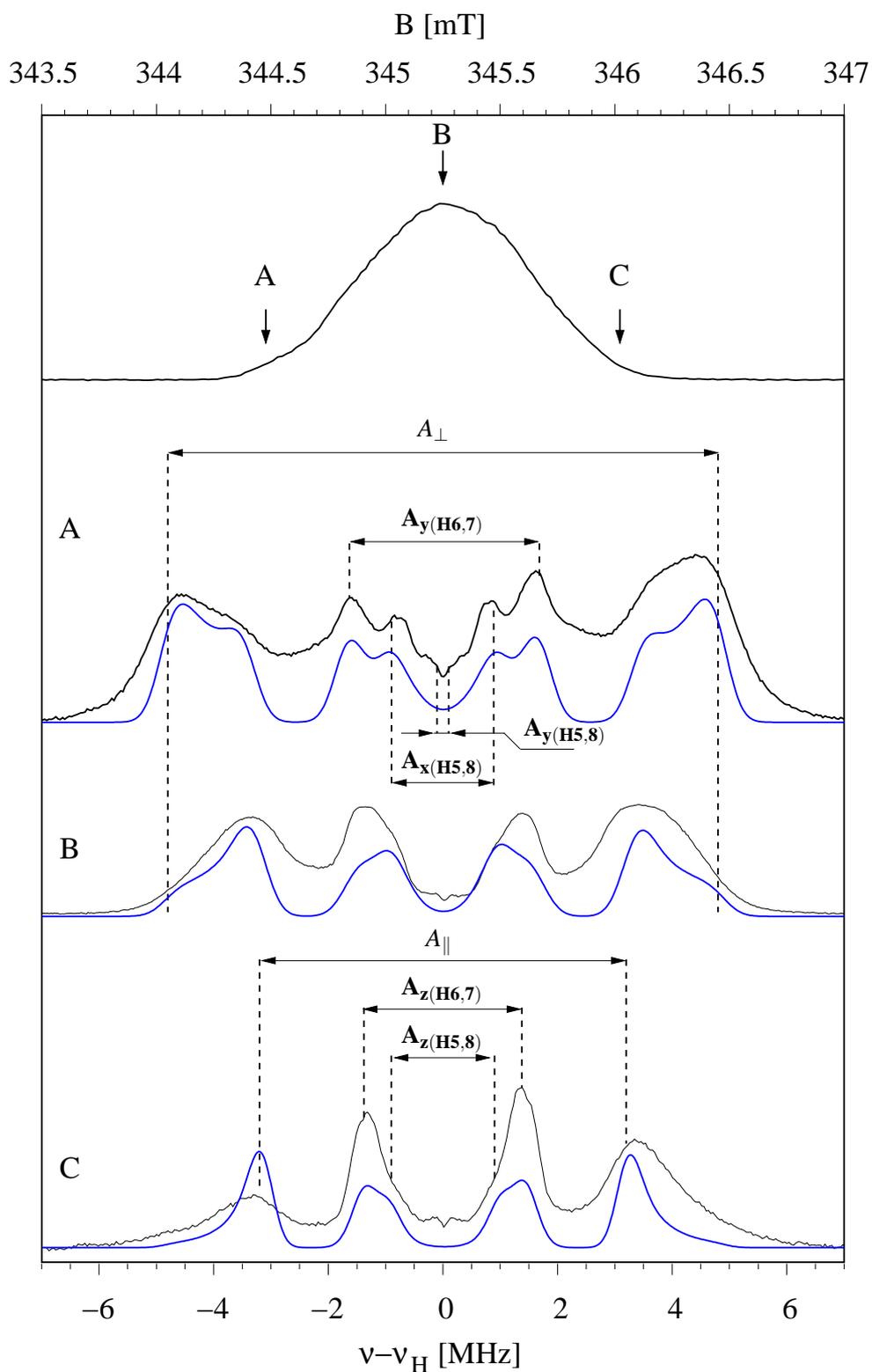


Abbildung 4.16: Puls-EPR- und ENDOR-Spektren von $VK_1^{\bullet-}$ in gefrorenem d_8 -IP; A: Orientierungsselektion auf g_{xx}/g_{yy} ; B: Pulvermittel aller Orientierungen; C: Orientierungsselektion auf g_{zz} ; schwarz: Experiment; blau: Simulation der Methylgruppe und der α -Protonen

Abb. 4.17 zeigt die Puls-ENDOR-Spektren von $VK_1^{\bullet-}$ in protoniertem IP an selektierten Feldpositionen. Um die Kopplungen der Wasserstoffbrückenprotonen mit dem Molekül zu identifizieren, sollte das gleiche Verfahren wie für die Bestimmung der HFC's der Molekülprotonen angewandt werden. Erschwert wurde die Identifizierung der H-Brücke durch die Überlappung der HFC's mit den α -Protonenkopplungen. Die unterschiedliche Substitution an C-2 und C-3 wie im Fall des EthNQ sollte im VK_1 auch zu mehreren unterscheidbaren Wasserstoffbrücken führen. Es konnte jedoch nicht mehr als eine Wasserstoffbrücke zugeordnet werden. Eine solche Situation, in der verschiedene H-Brücken zum Vitamin K_1 vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Überlappung mit den anderen Kopplungen, insbesondere im Matrixbereich gestattete jedoch nicht die Zuordnung einer zweiten A_{\perp} -Komponente. Die in den Spektren in Abb. 4.17 zugeordnete A_{\parallel} -Komponente weist allerdings eine große Linienbreite auf, unter der sich zumindest eine Verteilung von HFC's verbergen kann. Gardiner *et al.* [153] fanden aus ENDOR-Untersuchungen an Menachinon-4 $^{\bullet-}$ ($MQ_4^{\bullet-}$)¹ in protoniertem und deuteriertem Isopropanol Hinweise auf zwei Wasserstoffbrücken, konnten jedoch nicht für den Hyperfeintensor der zweiten H-Brücke A_{\perp} identifizieren. Die zugeordneten HFC's für $VK_1^{\bullet-}$ in IP und ein Vergleich mit $VK_2^{\bullet-}$ sind in Tab. 4.12 aufgeführt.

Tabelle 4.12: Hyperfeinkopplungen von $VK_1^{\bullet-}$ in IP (gefrorene Lösung), ermittelt aus Simulationen der orientierungsselektierten ENDOR-Spektren, Vergleich mit Literaturdaten von $MQ_4^{\bullet-}$ [153]

Zuordnung	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	$\frac{1}{3}\text{Tr}(\mathbf{A})$
$VK_1^{\bullet-}$				
2-CH ₃	-6.40(5)	9.70(5)	-6.40(5)	+7.50(5)
α -H 6,7	-0.20(8)	-3.60(8)	-2.80(8)	-2.20(8)
α -H 5,8	-1.80(8)	-0.10(8)	-2.00(8)	-1.30(8)
H-Brücke	-2.7(1)	+5.7(1)	-2.7(1)	+0.10(1)
$MQ_4^{\bullet-}$ (Ref. [153])				
CH ₃	6.6	10.1	6.6	7.8
CH ₂	3.0	(1.5) ^a	-	-
H-Brücke 1	-2.2	+4.6	-2.2	+0.1
H-Brücke 2	-	5.5 ^b	-	-

^aZuordnung unsicher

^bdie korrespondierende A_{\perp} -Komponente konnte nicht zugeordnet werden

¹Menachinon-4 ist nahezu identisch mit Vitamin K_1 , es trägt an C-3 statt der Phytylkette einen Rest aus vier Isoprenyleinheiten.

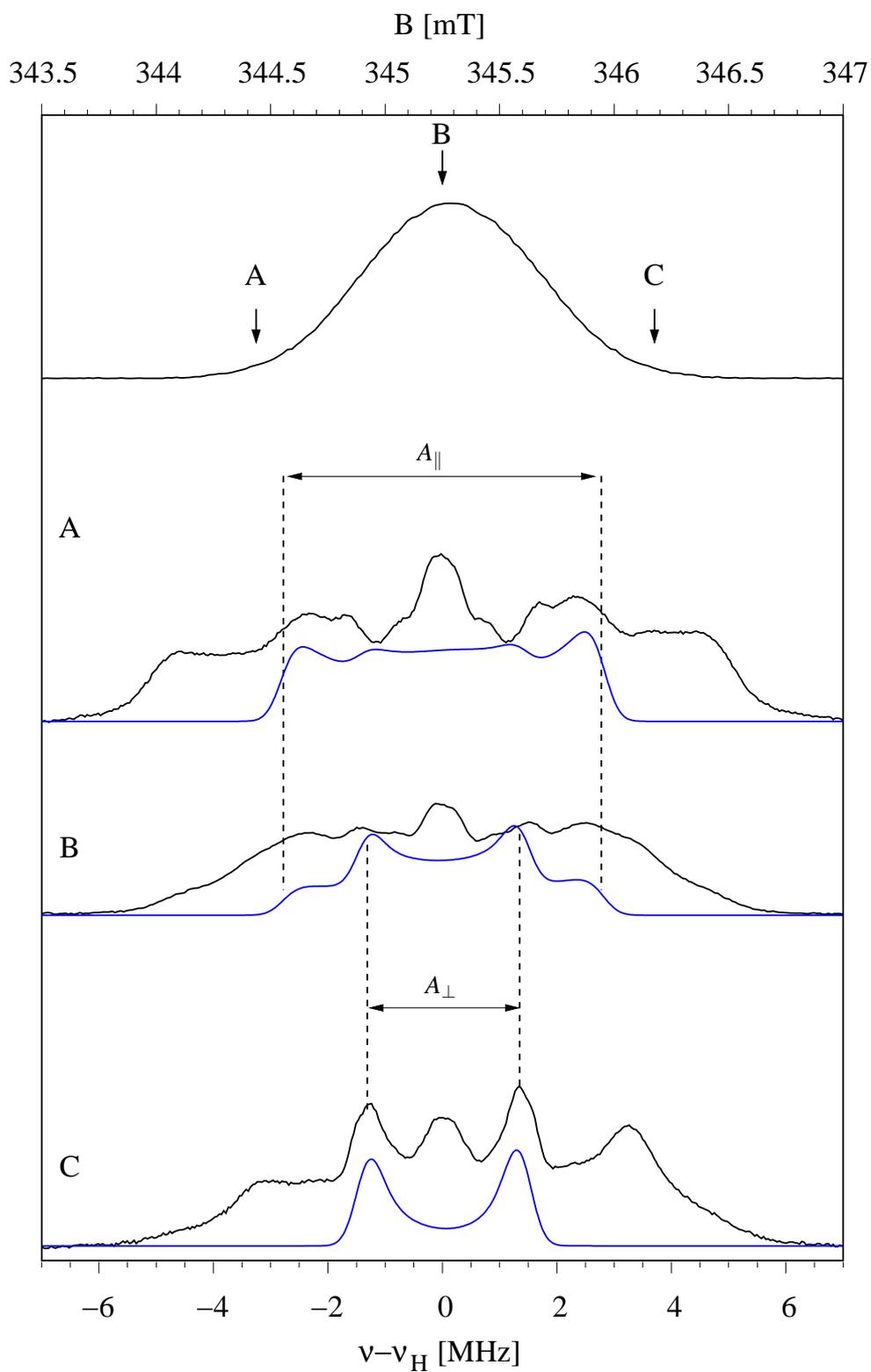


Abbildung 4.17: Puls-EPR- und ENDOR-Spektren von $VK_1^{\bullet-}$ in gefrorenem h_8 -IP; A,B,C: Messung der ENDOR-Spektren an der jeweils im EPR-Spektrum gekennzeichneten Feldstelle; schwarz: Experiment; blau: Simulation der Wasserstoffbrücke

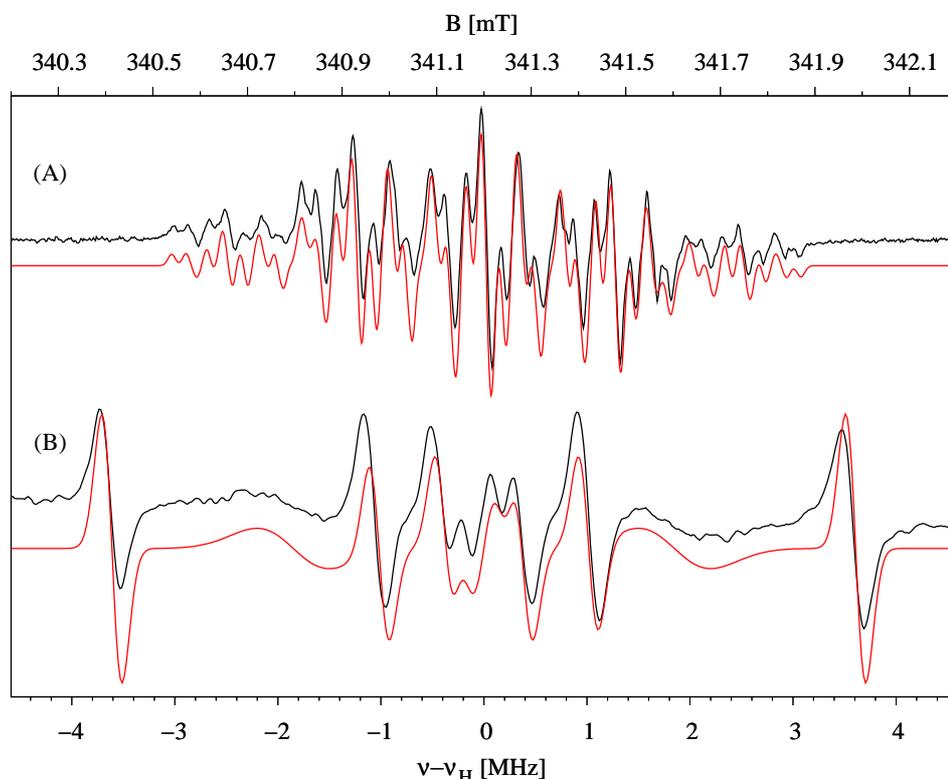


Abbildung 4.18: (A) cw-EPR und (B) -ENDOR Spektrum von $VK_1^{\bullet-}$ in DME/MTHF, schwarz: Experiment, rot: Simulation; $T = 250$ K, Parameter wie bei Messungen in IP

Messungen an $VK_1^{\bullet-}$ im apolaren Lösemittel

Als Modell für eine besonders apolare Umgebung wurde DME/MTHF gewählt, die zu den apolarsten Lösemitteln gehören, siehe z. B. Tab. 4.2 in Kap. 4.1. Da das Redoxpotential der ersten Reduktionsstufe in DME/MTHF um ≈ -400 mV abgesenkt ist, funktioniert die Radikalerzeugung mit Kalium-tert-Butylat nicht mehr. Daher wurden die Proben durch potentiostatische Elektrolyse erzeugt.

Abb. 4.18 zeigt das cw-EPR und ENDOR Spektrum von $VK_1^{\bullet-}$ in DME/MTHF. Das EPR Spektrum weist eine etwas besser aufgelöste Hyperfeinstruktur auf als das von $VK_1^{\bullet-}$ in IP. Das ENDOR Spektrum ist dem Spektrum in IP ähnlich, die Hyperfeinkopplungen der α -Protonen sind etwas verschoben. Die aus der Simulation von EPR und ENDOR Spektrum ermittelten Hyperfeinkopplungen sind in Tab. 4.11 aufgelistet. Die Spindichteverteilung ist offenbar symmetrischer geworden, die α -Protonen liegen im Rahmen der Meßgenauigkeit entartet vor. Daraus läßt sich schließen, daß die in IP zu beobachtenden unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen der α -H's durch die Wasserstoffbrücken induziert werden.

Gendell *et al.* [140] konnten zeigen, daß die Spindichteverteilung im Semichinonanionen hauptsächlich von Wechselwirkungen des Lösemittels zu den Carbonylsauerstoffen abhängt. Mit diesem einfachen Modell, welches nur diese Wechselwirkungen berücksichtigt, konnte auch gezeigt werden, daß die ^1H -Hyperfeinkopplungen sich in ihrer absoluten Größe in unterschiedlichen Lösemitteln (in Ref. [140] EtOH/DMSO, siehe Tab. 4.13) wenig ändern, jedoch die relative Änderung, insbesondere an Positionen mit wenig Spindichte, groß sein kann. Da die isotrope Hyperfeinkopplung der Protonen durch die π -Spindichte am α -C vermittelt wird, hängt die Änderung der Protonen-HFC von der Spindichteverteilung im Ring ab. Die Spindichteverteilung wird durch die Polarisation der negativen Ladung im Semichinonanion beeinflusst. Dies ist hauptsächlich ein lokaler Effekt an den Carbonylgruppen und wirkt sich wenig auf das restliche π -System aus, es sei denn, es treten drastische Veränderungen wie Protonierungen der Carbonylsauerstoffe auf. Genau dieses Verhalten der Protonenhyperfeinkopplungen kann auch hier beobachtet werden. Die Hyperfeinkopplungen von $\text{VK}_1^{\bullet-}$ ändern sich wenig von IP zu DME/MTHF als Lösemittel, die relativen Änderungen der Protonen im annellierten Ring werden teilweise halbiert.

Tabelle 4.13: Lösemiteleinfluß auf die isotropen ^1H -Hyperfeinkopplungen in Semichinonanionen

Radikalanion	Position	IP ^a	DME/MTHF ^b	EtOH/H ₂ O ^c	DMSO ^d
Vitamin K ₁ ^{•-}	9	+7.32	+7.22		
	3	+3.65	+3.75		
	6	-2.15	-2.03		
	7	-1.96	-2.03		
	5	-1.48	-0.76		
	8	-1.29	-0.76		
	γ -H	-0.38	-0.38		
NQ ^{-•}	2,3			9.11	9.33
	6,7			1.85	1.79
	5,8			1.45	0.85

^ahier, 270 K

^bhier, 250 K

^cRef. [140]

^dRef. [140]

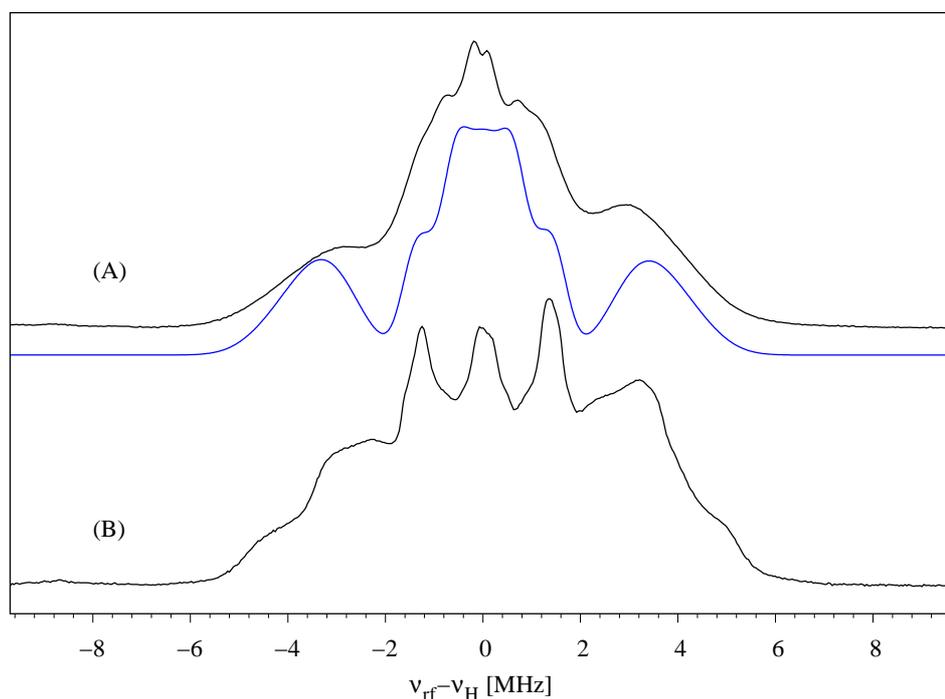


Abbildung 4.19: Davies-ENDOR Spektrum von Vitamin $K_1^{\bullet-}$ in (A): DME/MTHF, schwarz Experiment, blau: Simulation, (B): IP, $T = 80$ K

In Abb. 4.19 ist ein Vergleich der Davies-ENDOR-Spektren von $VK_1^{\bullet-}$ in Isopropanol und DME/MTHF gezeigt. Es wurde versucht das ENDOR Spektrum von $VK_1^{\bullet-}$ in DME/MTHF unter Benutzung der in flüssiger Lösung zugeordneten isotropen HFC's und der dipolaren Hyperfeintensoren wie für die Simulation der ENDOR Spektren in IP zu simulieren, Abb. 4.19 oben in blau. Eine genauere Anpassung der α -Protonen-HFC's ist durch die Überlagerung der Linien nicht sinnvoll.

Zumindest der Hyperfeintensor der Methylgruppe war genauer bestimmbar. Man erhält für die Hauptwerte:

$$A_{\perp} = 5.9 \text{ MHz} \quad A_{\parallel} = 9.2 \text{ MHz} \quad a_{\text{iso}} = 7.0 \text{ MHz.}$$

Wie zu erkennen ist, hat sich die Anisotropie und die Lage des Methyltensors in DME/MTHF im Vergleich zu IP nicht verändert. Offenbar wird auch in gefrorener Lösung die Spindichteverteilung im Chinonring durch die Wasserstoffbrücken nicht beeinflusst. Ein signifikanter Einfluß des Solvens auf die Protonenhyperfeinkopplungen im Vitamin $K_1^{\bullet-}$ ist demnach nicht zu verzeichnen. Eine genauere Bestimmung der anderen HFC's ist erst mit besser aufgelösten ENDOR Spektren, z. B. durch Orientierungsselektion bei höheren Feldern möglich.

Abhängigkeit des g -Tensors vom Lösemittel

Im folgenden Teil soll der Effekt der Polarität des Solvens auf den g -Tensor untersucht werden. Dafür wurden EPR-Spektren von $VK_1^{\bullet-}$ in IP und DME/MTHF bei 94 GHz aufgenommen (Abb. 4.2.4), wo der g -Tensor vollständig aufgelöst ist. Es ist deutlich zu erkennen, daß die g -Tensoren in den zwei Lösemitteln unterschiedlich sind. Dieser Effekt zeigt sich besonders deutlich an g_{xx} , wie in Abb. 4.2.4 dargestellt ist. Die beiden anderen g -Tensorhauptwerte verschieben sich im Rahmen der Meßgenauigkeit marginal. Die Linienbreite ist im Spektrum von $VK_1^{\bullet-}$ in DME/MTHF leicht erhöht im Vergleich zum Spektrum in IP. Eine mögliche Ursache ist die Verwendung von protoniertem Ether, während volldeuteriertes Isopropanol verwendet wurde. Messungen in d_1 -IP zeigten im Vergleich zu d_8 -IP auch eine erhöhte Linienbreite der g -Tensorkomponenten. Es existieren offenbar auch schwache Matrixwechselwirkungen mit den restlichen Protonen des Solvens, die zur Linienbreite beitragen. Die g -Tensorhauptwerte wurden durch Simulation der W-Band-Spektren ermittelt und sind in Tab. 4.14 zusammengestellt.

Tabelle 4.14: Einfluß des Solvens auf die g -Tensorhauptwerte von $VK_1^{\bullet-}$

Solvans	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
IP	2.00578	2.00503	2.00224
DME/MTHF	2.00623	2.00505	2.00220

Die signifikanten Unterschiede in den g -Werten haben ihre Ursache in den unterschiedlichen Solvenseigenschaften, d. h. der Polarität und das Vermögen H-Brücken auszubilden. Dieser Effekt kann im Rahmen der g -Tensor-Theorie von Stone [157] beschrieben werden. Nach Stone ist in planaren π -Radikalen die parallel zur Molekülnormalen stehende g -Tensorkomponente gleich dem Wert des freien Elektrons. Die in der Ebene liegenden Komponenten sind durch Spin-Bahn-Kopplung des Grundzustands mit angeregten Zuständen zu höheren Werten verschoben. Der dominierende Beitrag ist dabei die Anregung eines Elektrons von einem der nichtbindenden n -Orbitale des Sauerstoffs in das (halbbesetzte) π^* -Orbital [96]. Die Beiträge der g -Verschiebung von g_{xx} und g_{yy} sind [158]:

$$\Delta g_{xx} = c_y^2 \rho_O^\pi \xi_O / \Delta E_{n-\pi^*} \quad \Delta g_{yy} = c_x^2 \rho_O^\pi \xi_O / \Delta E_{n-\pi^*}, \quad (4.1)$$

mit den Orbitalkoeffizienten c_y, c_x der zum n -Orbital beitragenden Sauerstoff-p-Orbitale, der Spindichte am Sauerstoff ρ_O^π , der Spin-Bahn-Kopplungskonstante ξ_O und der Energielücke $\Delta E_{n-\pi^*}$ zwischen nichtbindendem (n) und anti-bindendem (π^*) Orbital. Aus einer geometrischen Interpretation des Verhältnisses $\Delta g_{xx} / \Delta g_{yy} = c_x^2 / c_y^2 = \tan^2 \delta$, wobei δ der Winkel zwischen n -Orbital und molekularer y -Achse ist, folgt, daß $\Delta g_{xx} > \Delta g_{yy}$ ist [95]. Daraus folgt auch, daß bei Änderun-

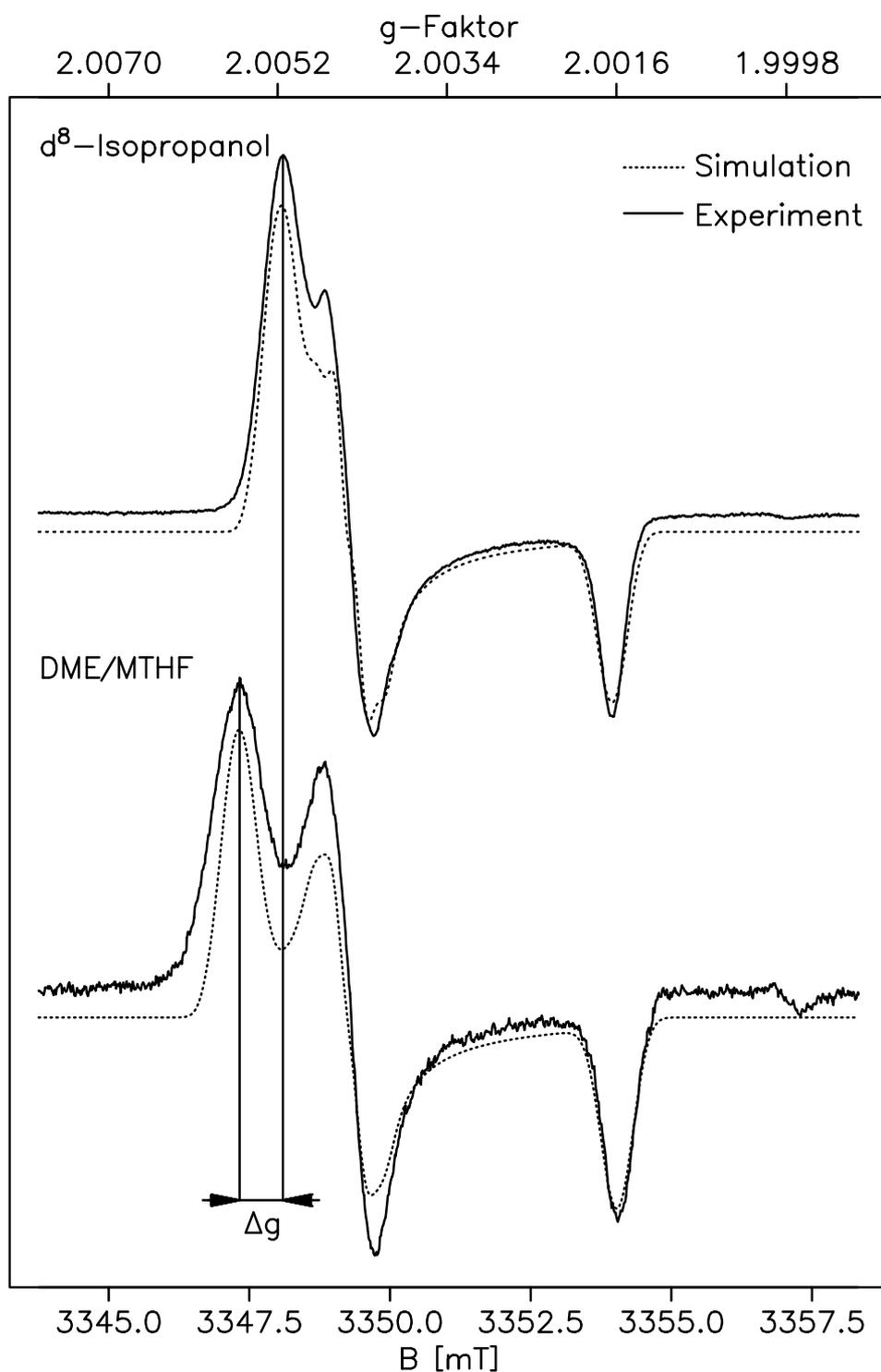


Abbildung 4.20: EPR-Spektren von Vitamin $K_1^{\bullet-}$ bei 94 GHz in d_8 -IP und DME/MTHF; die Verschiebung Δg_{xx} zwischen protischem und apolarem/aprotischem Solvens ist gekennzeichnet; nichtsättigende Mikrowellenleistung, Mod.-hub=0.2 mT, Mod.-frequ.=100 kHz, t_c =82 ms, 1024 Pkte., $T = 80$ K

gen der Energielücke $\Delta E_{n-\pi^*}$ oder der Spindichte am Sauerstoff ρ_O^π die g_{xx} -Komponente des \mathbf{g} -Tensors am empfindlichsten reagiert.

Die Ausbildung von H-Brücken zu den Carbonylsauerstoffen beeinflusst sowohl $\Delta E_{n-\pi^*}$ als auch ρ_O^π . Sie führt zur Stabilisierung des nichtbindenden Orbitals und damit zu einer vergrößerten Energieaufspaltung $\Delta E_{n-\pi^*}$. Dies wurde durch optische Messungen der $n-\pi^*$ Übergangsenergien von Benzochinon in EtOH und DMSO nachgewiesen [159, 160]. Die H-Brückenbildung führt auch zu einer reduzierten Spindichte an den beteiligten Carbonylsauerstoffatomen, wie indirekt von Nimz *et al.* durch Q-Band-EPR an selektiv ^{13}C -markierten Benzochinonen gezeigt wurde [161]. Wie von Nimz *et al.* berichtet, erhöhte sich die Spindichte an den Carbonylkohlenstoffen, wenn als Solvens Isopropanol statt DME/MTHF verwendet wurde. Die im protischen Solvens gebildeten Wasserstoffbrücken polarisieren die C=O-Bindung zugunsten des Kohlenstoffs und führen damit zur Verschiebung der Spindichte vom Sauerstoff zum Kohlenstoff.

Der experimentelle Nachweis, daß nichtprotische, aber polare Lösemittel wie DMF oder Chloroform (im Vgl. zu aprotischen Solvenzien) auch g_{xx} verschieben, steht noch aus. Es kann jedoch genauso wie für Wasserstoffbrücken argumentiert werden, daß durch die Solvensdipole die C=O-Doppelbindung polarisiert wird. Der Einfluß auf die Anregungsenergielücke $\Delta E_{n-\pi^*}$ wird geringer sein, da es durch die sphärische Verteilung der Solvensdipole um das Anion auch zur Stabilisierung (und damit Absenkung) des π^* -Orbitals kommt. Die spezifische Wechselwirkung über Wasserstoffbrücken auf das n-Orbital jedoch existiert hier nicht. Somit kann sich die Absenkung sowohl von n- als auch π^* -Orbital kompensieren und $\Delta E_{n-\pi^*}$ ändert sich wenig oder gar nicht.

Die Verschiebung von g_{xx} in Abhängigkeit von der Lösemittelpolarität weist interessante Parallelen zur Abhängigkeit des Reduktionspotentials vom Solvens auf (Kap. 4.1). Der dort gefundenen (absoluten) Erhöhung des Reduktionspotentials bei sinkender Polarität des Solvens steht hier die Vergrößerung von Δg_{xx} gegenüber. Die Verschiebung von g_{xx} ist offenbar ein Maß für die Polarität der Umgebung des Semichinonanions. Obwohl es bei der Änderung des Redoxpotentials um die absolute Verschiebung von Orbitalenergien geht², jedoch bei der g_{xx} -Verschiebung die relative Lage von n- und π^* -Orbital die wichtige Größe ist, so existiert doch eine empirische Beziehung zwischen g_{xx} und dem Redoxpotential des Semichinonanions bzw. Größen wie AN oder E_T^N , die die Polarität des Solvens beschreiben.

²Das Reduktionspotential ist die Elektronaffinität des Chinons, welche durch die Energie des SOMO's (Single Occupied Molecular Orbital) des Anions bestimmt ist.

4.2.5 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen an Modellchinonen hatten zwei Ziele. Erstens sollte mit Methoden der EPR- und ENDOR-Spektroskopie an einer Reihe von Naphthochinonen mit verschiedenen Substitutionen die Basis für vergleichende Untersuchungen am sekundären Akzeptor A_1 in PS I geschaffen werden. Neben der Messung der isotropen und anisotropen Protonenhyperfeinkopplungen der Chinone in flüssiger und gefrorener Lösung waren die Wechselwirkungen mit Solvensprotonen von besonderem Interesse. Die Hyperfeinkopplungen von wasserstoffbrückenbildenden Protonen konnte durch vergleichende Messungen in protoniertem und deuteriertem Isopropanol bestimmt werden. Durch die Bestimmung der Spindichte an den Carbonylsauerstoffen können unter Annahme eines Punktdipolmodells die Wasserstoffbrückenabstände zu den untersuchten Chinonen abgeschätzt werden. Die Länge der Wasserstoffbrücken befindet sich bei allen Chinonen im Bereich von 1.75 – 1.80 Å, vgl. Tab. 4.15. Der isotrope Anteil der Wasserstoffbrückenkopplung ist in meisten der untersuchten Chinone gering. Im Fall des 2-Ethyl-naphthochinons wurde eine zweite Wasserstoffbrücken-HFC identifiziert, deren signifikanter isotroper Anteil vermutlich durch eine Orientierung aus der Chinonebene heraus stammt. In den anderen substituierten Naphthochinonen kann eine solche zweite H-Brücke nicht ausgeschlossen werden, zu ihrer Identifizierung wäre jedoch volldeutertes Chinon notwendig, um die Kopplungen von Matrixprotonen zu unterscheiden. Der Einfluß von Substituenten am Chinonring auf die Spindichte im Ring ist gering, führt jedoch durch sterische Hinderung zu oben genannten nicht-planaren Wasserstoffbrücken.

Tabelle 4.15: Mittels Punkt-Dipol-Näherung abgeschätzte Abstände der H-Brücken zu verschiedenen Naphthochinonen aus der dipolaren HFC, verwendete Spindichte $\rho_O^\pi = 0.19$ aus Messungen an ^{17}O -markiertem $\text{VK}_3^{\bullet-}$

Chinonanion	A_\perp	A_\parallel	$\frac{1}{3}Tr(\mathbf{A})$	$d(\text{O} \cdots \text{H}) [\text{Å}]$
$\text{NQ}^{\bullet-}$	-2.65	5.30	0	1.78
$\text{VK}_3^{\bullet-}$	-2.78	5.60	0.01	1.75
EthNQ	-2.45	5.00	0.03	1.82
	-0.75	4.60	1.03	2.03
VK_1	-2.70	5.70	0.10	1.75

Zweitens sollte durch Untersuchungen in verschiedenen Lösemitteln der Einfluß der Polarität auf das Redoxpotential und auf magnetische Parameter ermittelt werden. Die Redoxpotentialmessungen zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen E_M und den dimensionslosen Kenngrößen E_T^N und E_T^N , die die Polarität des Lösemittels beschreiben. Eine signifikante Abhängigkeit der Hy-

perfeinkopplungen von Vitamin $K_1^{\bullet-}$ vom Lösemittel wurde nicht gefunden. Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß der \mathbf{g} -Tensor des Semichinonanions eine empfindliche Sonde für die Solvenspolarität ist. Insbesondere die g_{xx} -Komponente zeigte eine signifikante Abhängigkeit vom Solvens. Die Verschiebung zu höheren Werten kann im Rahmen der g -Faktor Theorie von Stone verstanden werden. Durch die Wechselwirkungen des Solvens mit den Carbonylsauerstoffen wird die Lage des n -Orbitals stabilisiert und die Spindichte am Sauerstoff verschoben, was sich hauptsächlich auf die Verschiebung von g_{xx} auswirkt. Die Abhängigkeit der \mathbf{g} -Anisotropie von der Solvenspolarität ist auch an Messungen an Nitroxidradikalen beobachtet worden [162–164].

Parallelen zur Abhängigkeit des Redoxpotentials des Semichinonanions und des \mathbf{g} -Tensor von der Polarität des Solvens konnten gezeigt werden, es wurde ein empirischer Zusammenhang zwischen Redoxpotential des Anions bzw. Polarität seiner Umgebung und Δg_{xx} -Verschiebung vorgeschlagen. Somit kann über den \mathbf{g} -Tensor des Semichinonanions auch in biologischen Systemen auf die Polarität der Bindungstasche des Chinons geschlossen werden (siehe Kap. 6.1).

