

# Aufbau eines cw- / Puls- EPR Spektrometers bei 180 GHz

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Oliver Brüggemann  
aus Lübeck

Frankfurt am Main 2003  
DF1

vom Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. T. F. Prisner

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Brutschy

Datum der Disputation: 1. August 2003

Am Abend wird man klug für den vergangenen Tag,  
doch niemals klug genug für den, der kommen mag.

Friedrich Rückert





# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>TEIL I – THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Grundlagen der EPR .....</b>	<b>7</b>
2.1 Der Elektronenspin .....	7
2.2 Klassische Beschreibung der EPR .....	8
2.3 Relaxation und Linienbreite .....	10
2.4 Puls-EPR .....	11
2.5 Der stationäre Spinhamiltonoperator .....	12
2.5.1 Die Elektron Zeeman-Aufspaltung .....	13
2.5.2 Die Hyperfeinwechselwirkung .....	13
2.5.3 Die Nullfeldaufspaltung .....	14
2.5.4 Weitere Terme im Hamiltonoperator .....	15
2.6 Hochfeld/Hochfrequenz-EPR .....	15
2.7 ENDOR .....	17
2.7.1 Davies-ENDOR .....	18
2.7.2 Mims-ENDOR .....	19
<b>3 EPR an Mn<sup>2+</sup>-Systemen .....</b>	<b>21</b>
3.1 Allgemeines .....	21
3.2 Simulation von cw-EPR Mn <sup>2+</sup> -Spektren .....	24
<b>TEIL II – AUFBAU EINES CW- / PULS-EPR SPEKTROMETERS BEI 180 GHZ ...</b>	<b>27</b>
<b>4 Der Supraleitende Magnet.....</b>	<b>27</b>
<b>5 Der Transmissionsprobenkopf.....</b>	<b>31</b>
5.1 Aufbau .....	31
5.2 Eigenschaften des Transmissionsaufbaus .....	33
<b>6 Aufbau eines EPR-Spektrometers im Reflexionsbetrieb.....</b>	<b>35</b>
6.1 Überblick .....	35
6.2 Die Mikrowellenbrücke .....	37
6.3 Die Quasioptischen Komponenten .....	37
6.4 Der Resonator .....	40
<b>7 Eigenschaften des Spektrometers .....</b>	<b>45</b>
7.1 Die Mikrowellenbrücke .....	45
7.1.1 Anregung .....	45
7.1.2 Detektion .....	47
7.2 Die Quasioptischen Komponenten .....	48
7.3 Der Resonator .....	49
7.4 Genauigkeit der Bestimmung von g-Werten .....	51