Kapitel 5

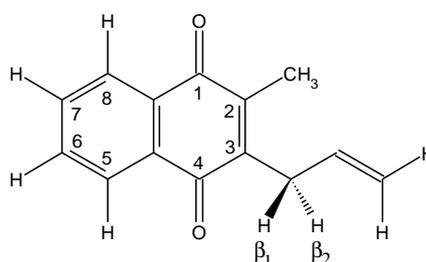
DFT-Rechnungen an Chinonen

Die Benutzung quantenchemischer Rechnungen für die Berechnung spektroskopischer Parameter ist durch die rapide Entwicklung sowohl von Computerhardware in den letzten Jahren als auch durch die Verfügbarkeit effizienter Methoden zu einem wertvollen Werkzeug des Spektroskopikers für den Vergleich mit seinen Messergebnissen geworden. In Situationen, wo experimentelle Daten fehlen oder die Interpretation der Experimente nicht zweifelsfrei ist, können quantenchemische Methoden Hinweise zu deren Aufklärung beitragen. Es wurde demonstriert, daß strukturelle, Schwingungs- und EPR-spektroskopische Eigenschaften [154, 165–167] mit vergleichsweise geringem Rechenaufwand durch Verwendung von Hybrid-Hartree-Fock/Dichtefunktional-Methoden reproduziert werden können. Die Berechnung von **g**-Tensoren kleiner organischer Radikale hingegen ist noch relativ neu und stellt eine Herausforderung an die Methodik dar [168–170].

Die in diesem Kapitel aufgeführten DFT-Rechnungen hatten zum Ziel, Aussagen über die Wasserstoffbrückenbindungen des Radikalanions von VK₁ mit dem Lösemittel zu treffen. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die Geometrie der Bindung, Auswirkungen auf die Hyperfeinkopplungen und den **g**-Tensor gerichtet. Alle DFT-Rechnungen wurden an einem Modell des Vitamin K₁ durchgeführt, in dem der Phtylrest durch eine Propenylgruppe ersetzt wurde, siehe Abb. 5.1. Dadurch ist immer noch eine Aussage über eine Vorzugskonformation des Restes möglich, außerdem ist die Spindichte schon am zweiten C-Atom im Phtylrest sehr gering (im VK₁^{•-} in IP in flüssiger Lösung konnte noch eine sehr kleine, dem γ -H der Phtylkette zugeordnete, ¹H-Hyperfeinkopplung detektiert werden, Kap. 4.2.4). Als Modell für die Solut-Solvens-Wechselwirkungen wurden bis zu vier Lösemittelmoleküle, die Wasserstoffbrücken zu den Carbonylsauerstoffen des Chinons ausbilden, in die Rechnungen eingeschlossen. Wegen der begrenzt zur Verfügung stehenden Rechenkapazität wurde dafür Wasser gewählt.

5.1 Rechnungen an Modellchinonen

Alle Strukturoptimierungen wurden am Radikalanion des gewählten Modells, 2-Methyl-3-Propenyl-Naphthochinon durchgeführt. Die DFT-Rechnungen wurden in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurden die Modelle mit dem 6-31G(2d,2p)-Basissatz geometrieoptimiert, welcher um Polarisationsfunktionen und diffusen Funktionen erweitert ist. Gerade für schwache Dipol-Dipol-Wechselwirkungen wie in H-Brücken ist die Benutzung eines erweiterten Basissatzes essentiell [167].



In einem weiteren Schritt wurden die Hyperfeintensoren des Radikalanions berechnet unter Benutzung des EPR II-Basissatzes [171]. Dieser Basissatz ist für die Berechnung von Hyperfeinkopplungen durch seine erweiterte Basis für s-Elektronen besonders geeignet, da die isotrope Hyperfeinkopplung von der Spindichte am Kernort abhängt.

Abb. 5.1 zeigt die geometrieoptimierten Strukturen des Semichinonanions von 2-Methyl-3-Propenyl-Naphthochinon (MPNQ) ohne und mit Wasserstoffbrücken. Insgesamt wurden Rechnungen an $\text{MPNQ}^{\bullet-}$ in der Gasphase und mit bis zu jeweils zwei Wassermolekülen an O-1 und O-4 (5 Kombinationen) durchgeführt. Die geometrieoptimierte Struktur von $\text{MPNQ}^{\bullet-}$ *in vacuo* zeigt, daß die bevorzugte Konformation des Ethylrestes senkrecht zur Ebene stehend ist. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Konformationsanalyse von Himo *et al.* [154], die zeigte, daß für Benzo- und Naphthochinone mit einer Ethylseitenkette die energetisch günstigste Konformation senkrecht zur Molekülebene ist. Dies ist insoweit bemerkenswert, da dadurch Hinweise auf die zu erwartende Größe der isotropen HF-Kopplungen der β -Protonen des Restes gegeben werden. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Methylprotonen die am wenigsten raumfordernde Konformation einnehmen mit einem Proton in Richtung des Carbonylsauerstoffes, welches in der Chinonebene liegt.

Wird ein Wassermolekül eingeführt, so orientiert es sich in Richtung des anelierten Ringes mit einem Abstand zum Carbonylsauerstoff von $d(\text{H} \cdots \text{O}) = 1.76 \text{ \AA}$ und einem Winkel von 138° zur Carbonylgruppe. Es nimmt damit die sterisch weniger gehinderte Position ein. Die ausgebildeten Wasserstoffbrücken liegen hierbei weitestgehend in der Molekülebene (maximal $4-8^\circ$ aus der Ebene gedreht). Mit jeweils einer Wasserstoffbrücke wird eine in bezug auf die Brücken symmetrische Situation ausgebildet, beide Wassermoleküle unterscheiden sich wenig in ihrer Orientierung zum Chinon.

Wird noch jeweils ein weiteres Wassermolekül an die Carbonylsauerstoffe gelagert, so muß es die

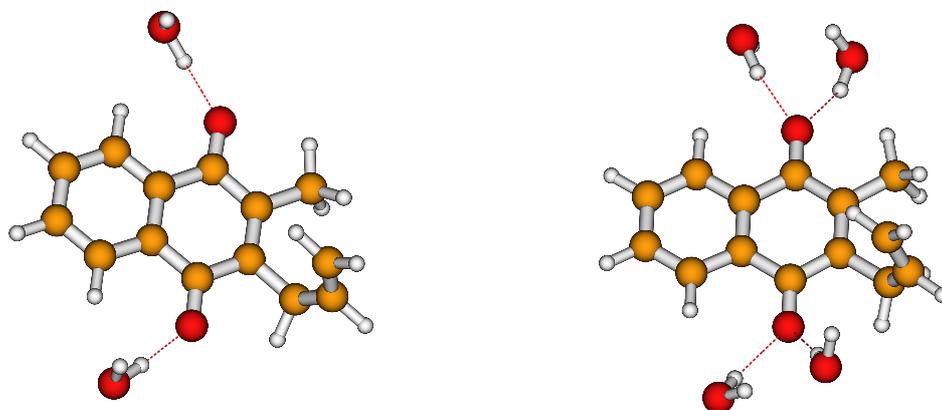


Abbildung 5.1: Geometrieoptimierte Strukturen von MPNQ^{•-} mit zwei und vier Wasserstoffbrücken

stärker gehinderte Position in Richtung des Substituenten einnehmen. Das führt zu einer deutlich geänderten Konformation zum Chinon. Der Wasserstoffbrückenabstand verlängert sich auf von 1.76 Å auf 1.88 Å und die Wasserstoffbrücke liegt nicht mehr in der Chinonebene, sie wird bis zu 59° aus der Ebene herausgedreht. Dabei ist anzumerken, daß die Konformation dieser Wasserstoffbrücke nur in einem sehr flachen Energieminimum liegt. Mehrere energetisch nahe beieinander liegende H-Brücken-Konformationen mit unterschiedlichen Diederwinkeln zur Ringebene ($\Delta = 15^\circ$) sind möglich.

Die zusätzlichen Wassermoleküle beeinflussen auch die vorher symmetrisch angeordneten Wasser. An O-1 nehmen sie eine anti-Stellung in bezug auf die Molekülebene ein, an O-4 sind die Wasser asymmetrisch angeordnet, das Wasser in Richtung zum Propenylrest ist stärker aus der Ebene gedreht. Bemerkenswert ist dabei auch der geringere Bindungsabstand dieses Wassermoleküls von 1.76 Å mit Hinblick auf seine besondere Geometrie zum Chinon. Das andere Wasser weist einen auf 1.96 Å verlängerten Abstand zum Carbonylsauerstoff auf. Weiterhin ist die H-Brücke der zu den Substituenten zeigenden Wasser nicht linear, sondern nimmt Winkel bis zu $\angle(\text{O} \cdots \text{HO}) = 180 + 25^\circ$ ein. Die Substituenten erzwingen durch ihre Sperrigkeit wohl eine solche Anordnung. Starke Wasserstoffbrücken liegen gewöhnlich linear vor, schwächere H-Brücken können jedoch bis zu 50° von der linearen Form abweichen [172]. Die Abstände und Orientierungen der Wassermoleküle sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 zusammengefaßt.

O'Malley et al. [173] führte semiempirische Geometrieoptimierungen mit PM3-Parametrisierung¹

¹PM3 ist eine Variante der semiempirischen Methoden, der *Modified Neglect of Differential Overlap* (MNDO) Modelle. Hintergrund der semiempirischen Methoden ist, Mehrzentrenelektronenintegrale in der Fockmatrix zu ver-

an dem gleichen Phyllochinonmodell wie hier gezeigt durch, allerdings mit Methanol als Solvens. Die dort berichteten Strukturen weichen leicht von den hier gezeigten ab. Der Propenylrest ist nicht wie hier über den Chinonring gedreht, sondern zeigt vom Molekül weg. Es werden auch ausschließlich Wasserstoffbrücken am MPNQ^{•-} postuliert, die nicht in der Chinonebene liegen. Ein genauerer Vergleich ist leider nicht möglich, da O'Malley keine quantitativen Aussagen über die Orientierung insbesondere der H-Brücken macht. Offenbar hat hier die semiempirische Methode ihre Schwächen in der genauen Bestimmung von Geometrien. Grafton et al. [175] ermittelten eine sehr ähnliche wie die hier beschriebene Struktur an einem Vitamin K₁ Modell auf dem UKS/B3LYP/6-31G(d)-Level in der Gasphase.

Tabelle 5.1: Abstand und Orientierung der Wasserstoffbrücken zu MPNQ^{•-} mit zwei H-Brücken

	H-Brücke an O-1	H-Brücke an O-4
d(H···O)	1.76 Å	1.76 Å
∠(H···O-C)	138°	138°
∠(H···O- Molekülebene)	9°	7°

Tabelle 5.2: Abstand und Orientierung der Wasserstoffbrücken zu MPNQ^{•-} mit vier H-Brücken

	1. H-Brücke an O-1	2. H-Brücke an O-1	1. H-Brücke an O-4	2. H-Brücke an O-4
d(H···O)	1.80 Å	1.88 Å	1.97 Å	1.76 Å
∠(H···O-C)	139°	141°	139°	130°
∠(H···O- Molekülebene)	28°	-30°	6°	59°

Hyperfeinkopplungen An den optimierten Strukturen wurden die Hyperfeinkopplungen von Protonen und ¹⁷O berechnet. In Tabelle 5.3 und 5.4 sind die mittels der in Gaussian 98 [176] implementierten Fermikontaktanalyse berechneten Hyperfeinkopplungen aufgeführt. Hierbei wurden die isotropen Hyperfeinkopplungen für die CH₃-Gruppe, welche in Wirklichkeit frei rotiert, durch eine Mittelung der für die drei Protonen berechneten Einzelwerte angenähert. Das ist insofern nachlässigen. Dies wird durch geeignete Parametrisierung der übrigbleibenden Integrale kompensiert, im Falle der MNDO-Varianten durch Parameter aus Atomspektren. Eine bekannte Schwäche der MNDO-Methoden ist die schlechte Vorhersage von schwachen Wechselwirkungen wie van der Waals Komplexe oder eben auch Wasserstoffbrücken [174].

gerechtfertigt, da bei Rechnungen mit unterschiedlichen Konformationen der Methylgruppe der Mittelwert konstant blieb.

Tabelle 5.3: Berechnete isotrope Hyperfeinkopplungen von MPNQ^{•-} [MHz] ohne und mit H-Brücke(n)

Position	Gasphase	H-Brücke an O-1	H-Brücke an O-4	H-Brücke an O-1 und O-4	Exp. (VK ₁ ^{•-} in IP)
¹⁷ O-1	-19.82	-18.18	-18.21	-18.09	-
¹⁷ O-4	-20.49	-19.14	-19.17	-19.06	-
CH ₃	+8.21	+9.55	+6.09	+7.79	+7.32
CH ₂ (β ₁)	+2.59	+2.12	+3.19	+2.88	+2.47
CH ₂ (β ₂)	+4.75	+2.86	+5.61	+3.79	+4.52
α-H ₆	-2.16	-1.46	-2.85	-2.14	-2.15
α-H ₇	-2.13	-2.64	-1.25	-1.92	-1.96
α-H ₅	-0.11	-1.10	+0.29	-0.67	-1.48
α-H ₈	-0.10	+0.10	-1.30	-0.87	-1.29

Tabelle 5.4: Berechnete isotrope Hyperfeinkopplungen von MPNQ^{•-} [MHz] mit mehreren H-Brücken am Carbonyl-Sauerstoff

Position	2 H-Brücken an O-4	2 H-Brücken an O-1	2 H-Brücken an O-4 und O-1	Exp. (VK ₁ ^{•-} in IP)
¹⁷ O-1	-19.01	-17.70	-16.95	-
¹⁷ O-4	-17.62	-18.23	-17.30	-
CH ₃	+11.33	+4.40	+8.60	+7.32
CH ₂ (β ₁)	+2.29	+4.17	+2.90	+2.47
CH ₂ (β ₂)	+0.70	+6.51	+3.88	+4.52
α-H ₆	-0.92	-3.25	-1.97	-2.15
α-H ₇	-3.07	-0.71	-1.85	-1.96
α-H ₅	-1.76	+0.57	-1.05	-1.48
α-H ₈	+0.39	-1.90	-1.14	-1.29

Der Einfluß der Wasserstoffbrücken läßt sich deutlich erkennen. Ein einseitig angelagertes Wassermolekül verschiebt die Spindichte derart, daß der in ortho-Stellung zum wasserstoffbrücken-gebundenen Carbonylsauerstoff gelegene Kohlenstoff eine geringere Spindichte erhält und sich

am meta-Kohlenstoff die Spindichte erhöht. Dieser „push-pull“-Effekt wird entsprechend an den veränderten Protonenhyperfeinkopplungen der Methylgruppe und den β -CH₂-Protonen deutlich. Auch die α -Protonen im benachbarten Ring erfahren diesen periodischen Effekt.

Die für den Vergleich der berechneten isotropen mit experimentellen Daten relevanten Modelle

Tabelle 5.5: Mit Gaussian 98 berechnete Hyperfeinkopplungen der Wasserstoffbrückenprotonen von MPNQ^{•-} mit unterschiedlicher Zahl von H-Brücken, bei Mehrfachsubstitutionen ist die 1. H-Brücke immer diejenige zum Phenylring geneigte.

	a_{iso}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
H-Brücke an O-1	+0.12	-3.28	-2.89	+6.17
H-Brücke an O-4	+0.17	-3.09	-2.73	+5.83
1. H-Brücke an O-1	+0.04	-3.20	-2.99	+6.19
2. H-Brücke an O-1	+0.03	-2.86	-2.74	+5.60
1. H-Brücke an O-4	+0.28	-2.27	-2.21	+4.49
2. H-Brücke an O-4	-1.26	-4.22	-4.07	+8.29
Exp. (VK ₁ ^{•-} in IP)	0.1	-2.8	-2.8	+5.6

sind die Gasphasenrechnung (für Messungen in DME/MTHF) und die Chinone mit symmetrisch angeordneten Wassermolekülen (für Messungen in IP). Ob zwei oder vier Wasser an H-Brücken beteiligt sind, kann aus den Rechnungen nicht entnommen werden. Es wird aber sowohl von quantenchemischer [167,177,178] als auch spektroskopischer Seite [150] angenommen, daß bis zu vier Koordinierungsstellen der Carbonylsauerstoffe von Wasserstoffbrücken besetzt sind.

Die berechneten isotropen Hyperfeinkopplungen stimmen gut mit den experimentellen Daten überein, vgl. auch mit Tab. 4.13. Die Methyl-HFC weicht am weitesten vom Experiment ab, in Ref. [141, 173] ist die berechnete Methyl-HFC ≈ 0.6 MHz eines Naphthochinonmodells zu groß, möglicherweise ein systematischer Fehler. Die anderen Hyperfeinkopplungen stimmen besser mit dem Experiment überein. In den berechneten Werten ist auch der Trend wiedergegeben, daß im wasserstoffbrückengebundenen Fall die paarweise Äquivalenz der α -Protonen (H6/H7, H5/H8) aufgehoben ist.

Bis auf eine Ausnahme sind die in Tab. 5.5 aufgeführten Hyperfeinkopplungen der H-Brückenprotonen im Rahmen der experimentell gefundenen Werte (siehe Tab. 4.15 in Kap. 4.2.5). Der für die zweite H-Brücke an O-4 berechnete Hyperfeintensor weist ungewöhnliche Werte auf, wie sie bisher im Experiment nicht bestätigt wurden. Das ist zurückzuführen auf die stark aus der Chinonebene gedrehten Konformation des Wassers und ein damit verbundenes Eintauchen des Proton in die π -Spindichte des Chinons. Dieser Wert ist jedoch mit Vorsicht zu interpretieren,

da gerade an der syn-Position zum Propenylrest die H-Brücke wie schon beschrieben in einem sehr flachen Minimum liegt. Man muß also von einer Verteilung von Orientierungen ausgehen, in welcher die hier dargestellte Konformation eine Möglichkeit darstellt. Da die Hyperfeinkopplungen der H-Brückenprotonen von der Orientierung der Protonen zu den Carbonylsauerstoffen abhängen, führt die konformative Variabilität auch zu einer Verteilung von HFC's der H-Brücken. Abschließend läßt sich ableiten, daß an hochsubstituierten Naphthochinonen wie dem Vitamin K₁ sich:

1. weniger definierte H-Brücken ausbilden und somit die mit EPR-Methoden beobachtbaren Hyperfeintensoren der Brückenprotonen höhere Linienbreiten aufweisen.
2. durch die Substitution Wasserstoffbrücken ausbilden, deren H···OH-Bindungsachse aus der Molekülebene gedreht ist.

Beide Effekte sind am deuterierten Durochinonanion [150] und am deuterierten 2-Ethyl-naphthochinon (vgl. Kap. 4.2.3) am deutlichsten beobachtet worden, da durch die Deuterierung nur die HFC's mit den Solvensprotonen im ¹H-ENDOR erscheinen.

Relativ gering ist der Effekt auf die isotrope ¹⁷O-Hyperfeinkopplung. Eine Erklärung dafür läßt sich aus einem Valenzbindungsbild wie z. B. in Ref. [150] ableiten. Danach ist in keiner Resonanzstruktur eine verminderte ¹⁷O-Spindichte zu erwarten. Die Unterschiede in den ¹⁷O-Hyperfeinkopplungen sind demnach nur auf die durch die H-Brücken übertragene Spindichte zurückzuführen.

Die dipolaren Anteile der ¹⁷O-HFC reagieren weitaus stärker auf die H-Brücken. In Tab. 5.6 sind die rein dipolaren Anteile der ¹⁷O-HFC aufgeführt. Eine asymmetrische Wasserstoffbrücke verringert die Hauptwerte des dipolaren ¹⁷O-Hyperfeintensors des beteiligten Sauerstoffs um ca. 15%, während der ungebundene Carbonylsauerstoff weitgehend konstant bleibt. Die noch im *in vacuo*-MPNQ^{•-} Modell erkennbare Ungleichmäßigkeit in der Spindichteverteilung der Carbonylsauerstoffe ist mit symmetrischen H-Brücken an beiden Sauerstoffen aufgehoben. Dieses Ergebnis wird exzellent bestätigt durch die an ¹⁷O-markiertem Menadion durchgeführten EPR-Experimente im Q-Band (Kap. 4.2.2). In gefrorener Lösung werden beide Carbonylsauerstoffe in die H-Brückenbildung einbezogen, sodaß eine Situation wie in Abb. 5.1 rechts vorliegt. Eine ¹⁷O-Markierung ist demnach weniger gut geeignet für die Untersuchung von strukturellen Ungleichmäßigkeiten in Wasserstoffbrücken, die durch unterschiedliche Substitutionen im Molekül an den Positionen C-2 und C-3 (oder C-5 und C-8) hervorgerufen werden. Allerdings sollte eine einseitige Wasserstoffbrücke zweifelsfrei erkannt werden, da insbesondere A_{zz} empfindlich darauf reagiert und sehr gut detektiert werden kann. Auf die Diskussion der ¹³C-Hyperfeinkopplungen wird hier verzichtet, da keine experimentellen Daten verfügbar sind.

Tabelle 5.6: Dipolarer Anteil der ^{17}O -Hyperfeinkopplungen in $\text{MPNQ}^{\bullet-}$ (in MHz)

Position	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
$^{17}\text{O-4}$ (<i>in vacuo</i>)	36.3	35.7	-72.0
$^{17}\text{O-1}$ (<i>in vacuo</i>)	38.2	37.5	-75.7
$^{17}\text{O-4}$ (H-Brücke an O-1)	33.2	32.5	-65.7
$^{17}\text{O-1}$ (H-Brücke an O-1)	37.9	37.2	-75.1
$^{17}\text{O-4}$ (H-Brücke an O-4)	35.9	35.3	-71.2
$^{17}\text{O-1}$ (H-Brücke an O-4)	35.0	34.2	-69.2
$^{17}\text{O-4}$ (2 H-Brücken an O-1)	30.6	30.0	-60.6
$^{17}\text{O-1}$ (2 H-Brücken an O-1)	38.1	37.5	-75.6
$^{17}\text{O-4}$ (2 H-Brücken an O-4)	36.5	36.0	-72.5
$^{17}\text{O-1}$ (2 H-Brücken an O-4)	31.7	31.0	-62.7
$^{17}\text{O-4}$ (4 H-Brücken)	31.7	31.1	-62.8
$^{17}\text{O-1}$ (4 H-Brücken)	31.1	30.6	-61.7

g-Tensor Rechnungen Der **g**-Tensor wurde mittels des Programmpakets ADF2000 [179] berechnet unter Verwendung des Austauschkorrelationsfunktionals BP86 [180, 181] und eines DZVP²-Basissatzes. Die ermittelten Tensorhauptachsen bestätigen die Zuordnung von Burghaus et al. [95]: Der größte Tensorhauptwert ist entlang der C=O-Bindungsachse orientiert, der kleinste senkrecht zur Molekülebene. Qualitativ ist der Trend der **g**-Tensorhauptwerte für Chinone gut reproduziert. Während g_{xx} und g_{yy} von g_e abweichen, bleibt g_{zz} nahe g_e . Der Einfluß von Wasserstoffbrücken ist erkennbar, bei deren Einführung wird hauptsächlich g_{xx} gesenkt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den beschriebenen Experimenten in Kapitel 4.2.4, wo ein signifikanter Einfluß der Wasserstoffbrücken auf g_{xx} festgestellt wurde. Absolut gesehen sind die berechneten Hauptwerte insbesondere von g_{xx} zu groß. Kaupp et al. [170] haben Rechnungen zur Bestimmung des **g**-Tensors von Benzo- und Naphthochinonen unter Verwendung eines selbst entwickelten DFT-Ansatzes [169] durchgeführt. Die dort ermittelten **g**-Werte zeigten einen ähnlichen Trend wie hier. Jede Wasserstoffbrücke senkte den g_{xx} -Wert, bei Berücksichtigung von vier H-Brücken blieb g_{xx} systematisch 10 % zu groß. Dies wurde auf Probleme der derzeit verwendeten Funktionale zurückgeführt [170]. Die größeren Abweichungen bei den hier präsentierten berechneten **g**-Hauptwerten läßt sich durch die Berücksichtigung von nur einer H-Brücke in den untersuchten Modellen erklären.

Knüpling *et al.* [178] haben Rechnungen zur **g**-Tensorbestimmung an Semichinonanionen mit einem semiempirischen Verfahren³ basierend auf den Arbeiten von Stone [96, 157, 183] und Angstl [184] durchgeführt und den Einfluß von Punktladungen und Wasserstoffbrücken untersucht. Bei Berücksichtigung von vier Solvensmolekülen um ein Benzochinonradiaklanion berechneten sie **g**-Werte, die vergleichbar mit experimentellen Daten waren. Die Berücksichtigung einer zweiten Solvenshülle verbesserte die Werte noch. Außerdem fanden sie eine Abhängigkeit für Δg_{xx} vom Abstand r des Solvensprotons zum Carbonylsauerstoff, die mit einer Multipolentwicklung⁴, angefüttet werden konnte. Damit ist es prinzipiell möglich, aus der Verschiebung des **g**-Tensors beim Übergang vom aprotischen ins protische Lösemittel den Abstand der Wasserstoffbrücke zu bestimmen. Es gestaltet sich nur schwierig, die geeigneten Fitparameter zu finden, da für die Ermittlung der Abstandsabhängigkeit von Δg_{xx} detailliertes Wissen über die Orientierung der H-Brücken um das Molekül erforderlich ist.

²Der DZVP-Basissatz ist ein Basissatz mit verdoppelten Basisfunktionen und zusätzlichen Polarisationsfunktionen für die Valenzorbitale. Er ist mit einem 6-31G(2d,2p)-Basissatz vergleichbar

³UHF MNDO mit PM3 Parametrisierung, Näheres zur Ableitung der zur **g**-Verschiebung beitragenden Ausdrücke ist in Ref. [182] zu finden

⁴ $\Delta g_{xx} = \frac{\alpha}{r^2} + \frac{\beta}{r^3} + \frac{\xi}{r^6}$, dadurch werden elektrostatisches Potential um das Molekül, Dipol-Dipol- und dispersive Wechselwirkungen berücksichtigt

Tabelle 5.7: Berechnete g -Hauptwerte von $\text{MPNQ}^{\bullet-}$ mit und ohne H-Brücke

	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
<i>in vacuo</i>	2.099	2.0058	2.0020
H-Brücke an O-1	2.0096	2.0057	2.0020
H-Brücke an O-4	2.0096	2.0057	2.0020
Exp. ($\text{VK}_1^{\bullet-}$ in IP)	2.00578(3)	2.00503(3)	2.00224(3)
Exp. ($\text{VK}_1^{\bullet-}$ in DME/MTHF)	2.00623(3)	2.00505(3)	2.00220(3)
Exp. ($\text{A}_1^{\bullet-}$ in PS I)	2.00625(3)	2.00512(3)	2.00220(3)

5.2 Rechnungen an einem Modell der A₁-Bindungstasche

Um die am sekundären Akzeptor A₁^{•-} gemessenen magnetischen Parameter mit der Struktur des Proteins zu verbinden, wurden DFT-Rechnungen an einem Modell der Bindungstasche des A₁ durchgeführt. Dazu wurden aus der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur [34] die Koordinaten des Phyllochinons in der PsaA-Untereinheit und der nächsten Aminosäurereste genommen. Drei Aminosäuren mit potentiellen Wechselwirkungen zum Kofaktor wurden ausgewählt, die (strukturelle) Umgebung von A₁ zu modellieren:

Phenylalanin (Phe A689), Tryptophan (Trp A697) und Leucin (Leu A722).

Dies ist noch ein relativ begrenztes Modell der Bindungstasche, jedoch sind größere Ausschnitte aus dem Protein mit dem gewählten Verfahren und der zur Verfügung stehenden Rechenleistung in einer vertretbaren Rechenzeit nicht mehr zu bewältigen. Um das Modell in seinen Freiheitsgraden noch einzuschränken, wurden Peptidbindungen der berücksichtigten Aminosäuren zum Proteingerüst berücksichtigt. Die Phytylkette des Phyllochinons wurde durch eine Ethylgruppe ersetzt, da der Rest die elektronische Struktur des Chinonkopfes nicht beeinflusst [173]. Dieses Modell der Bindungstasche des Kofaktors bestehend aus 95 Atomen wurde vollständig geometrieoptimiert ohne weitere Einschränkungen der Struktur. Für die Geometrieoptimierung wurde das effizient parallelisierte Programm DGAUS [185] benutzt, welches auf einem Vektorrechner mit 128 Prozessoren (Cray T3D) lief. Für die Optimierung wurde das Austausch-Korrelationsfunktional BP86 [180, 181] und ein Basissatz mit Polarisationsfunktionen für Valenzorbitale (DZVP) benutzt. Obwohl dieser DFT-Ansatz Probleme bei der Geometrieoptimierung nichtkovalent gebundener Systeme bergen kann, wurde er wegen der besseren Skalierung im Hinblick auf die Größe des Systems CI-Methoden vorgezogen.

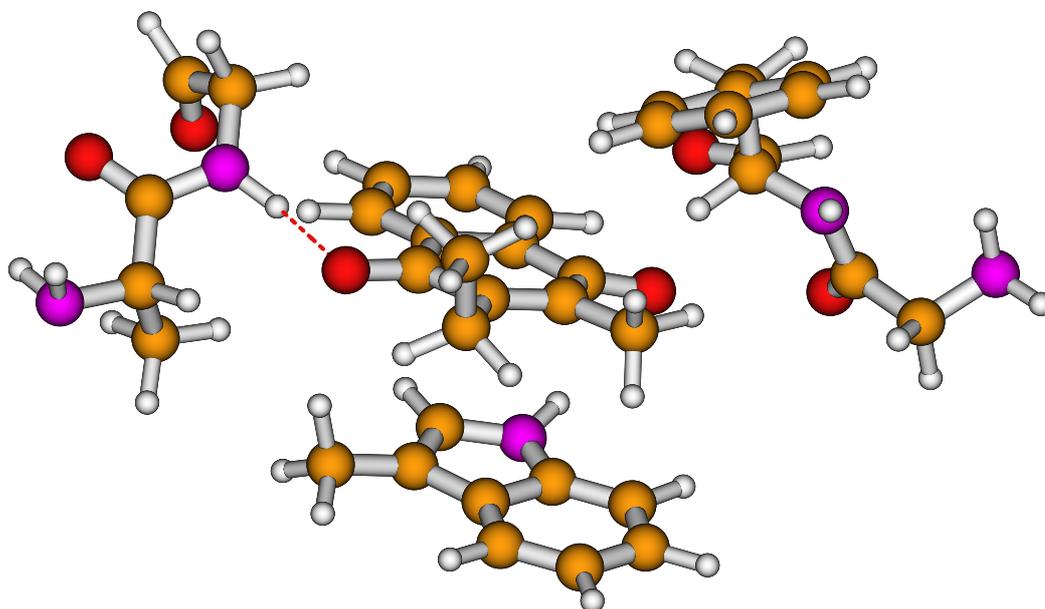


Abbildung 5.2: Geometrieoptimiertes Modell der Bindungstasche des A_1 in der PsaA-Untereinheit, links ist ein Fragment des Proteingerüsts mit Leu A722, unter dem Phyllochinon Trp A697 und rechts, fast über dem Chinon Phe A689, die gestrichelte Linie verdeutlicht die Wasserstoffbrücke zum Phyllochinon

Ein Vergleich der geometrieoptimierten Bindungstasche von A_1 mit der Kristallstruktur zeigt gute Übereinstimmung. Daher kann angenommen werden, daß diese Modelltasche für eine strukturelle Beschreibung der Proteinumgebung genutzt werden kann. Die in der Kristallstruktur präsentierte Bindungstasche von A_1 basiert auf dem diamagnetischen Grundzustand. Nach Bildung des Radikals $A_1^{\bullet-}$ können größere Wechselwirkungen mit dem Protein wie z.B. stärkere Wasserstoffbrücken und dipolare Wechselwirkungen erwartet werden. Genau dieser Effekt ist auch zu beobachten, der Abstand der Wasserstoffbrücke von $A_1^{\bullet-}$ zu Leu A722 ist in der geometrieoptimierten Struktur von 1.74 Å auf 1.56 Å verkürzt. Die H-Brücke weist einen Diederwinkel von 35° zur Kopfgruppe des Chinons auf. Das Trp A697 ist in die Richtung des Chinons verschoben worden, was zu einem kürzeren Abstand zwischen dem Stickstoff des Tryptophans und O-1 des Chinons führt.

Von dieser geometrieoptimierten Struktur wurden Hyperfeintensoren und g -Tensorhauptwerte berechnet. Die für die Berechnung der magnetischen Parameter benutzten Methoden waren die gleichen wie für das Modellchinon *in vacuo* und mit H_2O als Wasserstoffbrückenbildner.

In Tabelle 5.8 sind die ermittelten Hyperfeintensoren zusammengefaßt.

Auffällig ist die nur mäßige Übereinstimmung der isotropen Hyperfeinkopplungen der Methyl-

Tabelle 5.8: Mit Gaussian98 berechnete Hyperfeintensorhauptwerte (in MHz) aus dem geometrieoptimierten Modell der Bindungstasche von A₁^{•-}

Position	A _{xx}	A _{yy}	A _{zz}	a _{iso}
CH ₃	-1.73	-0.977	+2.709	+8.33
CH ₃ , ohne Trp A697	-1.89	-1.02	+2.90	+9.75
CH ₂ (1)	-1.39	-0.58	+1.97	+1.42
CH ₂ (2)	-2.30	-1.07	+3.37	+3.01
α-H-5	-1.76	+0.03	+1.74	-1.58
α-H-6	-1.29	-0.68	+1.97	-1.70
α-H-7	-1.64	-0.64	+2.27	-2.43
α-H-8	-1.85	-0.29	+2.14	-0.82
H-Brücke Leu A722	-4.56	-4.50	+9.06	-0.37
¹⁷ O-1	+29.8	+29.2	-59.0	-16.0
¹⁷ O-4	+31.7	+31.2	-62.9	-15.6
Exp.(A ₁ ^{•-} in PS I)				
CH ₃	-1.5	-1.1	+2.6	+10.2
H-Brücke	-6.6	-6.6	+13.2	+1.7

gruppe mit dem experimentellen Wert (vgl. Tab. 6.2 in Kap. 6.2). Die einseitige Wasserstoffbrücke sollte zu einer Verschiebung der Spindichte im Chinon mit einer Erhöhung an C-2⁵ führen und damit zu einer Erhöhung der Methylhyperfeinkopplung, wie an den Modellrechnungen gezeigt werden konnte. Dieser Effekt sollte bei einer Verkürzung der Wasserstoffbrücke um so drastischer sein. Eine nähere Untersuchung des Einflusses des Trp A697 ergab, daß es offenbar einen lokalen Einfluß auf die Spindichteverteilung an C-3 und C-4 hat. Die Berechnung der ¹H-Hyperfeinkopplungen ohne Tryptophan erhöhte die Methylkopplung und führte zu einem CH₃-Hyperfeintensor vergleichbar mit dem experimentellen Wert. Hier zeigt sich die Schwäche der DFT-Methode, korrekt dispersive Wechselwirkungen zu berücksichtigen. Dadurch wird offenbar das Trp A697 falsch positioniert. Dies führt zu einem Abfließen der Spindichte vom Chinon insbesondere zum Stickstoff des Trp und damit zu einer zu kleinen Methylhyperfeinkopplung.

Die ¹⁷O-Hyperfeinkopplung an O-1 scheint von diesem Effekt auch betroffen zu sein. Für eine asymmetrische Wasserstoffbrücke sollte, basierend auf den Erfahrungen aus den Rechnungen an den Modellsystemen der anisotropen Teil der HFC von O-1 größer und wohlunterscheidbar vom Hyperfeintensor von O-4 sein (siehe Tab. 5.6). Ein Beispiel für eine solche beobachtete asymme-

⁵Die Nummerierung der Atome im Chinon ist wie die bei den Modellchinonen benutzte, vgl. die Abb. von 2-Methyl-3-Propenyl-Naphthochinon zu Beginn von Kap. 5.1.

trische Spindichtevertellung an den Carbonylsauerstoffen ist das Radikalanion $Q_A^{\bullet-}$ des primären Akzeptors im bakteriellen Reaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* [155, 186]. Die durch unterschiedlich starke H-Brücken induzierte Asymmetrie spiegelte sich in einem Unterschied von 19 MHz zwischen den Hyperfeintensorkomponenten $A_{||}$ (^{17}O) der beiden Carbonylsauerstoffe wider.

Um den Einfluß des H-Brückenabstandes auf die Methyl-HFC näher zu untersuchen, wurde ein Hyperfeinkopplungsprofil bei Variation von $d(\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{O})$ erstellt.

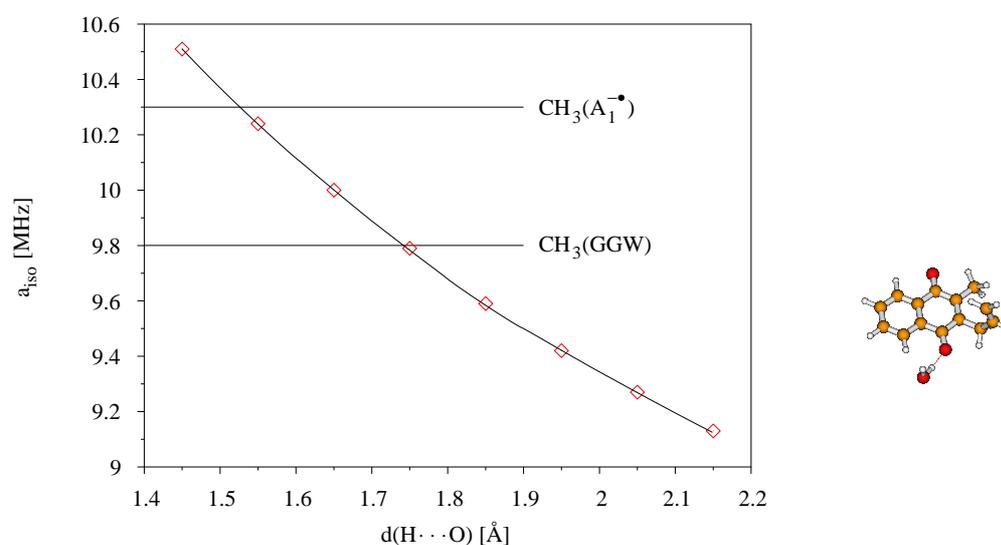


Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Methylhyperfeinkopplung vom Abstand $\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$ im $\text{MPNQ}^{\bullet-}$ -Modell, gekennzeichnet sind der per DFT gefundene Wert im Gleichgewichtsabstand (GGW) und der gemessene Wert im Protein ($A_1^{\bullet-}$)

Die in Abb. 5.3 dargestellte Abhängigkeit zeigt mit kürzerem Abstand das Ansteigen der isotropen 2-Methyl-HFC. Erst bei einem Abstand von 1.55 \AA wird eine isotrope Hyperfeinkopplung von 10.25 MHz für die Methylgruppe gefunden, in Übereinstimmung bei dem im Protein gefundenen Wert. Dies gilt quantitativ natürlich nur solange, wie keine anderen Wechselwirkungen (was im Protein denkbar ist) hinzukommen, die die Spindichtevertellung zusätzlich beeinflussen. In Verbindung mit dem Hyperfeinkopplungsprofil zeigen aber die Rechnungen an dem Model der A_1 -Tasche, daß eine kürzere (als im Gleichgewichtsabstand) H-Brücke zu O-4 vorliegen muß, um die ungewöhnliche Spindichtevertellung im $A_1^{\bullet-}$ erklären zu können. Dies ist auch ein Indiz dafür, daß der im Vergleich zur Kristallstruktur verkürzte Abstand kein Artefakt der Rechnung ist. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, daß auch mit zwei Wasserstoffbrücken, die asymmetrisch an O-4 gebunden sind, eine isotrope Hyperfeinkopplung für die 2- CH_3 -Gruppe in der Größe berechnet wird, wie sie im Protein ist, siehe Tab. 5.4. Allerdings gibt es im Fall von PS I aus der Kristallstruktur für eine zweite H-Brücke keinen Hinweis.

Für die Wasserstoffbrücke liefert die DFT-Rechnung einen stark anisotropen, axialen Hyperfeintensor mit geringer isotroper Komponente. Dieser ist größer als die in den *in vitro*-Modellen experimentell bestimmten (Kap. 4.2) und die an MPNQ^{•-} berechneten Werte, eine Konsequenz des verkürzten Abstandes zwischen N-H und O-4. Verglichen mit den experimentell gefundenen Werten ist der Hyperfeintensor zwar zu klein (im PS I wurde eine HFC für die H-Brücke mit $A_{\parallel} = 14.8$ MHz, $A_{\perp} = -4.9$ MHz, $a_{\text{iso}} = +1.67$ MHz identifiziert, vgl. Tab. 6.2 in Kap. 6.2), gibt aber den Trend zu größeren Werten im Protein wider.

Entsprechend der veränderten Spindichteverteilung sind die Hyperfeinkopplungen der β -CH₂-Protonen geringer als in den berechneten Modellen mit asymmetrischer H-Brücke. Aufgrund der alternierenden Spindichte im Ringsystem sind die HFC's an den Positionen H5/H7 erhöht und an H6/H8 abgesenkt.

Um den Effekt einzelner Aminosäuren auf den **g**-Tensor zu untersuchen, wurde aus der geometrioptimierten Struktur nur die jeweilige Aminosäure bei der Berechnung berücksichtigt und die anderen entfernt. Den größten Einfluß hat Leu A722, welche den g_{xx} -Wert um $11 \cdot 10^{-3}$ senkt. Das ist auf die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu O-4 zurückzuführen. Die $\pi - \pi$ -wechselwirkende Aminosäure Trp A697 hat den zweitgrößten Einfluß ($\Delta g_{xx} = -7 \cdot 10^{-4}$), Phe A689 hat den geringsten ($\Delta g_{xx} = -4 \cdot 10^{-4}$). Die Berücksichtigung von zwei Aminosäuren (mit zyklischer Vertauschung der Aminosäuren, Tab. 5.9) zeigt einen fast additiven Effekt auf den **g**-Tensor. Der Einfluß auf die **g**-Werte ist für g_{xx} am signifikantesten, während g_{yy} nur moderat gesenkt wird und g_{zz} unverändert bleibt. Bei Hinzunahme aller drei Aminosäuren erhält man für g_{yy} und g_{zz} Werte, die bemerkenswert mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Die Abweichung von g_{xx} ist signifikanter. Es ist bekannt, daß die Berechnung von **g**-Tensoren kleiner organischer Molekülradikale wie Phenoxy- [169] und eben auch Semichinonradikalanionen mittels DFT-Methoden dazu tendieren, Δg_{xx} zu überschätzen. So wies g_{xx} von Chinonanionradikalen eine systematische Abweichung von $\approx 6 \cdot 10^{-4}$ auf [170]. Diese wahrscheinlich auf Schwächen der verwendeten Funktionale zurückzuführende Diskrepanz muß bei der Bewertung der hier bestimmten **g**-Werte auch berücksichtigt werden. Kaupp *et al.* geben für diese systematische Abweichung einen Skalierungsfaktor von 0.92 an [170]. Neese [187] fand bei einer vergleichenden Untersuchung zur Berechnung der **g**-Tensoren von kleinen Radikalen (wie z. B. CO⁺, CN, H₂O⁺, C₃H₅), daß der dem Programmpaket ADF2000 zugrundeliegende „zeroth-order regular approximation“ (ZORA) Ansatz mit einem noch größeren Fehler behaftet ist (bis zu 50%!). Die erhaltenen **g**-Tensorhauptwerte sind in Tab. 5.9 aufgeführt.

Tabelle 5.9: Aus dem geometrieoptimierten Modell berechnete (ADF2000/ZORA) g -Tensorhauptwerte von $A_1^{\bullet-}$

Modell ^a	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
$VK_1^{\bullet-}$ <i>in vacuo</i>	2.0099	2.0058	2.0021
$VK_1^{\bullet-}$ +Phe689	2.0095	2.0057	2.0021
$VK_1^{\bullet-}$ +Trp697	2.0092	2.0057	2.0020
$VK_1^{\bullet-}$ +Leu722	2.0088	2.0056	2.0020
$VK_1^{\bullet-}$ +Phe689+Trp697	2.0088	2.0054	2.0021
$VK_1^{\bullet-}$ +Phe689+Leu722	2.0082	2.0055	2.0020
$VK_1^{\bullet-}$ +Trp697+Leu722	2.0081	2.0054	2.0020
$VK_1^{\bullet-}$ +Phe689+Leu722+Trp697	2.0075	2.0052	2.0020
$VK_1^{\bullet-}$ +Phe689+Leu722+Trp697 ^b	2.0069	2.0052	2.0020
$A_1^{\bullet-}$ (PS I)	2.0063	2.0051	2.0022

^aDer Effekt einzelner Aminosäuren ist durch Entfernen der anderen Aminosäuren aus dem geometrieoptimierten Modell ermittelt worden.

^bnach Skalierung von Δg_{xx} mit 0.92 [170]

5.3 Zusammenfassung

Mittels DFT-Rechnungen an einem Modell für das Semichinonanion des Vitamin K_1 wurden an optimierten Geometrien magnetische Parameter und der Einfluß von Wasserstoffbrücken auf diese bestimmt. Die optimierten Modelle zeigen, daß durch die Substitution in α -Position am Chinonring die Wasserstoffbrücken zu Konformationen außerhalb der Chinonebene neigen. Allerdings weisen diese Geometrien Variabilitäten in ihrem Diederwinkel auf, sodaß in gefrorener Lösung mit einer Verteilung von H-Brücken-Konformationen zu rechnen ist.

Die berechneten Hyperfeintensoren stimmen mit experimentellen Werten gut überein. Asymmetrische H-Brücken verschieben die Spindichte alternierend im Semichinonanion, was zur Erhöhung der HFC in meta-Position zum Carbonylsauerstoff führt. Es konnte gezeigt werden, daß ^{17}O -Hyperfeinkopplungen eine empfindliche Sonde für derartige asymmetrische Bindungssituationen sein können. Der Berücksichtigung des Einflusses der Solvenswechselwirkungen auf den g -Tensor konnte qualitativ die experimentell gefundenen Effekte reproduzieren. Die Einführung von H-Brücken senkt hauptsächlich g_{xx} .

Rechnungen an einem Modell der Bindungstasche des A_1 im Protein konnten die starke einseitige Wasserstoffbrücke nachweisen. Trotz dieser starken H-Brücke weist auch das Modell einen ver-

gleichsweise großen \mathbf{g} -Tensor auf, was zeigt, daß das Chinon in einer sehr apolaren, hydrophoben Tasche sitzt. Es kann angenommen werden, daß die einseitige Wasserstoffbrücke zur Fixierung des Chinons im Protein dient. Weiterhin zeigt die Abhängigkeit der \mathbf{g} -Anisotropie, daß der \mathbf{g} -Tensor ein empfindliches Maß für die Polarität der Umgebung ist. Der experimentelle Befund, daß insbesondere g_{xx} empfindlich auf Veränderungen der Solvenspolarität reagiert, kann hier am Einfluß von Wasserstoffbrücken bestätigt werden.

Kapitel 6

EPR- und ENDOR-Spektroskopie am sekundären Akzeptoranion, $A_1^{\bullet-}$

Der sekundäre Akzeptor, A_1 , in Photosystem I ist ein Phyllochinon. Er funktioniert als Eielektronenmediator zwischen dem primären Akzeptor $A_0^{\bullet-}$ und dem [4Fe-4S]-Zentrum F_X . Zahlreiche Informationen über die Identität des sekundären Akzeptors wurden schon vor der hochaufgelösten PS I-Kristallstruktur durch optische Spektroskopie und EPR-Spektroskopie gewonnen (siehe dazu auch folgende Übersichtsartikel [67, 188–193]):

Erste Hinweise auf zwei intermediäre Akzeptoren zwischen P_{700} und F_X kamen von der Beobachtung zweier unterschiedlicher EPR-Signale nach unterschiedlich langer Belichtung von PS I-Proben unter reduzierenden Bedingungen bei Temperaturen um 200 K [119, 194]. Ein Q-Band-Spektrum von $A_1^{\bullet-}$ wies eine g -Anisotropie ähnlich der von Chinonen auf [195]. Optische Absorptionsdifferenzspektren an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ bei tiefen Temperaturen zeigten Ähnlichkeiten zu dem optischen Differenzspektrum von Vitamin $K_1/K_1^{\bullet-}$ *in vitro* [196]. Große Unterstützung, daß der sekundäre Akzeptor ein Phyllochinon ist, wurde durch Rekonstitution von extrahiertem PS I mit Phyllochinon [197, 198] erhalten, welche das transiente EPR-Spektrum von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ und Vorwärtselektronentransfer zu F_A/F_B wiederherstellte.

Hochfeld-EPR am photoakkumulierten Semichinonanion [118, 199] und am sekundären Radikalpaar [200] sowie cw- und Puls-ENDOR an $A_1^{\bullet-}$ [199, 201] zeigten ungewöhnliche magnetische Eigenschaften von $A_1^{\bullet-}$:

Der g -Tensor von $A_1^{\bullet-}$ ist signifikant verschoben im Vergleich zu Vitamin $K_1^{\bullet-}$ in protischem Lösemittel [95] (siehe dazu Kap. 4.2.4) und das ENDOR-Spektrum von $A_1^{\bullet-}$ wies eine deutlich veränderte Spindichteverteilung im Vergleich zu $VK_1^{\bullet-}$ *in vitro* auf.

In diesem Kapitel werden Untersuchungen am photoakkumulierten Semichinonanion des sekundären Akzeptors mittels Multifrequenz-EPR und Puls-ENDOR-Spektroskopie im X-Band darge-

stellt. Die besonderen Eigenschaften von $A_1^{\bullet-}$ werden mit den Ergebnissen aus den Kapiteln 4.2 und 5 diskutiert.

6.1 EPR-Spektroskopie im X-, Q- und W-Band

Durch die in Kap. 3 beschriebene Photoakkumulation von mit Dithionit vorreduzierten PS I-Komplexen aus *S. elongatus* erhält man das Semichinonanion $A_1^{\bullet-}$, dessen EPR-Signal im X-Band eine charakteristische Linienform aufweist. In Abb. 6.1 unten ist das EPR-Spektrum von $A_1^{\bullet-}$ im X-Band gezeigt. Eine große Hyperfeinkopplung dominiert das Spektrum. Dieses Hyperfeinquantett ist typisch für den photoakkumulierten sekundären Akzeptor $A_1^{\bullet-}$ in cyanobakteriellem PS I [118, 199]. Im Q-Band (Abb. 6.1, Mitte) beginnt die Auflösung des g -Tensors, g_{zz} ist separiert von g_{xx} und g_{yy} zu erkennen. Die große Hyperfeinkopplung liegt auf g_{xx}/g_{yy} . Der vollständige g -Tensor ist erst im W-Band aufgelöst. Das im X-Band das Spektrum dominierende Hyperfeinquantett ist auf g_{yy} lokalisiert. Die Form des W-Band Spektrums mit der Separation von g_{xx}/g_{yy} zu g_{zz} und einer kleineren Trennung von g_{xx} und g_{yy} ist typisch für Hochfeld-EPR Spektren von Semichinonanionen, siehe Burghaus *et al.* [95] und Kap. 4.2.4. Die Spektren von Vitamin $K_1^{\bullet-}$ in gefrorener Lösung von Isopropanol und DME/MTHF (Kap. 4.2.4) wiesen jedoch nicht die ausgeprägte Hyperfeinstruktur auf g_{yy} auf. Dies ist eine spezielle Eigenschaft des Semichinonanions in PS I.

Simulation der EPR-Spektren

Die große, aufgelöste Hyperfeinkopplung, drei magnetisch äquivalente Protonen repräsentierend, wurde der Methylgruppe an C-2 des Phyllochinons zugeordnet [199, 201]. Unter Benutzung der aus dem ENDOR-Spektrum (siehe folgendes Kap. 6.2, Tab. 6.2) für die 2-Methyl-HFC und die H-Brücke ermittelten Werte wurde versucht, das Spektrum in allen drei Frequenzbändern zu simulieren. Als freie Parameter wurden die g -Hauptwerte und die Orientierung der Hyperfeintensoren der 2-Methylgruppe sowie der Wasserstoffbrücke gewählt. Weitere Hyperfeinkopplungen sind in den EPR-Spektren nicht aufgelöst und in der Simulation durch eine Gauss'sche Linienformfunktion berücksichtigt.

Die Simulation der EPR-Spektren in den drei Frequenzbändern gelang allein bei Berücksichtigung der Methyl-HFC überraschend gut (Abb.6.1). Dies bedeutet, daß der Hyperfeintensor der Wasserstoffbrücke so orientiert sein muß, daß seine effektiven Hyperfeinkopplungen kaum zur Linienbreite auf g_{xx} und g_{yy} beitragen können. Anderenfalls wäre die Hyperfeinstruktur auf g_{yy} nicht so gut aufgelöst und die Spektren auf g_{xx} zu breit. Damit ergeben sich zwei mögliche Orientierungen für den Hyperfeintensor der Wasserstoffbrücke:

Einerseits wäre eine Lage nahe des magischen Winkels (54.74°) denkbar, da hier durch die Winkelabhängigkeit der dipolaren Hyperfeinkopplung ($3 \cos^2 \theta - 1$) die effektive HFC sehr klein wird und nicht mehr zum EPR-Spektrum beiträgt. Eine andere Variante ist die Orientierung des Hy-

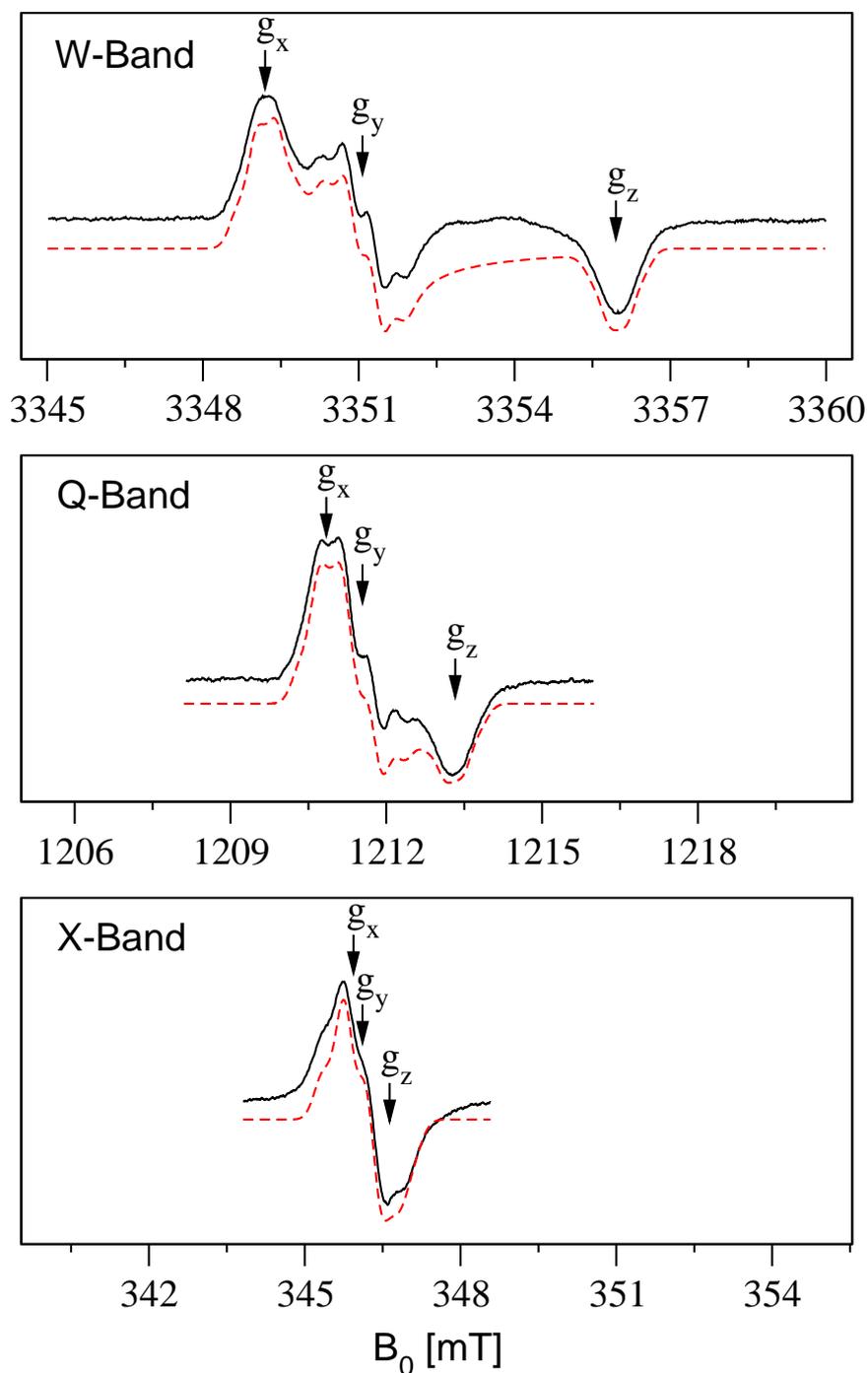


Abbildung 6.1: EPR Spektrum des photoakkumulierten Radikalanions $A_1^{\bullet-}$ im W-Band (94 GHz), Q-Band (34 GHz) und X-Band (9 GHz), schwarz: Experiment, rot: Simulation, $T = 80$ K, nichtsättigende Mikrowellenleistung, 0.1 mT Modulationsamplitude

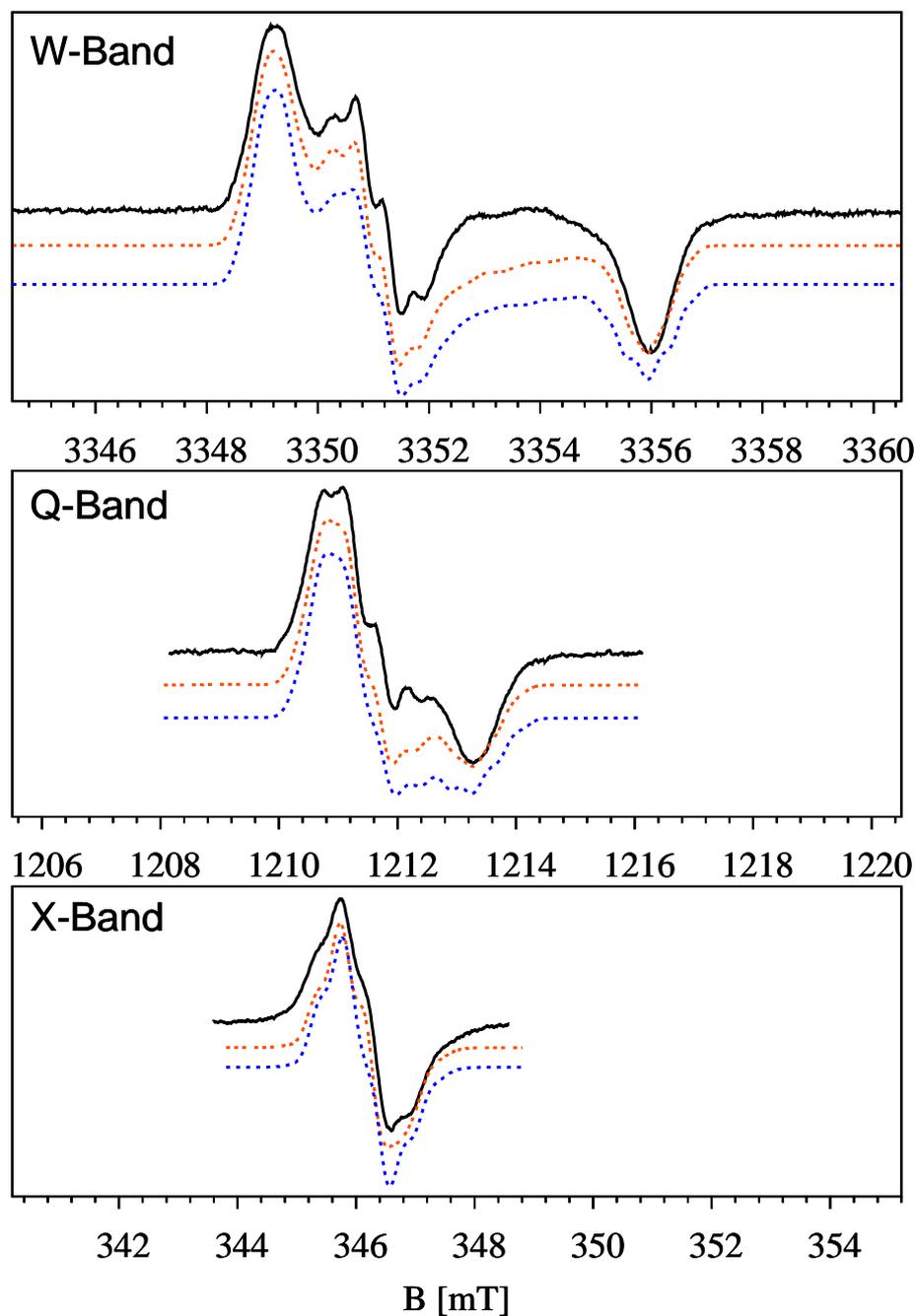


Abbildung 6.2: Vergleich von Experiment und Simulation der cw-EPR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in PS I aus *S. elongatus* unter Berücksichtigung von Hyperfeinkopplungen der CH_3 -Gruppe und der Wasserstoffbrücke, schwarz: Experiment, rot: Simulation mit A_{\parallel} der H-Brücke 54.74° zu g_{xx} , blau: Simulation mit A_{\parallel} der H-Brücke mit Winkel zu $g_{zz} = 10^\circ$

perfeintensors der H-Brücke in Richtung g_{zz} , also senkrecht zur Molekülebene. Ein Indiz dafür, daß die Wasserstoffbrücke aus der Chinonebene gedreht vorliegt, ist das Vorliegen eines großen isotropen Anteils an der Hyperfeinkopplung (Tab. 6.2), siehe dazu die Bestimmung der Wasserstoffbrücken in d_{10} -2-EthNQ \bullet^- , Kap. 4.2.3.

Die beste Übereinstimmung der Simulation mit den experimentellen Spektren unter Berücksichtigung nur der 2-CH₃-HFC ergab sich für die Orientierung des Hyperfeintensors der Methylgruppe im g -Achsen-System des Chinons mit seiner $A_{||}$ -Komponente in der xy -Ebene und einem Winkel von $25 \pm 5^\circ$ mit g_{yy} . Der Hyperfeintensor liegt damit ungefähr entlang der C-CH₃ Bindungsachse. Eine genauere Bestimmung der Orientierung des Methylhyperfeintensors folgt in Kap. 7.5 aus Puls-ENDOR-Messungen am sekundären Radikalpaar $P_{700}^+A_1^{\bullet-}$ in PS I-Einkristallen.

Eine Simulation der EPR-Spektren in X-, Q- und W-Band unter Berücksichtigung von 2-CH₃-HFC und den beiden oben diskutierten Varianten für die Orientierung des Hyperfeinkopplungstensors der Wasserstoffbrücke ist in Abb. 6.2 gezeigt. Die durch Simulation der Spektren in den drei Frequenzbändern erhaltenen g -Hauptwerte sind in Tab. 6.1 aufgeführt.

Für eine vollständige Aufklärung der Orientierung der Wasserstoffbrücke sind jedoch ENDOR Messungen mit höherer Orientierungsselektion als im X-Band notwendig. Erste Hinweise, daß diese ungewöhnliche Orientierung der H-Brücke nicht unwahrscheinlich ist, geben die ENDOR-Experimente am sekundären Radikalpaar $P_{700}^+A_1^{\bullet-}$ im Einkristall, siehe Kap. 7.5.

Tabelle 6.1: g -Tensor-Hauptwerte von $A_1^{\bullet-}$ in PS I und $K_1^{\bullet-}$ *in vitro* bestimmt aus Hochfeld-EPR-Spektroskopie und Vergleich mit Literaturwerten für $A_1^{\bullet-}$

Radikal	g_x	g_y	g_z	Ref.	ν_{mw}
VK $_1^{\bullet-}$ (IP)	2.00578(3)	2.00503(3)	2.00224(3)	hier	94 GHz
VK $_1^{\bullet-}$ (D/M) ^a	2.00623(3)	2.00505(3)	2.00220(3)	hier	94 GHz
VK $_1^{\bullet-}$ (IP)	2.00579	2.00498	2.00218	[95]	95 GHz
$A_1^{\bullet-}$ (PS I)	2.00625(3)	2.00512(3)	2.00220(3)	hier	94 GHz
$A_1^{\bullet-}$ (PS I) ^b	2.0062	2.0051	2.0022	[202]	94 GHz
$A_1^{\bullet-}$ (PS I)	2.00625	2.00503	2.00227	[118]	283 GHz

^aD/M = DME/MTHF

^baus Messungen an $P_{700}^+A_1^{\bullet-}$ bestimmt

6.2 ENDOR-Spektroskopie

Zur genaueren Untersuchung der Spindichtevertielung wurden von $A_1^{\bullet-}$ ENDOR-Spektren aufgenommen. Abb. 6.3 zeigt das Field Swept Echo und die Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in PS I aus *S. elongatus* im X-Band. Die ENDOR-Spektren wurden an den drei markierten Feldstellen aufgenommen, um wie in Kap. 4.2.4 eine gewisse Orientierungsselektion zu erreichen. Das mittlere Spektrum stellt das Pulvermittel dar, wo alle Orientierungen zum Spektrum beitragen. Charakteristisch ist die spektrale Trennung eines axialen Hyperfeintensors im Bereich von $\pm(6.5-4.5)$ MHz vom restlichen Spektrum. Dieser wurde der Methylgruppe zugeordnet [199,201] und ist charakteristisch für $A_1^{\bullet-}$ in PS I. Die ENDOR Spektren im X-Band zeigen ähnlich wie im Falle des $VK_1^{\bullet-}$ in gefrorenem Isopropanol eine begrenzte Orientierungsselektion an den extremen Feldstellen im EPR Spektrum (vgl. Abb. 4.17). Das ist z. B. gut am Hyperfeintensor der Methylgruppe zu erkennen: An Feldstelle A, B tragen hauptsächlich A_{xx} und A_{yy} zum ENDOR Spektrum bei, nur an Feldstelle C ist die Orientierungsselektion ausreichend, um nahezu nur A_{zz} zu erhalten. Die Ursachen dafür sind identisch mit denen im Fall von $VK_1^{\bullet-}$. Die spektrale Trennung zwischen g_{xx} und g_{yy} (0.19 mT) ist kleiner als die Hyperfeinanisotropie des Methylhyperfeintensors (0.46 mT, bei Berücksichtigung des Hyperfeinquartetts 0.92 mT zwischen g_{xx} und g_{yy}), zwischen g_{yy} und g_{zz} beträgt die g -Anisotropie 0.5 mT.

Austauschbare Protonen konnten nicht direkt durch H_2O/D_2O -Austauschexperimente gefunden werden. Mehrere Austausch-Experimente mit D_2O -Puffer bei verschiedenen pH-Werten, unterschiedlichen Austauschtemperaturen und Zeiträumen führten nicht zu detektierbaren Änderungen in der Linienbreite der EPR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ oder zu verringerten Linienintensitäten im ENDOR-Spektrum (verglichen mit dem Spektrum in H_2O). Selbst ein Austausch über einen Zeitraum von 9 Monaten an PS I-Ferredoxin-Kokristallen führte zu keinem Effekt in den EPR oder ENDOR Spektren.

Ein elegantes Verfahren zum Nachweis der Wechselwirkung von $A_1^{\bullet-}$ mit Protonen der Proteinumgebung wurde durch Deletions-Mutanten ermöglicht. In diesen Mutanten ist die Bindungsstelle mit einem leicht austauschbaren Plastochinon-9 besetzt [108]. Dieses wurde hier durch ein voll deuteriertes Vitamin K_3 ersetzt. Abb. 6.4 zeigt einen Vergleich der Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ und d_8 - $VK_3^{\bullet-}$. Durch die Deuterierung sind nur die Hyperfeinkopplungen mit Protonen aus der Proteintasche im Protonenbereich des ENDOR-Spektrums zu sehen.

Dazu gehören Kopplungen entfernter Protonen, die zum Matrixbereich beitragen. Es sind aber auch Hyperfeinkopplungen zu erkennen, die zu einem axialen Tensor zugeordnet werden können (mit Pfeilen in Abb. 6.4 gekennzeichnet). In Abb. 6.4 unten ist eine Simulation des Hyperfeintensors dargestellt. Ein Vergleich mit dem Puls-ENDOR-Spektrum von nativem $A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* (Abb. 6.4 oben) zeigt Übereinstimmung von Tensorkomponenten mit dem axialen Tensor, wie er

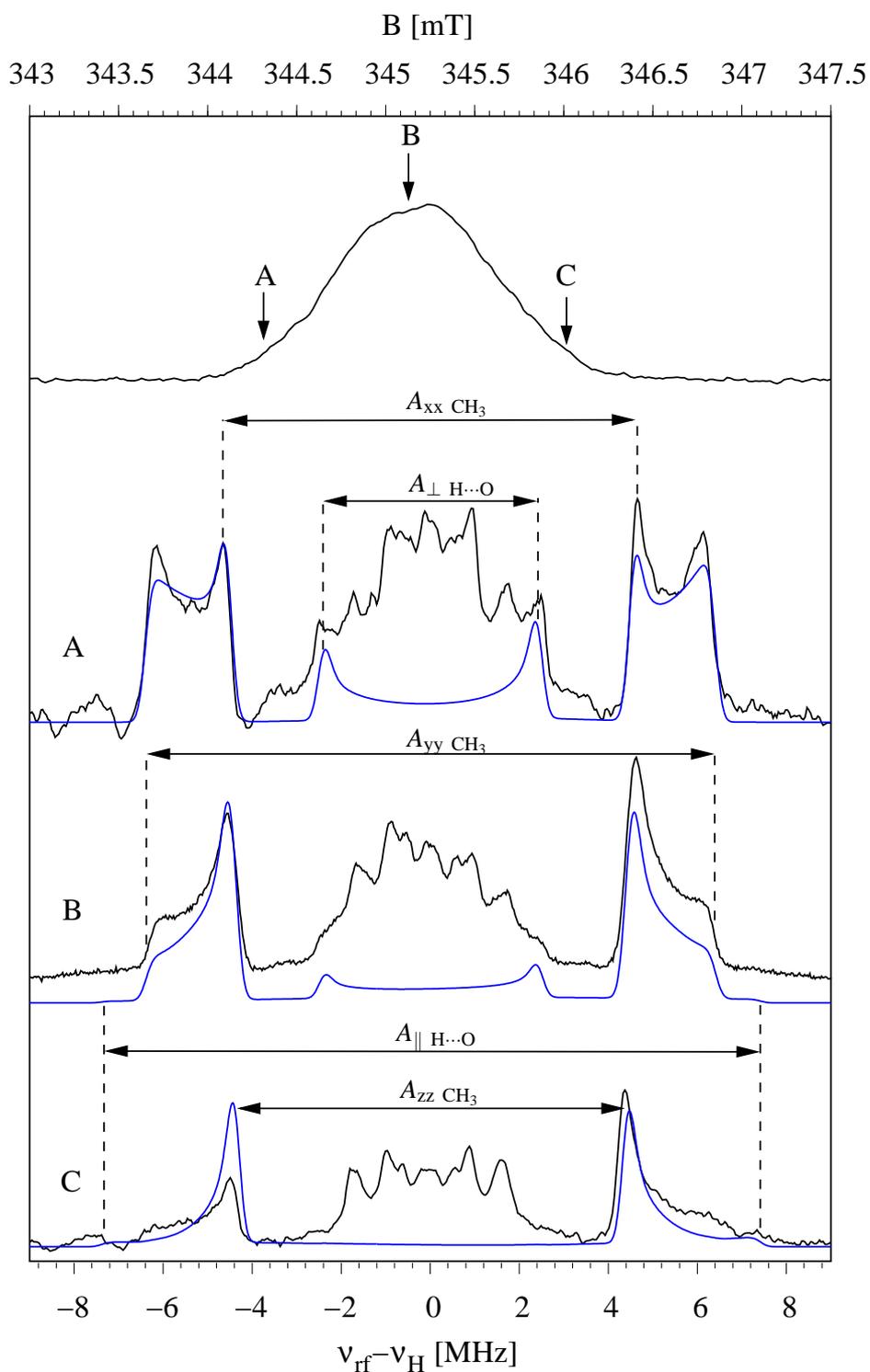


Abbildung 6.3: Puls-EPR und Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus*; A,B,C: ENDOR Spektrum an der jeweils im EPR Spektrum gekennzeichneten Feldstelle; schwarz: Experiment, blau: Simulation der CH_3 -Kopplung und der H-Brücke; $T = 80 \text{ K}$, Davies-ENDOR

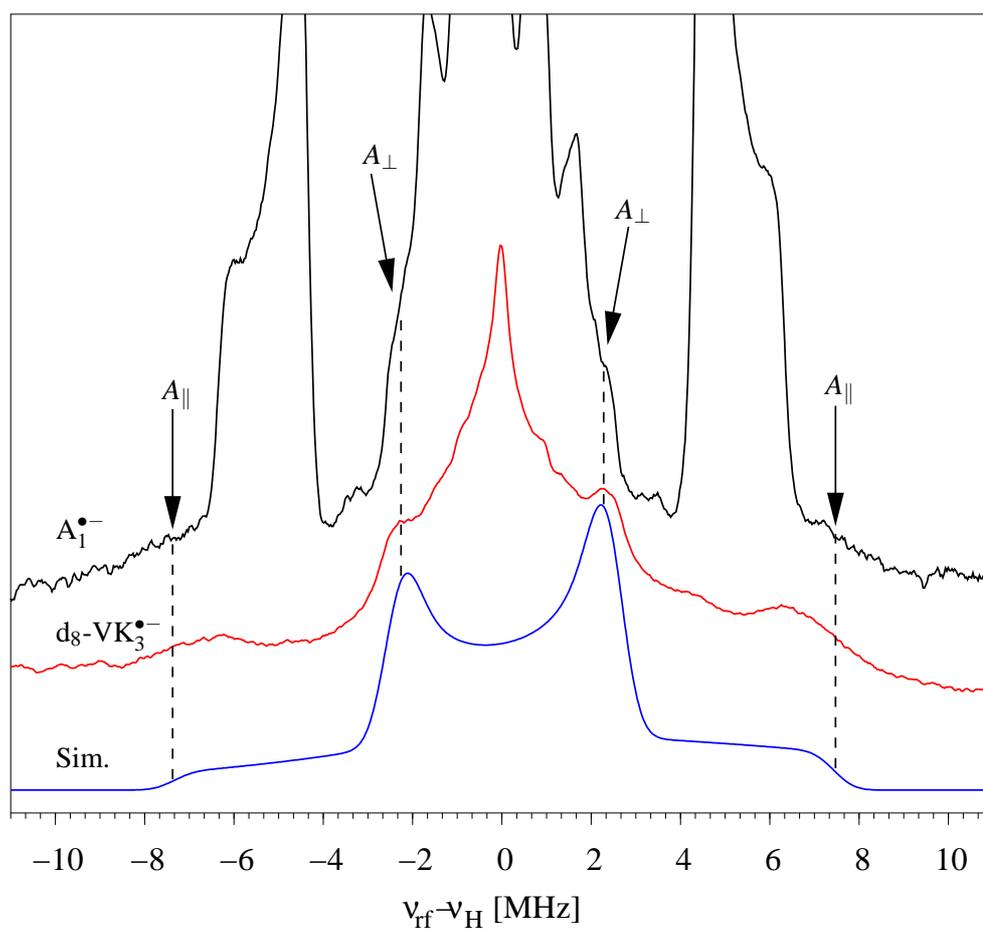


Abbildung 6.4: Vergleich der Davies-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus*, $d_8\text{-VK}_3^{\bullet-}$ in der A_1 -Tasche (*menB*-Mutante) und der Simulation der H-Brücke; T = 80 K, Davies-ENDOR

im Spektrum von $d_8\text{-VK}_3^{\bullet-}$ (in der A_1 -Bindungstasche) zugeordnet werden konnte. Es konnte mittels transientser EPR gezeigt werden, daß in die A_1 -Tasche inkorporierte artifizielle Chinone eine zum nativen Phyllochinon identische Orientierung einnehmen, wenn sie am Chinonring eine Substitution tragen [203]. Unter dieser Prämisse ist es plausibel anzunehmen, daß $d_8\text{-VK}_3^{\bullet-}$ in derselben Weise mit der Proteinumgebung wechselwirkt wie Phyllochinon in PS I. Da die Kopfgruppe von VK_3 und VK_1 sich nur durch den Phytylschwanz unterscheiden, sollte durch die asymmetrische Wasserstoffbrücke das $d_8\text{-VK}_3^{\bullet-}$ eine vergleichbare Spindichteverschiebung im Chinonring erfahren wie das Phyllochinon *in vivo*. Ein Vergleich der Spektren bestätigt dies, es ist ein vergleichbarer axialer Tensor im ENDOR-Spektrum von $A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* wiederzufinden (oberstes Spektrum in Abb. 6.4). Damit können die Hyperfeinkopplungen in $A_1^{\bullet-}$ zugeordnet werden. Es muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß in Ref. [203] von einem partiellen Austausch von Plastochinon mit artifiziellen Chinonen berichtet wurde. In dem hier photoakkumulierten $d_8\text{-VK}_3^{\bullet-}$ sollte dies als Überlagerung sowohl im FSE als auch im Puls-ENDOR-Spektrum sichtbar sein. Im FSE ist jedoch keine Linienverbreiterung (nicht gezeigt) bemerkbar, das ENDOR Spektrum weist auch keine Spuren der charakteristischen Kopplungen der Methylgruppen des Chinons in *menA/menB* auf [204] (siehe auch Kap. 7.3.1). Es kann daher angenommen werden, daß nur das Radikalanion von $d_8\text{-VK}_3$ photoakkumuliert wurde.