7.5	Empfindlichkeit im Puls-Betrieb.....	52
7.5.1	Zeitauflösung.....	52
7.5.2	Empfindlichkeit.....	53
7.6	Empfindlichkeit im cw-Betrieb.....	54
<b>8</b>	<b>Spektrometersteuerung mit LabVIEW.....</b>	<b>59</b>
8.1	Die Benutzeroberfläche der Spektrometersteuerung.....	60
8.2	Ablaufsteuerung von Experimenten.....	62
8.2.1	Cw-Experimente.....	62
8.2.2	Messungen im Pulsbetrieb.....	63
8.3	Eigenschaften der Spektrometersteuerung.....	64
8.3.1	Cw-Experimente.....	64
8.3.2	Puls-Experimente.....	64
	<b>TEIL III – ANWENDUNGSBEISPIELE FÜR HF-EPR.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Das Ras Protein.....</b>	<b>69</b>
9.1	Motivation.....	69
9.2	Probenpräparation.....	72
9.3	Cw-EPR an Ras•Mn <sup>2+</sup> •GDP Komplexen bei Raumtemperatur.....	73
9.3.1	Simulation der Spektren mit H <sub>2</sub> <sup>16</sup> O.....	73
9.3.2	Simulation der Spektren mit H <sub>2</sub> <sup>17</sup> O.....	75
9.3.3	Auswertung mit der Faltungsmethode.....	79
9.4	Cw-EPR an Ras•Mn <sup>2+</sup> •GDP Komplexen bei tiefen Temperaturen.....	81
9.4.1	Simulation der cw-Spektren mit H <sub>2</sub> <sup>16</sup> O bei 20 K.....	82
9.4.2	Simulation der cw-Spektren mit H <sub>2</sub> <sup>17</sup> O bei 20 K.....	83
9.4.3	Auswertung mit der Faltungsmethode.....	86
9.5	<sup>17</sup> O-ENDOR Untersuchungen an Ras•Mn <sup>2+</sup> •GDP Komplexen.....	87
9.6	Diskussion und Ausblick.....	90
<b>10</b>	<b>Anwendungsbeispiele des 180 GHz EPR-Spektrometers.....</b>	<b>97</b>
10.1	Nitroxid-Spinlabel.....	97
10.2	Quinoloxidase.....	100
	<b>TEIL IV – ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>105</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>107</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>129</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>132</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\hat{\phantom{x}}$	Operator
$\sim$	Tensor
$\alpha$	Mikrowellenphase, Detektionsphase
$\alpha_{\text{MW}}$	Drehwinkel eines Mikrowellenpulses
$\delta_{ij}$	Kronecker-Symbol
$\eta$	Füllfaktor eines Mikrowellenresonators
$\eta_V$	Viskosität eines Lösungsmittels
$\vartheta, \varphi$	Polarwinkel
$\mu_0$	Vakuumpermeabilität
$\mu_B$	Bohrsches Magneton
$\vec{\mu}, \vec{\mu}_e, \vec{\mu}_K$	magnetisches Moment, Moment eines Elektrons, eines Kernes
$\nu_L, \omega_L$	Larmorfrequenz im Laborsystem
$\nu_L', \omega_L'$	Larmorfrequenz im rotierenden Koordinatensystem
$\nu_{\text{MW}}, \omega_{\text{MW}}$	Mikrowellenfrequenz
$\tau$	Evolutionszeit zwischen zwei Mikrowellenpulsen
$\Psi_e$	Wellenfunktion des Elektronenspins
$\Delta\omega$	Energie-, Linienbreiteunschärfe eines Übergangs
$a_{\text{iso}}$	isotroper Anteil der Hyperfeinwechselwirkung
$\tilde{A}$	Tensor der Hyperfeinwechselwirkung
$\tilde{A}_{\text{dip}}$	dipolarer Anteil der Hyperfeinwechselwirkung
$\vec{B}_0, B_0$	statisches Magnetfeldstärke, Magnetfeldstärke
$\vec{B}_1, B_1$	vom MW-Feld erzeugtes magnetisches Wechselfeld im Resonatorinnern
$\Delta B$	Abstand zweier Signale auf der Magnetfeldachse
BDPA	$\alpha, \gamma$ -Bisdiphenylen- $\beta$ -phenylallyl
c	Konversionsfaktor eines Resonators
cw	Dauerstrichexperiment (engl. <i>continuous wave</i> )
$\tilde{D}$	Nullfeldtensor
D	axialer Anteil der Nullfeldaufspaltung
DTE	erythro-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (Dithioerythritol)
e	Elementarladung
E	rhombischer Anteil der Nullfeldaufspaltung
E, $\Delta E$	Energie, Energieabstand
ENDOR	Elektron-Kernspin Doppelresonanz (engl. <i>electron nuclear double resonance</i> )
ESR / EPR	Elektronenspinresonanz / <i>electron paramagnetic resonance</i>
ESEEM	<i>electron spin echo envelope modulation</i>
f	Anreicherungsgrad von $\text{H}_2^{16}\text{O}$ mit $\text{H}_2^{17}\text{O}$
$\Delta f$	Bandbreite der Mikrowellendetektion
F	Rauschzahl eines signalverarbeitenden Mikrowellenbauteils
$F_{\text{ENDOR}}$	ENDOR-Effizienz

FID	<i>free induction decay</i>
FIR	Ferninfrarot
FTIR	Fouriertransform Infrarot Spektroskopie
G	Verstärkungsfaktor eines signalverarbeitenden Mikrowellenbauteils
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
$\tilde{g}$	g-Tensor
$g_e$	g-Faktor des Elektrons
GEF	Guanosin-Austauschfaktor (engl. <i>guanosine exchange factor</i> )
$g_K$	g-Faktor des Kernspins
GNB	Guanosin-bindend
GPIB	<i>general purpose interface bus</i>
GTP	Guanosintriphosphat
$\hbar, h$	Plancksches Wirkungsquantum
H	Hamiltonoperator
HF-EPR	Hochfeld-EPR
$\vec{I}$	Kernspin
$\hat{I}$	Kernspinoperator
I	Kernspinquantenzahl
IEEE	<i>Institute of Electrical and Electronics Engineers</i>
ITC	<i>intelligent temperature control</i>
$k_B$	Boltzmannkonstante
lw	Linienbreitenparameter bei Spektrensimulationen
$\vec{M}$	Gesamtmagnetisierung eines Spinensembles
$M_0$	Gesamtmagnetisierung im thermischen Gleichgewicht
$m_e$	Elektronenmasse
MD	Molekulardynamik
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
$m_S, m_I$	z-Komponente des Elektronen- bzw. des Kernspins
MW	Mikrowelle
N	Anzahl an Wasserliganden am $Mn^{2+}$ -Ion
$N^*$	theoretische Empfindlichkeit eines EPR-Spektrometers im cw-Betrieb
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
$P_0$	am Resonator ankommende Mikrowellenleistung
PC	<i>personal computer</i>
PCI	<i>peripheral component interconnect</i>
PELDOR	<i>pulsed electron electron double resonance</i>
$P_i$	bei der GTP $\rightarrow$ GDP Hydrolyse abgespaltener Phosphor
PXI	<i>PCI extensions for instrumentation</i>
Q	Resonatorgüte
$\vec{r}$	Abstandsvektor vom Kernort zum Elektronenspin
RF	Radiofrequenz
RT	Raumtemperatur
$\vec{S}$	Elektronenspin
$\hat{S}$	Elektronenspinoperator
S	Spinquantenzahl
S/N	Signal-zu-Rausch Verhältnis

$\Delta t$	Lebensdauer eines angeregten Zustands
$t_p$	Dauer eines Mikrowellenpulses
T	Temperatur
T	Evolutionszeit zwischen Mikrowellenpulsen
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yloxy
$T_1$	longitudinale Relaxationszeit
$T_2$	transversale Relaxationszeit
$T_2^*$	Phasengedächtniszeit
$V_{pp}$	Amplitude der Modulationsspannung (Minimum bis Maximum)
$V_R$	Resonatorvolumen
$V_S$	Probenvolumen
VTI	<i>variable temperature inset</i>
wt	Wildtyp
w	Strahlradius eines Gaußschen Strahls
$w_0$	Strahltaille eines Gaußschen Strahls



# 1 Einleitung

Nach der Entdeckung der Elektronenspinresonanz (EPR) im Jahre 1945 durch Zavoisky [1] wurde EPR-Spektroskopie über lange Zeit nur bei Frequenzen zwischen 8 und 12 GHz betrieben. Während in der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) sehr schnell Puls-Methoden die klassische cw-Spektroskopie ablösten, fand in der EPR keine vergleichbare Entwicklung statt. In den letzten 10 bis 15 Jahren haben sich aber in der EPR zwei verschiedene Entwicklungen zunehmenden Interesses erfreuen können. Zum einen die Verwendung immer höherer Magnetfelder und MW-Frequenzen, zum anderen die Anwendung von Puls-Experimenten.

Wie in der NMR ist es auch in der EPR interessant, Messungen bei hohen Magnetfeldern durchzuführen, wofür es verschiedene Gründe gibt. Der Wichtigste ist sicherlich die höhere spektrale Auflösung bei höheren Magnetfeldern aufgrund der zunehmend besser aufgelösten g-Tensor Anisotropie (vgl. Kapitel 2.6). Dieser Effekt ermöglicht es beispielsweise, verschiedene Beiträge zu den Spektren zu trennen und auch an ungeordneten Proben orientierungsabhängige Messungen vorzunehmen. Ein weiterer Vorteil der Hochfeld-EPR (HF-EPR) besteht in der höheren absoluten Empfindlichkeit gegenüber Spektrometern bei konventionellen MW-Frequenzen im X-Band<sup>1</sup> (9 GHz) sowie dem geringeren Probenvolumen. Übergangsmetallionen mit halbzahligen Spin  $S > 1/2$  weisen im X-Band meist sehr große Linienbreiten auf, welche bei hohen Magnetfeldern kleiner werden, wodurch die Spektren leichter interpretierbar werden (vgl. Abbildung 3.3). Spinsysteme mit ganzzahligen Spin und einer großen Nullfeldaufspaltung können nur mit hohen MW-Frequenzen untersucht werden, da ansonsten keine Übergänge zwischen den Energieniveaus induziert werden können [2].

In der NMR haben Puls-Experimente die klassische cw-Spektroskopie mittlerweile vollständig verdrängt, während diese in der EPR immer noch weit verbreitet ist. Dennoch hat sich in den letzten Jahren auch hier der Trend entwickelt, Puls-Verfahren einzusetzen, da auf diese Weise viele Fragestellungen wesentlich eleganter bearbeitet werden können, beziehungsweise überhaupt erst zugänglich werden. Puls-Verfahren erlauben die Trennung von überlagerten Signalen, die zu verschiedenen paramagnetischen Spezies gehören, beispielsweise durch unterschiedliches Relaxationsverhalten. Mit Experimenten wie ESEEM [3] oder ENDOR [4,5] können Informationen über Hyperfeinwechselwirkungen gewonnen werden, welche mit cw-EPR nicht immer aufgelöst werden können [6-8].

Die Kombination dieser beiden methodischen Erweiterungen der EPR-Spektroskopie erlaubt es, mehrdimensionale Spektroskopie zu betreiben und damit detaillierte orientierungsabhängige Informationen zu erhalten [9]. Über orientierungsabhängiges Relaxationsverhalten können beispielsweise Rückschlüsse über anisotrope Bewegungsmoden paramagnetischer Spezies in ihren Bindungstaschen gewonnen werden [10,11]. Mit dieser Information wiederum können Aussagen über die Bindungsverhältnisse gemacht werden. Das zunehmende Interesse an HF-EPR Spektroskopie zeigt sich auch daran, dass die Deutsche Forschungsgemeinschaft 1998 ein Schwerpunktprogramm mit dem Titel *Hochfeld EPR in Biologie, Chemie und Physik* ins Leben gerufen hat, in dessen Rahmen sowohl Anwendungen als auch technische Neuentwicklungen gefördert werden.

---

<sup>1</sup> zur Nomenklatur der MW-Frequenzbänder siehe Anhang A.3

Die ersten Puls HF-EPR Spektrometer wurden in Leiden (1989, 95 GHz), Moskau (1991, 140 GHz), am MIT in Boston (1992, 140 GHz) und in Berlin gebaut (1994, 95 GHz) [12-15]. Seit 1996 ist ein Puls W-Band (95 GHz) Spektrometer auch kommerziell erhältlich, was das zunehmende Interesse an Puls-HF-EPR demonstriert [16,17].