Auswertung der Spektren

Die Simulation der ENDOR Spektren unter Berücksichtigung der g -Anisotropie von $A_1^{\bullet-}$ lieferte die Hauptwerte des Methyltensors und der Wasserstoffbrücke. Dabei wurde die Orientierung der beiden Hyperfeintensoren, wie sie aus den EPR-Spektren in X-, Q- und W-Band (siehe vorhergehenden Teil) abgeschätzt wurden, berücksichtigt.

Vergleicht man die Hyperfeinkopplung der CH_3 -Gruppe mit der Kopplung von $\text{VK}_1^{\bullet-}$ *in vitro* (Kap. 4.2), so ergibt sich eine Vergrößerung von 30% für das Radikalanion im Protein. Wie die Messungen von $\text{VK}_1^{\bullet-}$ in verschiedenen Lösemitteln gezeigt haben, kann diese drastische Spindichteverschiebung nicht von einer Änderung der Umgebung wie Polarität der Bindungstasche herrühren. Vielmehr muß ein spezifischer Einfluß zu diesem starken Effekt führen. Wie schon in Kap. 5 durch Rechnungen an einem Modell der A_1 -Tasche gezeigt werden konnte, ist die Ursache für diese Spindichteverschiebung eine starke einseitige Wasserstoffbrücke.

Durch einen D_2O -Austausch in *S. elongatus* konnten keine austauschbaren Protonen gefunden werden. Selbst ein Austausch von PS I-Ferredoxin-Kokristallen in D_2O -Puffer über einen Zeitraum von neun Monaten führte nicht zu einem Austausch. Durch den Einbau eines volldeuterierten $d_8\text{-VK}_3$ in die A_1 -Bindungstasche konnten jedoch spezifische Wechselwirkungen des Kofaktors mit dem Protein über die HFC's im ENDOR Spektrum sichtbar gemacht werden

(Abb. 6.4). Ostafin *et al.* [205] konnten jedoch zeigen, daß die A_1 -Bindungstasche prinzipiell für externe Chinonmoleküle zugänglich ist. Die Inkubation von protoniertem PS I mit deuteriertem Phyllochinon und *vice versa* zeigte deutliche Linienbreiteneffekte in den transienten EPR Spektren. Vermutlich ist die A_1 -Bindungstasche hydrophoben Molekülen zugänglich, hydrophile Moleküle wie H_2O/D_2O können jedoch nicht eindringen.

Eine Zuordnung der α -Protonen ist durch die mit der H-Brücke eingeführte Asymmetrie der Spindichte nicht möglich. Zwar kann angenommen werden, daß nur die isotrope Kopplung der α -Protonen alternierend im annellierten Phenylring erhöht bzw. verringert wird (wie auch in Kap. 5 gezeigt werden konnte). Jedoch ist dies nur ein qualitatives Argument, wie stark sich die isotrope Kopplung verschiebt, kann nicht angegeben werden. Außerdem sind in dieser Näherung keine weiteren Einflüsse (wie z. B. durch polare Aminosäuren) des Proteins einbezogen.

Tabelle 6.2: Aus der Simulation der Puls-ENDOR Spektren ermittelte Hyperfeinkopplungen von $A_1^{\bullet-}$ in PS I

Zuordnung	A_{xx}'	A_{yy}'	A_{zz}'	$\frac{1}{3}\text{Tr}(\mathbf{A})$
CH ₃	-1.1	2.6	-1.5	+10.2
H-Brücke zu O-4 ^a	-6.57	13.13	-6.57	+1.67

^agemessen an $d_8\text{-VK}_3^{\bullet-}$ in der A_1 -Tasche

6.2.1 Temperaturabhängigkeit der Hyperfeinkopplungen

Im Temperaturbereich von 10–30 K weisen die Puls-ENDOR Spektren von $A_1^{\bullet-}$ eine markante Temperaturabhängigkeit auf. Abb. 6.5 zeigt die Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ über einen Temperaturbereich von 5-90 K. Im Bereich von 5-15 K ist eine zusätzliche Kopplung von 18-22 MHz zu erkennen. Diese Kopplung verliert ihre Struktur mit steigender Temperatur und ist oberhalb 15 K nur noch als verschmierter Untergrund außerhalb der Methylkopplung und teilweise überlappend mit $A_{||}$ (CH₃) zu erkennen. Oberhalb 30 K ist die Struktur des Hyperfeintensors der Methylgruppe wiederhergestellt, die große Kopplung vollständig verschwunden. Parallel zu dieser Temperaturabhängigkeit verändert sich die partiell aufgelöste Hyperfeinstruktur des EPR-Spektrums (Abb. 6.6):

- Oberhalb 30 K ist das typische Hyperfeinquartett der Methylkopplung zu beobachten.

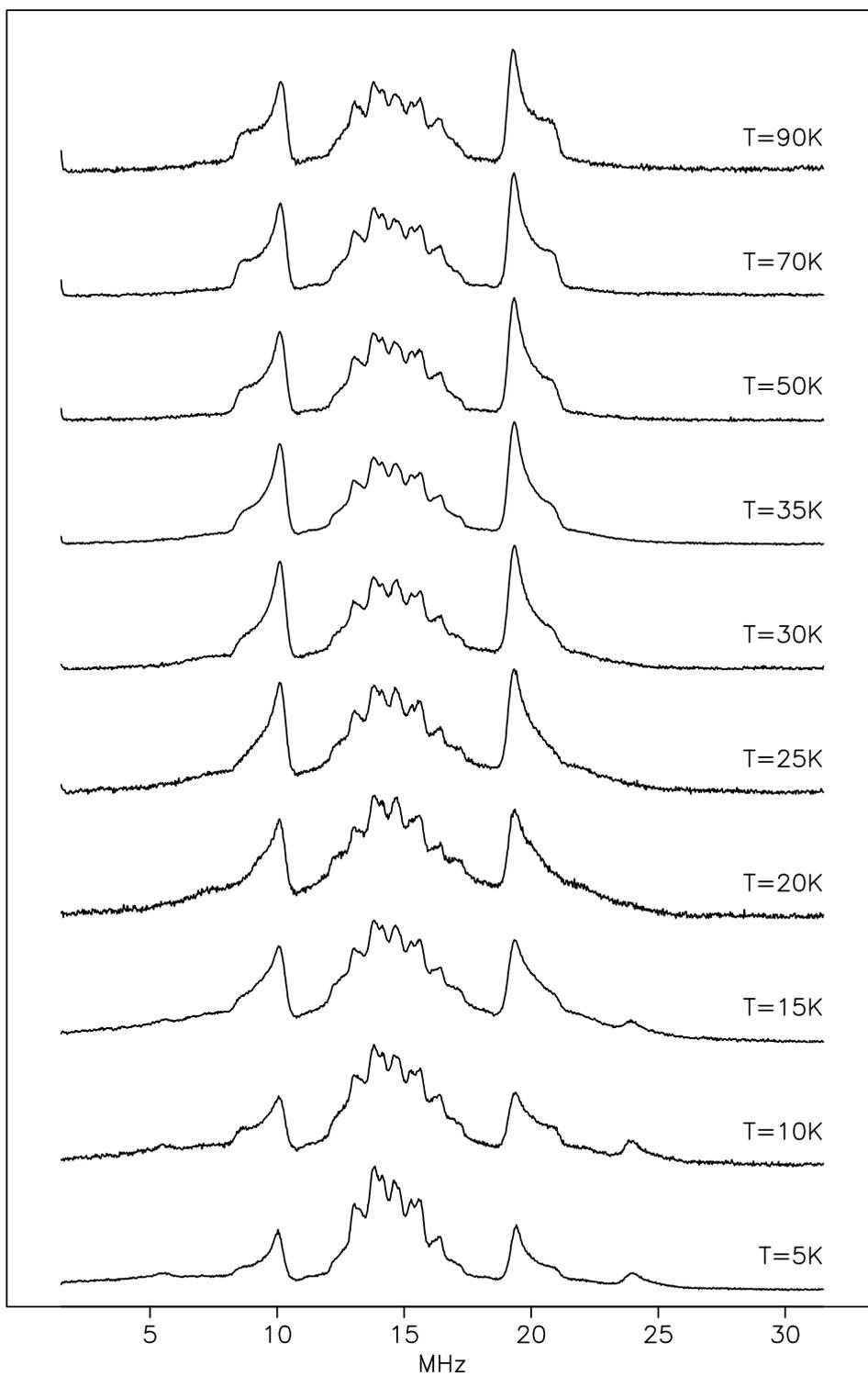


Abbildung 6.5: Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in PS I aus *S. elongatus* im Temperaturbereich von 5-90 K, Davies-ENDOR

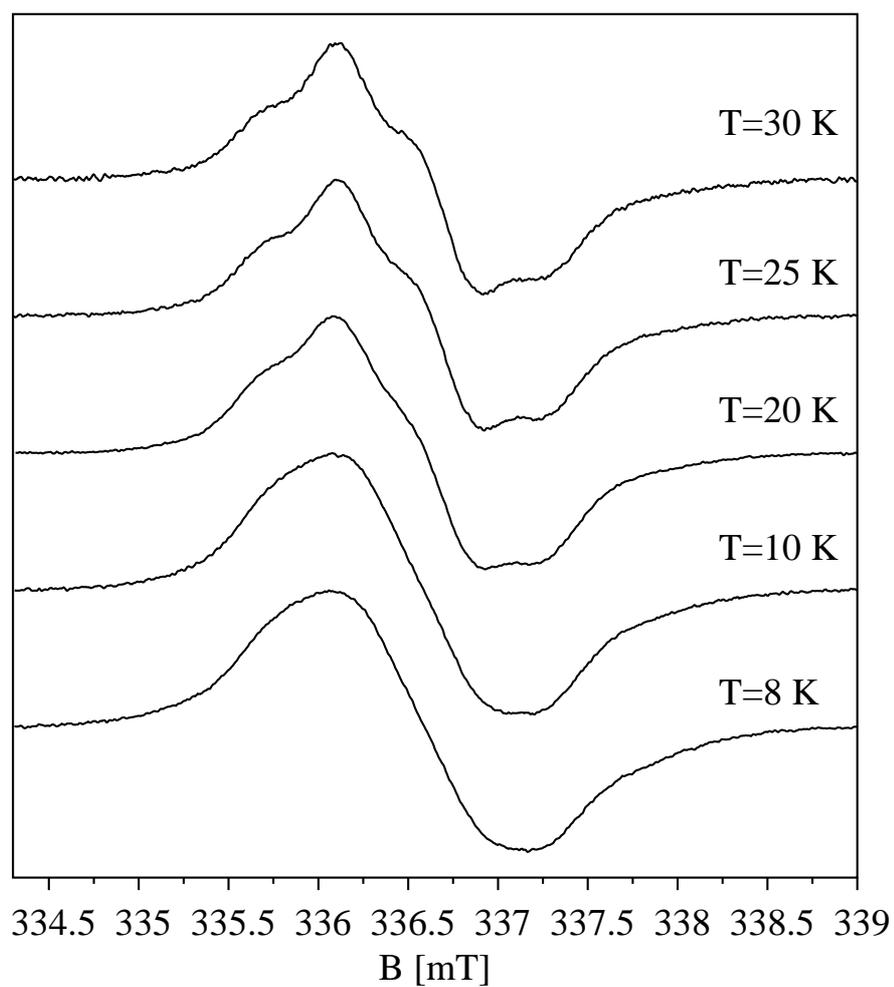


Abbildung 6.6: Temperaturabhängigkeit der cw-EPR Spektren von $A_1^{\bullet-}$ (in PS I aus *S. elongatus* im X-Band, nichtsättigende Mikrowellenleistung, Modulationsamplitude 1 G

- Unterhalb 30 K verbreitert sich das EPR-Spektrum, die partiell aufgelöste Hyperfeinstruktur verschwindet.

Die bei 5 K im Puls-ENDOR Spektrum (Abb. 6.5) gut zu erkennende, zusätzliche Hyperfeinkopplung weist eine axiale Struktur auf. Die Vermutung liegt daher nahe, daß die beobachtete Dynamik mit der Rotation der Methylgruppe des Phyllochinons zusammenhängt. Liegt ein Einfrieren der Rotation der Methylgruppe vor, so sollte die $\cos^2(\theta)$ -Abhängigkeit der isotropen Kopplung von β -Protonen gestatten, alle drei Methylprotonen zuzuordnen. Für eine frei rotierende Methyl-

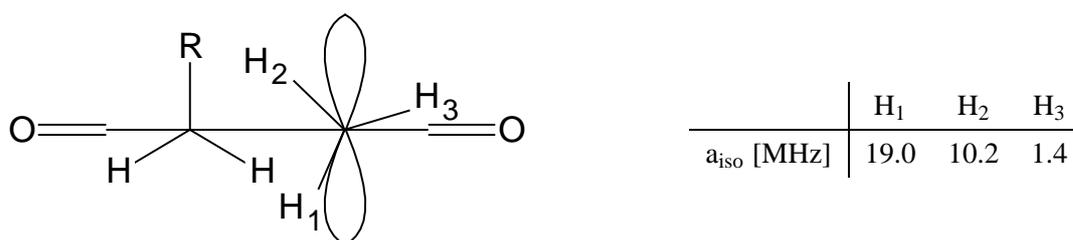


Abbildung 6.7: Orientierung der nichtrotierenden Methylgruppe in $A_1^{\bullet-}$ bei $T \leq 10$ K, schematische Darstellung mit Projektion entlang der Chinonebene, rechts: isotrope Hyperfeinkopplungen der einzelnen Protonen der 2-CH₃-Gruppe von $A_1^{\bullet-}$ bei $T \leq 10$ K, aus der Simulation des Puls-ENDOR Spektrums bei $T=5$ K (siehe Abb. 6.8) ermittelt

gruppe ist $\cos^2(\theta) = \frac{1}{2}$. Man erwartet also eine maximale isotrope Kopplung $a_{\text{iso}} = 20.4$ MHz ($\frac{1}{3}\text{Tr}(\mathbf{A})=10.2$ MHz für die Methylgruppe, siehe Tab. 6.2). Aus dem großen Hyperfeintensor im ENDOR-Spektrum bei 5 K ($A_{\parallel} = 18$ MHz, $A_{\perp} = 22$ MHz, $\frac{1}{3}\text{Tr}(\mathbf{A}) = 19.3$ MHz) ergibt sich damit ein Winkel von 13° zum π -System des Chinons oder 77° zur Chinonebene (H_1 in Abb. 6.7). Die beiden anderen Methylprotonen, die jeweils um 120° gedreht sind, sollten dann eine Konformation von 43° (H_2) und 17° (H_3) zum Chinonring einnehmen, siehe Abb. 6.7 links. Die sich daraus ergebenden isotropen Kopplungen sind in Abb. 6.7 rechts aufgeführt. Eine Simulation unter der Annahme, daß die Anisotropie der Hyperfeinkopplungen der einzelnen Methylprotonen identisch mit der der frei rotierenden Methylgruppe ist, zeigt Abb. 6.8. Wird das Intensitätsverhältnis der simulierten Methylprotonen (in Abb. 6.8 ganz unten) mit dem experimentellen Spektrum bei 10 K verglichen, so wird auch deutlich, daß die Methylgruppenrotation nur partiell einfriert. Das zeigt sowohl das Verhältnis der Linienintensitäten von Methylkopplung der rotierenden Methylgruppe zu der großen Kopplung als auch die größere Linienbreite der großen Kopplung. In Abb. 6.8 ist eine Simulation des Puls-ENDOR Spektrums bei tiefer Temperatur gezeigt. Bei der Simulation wurde die Methylgruppe in ihrer gestoppten Konformation (wie in Abb. 6.7 abgebildet) zu 40% und frei rotierend zu 60% bezogen auf das Integral der Methyl-HFC berücksichtigt. Ein Vergleich mit dem experimentellen Spektrum bei 10 K (Abb. 6.8) zeigt gute Übereinstimmung für die Methylhyperfeinkopplung in den Linienpositionen und -intensitäten.

Die Problematik der Rotation oder des Tunnelns von Methylgruppen und ihr Einfluß auf EPR und ENDOR Spektren wurde vielfach untersucht [206–209]. Ein ähnlicher Befund für eine temperaturabhängige Dynamik der Methylhyperfeinkopplungen wie hier wurde von Feher *et al.* [210] in cw-ENDOR Spektren am Bacteriochlorophyll *a*-Kation beobachtet und (das Tunneln der Protonen vernachlässigend) mit einem klassischen Modell eines gestoppten Methylgruppenrotors erklärt. Im Unterschied zu Feher *et al.* konnte die gehinderte Methylgruppenrotation nur in den EPR und ENDOR Spektren des Semichinonanions in PS I beobachtet werden, die Spektren des Vitamin $K_1^{\bullet-}$ *in vitro* zeigten keine derartige Temperaturabhängigkeit. Möglicherweise wird im PS I durch die Proteinumgebung dem Phytylschwanz eine Konformation aufgezwungen, die zu einer höheren Barriere für die Methylgruppenrotation führt, im Lösemittel hingegen kann sich der Phytylrest flexibler orientieren.

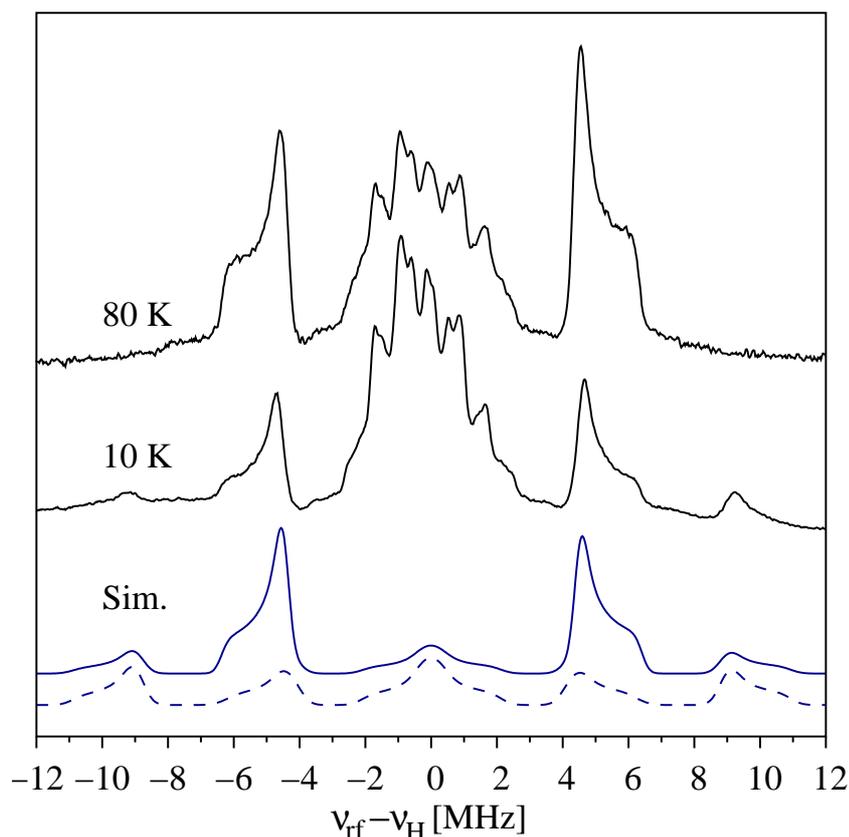


Abbildung 6.8: Vergleich der Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in PS I bei 5 K und 90 K, die zusätzlich bei 5 K auftauchende Hyperfeinkopplung kann einem Methylproton zugeordnet werden; unten: Simulation des ENDOR-Spektrums mit drei einzelnen Methylprotonen: obere Simulation mit 40% eingefrorener und 60% frei rotierender CH_3 -Gruppe, darunter Simulation des Puls-ENDOR Spektrums der CH_3 -Gruppe mit eingefrorener Methylrotation

6.2.2 $A_1^{\bullet-}$ in verschiedenen Spezies

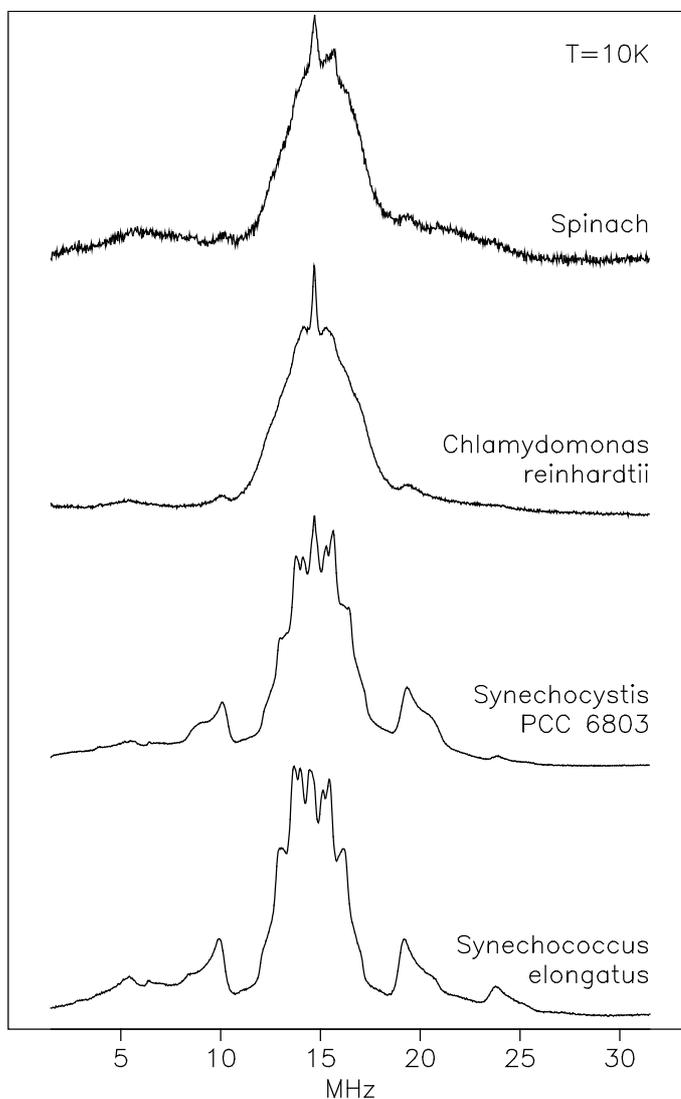


Abbildung 6.9: Vergleich der Puls-ENDOR-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in PS I von vier verschiedenen Spezies; Davies-ENDOR, $T = 10\text{ K}$

Die bisher gezeigten Untersuchungen an $A_1^{\bullet-}$ erfolgten ausschließlich an PS I aus *S. elongatus*. Um zu überprüfen, ob auch in anderen Spezies das Semichinonanion des sekundären Akzeptors photoakkumuliert werden kann und dieses mit $A_1^{\bullet-}$ aus *S. elongatus* vergleichbar ist, wurde versucht, auch in PS I aus drei anderen Organismen das Radikalanion zu erzeugen. Zu den untersuchten Spezies gehörten PS I aus *Synechocystis* PCC6803, Spinat, *C. reinhardtii*.

In PS I-Präparationen dieser drei Spezies wurden unter den in Kap. 3.2.2 beschriebenen Bedingungen $A_1^{\bullet-}$ photoakkumuliert. Abb. 6.9 zeigt einen Vergleich der Puls-ENDOR-Spektren von

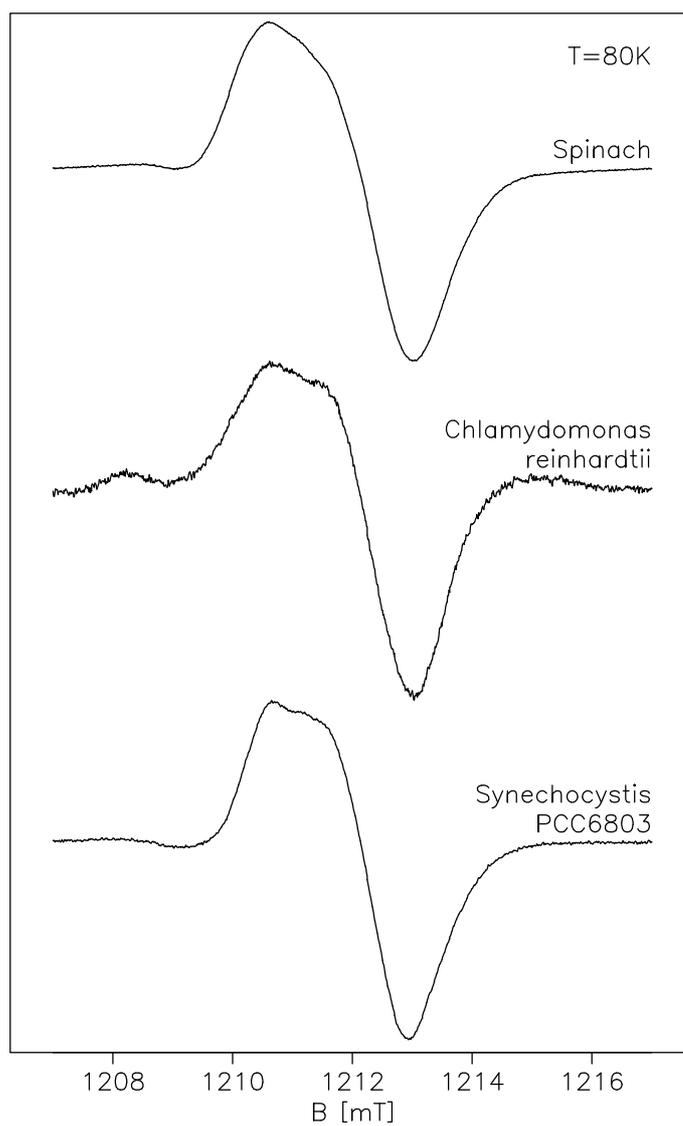


Abbildung 6.10: Vergleich der Q-Band EPR Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in Spinat, *C. reinhardtii* und von $A_1^{\bullet-}$ und $A_0^{\bullet-}$ in *Synechocystis* PCC6803

$A_1^{\bullet-}$ in Spinat, *C. reinhardtii*, *Synchocystis* PCC6803 (PCC6803) und *S. elongatus*. Während die ENDOR-Spektren der Cyanobakterien eine gut aufgelöste Hyperfeinstruktur sowohl des Zentralbereichs (12–18 MHz) als auch der Methylprotonen zeigen, sind in Spinat und *C. reinhardtii* die Kopplungen sehr verbreitert. Die kleineren Hyperfeinkopplungen im Bereich von 12–18 MHz sind unaufgelöst und von der Methyl-HFC ist nur die A_- -Komponente im Ansatz zu erkennen. Der Zentralbereich der Hyperfeinkopplungen erscheint im Vergleich zu *S. elongatus* und PCC6803 verbreitert. Verbreiterte Strukturen sind bis in den Bereich der großen Hyperfeinkopplung eines Protons der gestoppten CH_3 -Gruppe (im Bereich von 5 bzw. 25 MHz) zu erkennen.

Ein Vergleich der Q-Band-Spektren von photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ und $A_0^{\bullet-}$ in PCC6803 und unter $A_1^{\bullet-}$ -Photoakkumulationsbedingungen (siehe Kap. 3.2.2) behandelten Proben von Spinat und *C. reinhardtii* ist in Abb. 6.10 dargestellt. Hierbei wurde in der PS I-Probe von PCC6803 zusätzlich zu $A_1^{\bullet-}$ auch $A_0^{\bullet-}$ photoakkumuliert. Diese Photoakkumulation des primären Akzeptoranions ist bei 240 K möglich [118, 211]. Die Photoakkumulation wurde in Spinat und *C. reinhardtii* jedoch bei identischen Bedingungen wie für die Erzeugung von $A_1^{\bullet-}$ in den cyanobakteriellen PS I Proben durchgeführt, d. h. pH 10, Reduktion mit Dithionit und Photoakkumulation bei 205 K für 5 min, siehe Kap. 3.2.2.

Das Q-Band-Spektrum von $A_1^{\bullet-} + A_0^{\bullet-}$ in PS I von PCC6803 (Abb. 6.10, unten) zeigt große Ähnlichkeit mit den bei 205 K photoakkumulierten Signalen in Spinat und *C. reinhardtii*: während die Breite des Spektrums mit dem von $A_1^{\bullet-}$ vergleichbar ist, so ist die typische Hyperfeinstruktur auf g_{yy} nicht mehr zu erkennen (vgl. Abb. 6.1, mittlers Spektrum). Aus der vergleichbaren Form der Q-Band EPR Spektren kann geschlossen werden, daß in *C. reinhardtii* und in Spinat zusätzlich $A_0^{\bullet-}$ als Kontamination auch schon bei 205 K photoakkumuliert wird. Diese Kontamination führt offenbar zu den unaufgelösten ENDOR-Spektren wie in Abb. 6.9 gezeigt.

Die verbreiterte und unaufgelöste Struktur der ENDOR Spektren führten zu Schwierigkeiten in der Ermittlung der Hyperfeinkopplungen in *C. reinhardtii* und Spinat. Daher wurden weitere Untersuchungen an PS I von *C. reinhardtii* (Wildtyp und Punktmutanten) am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ durchgeführt, welches bei $T < 200$ K nach Lichtanregung und Elektronentransfer zu A_1 innerhalb von ca. 200 μs rekombiniert und somit der EPR-Spektroskopie zugänglich ist (siehe Kap. 7).

6.3 Diskussion und Zusammenfassung

Das photoakkumulierte Semichinonanion $A_1^{\bullet-}$ in PS I unterscheidet sich wesentlich durch zwei Merkmale in seiner elektronischen Struktur von Vitamin $K_1^{\bullet-}$ *in vitro*:

1. Der g -Tensor (besonders die g_{xx} -Komponente) in $A_1^{\bullet-}$ ist zu höheren Werten verschoben.
2. Die Spindichte im Chinonring ist in $A_1^{\bullet-}$ umverteilt, was sich durch eine deutliche Erhöhung der 2-Methyl-HFC bemerkbar macht.

Beide spektroskopische Befunde lassen sich im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Kap. 4 und 5 interpretieren. EPR-Spektroskopie im W-Band an $VK_1^{\bullet-}$ in dem polaren, protischen Lösemittel Isopropanol und dem apolaren Solvens-Gemisch DME/MTHF zeigte die gleiche signifikante Erhöhung der g_{xx} -Komponente in DME/MTHF (Abb. 4.2.4) wie in $A_1^{\bullet-}$ in PS I. Die Verschiebung von g_{xx} ist nicht ausschließlich auf das Fehlen von Wasserstoffbrücken zurückzuführen, in PS I konnte eine starke Wasserstoffbrücke zu A_1 durch ENDOR Spektroskopie an d_8VK_3 in der A_1 -Bindungstasche identifiziert werden. Vielmehr spielt auch die Polarität der Umgebung des Chinons eine bedeutende Rolle. Polare Gruppen führen zu einer höheren Anregungsenergie $\Delta E_{n\pi^*}$ und damit zu einer Verringerung von g_{xx} [178]. Daß die A_1 -Bindungstasche in ihrer Polarität mit DME/MTHF vergleichbar ist, konnte durch die Untersuchung der Abhängigkeit des Redoxpotentials $E_M(VK_1/VK_1^{\bullet-})$ vom Solvens gezeigt werden (Kap. 4.1).

Mit den DFT-Rechnungen an 2-Methyl-3-Propenyl-Naphthochinon konnte gezeigt werden, daß eine einseitige Wasserstoffbrücke zum O-4 (meta-ständig zur 2- CH_3 -Gruppe) zu einer Erhöhung der Spindichte an C-2 führt und damit auch zu einer größeren Methyl-HFC. Genau dieser Befund wurde am $A_1^{\bullet-}$ in PS I festgestellt, daher kann die H-Brücke dem O-4 zugeordnet werden. Die Kristallstruktur bestätigt dies [34], der Amidstickstoff von Leu A722 befindet sich in der Nähe zu O-4 des Phyllochinons. Hanley *et al.* [212] fanden auch mittels Elektronen-Spin-Echo-Envelope-Modulation-(ESEEM)Spektroskopie Hyperfein- und Quadrupolkopplungen zu zwei Stickstoffen, die zu einem Indolstickstoff eines Tryphtophans und einem Amidstickstoff¹ zugeordnet wurden. Die Zuordnung des Amidstickstoffs zu Leu A722 ist naheliegend. Ein Tryphtophan wird auch durch die Kristallstruktur bestätigt (Trp A697).

¹in Ref. [212] als auch Aminostickstoff eines Histidins oder als Amidstickstoff eines Asparagins/Glutamins vorgeschlagen

Die Art und Weise, wie das Phyllochinon in Photosystem I fixiert und in seinen Redoxeigenschaften an seine Funktion als Elektronenmediator zwischen A_0 und F_X angepaßt wird, kann aus den hier gezeigten Ergebnissen abgeleitet werden:

Die Einbindung in das Protein erfolgt über eine starke Wasserstoffbrücke von Leu A722 zu O-4. Das erforderliche negative Redoxpotential für die Funktion als Einelektronenmediator wird durch die apolare Bindungstasche erreicht.

Für die ungewöhnliche Einbindung ins Protein über eine starke einseitige Wasserstoffbrücke gibt es bisher in der Literatur nur ein Beispiel, das Ubichinon Q_H in dem Enzym Ubichinioxidase. Grimaldi *et al.* [213] fanden mit Q-Band EPR an selektiv ^{13}C -markierten Ubichinon-2 in der Q_H Bindungsstelle über Q-Band-EPR eine stark asymmetrische Spindichteverteilung im Semichinonion, die als einseitige (oder stark asymmetrische) Wasserstoffbrücke interpretiert wurde.

Die Simulation der EPR-Spektren in X-, Q- und W-Band war schon mit der Berücksichtigung der Methyl-HFC zufriedenstellend möglich. Dies kann als Indiz für die Orientierung von $A_{||}$ des Hyperfeintensors der Wasserstoffbrücke gewertet werden. Die H-Brücke sollte entweder nahe des magischen Winkels (54.74°) zur Chinonebene oder nahezu parallel zur g_{zz} -Tensorachse (was sehr ungewöhnlich ist) liegen. Um die Orientierung jedoch eindeutig festlegen zu können, sind ENDOR Experimente mit höherer Orientierungsselektion notwendig.

Die Puls-ENDOR Spektren von $A_1^{\bullet-}$ in PS I aus *S. elongatus* wiesen im Bereich von $T = 5-30$ K eine markante Temperaturabhängigkeit der Methylhyperfeinkopplung auf. Dies wurde als mit einem klassischen Modell einer gehinderten Methylrotation erklärt.

Ein Speziesvergleich zwischen Spinat, *C. reinhardtii*, *Synechocystis* PCC6803 und *S. elongatus* zeigte, daß die in cyanobakteriellem PS I erfolgreiche Photoakkumulation von $A_1^{\bullet-}$ in der Grünalge und Spinat zu Kontaminationen mit einem zweiten Radikal (vermutlich $A_0^{\bullet-}$) führte.

Kapitel 7

Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$

Das sekundäre Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ entsteht nach Lichtanregung in ca. 30 ps aus dem ersten angeregten Singulettzustand des primären Donators. Bei Temperaturen unter 200 K rekombiniert in einem Teil der PS I-Komplexe $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ innerhalb von ca. 200 μ s wieder in den Grundzustand. Durch diesen zyklischen Elektronentransfer ist dieser Zustand der transienten EPR-Spektroskopie zugänglich.