Schon vor über 20 Jahren wurde ein Aufbau beschrieben, mit dem ohne Verwendung eines MW-Resonators mit Hilfe eines FIR-Lasers Puls-EPR Experimente bei 330 GHz durchgeführt wurden [18]. Die höchste MW-Frequenz, bei der bislang ein Puls-EPR Experiment durchgeführt worden ist, beträgt 604 GHz [19]. Diese Experimente hatten allerdings nur Demonstrationscharakter und wurden nur einmalig durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Aufbau eines Puls HF-EPR Spektrometers, das bei einer Frequenz von 180 GHz arbeitet, vorgestellt. Das Spektrometer wird mit einem Zylinderresonator betrieben, welcher in einer fundamentalen Mode arbeitet. Dieser Resonatortyp bietet wesentliche Vorteile gegenüber den häufig in cw-HF-EPR Spektrometern verwendeten Fabry-Pérot Resonatoren. 180 GHz ist derzeit weltweit die höchste Frequenz, bei der routinemäßig Puls-EPR Experimente betrieben werden.

Die vorliegende Arbeit ist in drei Teile gegliedert. Im ersten Teil der Arbeit werden in Kapitel 2 die Grundlagen der EPR-Spektroskopie dargelegt. Da im dritten Teil der Arbeit ausführliche Untersuchungen an Proteinkomplexen mit  $Mn^{2+}$ -Ionen gezeigt werden, sind in Kapitel 3 die EPR-relevanten Eigenschaften des  $Mn^{2+}$ -Ions zusammengefasst.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem Aufbau und der Charakterisierung des 180 GHz EPR-Spektrometers. In Kapitel 4 werden die Eigenschaften des supraleitenden Magneten zusammengefasst. Ein Transmissionsaufbau, mit dem auf einfache Weise cw-Spektren aufgenommen werden können, wird in Kapitel 5 vorgestellt. In den Kapiteln 6 und 7 wird der Aufbau des Puls-Spektrometers vorgestellt sowie dessen Eigenschaften diskutiert. Abschließend wird in Kapitel 8 auf die Steuerung des Spektrometers eingegangen.

Im dritten Teil der Arbeit werden Anwendungsbeispiele für HF-EPR gezeigt. In Kapitel 9 wird ausführlich auf Untersuchungen am Ras-Protein eingegangen. Dieses Protein spielt eine wichtige Funktion bei der intrazellulären Signalweiterleitung und regelt solch wichtige Prozesse wie Zellwachstum, Differentiation und Apoptose. In ca. 30 % aller menschlichen Tumore werden Mutationen dieses Proteins gefunden. Trotz dieser wichtigen Funktion ist der genaue Mechanismus des Aktivierungszyklus noch nicht im Detail aufgeklärt. Hier kann mit Hilfe der HF-EPR ein entscheidender Beitrag geleistet werden, da ganz gezielt das aktive Zentrum der Proteinkomplexe untersucht werden kann. Mit Hilfe von cw-EPR Spektroskopie und ENDOR-Untersuchungen mit  $H_2^{17}O$ -markiertem Wasser soll die lokale Umgebung des Metallzentrums dieser Proteinkomplexe untersucht werden. Dabei wird zunächst der inaktive Zustand des Proteins untersucht, da möglicherweise auch aus diesen Informationen Hinweise darauf gefunden werden können, auf welche Weise verschiedene onkogene Mutanten den Deaktivierungsmechanismus blockieren. Die erhaltenen Ergebnisse werden kritisch mit bereits aus anderen Strukturuntersuchungen gewonnenen Erkenntnissen verglichen und diskutiert.

Abschließend werden in Kapitel 10 Anwendungsbeispiele des aufgebauten HF-EPR Spektrometers gezeigt. Dabei soll die Leistungsfähigkeit der Puls HF-EPR Spektroskopie im allgemeinen sowie des aufgebauten Spektrometers im besonderen demonstriert werden.



# Teil I – Theoretische Grundlagen

## 2 Grundlagen der EPR

Im Rahmen dieser Einleitung sollen nur die wesentlichen Grundlagen der EPR-Spektroskopie dargestellt werden, welche für das Verständnis der dargestellten Arbeit notwendig sind. Für weitergehende Grundlagen sei auf diverse Bücher verwiesen, welche sowohl die Grundlagen der cw- [20-22] als auch der Puls-EPR [6,8] behandeln.

### 2.1 Der Elektronenspin

Im Jahre 1922 machten Otto Stern<sup>2</sup> und Walther Gerlach<sup>3</sup> die Beobachtung, dass ein Strahl von Silberatomen in einem inhomogenen Magnetfeld in zwei Strahlen aufgespalten wird, was letztlich zur Entdeckung des Elektronenspins führte [23].

Der Betrag eines Spins  $\vec{S}$  ist gegeben durch die Spinquantenzahl  $S$  mittels

$$|\vec{S}| = \sqrt{S(S+1)}\hbar. \quad (2.1)$$

Mit dem Spin eines Elektrons ist auch ein magnetisches Moment  $\vec{\mu}_e$  mit

$$\vec{\mu}_e = -g_e \frac{e}{2m_e} \vec{S} = -g_e \mu_B \vec{S} \quad (2.2)$$

verknüpft, wobei  $\mu_B$  das Bohrsche<sup>4</sup> Magneton bezeichnet. Im Jahre 1928 konnte Paul Dirac<sup>5</sup> zeigen, dass der Spin des Elektrons eine notwendige Folge einer relativistischen Quantentheorie ist, er leitete einen g-Faktor von  $g_e = 2$  her [24]. Der exakte g-Faktor des freien Elektrons von  $g_e = 2.0023193043737$  kann mit Hilfe der Quantenelektrodynamik hergeleitet werden, er folgt aus der Wechselwirkung des Elektrons mit seinem eigenen Strahlungsfeld [25].

Wird ein magnetisches Moment  $\vec{\mu}$  in ein homogenes Magnetfeld  $\vec{B}_0$  gebracht, so sind aufgrund der quantenmechanischen Eigenschaften nur diskrete Werte der z-Komponente des magnetischen Moments erlaubt, wenn die z-Achse durch die Richtung des Magnetfelds festgelegt wird. Für die z-Komponente eines Spins  $\vec{S}$  gilt

$$S_z = m_s, \text{ mit } m_s = -S, -S+1, \dots S. \quad (2.3)$$

<sup>2</sup> Otto Stern: 1888 bis 1969, Nobelpreis für Physik 1943

<sup>3</sup> Walther Gerlach: 1889 bis 1979

<sup>4</sup> Niels Bohr: 1885 bis 1962, Nobelpreis für Physik 1922

<sup>5</sup> Paul Adrien Maurice Dirac: 1902 bis 1984, Nobelpreis für Physik 1933

Aufgrund der Wechselwirkung eines magnetischen Moments mit dem äußeren Magnetfeld

$$E = -\vec{\mu} \vec{B}_0 \quad (2.4)$$

besitzen die erlaubten Zustände verschiedene Energien, die Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Energieniveaus beträgt im Falle von Elektronen

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0, \quad (2.5)$$

ist also proportional zur Stärke des angelegten Magnetfelds. Der Zusammenhang zwischen der magnetischen Feldstärke und der Energiedifferenz ist in Abbildung 2.1 für den Fall  $S=1/2$  dargestellt. Dort sind auch häufig verwendete sowie die in dieser Arbeit erwähnten MW-Frequenzen mit den dazugehörigen Magnetfeldstärken eingetragen.

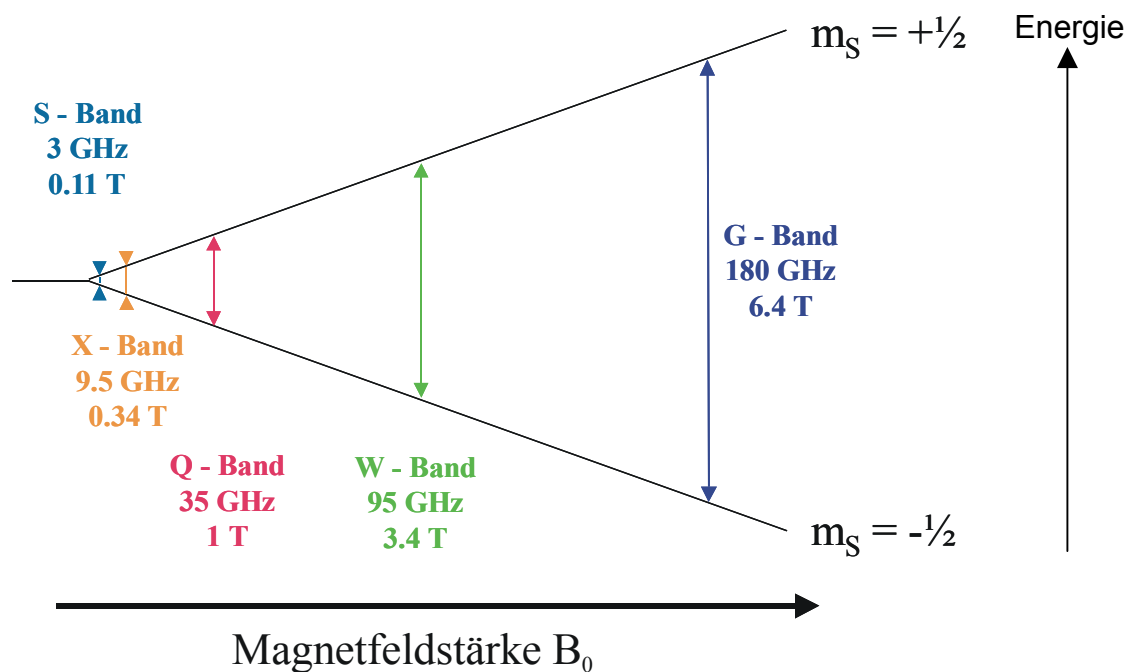


Abb. 2.1 Verschiedene in der EPR verwendete MW-Frequenzen bei zunehmender Magnetfeldstärke  $B_0$ , gezeigt am Beispiel eines Spinsystems mit  $S=1/2$ . (vgl. auch Anhang A.3)