Mehrere Gründe waren die Motivation, auch das sekundäre Radikalpaar mit Puls-ENDOR Verfahren zu untersuchen.

1. Um mit magnetischer Resonanz den sekundären Akzeptor A_1 untersuchen zu können, muß das Radikalanion $A_1^{\bullet-}$ durch Photoakkumulation erzeugt werden. Die Prozedur erfolgt unter reduzierenden Bedingungen, um das $P_{700}^{\bullet+}$ (in Konkurrenz zur Rekombination mit $A_1^{\bullet-}$) reduzieren zu können. Daher ist das Argument nicht einfach von der Hand zu weisen, daß durch die Reduktion mit Dithionit das Protein verändert wird. Der direkte Weg ist die Spektroskopie am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$, dessen spinpolarisierter Zustand mehrere Mikrosekunden Lebensdauer hat und dadurch der EPR-Spektroskopie zugänglich ist. Mit EPR- und TR-ENDOR-Spektroskopie an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ kann dann gezeigt werden, daß der photoakkumulierte Zustand kein artifizielles Produkt der Photoakkumulationsprozedur ist.
2. Da die Photoakkumulation von $A_1^{\bullet-}$ in *C. reinhardtii* nicht ohne zusätzliche Kontaminationen von $A_0^{\bullet-}$ gelang, war die ENDOR-Spektroskopie am sekundären Radikalpaar die Alternative, trotzdem den sekundären Akzeptor in dieser Spezies ohne Kontaminationen von $A_0^{\bullet-}$ untersuchen zu können.

3. Eine weitere Motivation für die EPR/ENDOR-Spektroskopie am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ ist die potentielle Möglichkeit, diese Experimente an Einkristallen durchzuführen, damit die Orientierung von magnetischen Wechselwirkungen zu erhalten und daraus Informationen über die räumliche Struktur der Proteinumgebung von A_1 zu erhalten. Die für die Photoakkumulation von $A_1^{\bullet-}$ erforderliche Vorreduktion mit Dithionit ist an Einkristallen nicht möglich, sie führt zum Auflösen der Kristalle aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber höheren Ionenstärken (siehe Ref. [105]). Dies ist eine Konsequenz der angewandten Kristallisationstechnik, die auf der kontinuierlichen Senkung der Ionenkonzentration im Puffer beruht.

7.1 Vergleich von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ mit $A_1^{\bullet-}$

Abb. 7.1 zeigt einen Vergleich der Puls-ENDOR-Spektren von photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ und Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I aus *S. elongatus*. Die beiden ENDOR Spektren sind sehr ähnlich in ihren Linienpositionen. In beiden Spektren ist ein intensiver weitgehend axialsymmetrischer Hyperfeintensor, welcher der Methylgruppe zugeordnet ist, erkennbar. Eine weitere intensive Hyperfeinkopplung (mit gepunkteter Linie markiert) ist auch in beiden Spektren zu finden. Weitere übereinstimmende Kopplungen sind erkennbar, jedoch beziehe ich mich nur auf die gekennzeichneten Kopplungen im weiteren Kontext.

Hyperfeinkopplungen von $P_{700}^{\bullet+}$ sollten nur im Matrixbereich überlagert sein und geben bei den hier gewählten Meßbedingungen (MW-Pulslänge und Pulsabstände) wesentlich schwächere Signale. Puls-ENDOR-Messungen wurden auch an $P_{700}^{\bullet+}$ mit identischen Meßparametern wie für Messungen an $A_1^{\bullet-}$ durchgeführt und haben gezeigt, daß der ENDOR-Effekt für $P_{700}^{\bullet+}$ viel kleiner als für $A_1^{\bullet-}$ ist. Damit ist auch im TR-ENDOR-Experiment eine geringere Signalintensität von $P_{700}^{\bullet+}$ zu erwarten.

Der axialsymmetrische Hyperfeintensor, welcher der Methylgruppe zugeordnet worden ist [199, 201], zeigt wie im photoakkumulierten Radikalalanion $A_1^{\bullet-}$ einen Anstieg in der isotropen Kopplung verglichen mit $VK_1^{\bullet-}$ *in vitro* (Kap. 4.2.4). Kleinere Verschiebungen in den Hauptwerten sind jedoch erkennbar:

Für $A_1^{\bullet-}$ erhält man $A_{xx} = 9.0$ MHz, $A_{yy} = 12.6$ MHz, $A_{zz} = 8.7$ MHz (siehe Kap. 6.2), während für $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ A_{\perp} (A_{xx}/A_{zz}) nicht größer als 8.9 MHz wird und $A_{\parallel} = 12.5$ MHz ist. In Tab. 7.1 sind die bisher identifizierten Hyperfeintensorhauptwerte für $A_1^{\bullet-}$ aufgeführt.

Daß diese Verschiebungen nicht von der Kopplung zwischen den Elektronen des Radikalpaares stammen, konnten wir durch Simulation der Hyperfeinkopplung eines Kernspins mit zwei spin-

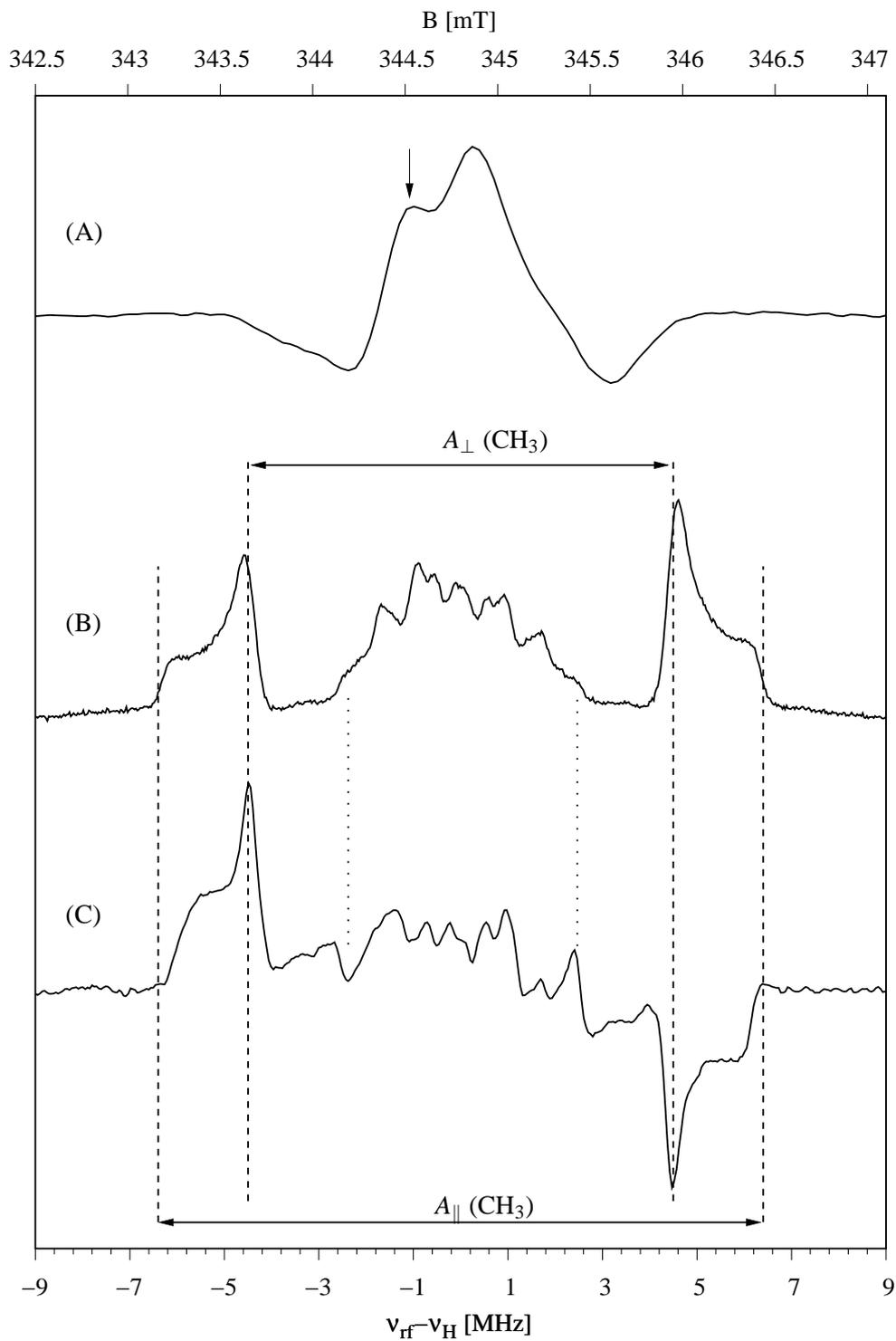


Abbildung 7.1: Vergleich der Puls-ENDOR Spektren von $A_1^{\bullet-}$ und $P_{700}^{+\bullet}A_1^{\bullet-}$ in PS I aus *S. elongatus*; (A) FSE von $P_{700}^{+\bullet}A_1^{\bullet-}$, markiert ist die Feldposition, an der das TR-ENDOR Spektrum (C) aufgenommen wurde, (B) Puls-ENDOR Spektrum von $A_1^{\bullet-}$, (C) Puls-TR-ENDOR Spektrum von $P_{700}^{+\bullet}A_1^{\bullet-}$; $T = 80$ K; experimentelle Parameter wie in Kap. 3 beschrieben

korrelierten Elektronen in Ref. [103] zeigen. Die Simulation der Puls-ENDOR-Spektren umfaßten zwei miteinander koppelnde Elektronenspins und einem $S=1/2$ Kern mit den folgenden Parametern:

Spin-Spin-Kopplungsparameter $D = -4.76$ MHz und $J = 0.03$ MHz (aus ESEEM-Experimenten an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ [214]), g -Tensoren von $P_{700}^{\bullet+}$ und $A_1^{\bullet-}$ und deren Orientierung sowie die Orientierung der dipolaren Kopplung zwischen den Elektronenspins aus Ref. [202], Hyperfeinkopplung als axialer Tensor mit $A_{\perp} = 9.1$ MHz und $A_{\parallel} = 12.8$ MHz der CH_3 -HFC von $A_1^{\bullet-}$ und die Orientierung des Hyperfeintensors mit A_{\parallel} in der Chinonebene mit 30° zu g_{yy} . Die Simulationen der TR-ENDOR Spektren zeigten, daß die Linienpositionen des axialen Hyperfeintensors sich nicht bei Entfernen der elektronischen Spin-Spin-Kopplung verschoben.

Die größten, im TR-ENDOR Spektrum zu erwartenden Hyperfeinkopplungen von $P_{700}^{\bullet+}$ sind die der $12-CH_3$ -Gruppe mit $A_{\parallel} = 6.1$ MHz und $A_{\perp} = 4.9$ MHz und Kopplungen der β -Protonen H17/H18 mit 9.6 und 7.7 MHz [68,215]. Die Kopplungen von H17/H18 überlappen zwar mit dem Bereich der CH_3 -Gruppe, sind aber verglichen mit CH_3 in ihrer Intensität wesentlich schwächer. Die Überlagerung mit $P_{700}^{\bullet+}$ sollte demnach allenfalls im Zentralbereich des TR-ENDOR Spektrums (± 4 MHz) auftreten.

Die auffallendste Eigenschaft des TR-ENDOR Spektrums in Abb. 7.1 C ist das Auftreten von sowohl absorptiven als auch emissiven Beiträgen. Während der niederfrequente Teil des Methylhyperfeintensors absorptiv ist, erscheint der hochfrequente Teil emissiv. Im Unterschied dazu zeigt die im gezeigten Spektrum (C) gestrichelt markierte Kopplung entgegengesetzte, Emissions/Absorption (E/A) Polarisation. Diese Kopplung wurde in Kap. 6 der A_{\perp} -Komponente eines Wasserstoffbrückenproton zugeordnet. Wasserstoffbrückenkopplungen sind ausgeprägt dipolar, die A_{\perp} -Komponente demnach hat relativ zur Hyperfeinkopplung der Methylgruppe ein entgegengesetztes Vorzeichen. Dieses ausgeprägte Polarisationsmuster läßt vermuten, daß TR-ENDOR an spinpolarisierten Radikalpaaren empfindlich auf die relativen Vorzeichen von Hyperfeinkopplungen ist.

In Abb. 7.2 werden TR-ENDOR Spektren von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ gezeigt, welche an verschiedenen Feldpositionen über den gesamten Bereich des FSE aufgenommen wurden. Das Polarisationsmuster der TR-ENDOR Spektren weist eine markante Abhängigkeit von der Feldposition, an der das Spektrum aufgenommen wurde, auf:

Auf der Niederfeldkante (343.6/343.7 mT), wo das FSE emissiv ist, erscheinen auch die ENDOR-Übergänge hauptsächlich in Emission. Mit wachsendem B-Feld ändern die niederfrequenten Teile des TR-ENDOR Spektrums ihre Polarisation und werden absorptiv, was besonders gut am Methyltensor zu erkennen ist. Wird die Hochfeldkante des EPR-Spektrums von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ erreicht, verschwindet der niederfrequente Teil der Methylkopplung völlig. In Abb. 7.2 sind die Extrempo-

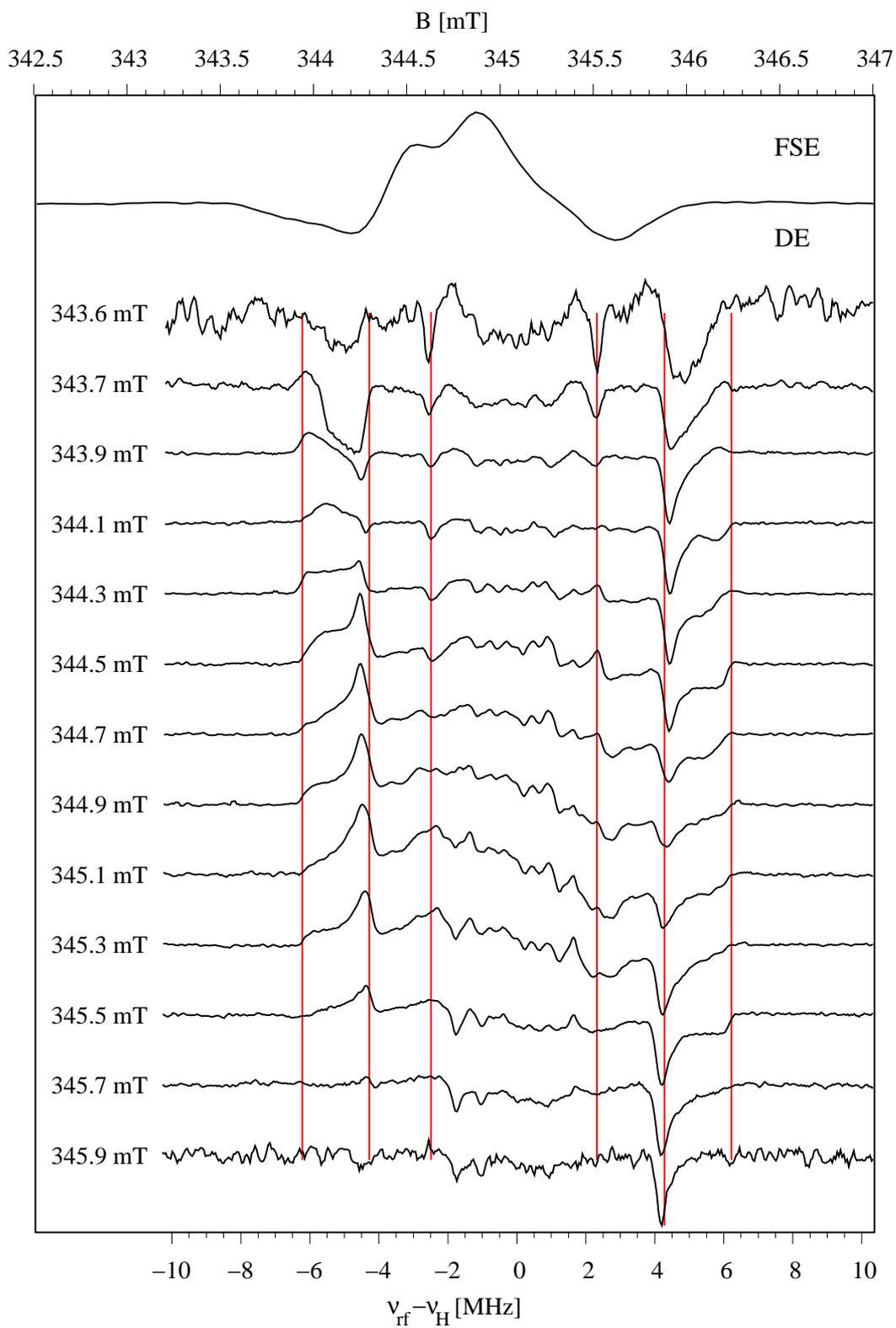


Abbildung 7.2: Abhängigkeit der ENDOR-Spektren von der Feldposition im EPR-Spektrum, oben ist das dazugehörige FSE abgebildet, Davies-ENDOR, 80 K

sitionen des Methyltensors gekennzeichnet. Verfolgt man die Entwicklung des Polarisationsmusters dieses Tensors, so ist zusätzlich zu erkennen, daß bei bestimmten Feldpositionen die Tensor­komponenten scheinbar kleiner oder größer erscheinen.

Mittels des in Kap. 2.5 erläuterten SCRIP-Modells und den dort abgebildeten Energieschemata (Abb. 2.7 und Abb. 2.8) läßt sich die spezielle Feldabhängigkeit der Spektren in Abb. 7.2 erklären. Ein wichtiger Punkt ist an dieser Stelle, daß im TR-ENDOR-Experiment am spinpolarisierten Radikalpaar die Intensitäten der zusätzlich auftretenden S/T_0 Übergänge stark abhängig von der Differenz der Larmorfrequenzen von $P_{700}^{\bullet+}$ und $A_1^{\bullet-}$, der Spin-Spin-Kopplung und der Hyperfeinkopplungen ist [103]. Ihr Wechselspiel zueinander an verschiedenen Stellen des EPR-Spektrums (unterschiedliche Larmorfrequenzdifferenz und Projektion von \mathbf{D} auf \mathbf{g}) führt zu sehr breiten Linien mit niedriger Intensität in den ENDOR-Spektren. Die voll erlaubten ENDOR Übergänge hingegen ergeben scharfe Linien, die das Spektrum dominieren.

Die Feldabhängigkeit der TR-ENDOR Spektren spiegelt einerseits die Abhängigkeit von den jeweils angeregten EPR-Übergängen wider, andererseits auch die (begrenzte) Orientierungsselektion, die im X-Band erreicht wird. Auf der Niederfeldseite ($B=343.7$ mT) werden daher hauptsächlich emissive EPR-Übergänge angeregt. Außerdem führt das Zusammenspiel von \mathbf{g} -Tensor und Hyperfein-Orientierungsselektion (siehe dazu auch Kap. 6.2) dazu, daß das Spektrum von Beiträgen von Molekülen mit $g_{xx} \parallel B_0$ dominiert wird. Das führt zu einer ausgeprägten A_{\perp} -Methyltensorkomponente auf der hochfrequenten Seite des Spektrums, während die niederfrequente Seite breiter und weniger ausgeprägt ist. An der kleinen absorptiven Linie bei -6 MHz ist aber zu erkennen, daß die Hyperfeinanisotropie im X-Band größer als Δg_{x-y} ist und die Breite des EPR-Spektrums bestimmt.

Mit wachsendem Magnetfeld werden Linien, die von Molekülen mit $g_{yy} \parallel B_0$ kommen, prominenter. Die TR-ENDOR-Spektren bekommen mehr und mehr absorptiven Charakter auf der niederfrequenten Seite. Außerdem wird die Parallelkomponente des Methyltensors immer ausgeprägter, da die Hauptachse von A_{\parallel} nahezu parallel zu g_{yy} orientiert ist ($\angle(A_{\parallel} g_{yy})=30^\circ$, vgl. Kap. 6.1).

In den TR-ENDOR-Spektren, die an Feldpositionen auf der Hochfeldseite des FSE aufgenommen worden sind, verliert A_{\parallel} an Intensität durch die Selektion von Molekülen mit $g_{zz} \parallel B_0$. Gleichzeitig ist aber auch an der Markierung der A_{\perp} -Komponente in Abb. 7.2 erkennbar, daß auf g_{zz} die A_{\perp} -Komponente des Methyltensors zu kleineren Werten als auf g_{xx} tendiert. Das bestätigt die Feststellung aus orientierungsselektiertem ENDOR an $A_1^{\bullet-}$ (Kap. 6.2), daß der Methyltensor leicht von axialer Symmetrie abweicht. Auf der extremen Hochfeldposition des FSE werden hauptsächlich emissive EPR-Übergänge angeregt. Das führt analog zur Tieffeldseite zu ausgeprägten Linien auf dem hochfrequenten Teil des TR-ENDOR Spektrums, während der tieffrequente Part des Methyltensors verbreitert ist.

Das in Kap. 2.5 erläuterte Modell zur Erklärung der A/E-Natur von TR-ENDOR Spektren läßt sich einfach auf einen koppelnden Kernspin ($I=1/2$) mit negativer Hyperfeinkopplung adaptieren. Die Änderung des Vorzeichens der Hyperfeinkopplung beeinflusst nur die Energiedifferenz der Hyperfeinsubniveaus. Entsprechend der Abb. 2.8 in Kap. 2.5 wird $\Delta E_{1\alpha \leftrightarrow 1\beta}$ zu ω_- und $\Delta E_{4\alpha \leftrightarrow 4\beta}$ zu ω_+ . Auf analoge Art und Weise wechseln die partiell erlaubten Übergänge:

$\Delta E_{2\alpha \leftrightarrow 2\beta}$ wird zu t_2 , $\Delta E_{3\alpha \leftrightarrow 3\beta}$ zu t_1 , dementsprechend vertauschen sich auch t_3 und t_4 . Diese Vertauschung der Energieaufspaltungen der Hyperfeinsubniveaus führt genau zu einer Umkehr der Polarisation der Linien im TR-ENDOR Spektrums, d. h. eine Hyperfeinkopplung mit negativem Vorzeichen führt zu einem Emissions-/Absorptionsmuster im Spektrum.

Genau dieses Polarisationsmuster ist an der in Abb. 7.1 gekennzeichneten Hyperfeinkopplung zu erkennen, diese HFC hat demnach relativ zur Methylkopplung ein umgekehrtes Vorzeichen. Das versichert zusätzlich die in Kap. 6.2 getroffene Zuordnung dieser Kopplung zur A_{\perp} -Komponente der Wasserstoffbrücke. Alternativ könnte diese Kopplung einem α -Proton zugeordnet werden. Die ausgeprägt scharfe Linienform spricht aber eher für die Zuordnung zu A_{\perp} einer H-Brücke. Die korrespondierende A_{\parallel} -Komponente kann im TR-ENDOR Spektrum nicht identifiziert werden, die größte Hyperfeinkopplung ist A_{\parallel} des Methyltensors. Da auch die Methyl-HFC im Radikalpaarspektrum etwas kleiner ist, ist möglicherweise die Spindichterverschiebung im Chinonring in den Messungen an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ geringer und daher der Abstand der H-Brücke zum Chinon etwas länger. Einhergehend damit würde die HFC der Wasserstoffbrücke etwas kleiner werden als in $A_1^{\bullet-}$ und die A_{\parallel} -Komponente dadurch mit der Methyl-HFC vollständig überlappen.

In Tab. 7.1 sind die bisher zugeordneten Hyperfeinkopplungen in $A_1^{\bullet-}$ aufgeführt. Während die Hyperfeinkopplungen der Methylgruppe gut mit Literaturwerten übereinstimmen, so bestehen Differenzen die HFC's der Wasserstoffbrücke betreffend. Rigby *et al.* [201] und Evans *et al.* [216] fanden noch eine weitere Hyperfeinkopplung für eine zweite Wasserstoffbrücke. Die Zuordnung der zweiten Wasserstoffbrücke basiert allerdings auf Special Triple-Messungen mit schlechtem Signal/Rausch-Verhältnis. Die Zuordnung der korrespondierenden A_{\parallel} -Komponenten erfolgte in Ref. [201] nicht wie A_{\perp} direkt aus dem ENDOR Spektrum an biosynthetisch deuteriertem $A_1^{\bullet-}$, sondern aus einem Special Triple Spektrum an protoniertem $A_1^{\bullet-}$ über das Argument, daß die Spur des Hyperfeintensors der Wasserstoffbrücke nahezu null sein muß. Durch die begrenzte Qualität der Spektren und dem Überlappen mit der 2-Methyl-HFC erscheint mir die Zuordnung von zwei Wasserstoffbrücken in Ref. [201] relativ willkürlich. In den hier untersuchten Spezies wurden keine Anzeichen für mehrere Wasserstoffbrücken gefunden. Die in Ref. [201, 216] diskutierte Fixierung des Phyllochinons über zwei Wasserstoffbrücken, jeweils eine zu einem Carbonylsauerstoff, stünde auch im Widerspruch mit der großen Methyl-HFC. Die DFT-Rechnungen in Kap. 5 zeigten, daß nur eine einseitige Wasserstoffbrücke zu der beobachteten Spindichterverschiebung führte. Die

Tabelle 7.1: Vergleich der Hyperfeinkopplungen von $A_1^{\bullet-}$ (in MHz)

Spezies	CH ₃ -Kopplung		H-Brücke		Referenz
	A_{\perp}	A_{\parallel}	A_{\perp}	A_{\parallel}	
<i>S. elongatus</i>	8.9	12.5	-4.9	n. d.	hier, Messung an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$
<i>C. reinhardtii</i>	9.0	12.6	-4.6 ^a	n. d.	hier, Messung an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$
<i>S. elongatus</i>	8.7, 9.1 ^b	12.8	-4.9	+14.8	hier, Messung an $A_1^{\bullet-}$
<i>C. reinhardtii</i>	9.2	(13.3) ^c	–	–	hier, Messung an $A_1^{\bullet-}$
<i>C. reinhardtii</i>	8.8	12.3	-4.6	10.9	$A_1^{\bullet-}$ [216]
Spinat	9.0	12.6	-6.4	13.7	
			-5.2	13.4	$A_1^{\bullet-}$ [201]
			-6.0	–	
<i>A. variabilis</i>	9.0	12.8	-5.0	13.4	$A_1^{\bullet-}$ [201]
			-5.8	–	

^ain Analogie zur Kopplung in *S. elongatus* zugeordnet, siehe Kap. 7.2

^b A_{xx}, A_{zz} , HF-Tensor weicht leicht von axialer Symmetrie ab, siehe Tab. reftab:ahlfc

^cDie Auswertung der A_{\parallel} -Komponente ist durch den sehr verschmierten Tensor sehr ungenau.

Möglichkeit einer zweiten Wasserstoffbrücke an derselben Seite ist ebenfalls unwahrscheinlich. In der Kristallstruktur mit 2.5 Å Auflösung [34] ist keine weitere Möglichkeit einer Wasserstoffbrücke zu erkennen. Außerdem wiesen die ENDOR-Spektren von photoakkumuliertem d-8-VK₃^{•-} in der A_1 -Tasche nur einen Hyperfeintensor auf. Die in Ref. [201, 216] verwendete cw-Methode mit Effektmodulation hat bei der Identifizierung großer Kopplungen prinzipbedingt Probleme. Wie die Puls-ENDOR Spektren in Abb. 6.4, Kap. 6.2 zeigen, ist die A_{\parallel} -Komponente sehr breit. Dies erschwert noch zusätzlich die Detektion mit der cw-ENDOR Methode. Daher stammt eventuell auch die Diskrepanz in der A_{\parallel} -Komponente der H-Brücken-HFC von Ref. [201, 216] und dem hier gemessenen Wert.

7.2 Vergleich der TR-ENDOR-Spektren von $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ in *S. elongatus* und *C. reinhardtii*

Der Vorteil der EPR- und ENDOR-Spektroskopie am sekundären Radikalpaar gegenüber dem photoakkumulierten Radikalanion soll im folgenden Teil gezeigt werden. Wie in Kap. 6.2.2 berichtet ist, konnte in *C. reinhardtii* und Spinat der sekundäre Akzeptor nicht ohne zusätzliche und die Spektren stark störende Kontaminationen photoakkumuliert werden. Die magnetische Resonanz am nativen System hat mit solchen Problemen nicht zu kämpfen. Hier wird nur das transiente, am zyklischen Elektronentransfer teilnehmende sekundäre Radikalpaar detektiert.

In Abb. 7.3 ist ein Vergleich der mit einer Hahn-Echo-Sequenz aufgenommenen EPR-Spektren von $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ in *S. elongatus* und *C. reinhardtii* gezeigt. Die Spektren sind in ihrer Struktur vergleichbar. Beide Spektren zeigen das für das spinpolarisierte sekundäre Radikalpaar typische Absorptions-/Emissionsmuster mit einer vergleichbaren Breite. Die Unterschiede in den Intensitäten der emissiven Anteile der Spektren sind auf etwas unterschiedlich eingestellte Detektionsphasen zurückzuführen. In beiden Spektren ist die partiell aufgelöste Hyperfeinstruktur zu erkennen, wenn auch im Falle von $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ in *C. reinhardtii* die Strukturen weniger ausgeprägt sind. Eine Reduktion der Methyl-HFC kann ausgeschlossen werden, wie in die Abb. 7.4 dargestellten TR-ENDOR-Spektren zeigen. Möglicherweise gibt es geringe Unterschiede in den kleineren HFC von $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ in *C. reinhardtii*, die zu einer größeren inhomogenen Linienbreite führen. Eine weitere Möglichkeit sind durch die Präparation bedingte strukturelle Heterogenitäten, die zu der erwähnten Linienbreitenerhöhung führen.

Die TR-ENDOR-Spektren zeigen wie die EPR-Spektren von $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ in beiden Spezies große Ähnlichkeit. Die Methyl-HFC ist im Spektrum von *C. reinhardtii* klar zu erkennen. Allerdings weist sie nicht so ausgeprägte Strukturen wie im TR-ENDOR-Spektrum von *S. elongatus* auf. Die weniger scharfen Strukturen sind ein Hinweis auf strukturelle Heterogenitäten im Protein. In Abb. 7.4 sind die in $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ von *C. reinhardtii* identifizierbaren Hyperfeinkopplungen gekennzeichnet, die Werte sind in Tab. 7.1 zu finden. Die A_{\perp} -Komponente der H-Brücke wurde aufgrund ihres im Vergleich zur Methyl-HFC symptomatischen umgekehrten Polarisationsmusters und einer vergleichbaren Größe wie in *S. elongatus* zugeordnet. Wie Tab. 7.1 zu entnehmen ist, weisen die Hyperfeinkopplungen in $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ von *C. reinhardtii* leichte Unterschiede zu denen in $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ von *S. elongatus* auf, sind aber im Rahmen der Streuung der Literaturwerte gut vergleichbar. Allerdings ist auch hier zu beachten, daß die Linienpositionen der Hyperfeinkopplungen im TR-ENDOR Spektrum empfindlicher auf die gewählte Feldposition reagieren. Daher können geringe Verschiebungen in den Hyperfeinkopplungen auch durch leicht unterschiedlich gewählte Feldpositionen im EPR Spektrum bei der Aufnahme der TR-ENDOR Spektren auftreten. Die weniger aufgelöste Struktur der EPR-Spektren von $P_{700}^{*\pm}A_1^{\bullet\mp}$ in *C. reinhardtii* ist wahrscheinlich sowohl auf strukturelle Heterogenitäten als auch zu *S. elongatus* leicht verschiedene HFC zurückzuführen.

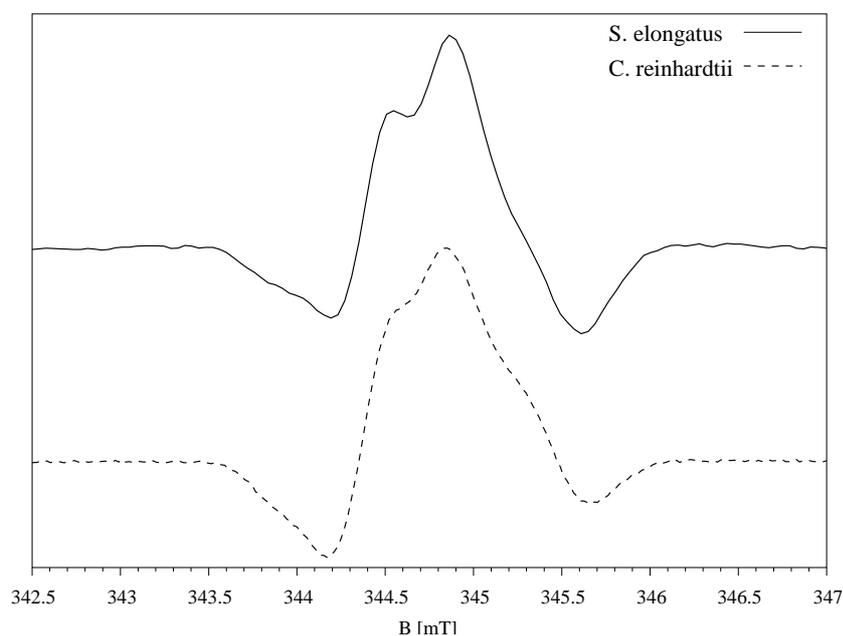


Abbildung 7.3: Vergleich der Field Swept Echos von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* und in *C. reinhardtii*, $T = 80$ K

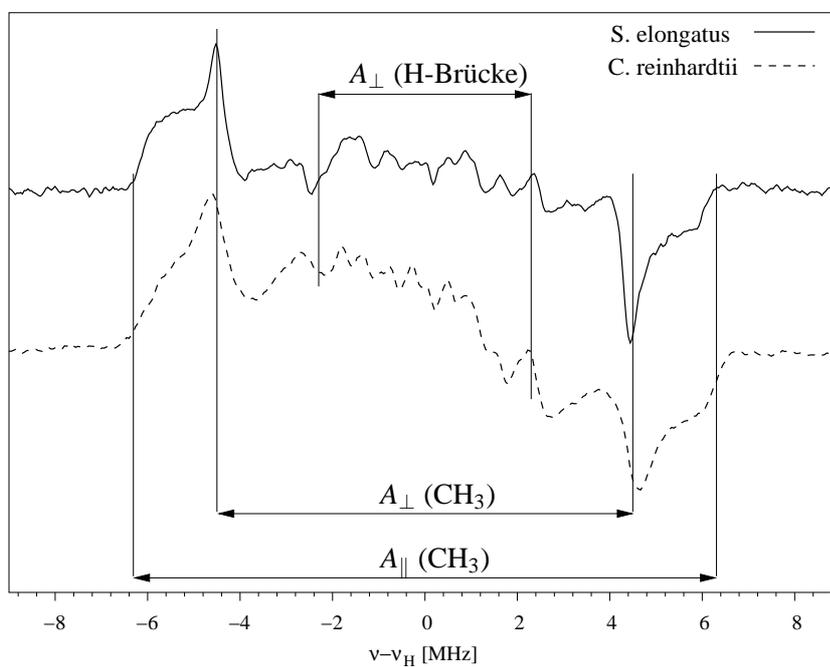


Abbildung 7.4: Vergleich der TR-ENDOR-Spektren von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* und *C. reinhardtii*, gekennzeichnet sind die HFC der Methylgruppe und die HFC der A_{\perp} -Komponente von der H-Brücke, A_{\perp} der H-Brücke wurde in Analogie zur HFC in *S. elongatus* zugeordnet, Davies-ENDOR-Sequenz, $T = 80$ K, $B = 344.6$ mT

7.3 Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie an Deletionsmutanten von *Synechocystis sp.* PCC 6803

7.3.1 *menA* und *menB*

menA und *menB* sind Deletionsmutanten in *Synechocystis sp.* PCC 6803, bei denen die kodierenden Gene für die Naphthoatsynthese (*menA*) oder die Phytyltransferase (*menB*) inaktiviert wurden [108]. Damit wird in den Biosyntheseweg des Phyllochinons derart eingegriffen, daß der Organismus nicht in der Lage ist, selbständig das Chinon zu synthetisieren. Damit sollte eine unbesetzte Bindungstasche des A_1 geschaffen werden, die leicht durch andere Chinone okkupiert werden kann. Daß ein solcher Austausch auch ohne harsche Extraktionen möglich sein sollte, konnte von Ostafin *et al.* [205] gezeigt werden, die durch Austausch mit deuteriertem VK_1 die prinzipielle Zugänglichkeit der A_1 -Bindungstasche nachwiesen. Es stellte sich jedoch heraus, das unter niedrigen Lichtintensitäten das photoautotrophe Wachstum dieser Deletionsmutanten unbeeinflusst war. Eine plausible Erklärung dafür ist, daß ein anderes Chinon (ein "Gastchinon") die A_1 -Bindungstasche besetzt hat. In diesem Abschnitt soll der spektroskopische Nachweis erbracht werden, daß das in den Pathwaymutanten *menA* und *menB* eingebaute Chinon Plastochinon-(PQ-9) ist. Parallel dazu wurde in Methanol/Aceton-Extrakten aus PS I-Präparationen der Deletionsmutanten *menA/menB* mittels gekoppelter Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (HPLC/MS) PQ-9 nachgewiesen, nicht jedoch in Wildtyppräparationen von *Synechocystis sp.* PCC 6803. Durch transiente EPR und OOP-ESEEM an $P_{700}^{*\bullet+}Q^{\bullet-}$ in *menA* und *menB* konnte festgestellt werden, daß sich dieses Chinon mit gleicher Orientierung und gleichem Abstand zu $P_{700}^{*\bullet+}$ befindet wie Phyllochinon in Wildtyp-PS I [204] Field Swept Echos und Puls-TR-ENDOR-Spektren wurden vom sekundären Radikalpaar $P_{700}^{*\bullet+}Q^{\bullet-}$ in den Deletionsmutanten aufgenommen, welche in Abb. 7.5 bzw. Abb. 7.6 abgebildet sind.