## 2.2 Klassische Beschreibung der EPR

Aus der klassischen Mechanik ist bekannt, dass die zeitliche Änderung eines Drehimpulses gleich dem angreifenden Drehmoment ist. Für Elektronenspins in einem Magnetfeld folgt damit:

$$\frac{d\vec{S}}{dt} = \vec{\mu}_e \times \vec{B}_0, \quad (2.6)$$

und mit (2.2) folgt daraus die Bloch<sup>6</sup>-Gleichung

$$\frac{d\vec{\mu}_e}{dt} = g_e \mu_B (\vec{B}_0 \times \vec{\mu}_e). \quad (2.7)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung ist eine Präzession des magnetischen Moments  $\vec{\mu}_e$  um die z-Achse mit der Larmorfrequenz

$$\nu_L = \omega_L / 2\pi = g_e \mu_B B_0, \text{ für} \quad (2.8)$$

$$\vec{B}_0 = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ B_0 \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

Die Komponenten des Spins und damit des magnetischen Moments senkrecht zur z-Achse sind somit zeitlich ausgemittelt.

Wird der Elektronenspin einem linear polarisierten elektromagnetischen Wechselfeld ausgesetzt, so kann dieses gedanklich in zwei mit unterschiedlichen Drehrichtungen rotierende Wechselfelder zerlegt werden. Eines dieser beiden rotierenden Felder hat den gleichen Umlaufsinn wie die Spins um die Magnetfeldachse, das andere hat keinen Einfluss. Um die Darstellungen zu vereinfachen, ist es sinnvoll, einen Wechsel des Koordinatensystems vorzunehmen. Als Bezugssystem wird ein Koordinatensystem gewählt, in dem das von der Mikrowelle erzeugte Magnetfeld  $\vec{B}_1$  zeitlich konstant ist. Dieses rotiert mit der Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{MW}$  um die z-Achse und hat den gleichen Umlaufsinn wie die Larmorpräzession der Elektronenspins. Die Orientierung des Koordinatensystems sei so gewählt, dass der Vektor  $\vec{B}_1$  entlang der x-Achse zeigt.

Ist die Resonanzbedingung

$$\Delta E = h\nu_{MW} \quad (2.10)$$

erfüllt, so werden zwischen den benachbarten Energieniveaus Übergänge induziert. Im Falle der Resonanzbedingung ist im rotierenden Koordinatensystem die Magnetfeldkomponente entlang der z-Achse gleich Null, sodass der Elektronenspin nun mit der Frequenz

$$\nu_{L'} = \omega_{L'} / 2\pi = g_e \mu_B B_1 \quad (2.11)$$

um die x-Achse präzediert. Zurücktransformiert in das Laborsystem erhält man eine Überlagerung zweier Rotationen, was schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt ist.

<sup>6</sup> Felix Bloch: 1905-1983, Nobelpreis für Physik 1952

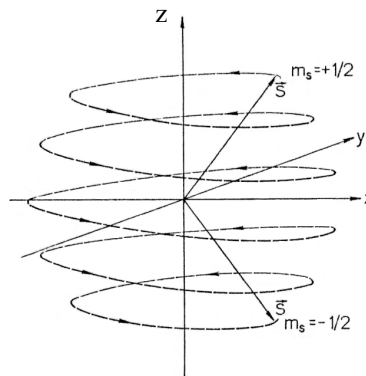


Abb. 2.2 Übergang eines Elektronenspins  $S=1/2$  zwischen den Zuständen  $m_s=-1/2$  und  $m_s=+1/2$  als Folge eines angelegten magnetischen Wechselfelds  $B_1$  (entnommen aus [20]).

### 2.3 Relaxation und Linienbreite

Da in der EPR-Spektroskopie nicht mit einzelnen Elektronenspins gearbeitet wird, sondern mit makroskopischen Proben, sind die Eigenschaften der Proben durch Mittelung über die Eigenschaften vieler Spins bestimmt. Das makroskopische magnetische Moment ist somit die Summe der einzelnen magnetischen Momente:

$$\vec{M} = \sum \vec{\mu}_i \quad (2.12)$$

Im thermischen Gleichgewicht stellt sich zwischen den einzelnen Energieniveaus eine Besetzungsverteilung gemäß der Boltzmann-Statistik<sup>7</sup> ein. Wird in einem cw-Experiment kontinuierlich MW-Strahlung von der Probe absorbiert, so strebt das System dadurch zu einer Gleichbesetzung der Energieniveaus. Bei Einstellen der Gleichbesetzung wäre kein EPR-Signal mehr vorhanden. Nach Ausschalten der Mikrowelle strebt das System mit der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  wieder dem thermischen Gleichgewicht  $M_0$  zu. Diese Relaxationszeit kann beschrieben werden durch:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.13)$$

Mit der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  werden alle Mechanismen erfasst, welche eine vorhandene Magnetisierung in der xy-Ebene im Laufe der Zeit abklingen lassen. Diese Effekte können durch

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \quad \text{und} \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2} \quad (2.14)$$

beschrieben werden.

<sup>7</sup> Ludwig Boltzmann: 1844 bis 1906

Zur transversalen Relaxation trägt unter anderem die Phasengedächtniszeit  $T_2^*$  bei, welche ein Maß dafür ist, wie schnell die Phasenbeziehung der betrachteten Spins aufgrund von Inhomogenitäten in der Probe abklingt. Auch die longitudinale Relaxation trägt zur Relaxationszeit  $T_2$  bei. In der Summe kann dieser Zusammenhang geschrieben werden als:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_2^*} + \frac{1}{2T_1}. \quad (2.15)$$

Je nach betrachtetem System müssen noch weitere Beiträge berücksichtigt werden, wie beispielsweise Librationen.

Über die Energie-Zeit-Unschärferelation hängt die Lebensdauer von angeregten Zuständen mit der beobachteten Linienbreite eines Übergangs zusammen:

$$\Delta\omega \times \Delta t \geq 1 \quad (2.16)$$

Die Prozesse, die zur beobachteten Linienbreite beitragen, können in homogene und inhomogene Beiträge unterteilt werden. Erstere führen zu einer Linienform, die mit einer Lorentz-Kurve<sup>8</sup> beschrieben werden können, deren Linienbreite umgekehrt proportional zu  $T_2$  ist. Eine inhomogenen Linienverbreiterung dagegen führt zu einer Gaußförmigen<sup>9</sup> Linienform.

## 2.4 Puls-EPR

Wird die Mikrowelle nicht kontinuierlich eingestrahlt, sondern nur für eine kurze Zeit  $t_p$ , so wird die Magnetisierung  $\vec{M}$  nur um einen bestimmten Winkel

$$\alpha_{MW} = \omega_L t_p \quad (2.17)$$

um die x-Achse gedreht.

Ein einfaches Beispiel für eine Pulssequenz ist das Hahn-Echo<sup>10</sup>, welche in Abbildung 2.3 dargestellt ist. Im Jahre 1950 hatte Erwin Hahn zum ersten Mal ein Echo mit Kernspins erzeugt [26]. 1958 konnte Richard Blume das erste Hahn-Echo mit Elektronenspins erzeugen [27].

Mit einem  $\pi/2$ -Puls wird die Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem von der z-Achse auf die y-Achse gedreht. Da sich die einzelnen Spins in leicht verschiedenen Umgebungen befinden, gibt es kleine Unterschiede in den lokalen Magnetfeldern und damit in den Larmorfrequenzen der verschiedenen Elektronenspins. Aufgrund der unterschiedlichen Larmorfrequenzen laufen während der Evolutionszeit  $\tau$  die Spins in der xy-Ebene auseinander, sie dephasieren. Dies gilt nur für den Fall einer inhomogenen Linienverbreiterung. Mit einem  $\pi$ -Puls werden nach der Zeit  $\tau$  alle Spins an der x-Achse

<sup>8</sup> Hendrik Antoon Lorentz: 1853 bis 1928, Nobelpreis für Physik 1902

<sup>9</sup> Johann Carl Friedrich Gauß: 1777 bis 1855

<sup>10</sup> Erwin Hahn: geb. 1921

gespiegelt. Während der zweiten Evolutionszeit laufen die Spins dann wieder zusammen, sodass nach der Zeit  $\tau$  ein Echo entlang der y-Achse entsteht. Mit der Hahn-Echo Sequenz kann also die Stärke der z-Magnetisierung, die vor dem ersten Puls vorhanden ist, abgefragt werden.

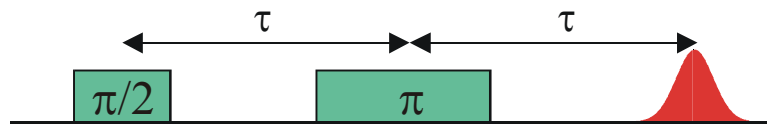


Abb. 2.3 Pulssequenz zur Erzeugung eines Hahn-Echos.

Eine andere einfache Pulssequenz ist die zur Erzeugung eines stimulierten 3-Puls Echos, welche in Abbildung 2.4 dargestellt ist.

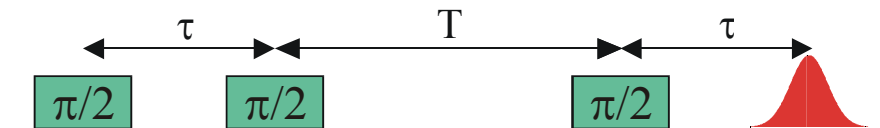


Abb. 2.4 Pulssequenz zur Erzeugung eines stimulierten Echos.