Die EPR-Spektren sind in ihrer Form mit E/A/E-Polarisation und der spektralen Breite vergleichbar mit dem Wildtypspektrum von $P_{700}^{*\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* (Abb. 7.5). Auffällig ist jedoch das Fehlen der charakteristischen Hyperfeinstruktur in *menA* und *menB*, die besonders als Schulter auf dem absorptiven Teil des FSE von *S. elongatus* (Abb 7.5 oben) zu erkennen ist.

Die TR-ENDOR-Spektren der Mutanten (Abb. 7.6) zeigen das typische Polarisationsmuster eines spinpolarisierten Radikalpaares wie das TR-ENDOR Spektrum von $P_{700}^{*\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus*. Eine weitere Beobachtung ist, daß die Spektren von *menA* und *menB* im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses identisch sind. In ihrem Hyperfeinkopplungsmuster unterscheiden sich allerdings die Spektren drastisch von dem TR-ENDOR Spektrum des Wildtyps (*S. elongatus*). Die große Hyperfeinkopplung der Methylgruppe, wie sie im TR-ENDOR Spektrum von $P_{700}^{*\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* (Abb. 7.6 unten, rot markiert) zu erkennen ist, ist in den Spektren beider Deletionsmutanten

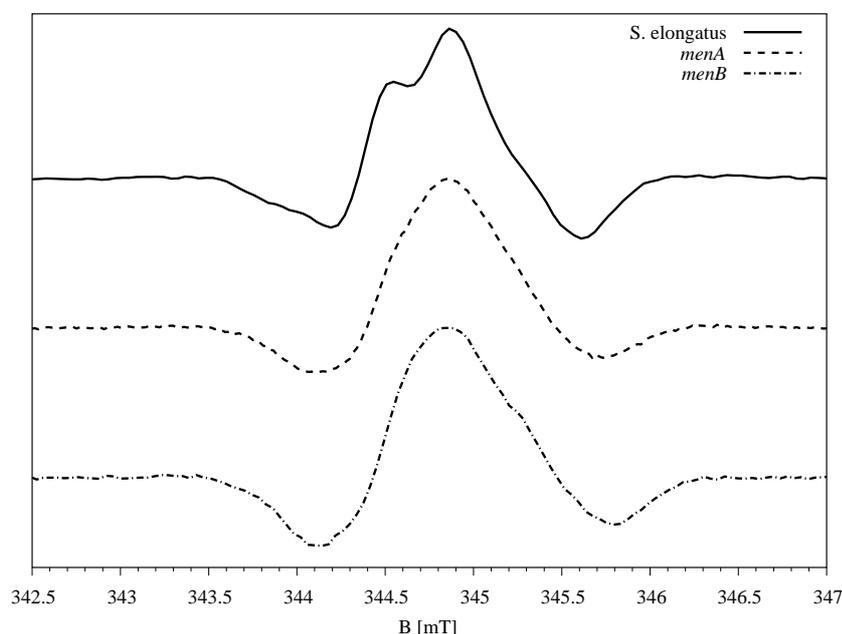


Abbildung 7.5: FSE des sekundären Radikalpaars $P_{700}^{\bullet+}Q^{\bullet-}$ von *menA* und *menB* im Vergleich zu $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus.*, $T = 80$ K

nicht vorhanden. Stattdessen sind zwei Linienpaare zu finden, die die Form eines axialen Tensors aufweisen und das gleiche Polarisationsmuster wie der Methylhyperfeintensor in $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ zeigen und nicht im TR-ENDOR Spektrum des Wildtyps zu finden sind. Diese beiden axialen Hyperfeintensoren mit 1. $A_{\parallel} = 9.8$ MHz, $A_{\perp} = 6.8$ und 2. $A_{\parallel} = 5.8$ MHz, $A_{\perp} = 2.8$ MHz ähneln in ihrer Linienform sehr dem Tensor einer Methylgruppe. Ihre Anisotropie ist auch mit derjenigen der Methylkopplung im Wildtyp vergleichbar. Ähnliche Anisotropien sind für Methylgruppen in Semichinonanionen *in vitro* (Ref. [97, 150], vgl. $VK_3^{\bullet-}$ und $VK_1^{\bullet-}$ in Kap. 4.2) und *in vivo* (Ref. [98, 153, 186]) gemessen worden. Daher läßt sich eine Zuordnung zu zwei inäquivalenten Methylgruppen vermuten. Die isotrope Kopplung beider Hyperfeintensoren sind kleiner als die der Methylgruppe in $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$, unterscheiden sich aber signifikant voneinander, was eine Asymmetrie der Spindichteverteilung im Molekül vermuten läßt.

Außerdem weisen die *menA*- und *menB*-TR-ENDOR Spektren außerhalb der axialen Tensoren Flanken eines Tensors mit entgegengesetzter Polarisation zu den beiden anderen Kopplungen auf. Diese Flügel reichen von 8.3–21.1 MHz, wie in Abb. 7.6 durch die gestrichelten Linien angedeutet ist. Aus der detaillierten Analyse von TR-ENDOR Spektren an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in *S. elongatus* ist bekannt, daß die Spektren für Kopplungen mit unterschiedlichem relativem Vorzeichen ein entgegengesetztes Polarisationsmuster aufweisen (siehe Kap. 7.1 und Ref. [103]). Die in den Spektren von *menA* und *menB* sichtbaren Flanken mit invertierter Polarisation relativ zu den

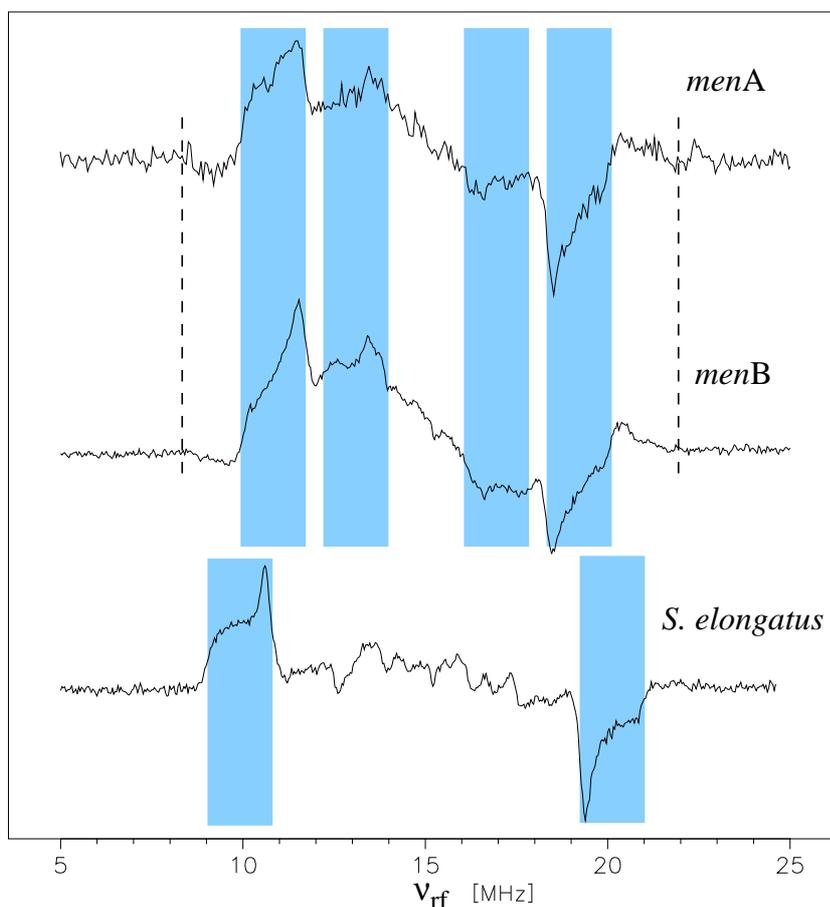


Abbildung 7.6: Puls-TR-ENDOR-Spektren am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{+\bullet}Q^{-\bullet}$ von *menA* und *menB* im Vergleich zu $P_{700}^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ in *S. elongatus*., Davies-ENDOR-Sequenz, $T = 80$ K

axialen Tensoren gehören demnach zu einer Kopplung mit umgekehrtem Vorzeichen.

Im PQ-9 Molekül sind in der Tat zwei Methylgruppen (passend zu den zwei axialen Hyperfeintensoren) sowie ein α -Proton (identifizierbar mit den Flanken der HFC mit invertierter Polarisation) präsent. Für diese beiden Methylgruppen sind unterschiedliche Hyperfeinkopplungen in flüssiger und gefrorener alkoholischer Lösung gemessen worden, genauso wie für den reduzierten sekundären Akzeptor $Q_A^{-\bullet}$ in PS II [152, 217]. Die Inäquivalenz der beiden Methylgruppen war in gefrorener alkoholischer Lösung am größten. In PS II wurde festgestellt, daß die beiden Methylkopplungen erheblich weniger unterschiedlich waren, was auf unterschiedlich starke Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylsauerstoffen und einer damit einhergehenden Verschiebung der Spindichte im Chinonring erklärt wurde. Die Inäquivalenz der in dem Gastchinonanion $Q^{-\bullet}$ zugeordneten Methylgruppen ist hier sogar noch größer als in alkoholischer Lösung gefunden wurde. Trotz dieser größeren Asymmetrie ist die Summe der isotropen Hy-

perfektkopplungen mit 11.1 MHz für $PQ-9^{-\bullet}$ in gefrorener Lösung und 11.6 MHz für $Q^{-\bullet}$ in *menA/menB* sehr ähnlich, was die Zuordnung zu zwei Methylgruppen in einem Chinon stützt. Die vergrößerte Differenz zwischen den Methylkopplungen ist mit einer starken Asymmetrie der Spindichtevertelung von PQ-9 in der A_1 -Bindungstasche konsistent. Dieser Befund wird durch die größte gefundene Kopplung weiter unterstützt, welche dem α -Proton zugeordnet werden kann. Die entsprechende Kopplung des α -H in PQ-9 in gefrorenem Alkohol wurde mit -9.0 MHz angegeben, ein signifikant kleinerer Wert als für PQ-9 in der A_1 -Tasche. Eine vergleichbare Erhöhung der Hyperfeinkopplung der Methylgruppe ist für $VK_1^{\bullet-}$ *in vitro* (wie in Kap. 4.2 berichtet) und $A_1^{\bullet-}$ in nativem PS I zu finden. Die mit transienter EPR und OOP-ESEEM festgestellte identische Orientierung von $PQ-9^{-\bullet}$ in *menA/menB* wie $A_1^{\bullet-}$ im Wildtyp berechtigt zu der Annahme, daß die beiden Chinone in einer vergleichbaren Bindungssituation vorliegen. Somit kann die größere Methylkopplung der Methylgruppe an C-6 in PQ-9 zugeordnet werden.

Tabelle 7.2: Hyperfeinkopplungen von PQ-9 in gefrorener Lösung, PS I und PS II (in MHz)

Spezies	Position	A_{\parallel}	A_{\perp}	A_{max}	Referenz
$A_1^{\bullet-}$ in PS I	2-CH ₃	9.8	6.8		hier, in <i>menA</i> , <i>menB</i>
	3-CH-3	5.8	2.8		hier, in <i>menA</i> , <i>menB</i>
	α -H an C-6			-12.8	hier, in <i>menA</i> , <i>menB</i>
$PQ-9^{-\bullet}$ in IP	2-CH ₃	8.58	5.29		[217]
	3-CH-3	6.68	3.70		[217]
	α -H an C-6			-9.0	[217]
$Q_A^{\bullet-}$ in PS II	2-CH ₃	7.8	4.8		[217]
	3-CH-3	6.7	3.3		[217]

Schlußfolgerungen

Durch EPR- und ENDOR-Spektroskopie am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}Q^{\bullet-}$ in den Deletionsmutanten *menA* und *menB* konnte nachgewiesen werden, daß als Ersatz für das Phyllochinon ein Plastochinon-9 Molekül eingebaut wird. Parallel dazu wurde mittels HPLC/MS an Extrakten aus PS I-Präparationen von *menA* und *menB* PQ-9 als einziges vorkommendes Chinon identifiziert [108] und die hier getroffene Zuordnung bestätigt. Daß eine identische Orientierung des Chinons relativ zum primären Donator P_{700} vorliegt, wurde auch mit transienter EPR und OOP-ESEEM gezeigt [204].

Die TR-ENDOR Experimente an *menA* und *menB* zeigten, daß eine asymmetrische Spindichteverteilung im Semichinonanion vorliegt. Die aus den Hyperfeinkopplungen ablesbare besondere Spindichteverteilung im PQ-9 ist ein Hinweis darauf, daß es wie im Wildtyp asymmetrisch über eine Wasserstoffbrücke an O-4 im Protein gebunden sein muß. Diese Asymmetrie in der Spindichteverteilung ist umgekehrt zu der im sekundären Akzeptor Q_A in bakteriellen Reaktionszentren [186] und in PS II [150]. Dort ist Q_A an beiden Carbonylsauerstoffen mit unterschiedlich starken H-Brücken verknüpft mit der kürzeren H-Brücke an O-1. Offenbar ist die Einbindung der Chinonakzeptoren über asymmetrische H-Brücken ein gemeinsames Motif in photosynthetischen Reaktionszentren. Die zu Q_A in bRZ und PS II umgekehrte Situation ist konsistent mit der im Wildtyp beobachteten Spindichteverteilung, die durch eine einseitige Wasserstoffbrücke an O-4 erklärt wurde (siehe Kap.6.2 und 7.1). Daher muß das PQ-9 in einer vergleichbaren Weise gebunden sein. Aus der identischen Orientierung des PQ-9 im Vergleich zu Phyllochinon im PS I-Komplex kann man schlußfolgern, daß auch in *menA* und *menB* das Chinon über eine einseitige Wasserstoffbrücke zum O-4 gebunden ist.

Da PQ-9 durch den PQ-Pool in großem Überschuß in der Membran vorliegt, kann angenommen werden, daß die A_1 -Bindungstasche mit einer hohen Affinität für Vitamin K_1 konstruiert ist. Hinweise dafür gibt es aus Austauschexperimenten mit anderen Naphthochinonen, welche bevorzugt in *menA/menB* eingebaut werden [203].

7.3.2 *menG*

Die Deletionsmutante *menG* ist das Produkt des gezielten Ausschaltens eines Gens für die Kodierung einer Methyltransferase in *Synechocystis sp.* PCC 6803 [108]. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Addition der Methylgruppe in 2-Phytyl-1,4-Naphthochinon, dem Vorläufer des Phyllochinons in der Biosynthese. Zeitaufgelöste EPR- und ENDOR-Spektroskopie wurden am sekundären Radikalpaar von *menG* durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Chinon am A_1 -Bindungsplatz ein 1,4-Naphthochinon ist, d. h. ob während der Biosynthese keine Methylgruppe an C-2 synthetisiert wurde. Sakuragi et al. [218] haben mittels transientser EPR an $P_{700}^{\bullet+}Q^{\bullet-}$ in *menB* im W-Band und OOP-ESEEM die Orientierung des Chinons und dessen Abstand bestimmt. Es wurde kein Unterschied zwischen *menG* und dem Wildtyp festgestellt.

Abb. 7.7 zeigt das transiente EPR Spektrum (oben) und an drei verschiedenen Feldpositionen aufgenommene TR-ENDOR Spektren von *menG*. Am EPR-Spektrum ist schon das Fehlen der Quartettstruktur erkennbar, die für $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in Wildtyp-PS-I charakteristisch ist. Die TR-ENDOR Spektren bestätigen diesen Befund, der typische intensive axialsymmetrische Hyperfeintensor bei ± 4.5 -MHz und ± 6.3 -MHz fehlt. Stattdessen ist eine große Kopplung bei ± 7.5 MHz zu erkennen, deren Polarisationsmuster zu dem der Methylkopplung im nativen Radikalpaar verschieden ist. Ein weiterer Punkt ist, daß die Spektren keine Ähnlichkeit mit den TR-ENDOR Spektren von *menA* und *menB* (Abb. 7.6) haben.

Wie das Wildtypspektrum zeigen die TR-ENDOR Spektren eine ausgeprägte Feldabhängigkeit. Bei 344.3 mT sind noch alle Linien emissiv, da im EPR-Spektrum emissive Übergänge dominieren. An dieser Feldposition tragen Chinonmoleküle mit $g_{xx} \parallel B_0$ hauptsächlich zum ENDOR Spektrum bei. Bei 344.6 mT werden hingegen auch absorptive EPR-Übergänge angeregt. Auf der hochfrequenten Seite des ENDOR Spektrums ist daher eine absorptive Kopplung bei ≈ 7.5 MHz erkennbar. Der tieffrequente Teil dieser großen Kopplung ist, obwohl verbreitert, als Mischung von absorptiver und emissiver Linie zu sehen. Bei 345.0 mT ist das E/A-Polarisationsmuster der großen Kopplung trotz der geringen Intensität auf der tieffrequenten Seite zu erkennen. Eine zweite Kopplung mit E/A-Polarisation bei ± 6 MHz ist außerdem aufgetaucht. An dieser Feldposition tragen alle Molekülorientierungen zum ENDOR Spektrum bei, es wird das Pulvermittel detektiert.

Das spezielle Polarisationsmuster und die veränderte Orientierungsselektion im Vergleich zum Wildtyp-Spektrum lassen auf einen Hyperfeintensor mit zwei großen negativen Hauptwerten schließen, die Zuordnung zu einem α -Proton liegt nahe. Diese Interpretation wird untermauert durch Messungen am photoakkumulierten Semichinonanion von *menG* im Q-Band [218]. Dort wurde ein ausgeprägtes Dublett auf der g_{xx} -Komponente statt der Quartettstruktur auf g_{yy} gemessen. Die Hauptachse des Hyperfeintensors mit dem größten Hauptwert liegt auf g_{xx} . Die

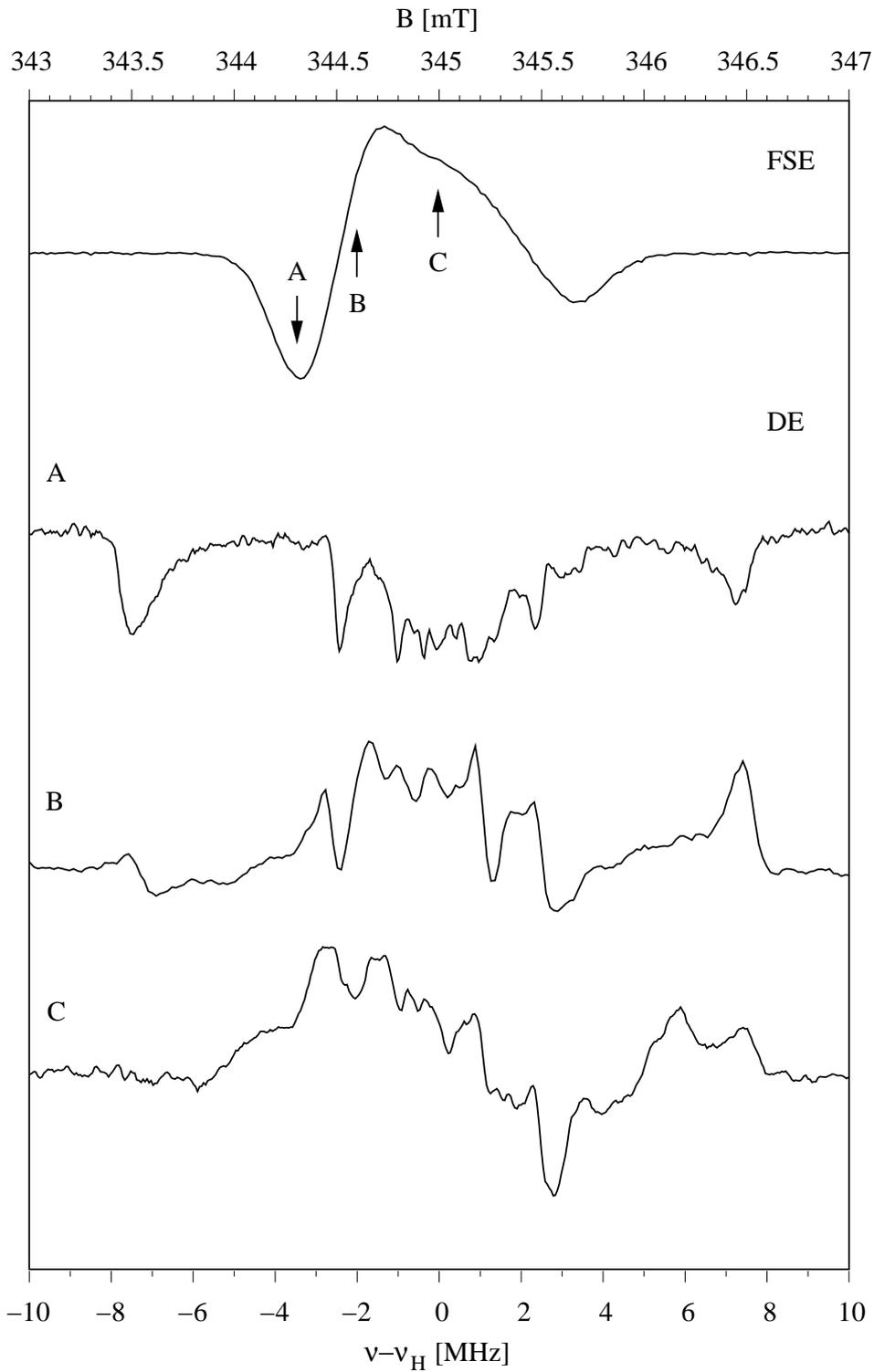


Abbildung 7.7: FSE und TR-ENDOR Spektren von $P_{700}^{*+}Q^{\bullet-}$ aus PS I der *menG*-Deletionsmutante, TR-ENDOR wurde an drei verschiedenen Feldpositionen aufgenommen, $T = 80$ K, Davies-ENDOR

Hauptachse der Kopplung mit 11.8 MHz (ENDOR Spektrum bei 345.0 mT) muß in Richtung von g_{zz} liegen, da die spektrale Trennung zwischen g_{xx} und g_{yy} im X-Band mit ≈ 1.9 G (5.4 MHz) nicht ausreichen würde, um die beobachtete Orientierungsselektion zu erklären. Die Anisotropie zwischen g_{yy} und g_{zz} ist hingegen in vergleichbarer Größe (4.9 G) wie die Kopplung (4.2 G). Die dritte Tensorkomponente ist im Matrixbereich durch die Vielzahl anderer Kopplungen überlagert und kann nicht zugeordnet werden.

Sakuragi et al. [218] haben mittels transientser EPR an $P_{700}^{\bullet+}Q^{\bullet-}$ in *menB* im W-Band und OOP-ESEEM die Orientierung des Chinons und dessen Abstand bestimmt. Es wurde kein Unterschied zwischen *menG* und dem Wildtyp festgestellt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in *menG* statt des Phyllochinons 2-Phytylnaphthochinon in die Bindungstasche von A_1 mit identischer Orientierung des Chinons eingebaut wird. Daß das Chinon in einer vergleichbaren Bindungssituation vorliegt, wird durch die bei ± 2.5 MHz sichtbare Kopplung mit E/A-Polarisation unterstützt. Die A_{\perp} -Komponente der Wasserstoffbrückenbindung im Wildtyp hat eine vergleichbare Größe (5.6 MHz) und hat aufgrund ihres negativen Vorzeichens eine wie hier gefundene Polarisation. Die Vermutung liegt also nahe, daß die Kopplung bei 4.8 MHz in *menG* die entsprechende A_{\perp} -Kopplung in *menG* ist und das Chinon wie im Wildtyp durch eine starke Wasserstoffbrücke gebunden ist.

Die trotz fehlender Methylgruppe mit A_1 identische Orientierung in der Bindungstasche läßt darauf schließen, daß die 2-Methylgruppe für den korrekten Einbau des Chinons ins Protein nicht zwingend notwendig ist.

7.4 TR-ENDOR an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ aus PS I-Punktmutanten von *C. reinhardtii*

Das Photosystem I weist eine pseudo- C_2 -Symmetrie mit zwei symmetrischen Zweigen von Kofaktoren zwischen P_{700} und F_X auf. Eine bis heute andauernde Debatte ist die Frage, ob und in welchem Maße beide Zweige am Elektronentransfer beteiligt sind [74, 75, 219–221]. Die ortsgerichtete Mutagenese ist bei diesen Untersuchungen zur Uni/Bidirektionalität des Elektronentransfers die Methode der Wahl, da gezielt jeweils in einer der Untereinheiten, die die Kofaktoren binden, Veränderungen vorgenommen werden können. Die Auswirkung der Mutagenese auf spektroskopische Parameter hat damit eine direkte Beziehung zur Funktion des betroffenen Kofaktors.

Die Funktion des Phyllochinons als sekundärem Akzeptor basiert unter anderem auf der Beobachtung eines transienten optischen Differenzspektrums, welches mit einer Halbwertszeit von 200 ns zerfällt [222], in Übereinstimmung mit Messungen der Reoxidation von $A_1^{\bullet-}$ mit transientser EPR [223–225]. Eine schnellere Phase für die Reoxidation von $A_1^{\bullet-}$ wurde in PS I aus Spinat (15–25 ns, Ref. [226, 227]) und in Cyanobakterien (7 ns, Ref. [228]) gefunden. Kürzlich durchgeführte optische Messungen *in vivo* führten zu dem Vorschlag, daß diese beiden Phasen zu zwei parallelen, aber kinetisch unterschiedlichen Elektronentransferwegen von P_{700} zu F_X gehörten [74].

Aus ESEEM Messungen an $A_1^{\bullet-}$ in ^{14}N und ^{15}N -markiertem PS I wurde auf ein in der Nähe zu A_1 liegendes Tryphtophan und eine weitere stickstoffhaltige Aminosäure geschlossen [212]. Seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur von PS I mit 2.5 Å Auflösung [34] ist bestätigt, daß jedes der beiden Phyllochinone in PS I nahezu parallel zu einem Tryphtophan liegt (W693 in Untereinheit PsaA, W673 in Untereinheit PsaB, Nummerierung nach der Aminosäuresequenz in *C. reinhardtii*).

In diesem Teil soll von Untersuchungen an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in Punktmutanten von *C. reinhardtii* berichtet werden. In einer Mutante ist das sich an Position 673 (Untereinheit PsaB) befindende Tryphtophan durch ein Phenylalanin ersetzt worden (hier WF673 genannt), die zweite Mutante besitzt diese Mutation an Position 673 (PsaB) und 693 (PsaA), also an den Bindungsplätzen beider Chinone (hier als WF673/693 bezeichnet).

TR-ENDOR Spektroskopie bei 80 K wurde an PS I-Komplexen des Wildtyps und an den beiden Mutanten durchgeführt. Ein für das sekundäre Radikalpaar charakteristisches ENDOR-Spektrum wurde in beiden Punktmutanten beobachtet (siehe Vergleich in Abb. 7.8).

Die allgemeine Struktur der Spektren der Mutanten ist mit der des Wildtyps (WT) vergleichbar. Das zeigt, daß auch in den Mutanten WF673 und WF673/693 ein photoreduzierbares Chinon

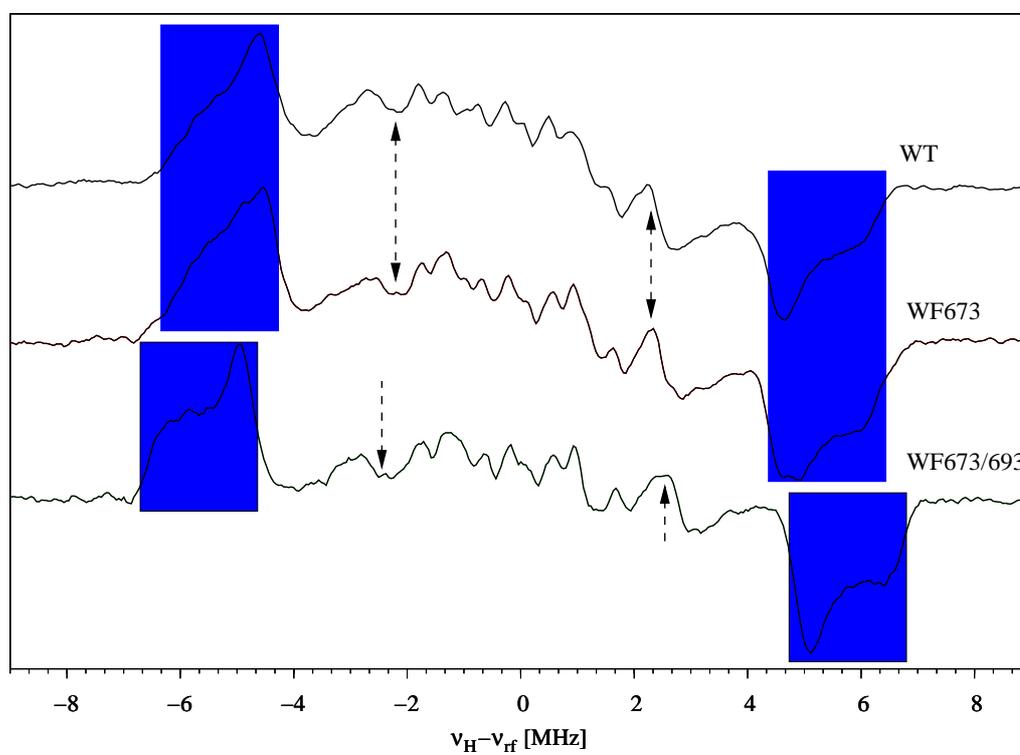


Abbildung 7.8: TR-ENDOR Spektren von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I vom Wildtyp (WT) und von Punktmutanten (WF673, WF673/693) aus *C. reinhardtii*, blau unterlegt: 2-Methyl-HFC, mit gestricheltem Pfeil gekennzeichnet: A_{\perp} der Wasserstoffbrücke, Davies-ENDOR, $T = 80$ K

vorhanden ist. Transiente EPR-Spektroskopie zeigte weiterhin, daß das $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ -Signal eine mit dem Wildtyp vergleichbare Lebensdauer von mehreren Mikrosekunden hat (hier nicht gezeigt). Eine abnorm schnelle Rekombination des beobachteten sekundären Radikalpaares bei kryogenen Temperaturen kann dadurch ausgeschlossen werden.

Eine detailliertere Analyse der Spektren liefert signifikante Verschiebungen von Hyperfeinkopplungen in der Doppelmutante, verglichen mit dem Spektrum des Wildtyps und der Mutante WF673. Die beobachteten Verschiebungen sind in Abb. 7.8 gekennzeichnet:

Im Spektrum der Doppelmutante ist die der 2-Methylgruppe zugeordnete Hyperfeinkopplung verschoben (in Abb. 7.8 blau unterlegt), die A_{\perp} -Komponente ist um 0.7 ± 0.15 MHz erhöht, die A_{\parallel} -Komponente zeigt eine Erhöhung um 0.9 ± 0.2 MHz. Das Spektrum von WF673 weist hingegen keine Unterschiede zum Wildtyp auf. Ein Vergleich der HFC's ist in Tab. 7.3 aufgeführt.

Tabelle 7.3: Hyperfeinkopplungen (in MHz) der 2-Methylgruppe von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I aus Punktmutanten von *C. reinhardtii*

	Wildtyp	WF673	WF673/693
A_{\perp}	9.0	9.0	9.7
A_{\parallel}	12.6	12.6	13.5

Weiterhin ist die der A_{\perp} -Komponente der Wasserstoffbrücke zugeordnete HFC in der Doppelmutante zu größeren Werten verschoben (durch gestrichelte Pfeile in Abb. 7.8 markiert), wiederum ist keine Änderung im Spektrum von WF673 zu beobachten. Diese beiden spezifischen Effekte zeigen, daß offenbar nur die Mutation auf PsaA (welche nur in der Doppelmutante vorhanden ist) das TR-ENDOR Spektrum beeinflusst. Daraus kann geschlossen werden, daß dasjenige Phyllochinon sich in der Nähe des Trp A693 befindet, welches an der reversiblen Ladungstrennung bei kryogener Temperatur teilnimmt. Bei kryogenen Temperaturen ist das mit Puls-EPR und ENDOR beobachtbare Chinon das Phyllochinon auf der A-Seite.

7.4.1 Diskussion

Die Effekte auf die Mutation von Trp A693 passen hervorragend zu den aus der Kristallstruktur von PS I mit 2.5 Å Auflösung [34] entnehmbaren Informationen zur Umgebung des Phyllochinons, siehe Abb. 7.9 ¹. Eine direkte Schlußfolgerung aus den experimentellen Befunden ist, daß das Tryptophan A693 ein Teil der Bindungstasche von A_1 ist ². Die hier gezeigten Ergebnisse sind generell in Übereinstimmung zu denen von Purton *et al.* [229], die über Änderungen des ENDOR-Spektrums von photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ (bei 60 K) und einer Verlangsamung des Zerfalls des spinpolarisierten $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ -Signals (bei 260 K) in Mutanten von Trp A693 zu Histidin oder Leucin berichteten.

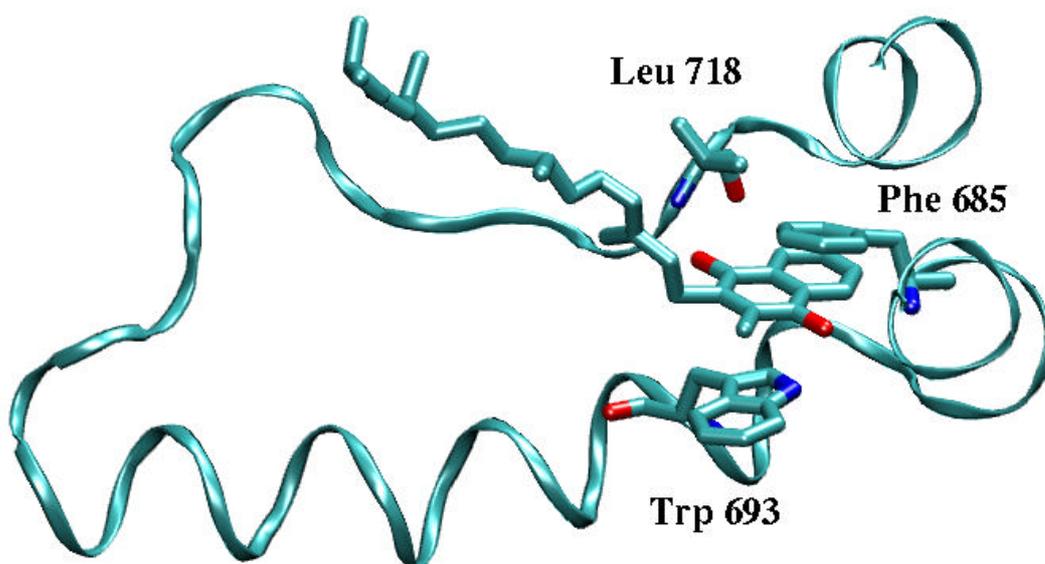


Abbildung 7.9: Die Bindungstasche des Phyllochinons in Untereinheit PsaA mit drei sich in direkter Umgebung befindlichen Aminosäuren: Phe A685 schirmt das Phyllochinon quasi von der Oberseite ab, Trp A693 überlappt mit seinem Fünfring den Chinonring und Leu A718 bildet eine (einseitige) Wasserstoffbrücke zum O-4 des Chinons. Erstellt mit VMD [37]

Das Tryptophan ist klar an einer $\pi - \pi$ -Wechselwirkung mit dem zu PsaA gebundenen Chinon beteiligt, das C_2 -symmetrisch dazu liegende Phyllochinon in PsaB zeigt die gleiche Anordnung.

¹Zur Beachtung: die Aminosäuresequenz zwischen *S. elongatus* und *C. reinhardtii* ist um vier Aminosäuren verschoben, die in Kap. 5.2 aufgeführten Aminosäuren zur Beschreibung eines Modells der A_1 -Bindungstasche sind mit den hier verwendeten identisch.

²Hiermit ist das bei Tieftemperatur durch EPR/ENDOR-Spektroskopie beobachtbare Semichinonanion gemeint.

Die Kopfgruppe des Chinons ist fast parallel zum Indolring des Trp mit dem N-haltigen Fünfring über dem Chinonring und dem Sechsring über der 2-Methylgruppe. Daher erscheint es sehr wahrscheinlich, daß der Stickstoff des Trp A693 derjenige mit ESEEM-Spektroskopie an photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ gemessene ist, wie aus diesen Experimenten vorgeschlagen wurde [212].

Zusätzlich kann mit den hier präsentierten Messungen belegt werden, daß bei kryogenen Temperaturen nur das Phyllochinon in PsaA photochemisch aktiv ist und an der reversiblen Ladungstrennung teilnimmt. Ein Effekt auf die HFC der Methylgruppe ist nur in der Doppelmutante zu beobachten, die Mutation von Trp B673 zeigt keinen Effekt auf das ENDOR-Spektrum. Der Effekt des Trp A693 auf die 2-Methyl-HFC beeinflusst offenbar nur die isotrope Komponente des Tensors, da sich sowohl A_{\perp} als auch A_{\parallel} in gleichem Maße verschieben. Das Tryptophan reduziert demnach die durch die einseitige Wasserstoffbrücke von Leu A718 induzierte Asymmetrie der Spindichteverteilung. Damit konsistent ist die Erhöhung der isotropen Kopplung in der WF673/693-Mutante. Die Beobachtung der Verschiebung der in Abb. 7.8 markierten zweiten Hyperfeinkopplung (und zwar einer Erhöhung dieser HFC) ist für die Zuordnung dieser HFC zur A_{\perp} -Komponente der Wasserstoffbrücke von besonderem Interesse für die Bestätigung der in Kap. 6.2 getroffene Zuordnung. Die Erhöhung dieser HFC in WF673/693 muß mit der Ursache der asymmetrischen Spindichteverteilung im Chinon zu tun haben. Eine plausible Schlußfolgerung ist die Zuordnung dieser HFC zur Wasserstoffbrückenkopplung.

7.5 ENDOR-Spektroskopie an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I-Einkristallen

ENDOR-Spektroskopie an Semichinonanionen in gefrorener Lösung liefert im X-Band die Größe von Hyperfeintensoren. Die geringe g -Anisotropie läßt nur eine begrenzte Orientierungsselektion in Bezug auf das Magnetfeld zu (siehe Kap. 4.2.4 und 6.2) und erlaubt daher nur beschränkte zusätzliche Informationen über die Orientierung der Hyperfeintensoren zum g -Achsensystem des Chinonanions. Für die TR-ENDOR-Messungen am sekundären Radikalpaar kommt erschwerend hinzu, daß die Polarisation der Hyperfeinkopplungen stark feldabhängig ist. Dadurch ist es nicht leicht, dem Verlauf sich überlagernder Hyperfeinkopplungen im Bereich innerhalb der Methyl-HFC's zu folgen.

Eine lohnenswerte Alternative ist die Untersuchung der Orientierungsabhängigkeit von Hyperfeintensoren des Semichinonanions mittels ENDOR-Spektroskopie an Einkristallen von PS I. Daraus lassen sich zusätzlich zur Größe der Hyperfeinkopplungen Informationen über die Lage der Tensoren im Kristall ermitteln und, bei Kenntnis der Beziehung zum molekularen Achsensystem, Aussagen zu räumlich spezifischen Wechselwirkungen treffen. Da die Photoakkumulation des Radikalanions $A_1^{\bullet-}$ in Einkristallen durch die speziellen Kristallisationsbedingungen nicht möglich ist, ist es eine zusätzliche Herausforderung, ob mittels TR-ENDOR Spektroskopie an PS I-Einkristallen Zusatzinformationen zur Orientierung von Hyperfeintensoren gewonnen werden können. Darüber soll dieser Teil der Arbeit berichten.

Bisherige Messungen an PS I-Einkristallen mittels EPR betrafen den primären Donator $P_{700}^{\bullet+}$, das sekundäre Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ und die terminalen Eisen-Schwefel-Zentren F_A und F_B sowie mittels ENDOR den primären Donator:

Mit ENDOR-Spektroskopie an primären Donator $P_{700}^{\bullet+}$ in PS I-Einkristallen [68] gelang es, die Hauptwerte und korrespondierende Hauptachsen von drei Hyperfeintensoren zu ermitteln, die drei Methylgruppen zugeordnet wurden. Mittels ESEEM-Messungen am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I-Einkristallen [107] konnte die Lage des dipolaren Wechselwirkungstensors zwischen $P_{700}^{\bullet+}$ und $A_1^{\bullet-}$ im Kristallachsensystem ermittelt werden und dadurch erstmals der sekundäre Akzeptor in der damals gering aufgelösten Kristallstruktur (4.0Å, Ref. [230]) lokalisiert werden. Transiente EPR-Spektroskopie an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I-Einkristallen lieferte die Orientierung des g -Tensors von $A_1^{\bullet-}$ im Kristallachsensystem, aus der Winkelabhängigkeit der EPR-Spektren ließ sich eine erste Abschätzung für die Orientierung des Hyperfeintensors der Methylgruppe zur kristallographischen c -Achse ermitteln [231]. Durch Untersuchungen an PS I-Kristallen aus *S. elongatus* mittels EPR-Spektroskopie konnten die Orientierungen der g -Tensoren des primären Donators, $P_{700}^{\bullet+}$, bestimmt werden [202]. Die Orientierung der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren F_A und F_B konnte durch EPR-Messungen an PS I-Einkristallen bestimmt werden [232].

Winkelabhängige TR-ENDOR Spektren des sekundären Radikalpaares $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in Einkristallen

von *S. elongatus* wurden unter Rotation um eine Achse \mathbf{r} senkrecht zur kristallographischen \mathbf{c} -Achse $\mathbf{c} \perp \mathbf{r}$ aufgenommen. Abb. 7.10 zeigt den erhaltenen Datensatz.

Zum Vergleich ist das TR-ENDOR Spektrum in gefrorener Lösung darüber abgebildet. Die Spektren wurden alle an Magnetfeldpositionen aufgenommen, bei denen das Polarisationsmuster der Methyl-HFC symmetrisch um die freie Protonenfrequenz ist. Die Spektren weisen eine minimale Linienbreite der Hyperfeinkopplungen von 170 kHz auf. Die Orientierungsabhängigkeit der Methyl-HFC ist durch die Separation vom übrigen Spektrum wohlaufgelöst und zeigt charakteristische Winkelpositionen auf, an denen die Lage des Kristalls und die Kristallsymmetrie (zumindest teilweise) zu erkennen ist: Bei -3° ist das Spektrum am einfachsten, es weist drei gut aufgelöste Linienpaare auf. Da der Kristall mit der kristallographischen \mathbf{c} -Achse senkrecht zur Drehachse montiert war und die Probe senkrecht zum Magnetfeld gedreht wurde, liegen \mathbf{c} -Achse und \mathbf{B}_0 -Feld immer in einer Ebene. Die Vereinfachung des Spektrums bei -3° bedeutet, daß alle Moleküle magnetisch äquivalent sind. Aus der Raumgruppe des Kristalls³ läßt sich schließen, daß dort das Magnetfeld parallel zur \mathbf{c} -Achse sein muß. Die erwartete 180° -Symmetrie der ENDOR-Spektren ist auch zu beobachten, z. B. sind die Spektren bei 77° und bei -103° identisch.

7.5.1 Auswertung der Spektren

In den winkelabhängigen TR-ENDOR Spektren sind maximal 14 Linienpaare aufgelöst. Da sechs magnetisch inäquivalente Molekülpositionen in der Einheitszelle vorhanden sind (D_6 -Symmetrie), wären für das Semichinonanion $A_1^{\bullet-}$ maximal 54 Linienpaare von Hyperfeinkopplungen der neun Molekülprotonen an nicht entarteten Winkelpositionen zu erwarten. Zusätzlich kämen noch Hyperfeinwechselwirkungen mit der Proteinumgebung hinzu, wie zum Beispiel das in Kap. 6.2 zugeordnete Wasserstoffbrückenproton. Weiterhin sind im zentralen Bereich der Spektren (± 4 MHz) Hyperfeinkopplungen von $P_{700}^{\bullet+}$ zu erwarten, allein bei Berücksichtigung der zugeordneten HFC's der drei Methylgruppen und der zwei β -Protonen würden noch 66 Linienpaare hinzukommen. Durch die Abhängigkeit der Polarisation der Linien vom Vorzeichen der HFC's kann es jedoch im ENDOR Spektrum durch Überlagerung von HFC's mit unterschiedlichem Vorzeichen zur Auslöschung von Linien kommen.

Selbst für die gut separierten HFC's der Methylgruppe sind drei, in Ansätzen vier von sechs möglichen Kopplungen zu erkennen. Daher wurde vom Autor ein Programm in Octave [233] geschrieben, mit der die Winkelabhängigkeit der TR-ENDOR Spektren simuliert werden konnte. Das Programm berechnet die Linienlage der Hyperfeinkopplungen in linearer:

³P6₃ Raumgruppe, reduziert sich zur D₆-Punktgruppe in der EPR aufgrund deren Invarianz gegenüber 180° -Drehungen und Translationen

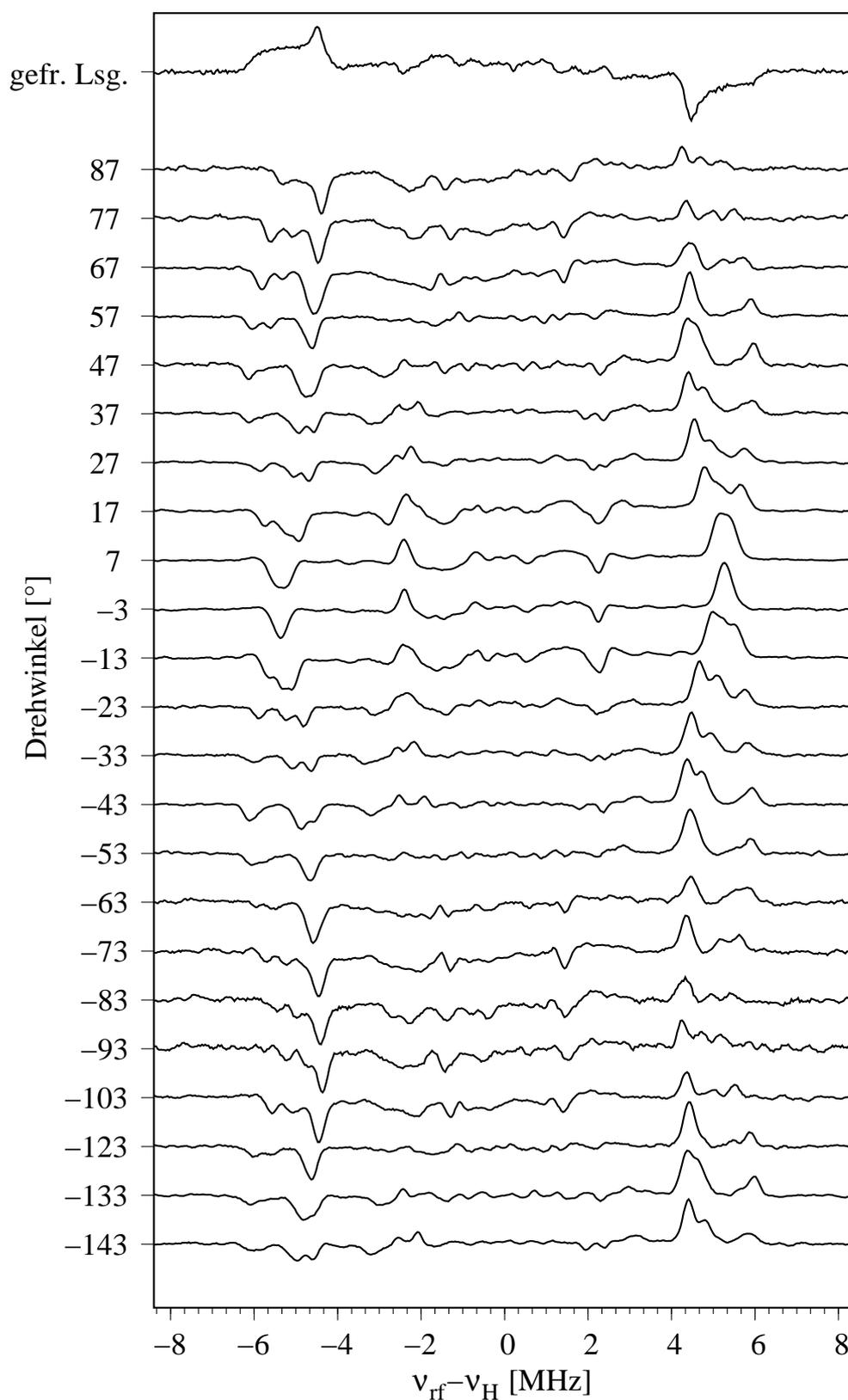


Abbildung 7.10: Puls-ENDOR-Spektren von $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in einem PS I-Einkristall als Funktion des Drehwinkels, der Kristall wurde senkrecht zu seiner c -Achse im Magnetfeld gedreht ($c \perp r$), Davies-ENDOR, $T = 80$ K

$$v_{\pm} = v_H \pm \frac{\vec{n}^T \vec{A}_{SK} \vec{n}}{2}. \quad (7.1)$$

und quadratischer Näherung [87] unter Verwendung von Drehmatrizen:

$$v_{\pm} = \sqrt{v_H^2 + \frac{1}{4} \vec{B}_0^T \vec{A}_{SK} \vec{A}_{SK}^T \vec{B}_0} \mp v_H \vec{B}_0^T \vec{A}_{SK} \vec{B}_0. \quad (7.2)$$

mit dem ins Kristallachsensystem transformierten Hyperfeintensor \vec{A}_{SK} , dem B-Feldvektor \vec{B}_0 , dem Hyperfeintensor \vec{A} in seinem Hauptachsensystem. Die Transformation des Hyperfeintensors erfolgte über Euler-Rotationsmatrizen [234]:

$$\vec{A}_{SK} = \vec{R}_S \vec{R}_K \vec{A} \vec{R}_K^T \vec{R}_S^T. \quad (7.3)$$

\vec{R}_K transformiert in das Kristallachsensystem, $\vec{R}_S (S = 1 \cdots 6)$ berücksichtigt die D_6 -Symmetrie der Elementarzelle des Kristalls. Die Eulermatrizen sind definiert als:

$$\vec{R}(\phi, \theta, \psi) = \vec{R}_z(\psi) \cdot \vec{R}_x(\theta) \cdot \vec{R}_z(\phi) \quad (7.4)$$

mit den Eulerwinkeln ϕ, θ, ψ . Die Transformation ist also aus drei einzelnen Drehungen zusammengesetzt: 1. Drehung um die z-Achse des lokalen Koordinatensystems, 2. Drehung um die x-Achse, 3. Drehung um die neue z-Achse. Die Einzeldrehungen sind definiert als:

$$\vec{R}_z(i) = \begin{pmatrix} \cos(i) & -\sin(i) & 0 \\ \sin(i) & \cos(i) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \vec{R}_x = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(\theta) & -\sin(\theta) \\ 0 & \sin(\theta) & \cos(\theta) \end{pmatrix} \quad (7.5)$$

$$i = \psi, \phi. \quad (7.6)$$

Eine dritte Transformation ins Laborachsensystem ist nicht vollständig möglich. Dazu wäre die genaue Orientierung des Kristalls in der EPR-Kapillare zu bestimmen. Die $P6_3$ -Symmetrie zeichnet zwar die kristallographische **c**-Achse als Symmetrieachse aus, ist aber unabhängig von der Orientierung von **a**- und **b**-Achse.

Die Kenntnis des Zusammenhangs von Morphologie der Einkristalle und der **c**-Achse⁴ gestatten jedoch eine Aussage über die Orientierung der Hauptachsen des Methylhyperfeintensors zu dieser Achse. Die TR-ENDOR-Spektren in Abb. 7.10 weisen ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis auf. Es reichte dennoch nicht aus, um die Rotationsabhängigkeit der Hyperfeintensoren mit einem Simplexalgorithmus anzufitten. Daher wurden die Spektren „per Hand“ angepaßt. Es wurden zwei

⁴Die kristallographische **c**-Achse ist parallel zur langen Achse der Kristallnadeln

Hyperfeintensoren in die Auswertung einbezogen: die Hyperfeintensoren der 2-Methylgruppe und der Wasserstoffbrücke. Andere Hyperfeinkopplungen waren nicht ausreichend aufgelöst.

Methylhyperfeinkopplung

Die Anisotropie des Hyperfeintensors der CH_3 -Gruppe ist relativ gering (38%), die Abweichung der Linienpositionen zwischen linearer und quadratischer Näherung betrug nur max. 30 kHz. Daher wurde zur Anpassung der Rotationsabhängigkeit Gl. 7.1 verwendet.

In Abb. 7.11 ist die beste Anpassung (gemäß visueller Anpassung) an die experimentellen Spektren gezeigt.

Tab. 7.4 enthält die sich aus der Spektrensimulation ergebenden Hyperfeintensorhauptwerte und Richtungscosini. Ein klares Ergebnis ist die leichte Abweichung des Methyltensors von einer axialen Form, was sich schon in der Auswertung der ENDOR-Spektren an $A_1^{\bullet-}$ in gefrorener Lösung andeutete. Außerdem bestätigt sich die, verglichen mit den Tensorhauptwerten von Messungen an photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ (vgl. Tab. 7.1), geringere Anisotropie der Hauptwerte.

Die Simulation der Orientierungsabhängigkeit liefert auch die Orientierung der Tensorhauptachsen zur kristallographischen c -Achse: Für die Orientierung der A_{yy} -Tensorkomponente ergibt sich ein Winkel von $46 \pm 5^\circ$. Aus der Kristallstruktur bei 2.5 Å Auflösung [34] erhält man für den Winkel zwischen der $C-CH_3$ -Bindungsachse und der c -Achse einen Wert von 35° . Diese Abweichung von ca. 10° von Bindungsachse zu Tensorsymmetrieachsen ist nicht untypisch. Eine Abweichung der gleichen Größe ist auch aus ENDOR-Messungen am primären Chinonakzeptor $Q_A^{\bullet-}$ in Einkristallen aus *Rhodobacter sphaeroides* für die CH_3 -Gruppe berichtet worden [186, 235].

Tabelle 7.4: Aus der Simulation der Winkelabhängigkeit der Methyl-HFC ermittelte Hyperfeintensorhauptwerte und Richtungscosini

	x	y	z
A_i [MHz]	8.65	12.50	8.80
l_{ai}	0.74314	-0.48133	0.46482
l_{bi}	0.66913	0.53457	-0.51623
l_{ci}	0.00000	0.69466	0.71934

Wasserstoffbrückenkopplung

Die Zuordnung der Hyperfeinkopplung der Wasserstoffbrücke im gemessenen Rotationsmuster gestaltet sich aus mehreren Gründen schwieriger:

Einerseits ist ein Großteil der effektiven Hyperfeinkopplungen im Zentralbereich zu erwarten, wo es zur Überlagerung mit den zahlreichen anderen HFC's kommt. Da das Polarisationsmuster der Hyperfeinkopplungen in den TR-ENDOR Spektren abhängig vom relativen Vorzeichen der

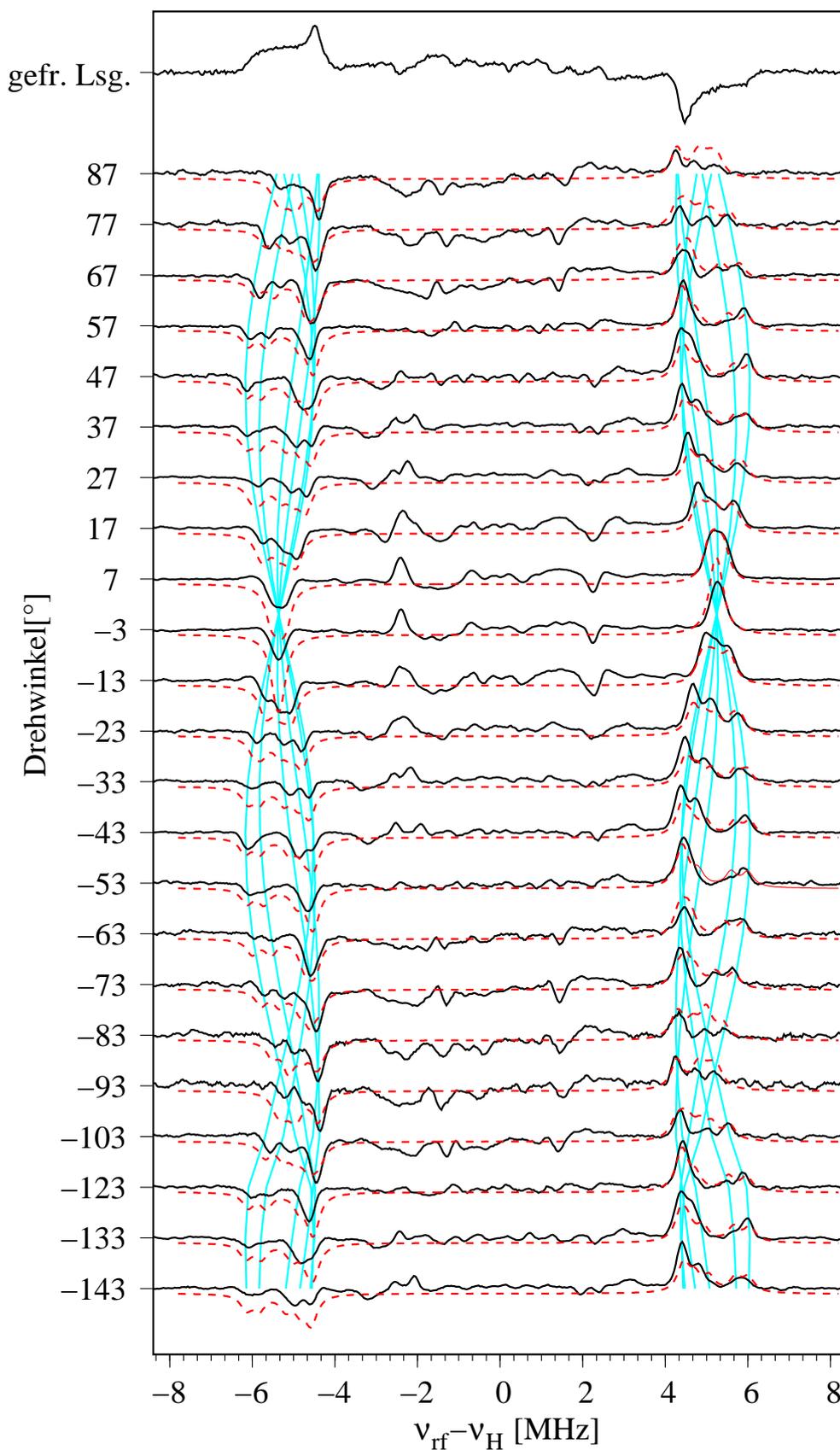


Abbildung 7.11: TR-ENDOR an $P_{700}^{*+}A_1^{*-}$ in PS I-Einkristallen aus *S. elongatus*, Simulation der Winkelabhängigkeit der Methyl-HFC, schwarz: Experiment, rot: Simulation, cyan: angepasste Winkelabhängigkeit für die sechs Molekülpositionen im Kristall

Hyperfeinkopplung ist, können sich positive und negative HFC's auslöschen. Da der Hyperfeintensor der Wasserstoffbrücke noch einen Vorzeichenwechsel in seinen Hauptwerten aufweist, ist das Auslöschen von HFC's der H-Brücke von verschiedenen Sites möglich. Daher ist es gerade im Bereich von ± 4 MHz sehr schwierig, einer Rotationsabhängigkeit von Hyperfeinkopplungen zu folgen. Wie auch in den TR-ENDOR Spektren in gefrorener Lösung sind in den Einkristallspektren keine Hinweise auf eine große A_{\parallel} -Komponente, die größer als die Methyl-HFC ist, zu finden. Daher konnte für die Wasserstoffbrücke kein Rotationsmuster angepaßt werden

An der Äquivalenzposition bei -3° kann jedoch eine Hyperfeinkopplung mit relativ zur Methyl-HFC negativem Vorzeichen identifiziert werden. Diese intensive Hyperfeinkopplung von $(-)$ 4.7 MHz und Emissions/Absorptions-Polarisation ist mit der Größe der A_{\perp} -Komponente, welche aus den Spektren in gefrorener Lösung der Wasserstoffbrücke zugeordnet wurde, vergleichbar. Man könnte also aufgrund der Linienintensität und des Polarisationsmusters dieses Linienpaar bei ± 2.35 MHz der Wasserstoffbrücke zuweisen. Da diese HFC an bei -3° invertiert zur CH_3 -HFC polarisiert ist, hätte dies für die Orientierung der H-Brücke zur Konsequenz, daß die A_{\perp} -Komponente fast parallel zur c -Achse liegt und damit die A_{\parallel} -Komponente nahezu senkrecht zur c -Achse.

7.6 Zusammenfassung

In diesem Teil konnten die ersten Untersuchungen mittels Puls-ENDOR Spektroskopie am spinpolarisierten sekundären Radikalpaar präsentiert werden. Der Vergleich mit Puls-ENDOR Spektren von photoakkumuliertem $A_1^{\bullet-}$ in PS I zeigte, daß die beiden Chinonspezies vergleichbare Hyperfeinkopplungen aufweisen. Dadurch konnte der Nachweis erbracht werden, daß durch Photoakkumulation der sekundäre Akzeptor A_1 (zumindest in PS I aus Cyanobakterien) in der aktiven Seite spektroskopisch untersucht werden kann. Eine andere Eigenschaft der Puls-ENDOR Spektroskopie ist die Empfindlichkeit auf das relative Vorzeichen von Hyperfeinkopplungen, was sich in den Spektren durch umgekehrte Polarisation der Kopplungen manifestiert.

Durch die erfolgreiche Demonstration des Puls-ENDOR-Experiments an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ wurde die Möglichkeit eröffnet, Untersuchungen auch am spinpolarisierten sekundären Radikalpaar in der Spezies *C. reinhardtii* durchzuführen, wo die Photoakkumulation von $A_1^{\bullet-}$ nicht ohne Kontaminationen von $A_0^{\bullet-}$ möglich war. Dies war insbesondere das Schlüsselexperiment zur erfolgreichen Untersuchung an mit gezielter Mutagenese veränderten Punktmutanten in *C. reinhardtii* (siehe folgenden Kontext).

Durch gezielten Eingriff in den Biosyntheseweg des Phyllochinons sollte eine leere A_1 -Bindungstasche geschaffen werden (Ref. [203]). Durch TR-ENDOR Spektroskopie an den De-

letionsmutanten *menA* (Deaktivierung der Naphthoatsynthase) und *menB* (Deaktivieren der Phytoltransferase) konnte gezeigt werden, daß in die Bindungstasche des sekundären Akzeptors stattdessen ein Plastochinon-9 Molekül eingebaut wird. Durch die Zuordnung von zwei Hyperfeintensoren zu den beiden Methylgruppen im PQ-9 in Verbindung mit der aus transienter EPR und OOP-ESEEM ermittelten Orientierung des Chinons [204] stellte sich außerdem heraus, daß dieses PQ-9 Molekül sogar in einer vergleichbaren Bindungssituation wie das native Phyllochinon eingebaut wird. Die Asymmetrie der Hyperfeinkopplungen spiegelt eine asymmetrische Spindichteverteilung wider, wie sie auch im nativen Phyllosemichinonanion gefunden wird und auf eine einseitige Wasserstoffbrücke zurückgeführt wird.

In einer weiteren Deletionsmutante *menG* (Deaktivierung der 2-Methyltransferase) konnte durch Untersuchungen mittels TR-ENDOR-Spektroskopie gezeigt werden, daß ein 2-Phytylnaphthochinon inkorporiert wird, dessen Orientierung wiederum mit dem natürlich eingebauten Phyllochinon übereinstimmt. Dies ist ein Indiz dafür, daß die Methylgruppe nicht für den korrekten Einbau eines funktionellen Chinons notwendig ist.

Die Messungen an PS I-Punktmutanten in *C. reinhardtii* zeigten, daß die Mutation des Tryptophans Trp A693 zu einem Phenylalanin die Hyperfeinstruktur des TR-ENDOR-Spektrums verändert. Die Mutation an der korrespondierenden Position in Untereinheit PsaB an Trp B673 zeigte keine Effekte auf das ENDOR-Spektrum. Damit konnte gezeigt werden, daß das bei Temperaturen unter 200 K am zyklischen Elektronentransfer teilnehmende A_1 das in Untereinheit PsaA gebundene Phyllochinon ist. Die Erhöhung der isotropen Hyperfeinkopplung der 2-Methylgruppe um ≈ 0.8 MHz in der Doppelmutante zeigte, daß durch das Tryptophan die Asymmetrie der Spindichteverteilung leicht gesenkt wird. In diesem Zusammenhang konnte die leichte Erhöhung einer weiteren Hyperfeinkopplung erklärt werden. Diese der A_{\perp} -Komponente der Wasserstoffbrücken-HFC zugeordnete Kopplung sollte (wie auch beobachtet wurde) bei Zunahme der asymmetrischen Spindichteverteilung größer werden.

Die ersten TR-ENDOR Spektren an $P_{700}^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ im Einkristall konnten aufgenommen werden. Die Simulation der Orientierungsabhängigkeit der Methyl-HFC lieferte die Hauptwerte des Hyperfeintensors und die Orientierung von A_{\parallel} zur c -Achse. Der Methylhyperfeintensor weicht leicht von axialer Symmetrie ab, die größte Tensorkomponente spannt einen Winkel von $46 \pm 5^\circ$ mit der c -Achse auf. Die Abweichung von der C-CH₃-Bindungsachse um ca. 11° ist im Rahmen bekannter Differenzen in der Literatur [186, 235] und vermutlich auf die große Spindichte am Carbonylsauerstoff O-1 und dem Carbonylkohlenstoff zurückzuführen.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungstasche des sekundären Akzeptors, A_1 , in Photosystem I charakterisiert. Dazu wurden mit EPR- und ENDOR-Spektroskopie sowohl die Semichinonanionen von Modellchinonen als auch der sekundäre Akzeptor als photoakkumuliertes Semichinonanion und im aktiven Zustand als sekundäres Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ untersucht. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch elektrochemische Experimente zur Abhängigkeit des Redoxpotentials des Vitamin K_1 von der Solvenspolarität und quantenchemische Rechnungen mit DFT-Methoden zur Bestimmung magnetischer Parameter.

Charakterisierung der Modellchinone

An einer Reihe von substituierten Naphthochinonen von Naphthochinon bis Phyllochinon wurden die Hyperfeintensoren mit EPR- und ENDOR-Spektroskopie in flüssiger und gefrorener Lösung bestimmt. Die Spindichteverteilung im Semichinonanion wird durch die Substituenten nur gering beeinflusst, der größte Teil der Spindichte ist im Chinonring anzutreffen. Durch Q-Band-EPR an ^{17}O -markiertem Vitamin $K_3^{\bullet-}$ konnte die Spindichte an den Sauerstoffatomen abgeschätzt werden, sie beträgt jeweils 19% und ist im Rahmen der Meßgenauigkeit unabhängig von der Methylsubstitution des Chinons an beiden Sauerstoffen gleich.

Durch Verwendung von deuteriertem Lösemittel wurden die Hyperfeintensoren von austauschbaren Protonen identifiziert, welche Wasserstoffbrücken zu den Carbonylsauerstoffen ausbilden. Durch die Kenntnis der Spindichte an den Sauerstoffen konnten die Längen der Wasserstoffbrücken abgeschätzt werden, sie liegen im Bereich von 1.75–1.80 Å. Eine Ausnahme bildete hierbei das 2-Ethyl-naphthochinon, hier konnte eine zweite Wasserstoffbrücke mit anderer Geometrie identifiziert werden. Diese Wasserstoffbrücke ist länger und liegt nicht mehr in

der Chinonebene. Eine solche Wasserstoffbrückensituation ist auch für die anderen Chinone nicht ausgeschlossen, jedoch wäre zu ihrer zweifelsfreien Detektion entweder volldeuteriertes Chinon oder ENDOR-Messungen mit Orientierungsselektion bei höheren Feldern/Frequenzen notwendig.

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit magnetischer Parameter von der Lösemittelpolarität zeigten, daß die Protonenhyperfeinkopplungen unempfindlich auf derartige Veränderungen reagieren. Vergleichende ENDOR-Experimente am Semichinonanion von Vitamin K₁ im protischen Isopropanol und im apolaren/aprotischen DME/MTHF-Gemisch wiesen vergleichbare Hyperfeinkopplungen auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich durch Hochfeld-EPR im W-Band, daß der **g**-Tensor und besonders die g_{xx} -Komponente des **g**-Tensors eine empfindliche Sonde für die Solvenspolarität ist. Die Messung in DME/MTHF zeigte eine signifikante Verschiebung der g_{xx} -Komponente ($\Delta g_{xx} = 4.5 \cdot 10^{-4}$) im Vergleich zur Messung in IP. Ein linearer Zusammenhang zwischen Solvenspolarität und Redoxpotential konnte durch die Bestimmung des Redoxpotentials der ersten Reduktionsstufe von Vitamin K₁ in einer Reihe von Lösemitteln nachgewiesen werden. Eine empirische Beziehung zwischen Redoxpotential des Semichinonanions und seinem **g**-Tensor wurde so gefunden.

DFT-Rechnungen

Mit DFT-Rechnungen an einem Modell des Phyllochinons wurden die Hyperfeinkopplungen aus der voll geometrieoptimierten Struktur bestimmt und der Einfluß von Wasserstoffbrücken untersucht. Durch die Substitutionen an C-2 und C-3 wiesen die Rechnungen eine Neigung zur Bildung von aus der Chinonebene gekippten Wasserstoffbrücken nach. Die berechneten Hyperfeinkopplungen zeigten bei Berücksichtigung von Wasserstoffbrücken gute Übereinstimmung mit experimentell gefundenen Werten für VK₁^{•-}. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß der dipolare Anteil der ¹⁷O-Hyperfeintensoren ein empfindliches Maß für einseitige oder asymmetrische Wasserstoffbrücken, wie sie im Protein gefunden werden [155,213], ist. Mit DFT-Rechnungen an einem Modell der A₁-Bindungstasche konnte die einseitige Wasserstoffbrücke zum O-4 des Phyllochinons nachgewiesen werden.

Untersuchungen am photoakkumulierten sekundären Akzeptor, A₁^{•-}, in Photosystem I

Mit Multifrequenz-EPR an A₁^{•-} in PS I aus *S. elongatus* konnte der **g**-Tensor bestimmt werden und eine Abschätzung für die Orientierung des 2-Methylhyperfeintensors im **g**-Achsensystem gegeben werden. ENDOR-Spektroskopie lieferte die Hauptwerte des Methylhyperfeintensors. Mit ENDOR-Messungen an einem bei physiologischen Bedingungen inkorporierten volldeute-

rierten Vitamin $K_3^{\bullet-}$ war es möglich, den Hyperfeintensor der einseitigen Wasserstoffbrücke zu identifizieren. Die bei tiefen Temperaturen beobachtete Dynamik der Methyl-HFC wurde einem partiellen Einfrieren der Rotation der Methylgruppe zugeschrieben.

EPR- und ENDOR-Spektroskopie am spinpolarisierten sekundären Radikalpaar, $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$, in Photosystem I

Die erfolgreiche Anwendung des Puls-ENDOR-Verfahrens auf Messungen am sekundären Radikalpaar $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ konnte gezeigt werden. Es wurde ein charakteristische Polarisationsmuster der TR-ENDOR-Spektren gefunden und im Rahmen des SCRP-Modells für schwach gekoppelte Radikalpaare erklärt. Weiterhin zeigte sich, daß die Polarisation der Hyperfeinlinien von ihrem Vorzeichen abhängt. Diese Eigenschaft konnte erfolgreich benutzt werden, um die Zuordnung einer Tensorkomponente (A_{\perp}) der Wasserstoffbrücken-HFC zu bestätigen.

Die Messungen an PS I-Deletionsmutanten, in denen die Biosynthese des Phyllochinons unterbunden ist, wiesen den Einbau eines Plastochinon-9 Moleküls anstatt des Phyllochinons nach. Durch die Zuordnung von zwei Hyperfeintensoren zu den Methylgruppen und einer weiteren Tensorkomponente zu dem α -Proton des PQ-9 konnte festgestellt werden, daß das Gastchinon in der Bindungstasche wie das Phyllochinon im Wildtyp eingebaut wurde, in Übereinstimmung mit transientser EPR-Spektroskopie und OOP-ESEEM am sekundären Radikalpaar [204]. Die besondere Spindichteverteilung war ein Indiz dafür, daß das Gastchinon durch das gleiche einzigartige Bindungsmotiv von A_1 im Wildtyp, eine einseitige Wasserstoffbrücke, gebunden wird. Die TR-ENDOR-Messungen an einer weiteren Deletionsmutante (*menG*), in der die Methyltransferase für das Phyllochinon deaktiviert ist, zeigten, daß die 2-Methylgruppe nicht für die Orientierung und Einbindung des Chinons in die A_1 -Proteintasche notwendig ist.

Erstmals wurden TR-ENDOR-Messungen an $P_{700}^{\bullet+}A_1^{\bullet-}$ in PS I-Einristallen aus *S. elongatus* durchgeführt. Aus der Winkelabhängigkeit der Spektren konnten die Hauptwerte des Hyperfeintensors ($A_{xx} = 8.65$ MHz, $A_{yy} = 12.50$ Hz, $A_{zz} = 8.80$ MHz) und die Orientierung seiner A_{yy} -Hauptachse zur *c*-Achse ($46 \pm 5^\circ$) bestimmt werden.

Ausblick

Die Untersuchungen an den Semichinonanionradikalen hat besonders gezeigt, daß die Zuordnung der Hyperfeintensoren in den ENDOR-Spektren durch Überlagerung begrenzt war. Es wäre daher wünschenswert, wenn hier eine größere Auflösung erzielt werden könnte. Dies sollte durch

ENDOR-Spektroskopie im W-Band möglich sein. Die im W-Band aufgenommenen EPR-Spektren zeigten die vollständige Auflösung des g -Tensors. Mit ENDOR im W-Band ist daher eine beträchtliche Auflösungssteigerung durch Orientierungsselektion möglich, dies ist auch durch Messungen an substituierten Benzochinonanionradikalen gezeigt worden [97, 98]. Ob in Naphthochinonen generell Wasserstoffbrücken mit einer Orientierung aus der Chinonebene heraus vorliegen, sollte auch mit ENDOR im W-Band geklärt werden können. Alternativ müßten die ENDOR-Messungen im X-Band an volldeutertem Material durchgeführt werden.

Die Auflösungssteigerung ist insbesondere auch für TR-ENDOR-Messungen am sekundären Radikalpaar interessant. Hier würde die gewonnene Auflösungssteigerung auch die Kopplungen im Matrixbereich erschließbar machen, was sich besonders für die Messungen an Einkristallen lohnen würde.

Um die Wasserstoffbrücke völlig zweifelsfrei identifizieren zu können, wäre der Einbau eines volldeuterten Phyllochinons in eine der *menA/menB*-Deletionsmutanten notwendig. Das komplementäre Experiment dazu wäre Deuterium-ENDOR an volldeutertem PS I, in welches ein protoniertes Phyllochinon eingebaut ist.

Die Bidirektionalität des Elektronentransfers bei physiologischen Temperaturen [74, 75] ist immer noch eine nicht völlig geklärte Frage. Möglicherweise kann das Phyllochinon in PsaB eventuell doch der transienten EPR-Spektroskopie zugänglich gemacht werden, eine Kombination von Blockierung der A-Seite und eine Mutation auf der B-Seite, welche den Vorwärtselektronentransfer verlangsamt, wäre dafür ein Ansatz.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel; *J. Mol. Biol.* 180; 385 (1984)
- [2] N. Krauß, W. D. Schubert, O. Klukas, P. Fromme, H. T. Witt, W. Saenger; *Nature Struct. Biol.* 3; 965 (1996)
- [3] A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauß, W. Saenger, P. Orth; *Nature* 409; 739 (2001)
- [4] D. W. Lawlor; *Photosynthese*; Stuttgart: Thieme, 1990
- [5] L. Stryer; *Biochemistry*; 4. Aufl.; New York: W. H. Freeman and Company, 1995
- [6] D. Voet, J. G. Voet; *Biochemistry*; 2. Aufl.; New York: J. Wiley & Sons, 1995
- [7] D.-P. Häder (Hrsg.); *Photosynthese*; Stuttgart: Georg Thieme, 1999
- [8] R. E. Blankenship; *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*; Oxford: Blackwell Science, 2002
- [9] J. Priestley; *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 62; 147 (1772)
- [10] J. Ingenhousz; *Experiment upon vegetables, discovering their great power of purifying the common air in the sunshine, and of injuring it in the shade and at night.*; London: Elmsley & Payne, 1779
- [11] J. R. Mayer; *Die organische Bewegung in ihrem Zusammenhang mit dem Stoffwechsel*; Heilbronn, 1845
- [12] O. Warburg; *Biochem. Z.* 100; 230 (1919)
- [13] O. Warburg; *Biochem. Z.* 103; 188 (1920)
- [14] R. Hill; *Nature* 139; 181 (1937)
- [15] R. Emerson, R. V. Chalmers, C. Cederstrand; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43; 133 (1957)
- [16] R. Hill, F. Bendall; *Nature* 186; 136 (1960)
- [17] H. T. Witt, A. Müller, B. Rumberg; *Nature* 191; 967 (1961)
- [18] B. Kok, G. Hoch; *Light and Life*; S. 397–416; Baltimore: John Hopkins Press, 1961
- [19] J. S. C. Wessels; *Biochim Biophys. Acta* 65; 561 (1962)
- [20] J. M. Olsen, D. Filmer, R. Radloff, C. Romano, C. Sybesma; in: *Bacterial Photosynthesis* (H. Gest, A. SanPietro, L. P. Vernon, Hrsg.); S. 423–431; Yellow Springs, Ohio: Antioch Press, 1963

- [21] H. Huzisige, B. Ke; *Photosynth. Res.* 38; 185 (1993)
- [22] J. Barber, J. Nield, E. P. Morris, D. Zheleva, B. Hankamer; *Physiol. Plantarum* 100; 817 (1997)
- [23] J. M. Erickson; *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas*; Kap. 15; Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers, 1998
- [24] F.-A. Wollmann; *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas*; Kap. 24, S. 459–476; Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers, 1998
- [25] B. L. Trumpower; *J. Biol. Chem.* 265; 11409 (1990)
- [26] H. Strothmann; *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas*; Bd. 7 von *Advances in Photosynthesis*; Kap. 25; Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers, 1998
- [27] B. R. Green, W. Parson (Hrsg.); *Light Harvesting Antennas*; Kluwer Academic Press, 2001
- [28] R. J. Radmer, B. Kok; *Photosynthesis I, Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation*; Heidelberg: Springer, 1977
- [29] D. Crowther, G. Hind; *Arch. Biochem. Biophys.* S. 568–577 (1980)
- [30] R. E. Cleland, D. S. Bendall; *Photosynth. Res.* 34; 409 (1992)
- [31] U. Heber, U. Gerst, A. Krieger, S. Neimanski, Y. Kobayashi; *Photosynth. Res.* 46; 295 (1995)
- [32] R. E. Blankenship; *Photosynth. Res.* 33; 91 (1992)
- [33] C. R. D. Lancaster, M. V. Bibikova, P. Sabatino, D. Oesterhelt, H. Michel; *J. Biol. Chem.* 275; 39364 (2000)
- [34] P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauß; *Nature* 411; 909 (2001)
- [35] G. Hauska, T. Schoedl, H. Remigy, G. Tsiotis; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 260 (2001)
- [36] S. Neerken, J. Amesz; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 278 (2001)
- [37] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten; *J. Molec. Graphics* 14; 33 (1996)
- [38] J. Hladik, D. Sofrova; *Photosynth. Res.* 33; 171 (1991)
- [39] N. V. Karapetyan, A. R. Holzwarth, M. Rögner; *FEBS Lett.* 460; 395 (1999)
- [40] A. Kitmitto, A. O. Mustafa, A. Holzenburg, R. C. Ford; *J. Biol. Chem.* 273; 29592 (1998)
- [41] M. Germano, A. E. Yakushevskaya, W. Keegstra, H. J. van Gorkom; *FEBS Letters* 525; 121 (2002)
- [42] P. Fromme, W.-D. Schubert, N. Krauß; *Biochim Biophys. Acta* 1187; 99 (1994)
- [43] J. Sun; *J. Biol. Chem.* 274; 19048 (1999)
- [44] M. Hippler, J. Reichert, M. Sutter, E. Zak, L. Altschmied, U. Schroer, R. G. Herrmann, W. Haehnel; *EMBO J.* 15; 6374 (1996)

- [45] M. Hippler, F. Drepper, J. D. Rochaix, U. Mühlenhoff; *J. Biol. Chem.* 274; 4180 (1999)
- [46] Q. Xu, L. Yu, V. P. Chitnis, P. R. Chitnis; *J. Biol. Chem.* 269; 3205 (1994)
- [47] J. Zhao, N. Li, P. V. Warren, J. H. Golbeck, D. A. Bryant; *Biochemistry* 31; 5093 (1992)
- [48] J. H. Golbeck; *Photosynthesis: Molecular Biology*; Bd. 297; S. 95–123; San Diego: Academic Press, 1998
- [49] B. Schoepp, M. Lebrun, E. Brugna, W. Nitschke; *Advances in Inorganic Chemistry*; Bd. 47; S. 335–360; New York: Academic Press, 1999
- [50] M. L. Antonkine, G. Liu, D. Bentrup, D. A. Bryant, I. Bertini, C. Luchinat, J. H. Golbeck, D. Stehlik; *J. Biol. Inorg. Chem.* (2001)
- [51] N. Li, J. Zhao, P. V. Warren, J. T. Warden, D. A. B. J. H. Golbeck; *Biochemistry* 30; 7863 (1991)
- [52] J. P. Yu, L. B. Smart, Y. S. Jung, J. H. Golbeck, L. McIntosh; *Plant Mol. Biol.* 29; 331 (1995)
- [53] Y. Takahashi, M. Goldschmidt-Clermont, S.-Y. Soen, L. G. Franzen, J.-D. Rochaix; *EMBO J.* 10; 2033 (1991)
- [54] A. L. Zilber, R. Malkin; *Plant Physiol.* 99; 901 (1992)
- [55] V. P. Chitnis, A. Ke, P. R. Chitnis; *Plant. Physiol.* 115; 1699 (1997)
- [56] P. Barth, B. Laoutte, P. Setif; *Biochemistry* 37; 16233 (1998)
- [57] B. Andersen, B. Koch, H. V. Scheller; *Plant Physiol.* 84; 154 (1992)
- [58] F. Rousseau, P. Setif, B. Lagoutte; *EMBO J.* 12; 1755 (1993)
- [59] J. Zhao, W. B. Snyder, U. Mühlenhoff, E. Rhiel, P. V. Warren, J. H. Golbeck, D. A. Bryant; *Mol. Microbiol.* 9; 183 (1993)
- [60] C. J. Falzone, Y. H. Kao, J. Zao, D. A. Bryant, T. T. J. Lecomte; *Biochemistry* 33; 6052 (1994)
- [61] P. Fromme, P. Jordan, N. Krauß; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 5 (2001)
- [62] J. H. Golbeck, D. A. Bryant; *Current Topics in Bioenergetics: Light Driven Reaction in Bioenergetics*; Kap. 16, S. 83–177; New York: Academic Press, 1991
- [63] P. Setif; *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*; Kap. 12, S. 471–499; Amsterdam: Elsevier, 1992
- [64] D. A. Bryant; *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*; Kap. 13, S. 501–550; Amsterdam: Elsevier, 1992
- [65] R. Nechushtai, A. Eden, Y. Cohen, J. Klein; *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*; Kap. 15, S. 289–311; Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996
- [66] R. Malkin; *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*; Kap. 16, S. 313–332; Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996

- [67] K. Brettel; *Biochim. Biophys. Acta* 1318; 322 (1997)
- [68] H. Käss, P. Fromme, H. T. Witt, W. Lubitz; *J. Phys. Chem. B* 105; 1225 (2001)
- [69] I. Sieckmann, K. Brettel, C. Bock, A. van der Est, D. Stehlik; *Biochemistry* 32; 4842 (1993)
- [70] W. D. Schubert, O. Klukas, N. Krauß, W. Saenger, P. Fromme, H. T. Witt; in: *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (P. Mathis, Hrsg.); Bd. II; S. 3–10; Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995
- [71] T. Swarthoff, P. Gast, J. Amesz, H. P. Buisman; *FEBS Lett.* 146; 129 (1982)
- [72] A. Forman, M. S. Davis, I. Fujita, L. K. Hanson, K. M. Smith, J. Fajer; *Isr. J. Chem.* 21; 265 (1981)
- [73] N. S. Smith, R. W. Mansfield, J. H. A. Nugent, M. C. W. Evans; *Biochim. Biophys. Acta* 892; 331 (1987)
- [74] P. Joliot, A. Joliot; *Biochemistry* 38; 11130 (1999)
- [75] M. Guergova-Kuras, B. Boudreaux, A. Joliot, P. Joliot, K. Redding; *Proc. Nat. Acad. Soc.* 98; 4437 (2001)
- [76] I. P. Muhiuddin, P. Heathcote, S. Carter, S. Purton, S. E. J. Rigby, M. C. W. Evans; *FEBS Lett.* 503; 56 (2001)
- [77] B. Boudreaux, F. MacMillan, C. Teutloff, R. Agalarov, F. Gu, S. Grimaldi, R. Bittl, K. Brettel, K. Redding; *J. Biol. Chem.* 276; 37299 (2001)
- [78] I. R. Vassiliev, M. L. Antonkine, J. H. Golbeck; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 139 (2001)
- [79] C. H. Hamann, W. Vielstich; *Elektrochemie*; 2. Aufl.; Weinheim: Wiley-VCH, 1998
- [80] C. M. A. Brett, M. O. Brett; *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*; Oxford University Press, 1993
- [81] J. E. B. Randles; *Trans. Faraday Soc.* 44; 327 (1948)
- [82] A. Sevcic; *Collect. Czech. Chem. Comm.* 13; 349 (1948)
- [83] J. G. Osteryoung, R. A. Osteryoung; *Anal. Chem.* 57; 101A (1985)
- [84] D. Krulic, N. Fatouros, M. M. Belamacchi; *J. Electroan. Chem.* 385; 33 (1995)
- [85] A. Carrington, A. D. McLachlan; *Introduction to Magnetic Resonance*; New York, Evanston & London: Harper&Row, 1969
- [86] J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz; *Electron Paramagnetic Resonance - Elementary Theory and Practical Applications*; New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994
- [87] N. M. Atherton; *Principles of Electron Spin Resonance*; New York: E. Horwood and PTR Prentice Hall, 1993
- [88] C. P. Poole, H. A. Farach; *Theory of Magnetic Resonance*; New York: John Wiley & Sons, Inc., 1987
- [89] H. Kurreck, B. Kirste, W. Lubitz; *Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy in Solution*; Weinheim: VCH, 1988

- [90] A. J. Hoff; *Advanced EPR*; Amsterdam: Elsevier, 1989
- [91] G. Feher; *Phys. Rev.* 103; 834 (1956)
- [92] W. B. Mims; *Proc. R. Soc. London* 283; 452 (1965)
- [93] E. R. Davies; *Phys. Letters* A47; 1 (1974)
- [94] B. F. Hales; *J. Am. Chem. Soc.* 97; 5993 (1975)
- [95] O. Burghaus, M. Plato, M. Rohrer, K. Möbius, F. MacMillan, W. Lubitz; *J. Phys. Chem.* 97; 7639 (1993)
- [96] A. J. Stone; *Mol. Phys.* 6; 509 (1963)
- [97] M. Rohrer, M. Plato, F. MacMillan, Y. Grishin, W. Lubitz, K. Möbius; *J. Magn. Reson. A* 116; 59 (1995)
- [98] M. Rohrer, F. MacMillan, T. F. Prisner, A. T. Gardiner, K. Möbius, W. Lubitz; *J. Phys. Chem. B* 102; 4648 (1998)
- [99] G. L. Closs, M. D. E. Forbes, J. J. R. Norris; *J. Phys. Chem.* 91; 3592 (1987)
- [100] C. D. Buckley, D. A. Hunter, P. J. Hore, K. A. McLauchlan; *Chem. Phys. Lett.* 135; 307 (1987)
- [101] P. J. Hore, D. A. Hunter, C. D. McKie, A. J. Hoff; *Chem. Phys. Lett.* 137; 495 (1987)
- [102] P. J. Hore; *Analysis of Polarized Electron Paramagnetic Resonance Spectra*; S. 405–440; Amsterdam: Elsevier, 1989
- [103] C. E. Fursman, C. Teutloff, R. Bittl; *J. Phys. Chem B* 106; 9679 (2002)
- [104] F. Lendzian, M. Plato, K. Möbius; *J. Magn. Reson.* 44; 20 (1981)
- [105] P. Fromme, H. T. Witt; *Biochim. Biophys. Acta* 1365; 175 (1998)
- [106] P. Fromme, H. T. Witt, W. D. Schubert, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauß; *Biochim. Biophys. Acta* 1275; 76 (1996)
- [107] R. Bittl, S. G. Zech, P. Fromme, H. T. Witt, W. Lubitz; *Biochemistry* 36; 12001 (1997)
- [108] T. W. Johnson, G. Shen, B. Zybailov, D. Kolling, R. Reategui, S. Beauparlant, I. R. Vassiliev, D. A. Bryant, A. D. Jones, J. H. Golbeck; *J. Biol. Chem.* 275; 8523 (2000)
- [109] M. Rögner, P. J. Nixon, B. A. Diner; *J. Biol. Chem.* 265; 6189 (1973)
- [110] T. G. Owens, S. P. Webb, L. Mets, R. S. Alberte, G. R. Felming; *Biophys. Journal* 74; 2611 (1989)
- [111] E. H. Harris; *The Chlamydomonas Sourcebook*; San Diego, New York: Academic Press, 1989
- [112] N. Chua, P. Bennoun; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73; 2175 (1975)
- [113] J. E. Mullet, J. J. Burke, C. J. Arntzen; *Plant Phys.* 65; 814 (1980)

- [114] Y. Takahashi, M. Goldschmidt-Clermont, S.-Y. Soen, L. G. Franzen, J.-D. Rochaix; *EMBO J.* 10; 2033 (1991)
- [115] L. Krabben; *Die Protein-Umgebung des primären Donators P700 im Photosystem I: Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von Mutanten der Grünalge Chlamydomonas reinhardtii*; Dissertation; TU Berlin (1999)
- [116] R. J. Porra, W. A. Thompson, P. E. Kriedemann; *Biochim. Biophys. Acta* 975; 384 (1989)
- [117] C. Teutloff; *Präparation und spektroskopische Charakterisierung des sekundären Akzeptors A₁ in Photosystem I*; Diplomarbeit; TU Berlin (1997)
- [118] F. MacMillan, J. Hanley, L. van der Weerd, M. Knüpling, S. Un, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 36; 9297 (1997)
- [119] J. Bonnerjea, M. C. W. Evans; *FEBS Letters* 148; 313 (1982)
- [120] S. van Gerken, J. P. Dekker, E. Schlodder, H. T. Witt; *Biochim. Biophys. Acta* 977; 52 (1989)
- [121] C. Flemming; *Charakterisierung der Antennensysteme von monomeren und trimeren Photosystem I Komplexen*; Diplomarbeit; TU Berlin (1996)
- [122] R. Thanner; *¹⁴N- und ¹⁵N-EPR und ENDOR Untersuchungen an Radikalanionen photosynthetisierender Pigmente in vitro und in vivo*; Diplomarbeit; Universität Stuttgart (1990)
- [123] A. Stesmans, G. van Gorp; *Rev. Sci. Instrum.* 60; 2949 (1989)
- [124] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison; *Inorg. Chim. Acta* 298; 97 (2000)
- [125] A. J. Swallow; *Physical Chemistry of Semiquinones, in: Function of Quinones in Energy Conserving Systems*; Academic Press, 1982
- [126] R. C. Prince, M. R. Gunner, P. L. Dutton; *Function of Quinones as Energy Conserving Systems*; Kap. II-1, S. 29–34; Academic Press, 1982
- [127] R. C. Prince, P. L. Dutton, J. M. Bruce; *FEBS Lett.* 160; 273 (1983)
- [128] V. Gutmann; *Coord. Chem. Rev.* 2; 239 (1967)
- [129] V. Gutmann; *Coordination Chemistry in Non-Aqueous Solvents*; Springer, Wien, New York, 1968
- [130] U. Mayer, V. Gutmann, W. Gerger; *Monatsh. Chem.* 106; 1235 (1975)
- [131] K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepmann, F. Bohlmann; *Liebigs Ann. Chem.* 727; 93 (1963)
- [132] U. Mayer; *NMR-Spectroscopic Studies on Solute-Solvent and Solute-Solute Interactions*; Kap. 5, S. 219ff.; Elsevier, Amsterdam, 1983
- [133] C. Reichardt; *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH, Weinheim, 1988
- [134] M. H. Vos, H. J. van Gorkum; *Biochim. Biophys. Acta* 934; 293 (1988)
- [135] P. Sétif, H. Bottin, K. Brettel; in: *Current Research in Photosynthesis* (M. Baltscheffsky, Hrsg.); Bd. 2; S. 539–546; Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers Group, 1990

- [136] M. Iwako, S. Itoh; *Plant Cell Physiol.* 35; 983 (1994)
- [137] B. Venkatamaran, G. Fraenkel; *J. Am. Chem. Soc.* 77; 2707 (1955)
- [138] B. Venkatamaran, G. Fraenkel; *J. Chem. Phys.* 23; 588 (1955)
- [139] G. Vincow, G. K. Fraenkel; *J. Chem. Phys.* 34; 1333 (1961)
- [140] J. Gendell, J. H. Freed, G. K. Fraenkel; *J. Chem. Phys.* 37; 2832 (1962)
- [141] A. K. Grafton, R. A. Wheeler; *J. Phys. Chem. A* 101; 7154 (1997)
- [142] M. R. Das, H. D. Connor, D. S. Leniart, J. H. Freed; *J. Am. Chem. Soc.* 92; 2258 (1969)
- [143] F. MacMillan; *EPR and ENDOR Investigation of the Electron Acceptor Q_A in Plant Photosystem II and Related Semiquinone Anion Radicals*; Dissertation; Freie Universität Berlin (1993)
- [144] P. O'Malley, G. T. Babcock; *J. Am. Chem. Soc.* 108; 3995 (1986)
- [145] C. Elsässer; *EPR- und ENDOR-Untersuchungen an biologisch relevanten Chinon-Anionradikalen*; Diplomarbeit; Technische Universität Berlin (2000)
- [146] H. Joela, P. Lehtovuori; *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1; 4003 (1999)
- [147] M. K. Bowman, M. C. Thurnauer, J. R. Norris, S. A. Dikanov, V. I. Gulin, A. M. Tyrishkin, R. I. Samoilova, Y. D. Tsvetkov; *Applied Magn. Res.* 3; 353 (1992)
- [148] M. R. Das, H. D. Connor, D. S. Leniart, J. H. Freed; *Journal of the American Chemical Society* 92; 2258 (1970)
- [149] J. R. Morton; *Chem. Rev.* 64; 453 (1964)
- [150] F. MacMillan, F. Lenzian, W. Lubitz; *Magn. Res. Chem.* 33; 81 (1995)
- [151] J. E. Wertz, J. R. Bolton; *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*; New York: McGraw-Hill, 1972
- [152] M. Zheng, G. C. Dismukes; *Biochemistry* 35; 8955 (1996)
- [153] A. T. Gardiner, S. G. Zech, F. MacMillan, H. Käss, R. Bittl, R. Schlodder, F. Lenzian, W. Lubitz; *Biochemistry* 38; 11773 (1999)
- [154] F. Himo, G. T. Babcock, L. A. Eriksson; *J. Phys. Chem. A* 103; 3745 (1999)
- [155] G. Feher, R. A. Isaacson, M. Y. Okamura, W. Lubitz; in: *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria* (M. E. Michel-Beyerle, Hrsg.); Bd. 42; S. 174; Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag, 1985
- [156] T. Maly; *EPR- und ENDOR-Untersuchungen an biologisch relevanten Semichinon-Radikalanionen*; Diplomarbeit; J.W.G. Universität Frankfurt (1999)
- [157] A. J. Stone; *Proc. R. Soc. A* 271; 424 (1963)
- [158] B. S. Prabhananda, C. C. Felix, J. S. Hyde, A. Walvekar; *J. Chem. Phys.* 83; 6121 (1985)
- [159] D. S. McClure; *J. Chem. Phys.* 17; 905 (1949)

- [160] A. Balasubramanian, C. N. R. Rao; *Spectrochim. Acta* 18; 1337 (1962)
- [161] O. Nimz, F. Lendzian, C. Boullais, W. Lubitz; *App. Magn. Res.* 14; 255 (1997)
- [162] T. Kawamura, S. Matsunami, T. Yonezawa; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 40; 1111 (1967)
- [163] M. A. Ondar, O. Y. Grinberg, A. A. Doubinskii, Y. S. Lebedev; *Sov. J. Phys. Chem.* 3; 781 (1985)
- [164] H.-J. Steinhoff, A. Savitsky, C. Wegener, M. Pfeiffer, M. Plato, K. Möbius; *Biochim. Biophys. Acta* 1457; 253 (2000)
- [165] P. J. O'Malley, S. J. Collins; *Chem. Phys. Lett.* 259; 296 (1996)
- [166] M. Nonella; *Phot. Res.* 55; 253 (1998)
- [167] D. M. Chipman; *J. Phys. Chem. A* 104; 11816 (2000)
- [168] M. Engström, O. Vahtras, H. Ågren; *Chem. Phys.* 243; 263 (1999)
- [169] O. L. Malkina, J. Vaara, B. Schimmelpfennig, M. Munzarova, V. G. Malkin, M. Kaupp; *J. Am. Chem. Soc.* 122; 9206 (2000)
- [170] M. Kaupp, C. Remenyi, J. Vaara, O. L. Malkina, V. G. Malkin; *J. Am. Chem. Soc.* 124; 2709 (2002)
- [171] V. Barone; in: *Recent Advances in Density Functional Methods* (D. P. Chong, Hrsg.); Singapore: World Scientific Publishing, 1995
- [172] G. Jeffrey; *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press, 1997
- [173] P. J. O'Malley; *Biochim. Biophys. Acta* 1411; 101 (1999)
- [174] F. Jensen; *Introduction into Computational Chemistry*; Chichester: John Wiley & Sons, 1999
- [175] A. K. Grafton, S. E. Boesch, R. A. Wheeler; *J. Mol. Struct.(Theochem)* 392; 1 (1997)
- [176] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, J. T. O. Farkas, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople; *Gaussian98, Revision A.6*; Gaussian, Inc.; Pittsburgh PA (1998)
- [177] P. J. O'Malley; *J. Phys. Chem. A* 101; 6334 (1997)
- [178] M. Knüpling, J. T. Törring, S. Un; *Chem. Phys.* 219; 291 (1997)
- [179] Scientific Computing and Modelling NV; *ADF Program System, Release 2000.02*; Vrije Universiteit; Theoretical Chemistry; De Boelelaan 1083; 1081 HV Amsterdam; The Netherlands (2000)

- [180] A. D. Becke; *Phys. Rev. A* 38; 3098 (1988)
- [181] J. P. Perdew; *Phys. Rev. B* 33; 8822 (1986)
- [182] J. Törring, S. Un, M. Knüpling, M. Plato, K. Möbius; *J. Chem. Phys.* 107; 3905 (1997)
- [183] A. J. Stone; *Mol. Phys.* 7; 311 (1964)
- [184] R. Angstl; *Chem. Phys.* 132; 435 (1989)
- [185] *DGauss 4.0*, Cray Research Inc., San Diego (1995)
- [186] W. Lubitz, G. Feher; *Appl. Magn. Reson.* 17; 1 (1999)
- [187] F. Neese; *J. Chem. Phys.* 115; 11080 (2001)
- [188] K. Brettel, W. Leibl; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 100 (2001)
- [189] S. Itoh, M. Iwaki, I. Ikegami; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 115 (2001)
- [190] R. Bittl, S. G. Zech; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 194 (2001)
- [191] A. van der Est; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 212 (2001)
- [192] Y. Deligiannakis, A. W. Rutherford; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 226 (2001)
- [193] S. E. J. Rigby, M. C. W. Evans, P. Heathcote; *Biochim. Biophys. Acta* 1507; 247 (2001)
- [194] P. Gast, T. Swarthoff, F. Ebskamp, A. J. Hoff; *Biochim. Biophys. Acta* 722; 163 (1983)
- [195] M. C. Thurnauer, P. Gast; *Photobiophys. Photobiophys.* 9; 29 (1985)
- [196] K. Brettel, P. Setif, P. Mathis; *FEBS Lett.* 203; 220 (1986)
- [197] R. R. Rustandi, S. W. Snyder, L. L. Feezel, T. J. Michalsky, J. R. Norris, M. Thurnauer, J. Biggins; *Biochemistry* 29; 8030 (1990)
- [198] I. Sieckmann, A. van der Est, H. Bottin, P. Setif, D. Stehlik; *FEBS Lett.* 284; 98 (1991)
- [199] C. Teutloff, F. MacMillan, R. Bittl, F. Lenzian, W. Lubitz; in: *Magnetic Resonance and Related Phenomena* (D. Ziessow, W. Lubitz, F. Lenzian, Hrsg.); Bd. II; S. 806–807; Technische Universität Berlin, 1998
- [200] A. van der Est, T. Prisner, R. Bittl, P. Fromme, W. Lubitz, K. Möbius, D. Stehlik; *J. Phys. Chem.* 101; 1437 (1997)
- [201] S. E. J. Rigby, M. C. W. Evans, P. Heathcote; *Biochemistry* 35; 6651 (1996)
- [202] S. G. Zech, W. Hofbauer, A. Kamlowski, P. Fromme, D. Stehlik, W. Lubitz, R. Bittl; *J. Phys. Chem. B* 104; 9728 (2000)
- [203] T. W. Johnson, B. Zybailov, A. D. Jones, R. Bittl, S. Zech, D. Stehlik, J. H. Golbeck, P. R. Chitnis; *J. Biol. Chem.* 276; 39512 (2001)
- [204] B. Zybailov, A. van der Est, S. G. Zech, C. Teutloff, T. W. Johnson, G. Shen, R. Bittl, D. Stehlik, P. Chitnis, J. H. Golbeck; *J. Biol. Chem.* 275; 8531 (2000)
- [205] A. E. Ostafin, S. Weber; *Biochim. Biophys. Acta* 1320; 195 (1997)

- [206] J. H. Freed; *J. Chem. Phys.* 43; 1710 (1965)
- [207] S. Clough, J. Hill, F. Poldy; *J. Phys. C.: Solid State Phys.* 5; 518 (1972)
- [208] A. R. Sornes, N. P. Benetis, R. Erickson, A. S. Mahgoub, L. Ebersson, A. Lund; *J. Phys. Chem.* 101; 8987 (1997)
- [209] A. R. Sornes, N. P. Benetis; *Chem. Phys.* 226; 151 (1998)
- [210] G. Feher, A. J. Hoff, R. A. Isaacson, L. A. Ackerson; *Ann. New York Acad. Sci.* 244; 239 (1975)
- [211] F. MacMillan, C. Teutloff, A. W. Rutherford, W. Lubitz; in: *Magnetic Resonance and Related Phenomena* (D. Ziessow, W. Lubitz, F. Lenzian, Hrsg.); Bd. II; S. 802–803; Technische Universität Berlin, 1998
- [212] J. Hanley, Y. Deligiannakis, F. MacMillan, H. Bottin, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 36; 11543 (1997)
- [213] S. Grimaldi, T. Ostermann, N. Weiden, T. Mogi, H. Miyoshi, B. Ludwig, H. Michel, T. F. Prisner, F. MacMillan; *Biochemistry* 42; 5632 (2003)
- [214] R. Bittl, S. G. Zech; *J. Phys. Chem. B* 101; 1429 (1997)
- [215] H. Käss; *Strukturuntersuchungen zum primären Donator P700 in PS I*; Dissertation; Technische Universität Berlin (1995)
- [216] M. C. W. Evans, S. Purton, V. Patel, D. Wright, P. Heathcote, S. Rigby; *Photosynthesis Research* 61; 33 (1999)
- [217] F. MacMillan, F. Lenzian, G. Renger, W. Lubitz; *Biochemistry* 34; 8144 (1995)
- [218] Y. Sakuragi, B. Zybailov, G. Shen, A. D. Jones, P. R. Chitnis, A. van der Est, R. Bittl, S. Zech, D. Stehlik, J. H. Golbeck, D. A. Bryant; *Biochemistry* 41; 394 (2002)
- [219] P. Heathcote, J. A. Hanley, M. C. W. Evans; *Biochim. Biophys. Acta* 1144; 54 (1993)
- [220] I. P. Muhiuddin, P. Heathcote, S. Carter, S. Purton, S. E. J. Rigby, M. C. W. Evans; *FEBS Lett.* 503; 56 (2001)
- [221] S. E. J. Rigby, I. P. Muhiuddin, M. C. W. Evans, S. Purton, P. Heathcote; *Biochim. Biophys. Acta* 1556; 13 (2002)
- [222] K. Brettel; *FEBS Lett.* 239; 93 (1988)
- [223] C. H. Bock, A. van der Est, K. Brettel, D. Stehlik; *FEBS Lett.* 247; 91 (1989)
- [224] P. Moenne-Loccoz, P. Heathcote, D. J. Maclachlan, M. C. Berry, I. H. Davis, M. C. W. Davis; *Biochemistry* 33; 10037 (1994)
- [225] A. van der Est, C. Bock, J. Golbeck, K. Brettel, P. Setif, D. Stehlik; *Biochemistry* 33; 11789 (1994)
- [226] P. Mathis, P. Setif; *FEBS Lett.* 237; 65 (1988)
- [227] P. Setif, K. Brettel; *Biochemistry* 32; 7846 (1993)

- [228] K. Brettel; in: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proceedings of the 11th International Congress of Photosynthesis* (G. Garab, Hrsg.); Bd. 1; Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998
- [229] S. Purton, D. R. Stevens, I. P. Muhiuddin, M. C. W. Evans, S. Carter, S. E. J. Rigby, P. Heathcote; *Biochemistry* 40; 2167 (2001)
- [230] W. D. Schubert, O. Klukas, N. Krauß, W. Saenger, P. Fromme, H. T. Witt; *J. Mol. Biol.* 272; 741 (1997)
- [231] A. Kamlowksi, S. G. Zech, P. Fromme, R. Bittl, W. Lubitz, H. T. Witt, D. Stehlik; *J. Phys. Chem. B* 102; 8266 (1998)
- [232] A. Kamlowksi, A. van der Est, P. Fromme, D. Stehlik; *Biochim. Biophys. Acta* 1319; 185 (1997)
- [233] J. W. Eaton; GNU Octave; *Techn. Ber.*; University of Wisconsin-Madison, Dep. of Chemical Engineering (2000)
- [234] H. Goldstein; *Klassische Mechanik*; Kap. 4; 7. Aufl.; Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden, 1983
- [235] R. A. Isaacson, E. C. Abresch, G. Feher, W. Lubitz, J. C. Williams, J. P. Allen; *Biophys. J.* 68; A246 (1995)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lubitz danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung und seine Anregungen und Unterstützung während der Arbeit. Der umfangreiche Gerätepark in seinem Labor erlaubte mir vielfältige Messungen.

Prof. Dr. Robert Bittl hat mich in die Welt der Radikalpaare und Puls-EPR eingeführt und dadurch neue, interessante Projekte angestoßen und viele Diskussionen über physikalische Fragen ausgelöst. Besonderer Dank gilt Dir auch für Deine Bemühungen um das Vorankommen meiner Arbeit bis zur letzten Stunde.

Dr. Fraser MacMillan sei für die abwechslungsreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet $A_1^{\bullet-}$ und anderer Chinonanionen gedankt. Fraser, unvergessen bleiben mir die gemeinsamen Nachtmessungen und Dein einzigartiges Geschick, drei Spektrometer gleichzeitig zu bedienen.

Celine Elsäßer gab mir die Gelegenheit, mich an der Betreuung ihrer Diplomarbeit zu versuchen und hat mich tatkräftig bei meinen Elektrolyseversuchen unterstützt. Während der gemeinsamen Messungen gab es auch mal Gelegenheit, Diskussionen philosophischer Natur zu führen.

Dr. Friedhelm Lenzian war die Seele des EPR-Labors und mit Robert immer zur Stelle, wenn die Spektrometer ihre Macken hatten. Friedhelm, Du warst immer diskussionsbereit und hattest Verständnis für alle Probleme. Besonders Deiner Bemühung um finanzielle Unterstützung während der Endphase gebührt mein Dank.

Marcus Galander hatte immer Code-Schnipsel zur Hand, wenn es mal nicht so funktionierte mit der Simulation der Spektren. Mit Catherine Fursman teilte ich Freud und Leid beim Verständnis der Radikalpaar-ENDOR Spektren.

Ohne die Kooperationspartner, die mich mit Probenmaterial versorgten, wären große Teile dieser Arbeit natürlich nicht möglich gewesen:

Petra Fromme war die unerschöpfliche Quelle von PS I aus *S. elongatus* und stellte die PS I-Kristalle zur Verfügung. John Golbeck, Parag Chitnis, Donald Bryant danke ich für die PS I-Proben der Deletionsmutanten. Kevin Redding versorgte mich mit *C. reinhardtii*-Punktmutanten. Von Claude Bollais (CEA Saclay, Frankreich) erhielt ich die ^{17}O -markierten Chinone. Eberhard Bothe (MPI Mühlheim) stellte mir seine Geräte für die Cyclovoltammetrie zur Verfügung. Er und Christoph Laurich unterstützten mich bei den Messungen.

Matthias Stein danke ich für die g -Tensor-Rechnungen. Eberhard Schlodder unterstützte mich bei den optischen Differenz-Absorptionsmessungen und war immer zu Diskussionen über Elektronentransfer in PS I bereit. Wulf Hofbauer führte mich in die Geheimnisse des W-Band-Spektrometers ein und half bei ersten Messungen. Marc (Hannes) Brecht half mir bei meinen ersten Versuchen, ESEEM- und HYSORE-Spektren von $A_1^{\bullet-}$ aufzunehmen.

Den Korrekturlesern Celine, Friedhelm, Marcus und meiner Frau Andrea sei herzlichst gedankt.

Der wechselnden Besetzung unseres Büros, des Multifunktionsraumes 316 sei für das angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt:

Claudia Schulz, Ludwig Krabben, Uwe Fink, Frank Müh, Irene Geisenheimer und Marcus Galander.

Allen Mitstreitern in der AG Lubitz danke ich für die gemeinsame, anregende Zeit.

Bei meiner Familie möchte ich mich für ihre Geduld mit mir und ihren Zuspruch, besonders zum Abschluß meiner Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Name: Christian Bork Teutloff
Geburtstag : 1. November 1970
Geburtsort: Potsdam-Babelsberg
Eltern: Heinz-Joachim Teutloff und
Anneliese Teutloff, geb. Lehmphul

Ausbildung

Sep. 1977 – Juni 1987 Polytechnische Oberschule „Hans Marchwitza“
in Potsdam
Sep. 1987 – Juni 1989 Spezialklassen für Chemie der TH Merseburg
Juni 1989 Abitur
Oktober 1991 Beginn des Chemiestudiums an der Technischen
Universität Berlin
Juli 1993 Vordiplom Chemie
Juli 1996 – April 1997 Diplomarbeit am Max-Volmer-Institut für
Biophysikalische Chemie und Biochemie der Technischen
Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Lubitz,
Thema: Erzeugung und spektroskopische Charakterisierung
des Radikalanions des primären Chinonakzeptors $A_1^{\bullet-}$
in Photosystem I
April 1997 Diplom in Chemie
seit Juli 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Volmer-Institut
für Biophysikalische Chemie und Biochemie der Technischen
Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Lubitz,
Beginn der vorliegenden Dissertation

Tätigkeiten

September 1989 – Oktober 1989 Praktikum im Zentralinstitut für Ernährung (Potsdam-Rehbrücke)
November 1989 – April 1990 Krankenpflegehilfe im Pflegeheim Sacrow (Potsdam)
Mai 1990 – Mai 1991 Zivildienst
1992 – 1995 Krankenpfleger in der Hauskrankenpflege
1995 – 1996 Wissenschaftliche Hilfskraft am
Fraunhoferinstitut für Siliziumtechnologie (Berlin)
seit 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Volmer-Institut
der TU Berlin