Der erste  $\pi/2$ -Puls bringt die Magnetisierung in Richtung der y-Achse. Während der Evolutionszeit  $\tau$  dephasieren die Spins in der xy-Ebene und die Gesamtmagnetisierung verschwindet. Der zweite  $\pi/2$ -Puls dreht die einzelnen Spins in die yz-Ebene. Während der Zeit T dephasieren wiederum alle Spins, die nicht genau entlang der z-Achse liegen. Dadurch verschwindet nach der Relaxationszeit  $T_2$  die transversale Magnetisierung. Nach dem dritten  $\pi/2$ -Puls werden die Spins von der z-Achse wieder auf die y-Achse gedreht. Da jetzt aber die Spins mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen in unterschiedliche Richtungen auf der y-Achse zeigen, laufen diese nach der Zeit  $\tau$  wieder zusammen. Auf diese Weise entsteht eine resultierende Magnetisierung entlang der y-Achse und damit ein Echo. Da nicht alle Spins exakt in die gleiche Richtung zeigen, ist die Gesamtmagnetisierung zum Zeitpunkt des Echos bei einem stimulierten Echo um den Faktor zwei kleiner als bei einem Hahn-Echo [6]. Dieses gilt nur für den idealisierten Fall, dass mit den MW-Pulsen das komplette Spektrum angeregt wird.

Diese eher klassische Beschreibung der beiden Pulssequenzen ist für einfache Pulsfolgen wie die beiden betrachteten noch nachvollziehbar. Bei komplizierteren Pulsfolgen mit mehr Pulsen oder bei Systemen mit  $S > 1/2$  stößt diese Methode aufgrund der quantenmechanischen Eigenschaften der Elektronen- und Kernspins an ihre Grenzen, sodass hier andere Verfahren wie der Dichteoperator- oder der Produktoperatorformalismus angewendet werden müssen, um die Wirkungsweise solcher Pulsfolgen zu beschreiben und zu verstehen [6].

## 2.5 Der stationäre Spinhamiltonoperator

Im stationären Spinhamiltonoperator sind alle zeitlich konstanten Wechselwirkungen, welche in der EPR-Spektroskopie eine Rolle spielen, zusammengefasst:

$$H = H_{EZ} + H_{HF} + H_{KZ} + H_{NF} + H_{KQ}, \quad (2.18)$$

wobei die Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:

$H_{EZ}$ :	Elektron Zeeman-Wechselwirkung
$H_{HF}$ :	Hyperfein-Wechselwirkung
$H_{KZ}$ :	Kern Zeeman-Wechselwirkung
$H_{NF}$ :	Nullfeldaufspaltung für Spins mit $S > 1/2$
$H_{KQ}$ :	Kern Quadrupol-Aufspaltung für Kerne mit $I > 1/2$

Da es sich bei den betrachteten Elektronen- und Kernspins um quantenmechanische und nicht um klassische Größen handelt, werden im Folgenden der Elektronenspin  $\vec{S}$  durch den Spinoperator  $\hat{S}$  und der Kernspin  $\vec{I}$  durch den entsprechenden Spinoperator  $\hat{I}$  ersetzt.

### 2.5.1 Die Elektron Zeeman-Aufspaltung

Durch Einsetzen der Gleichung (2.2) in (2.4) erhält man den Hamiltonoperator für die Elektron Zeeman-Aufspaltung

$$H_{EZ} = g_e \mu_B \hat{S} \vec{B}_0, \quad (2.19)$$

welcher in dieser Form für eine isotrope Wechselwirkung gültig ist. Ist das Bahndrehmoment des Elektronenspins ungleich Null, so gibt es auch eine Wechselwirkung des Bahndrehmoments mit dem Magnetfeld. Dieser Beitrag ist in Gleichung (2.19) noch nicht berücksichtigt. Da das Gesamtdrehmoment in diesem Fall nicht isotrop ist, ist auch die entstehende Wechselwirkung anisotrop, und statt dem g-Faktor wird der Tensor  $\tilde{g}$  eingeführt:

$$H_{EZ} = \mu_B \hat{S} \tilde{g} \vec{B}_0. \quad (2.20)$$

### 2.5.2 Die Hyperfeinwechselwirkung

Die Hyperfeinwechselwirkung zwischen einem Elektronen- und einem Kernspin setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen, einem isotropen und einem anisotropen Anteil.

Der isotrope Anteil  $a_{iso}$  der Hyperfeinwechselwirkung wird durch eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektronenspins am Kernort verursacht, was als Fermi<sup>11</sup>-Kontakt-Wechselwirkung bezeichnet wird:

$$a_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \mu_e g_K \mu_K |\Psi_e(r=0)|^2. \quad (2.21)$$

<sup>11</sup> Enrico Fermi: 1901 bis 1954, Nobelpreis für Physik 1938

Der anisotrope Anteil der Hyperfeinwechselwirkung wird durch eine Dipol-Dipol Wechselwirkung zwischen den beiden Spins verursacht, und kann daher ausgedrückt werden als:

$$H_{HF,dip} = -g_e \mu_e g_K \mu_K \left( \frac{\hat{I}\hat{S}}{r^3} - \frac{3\hat{I}\hat{r}\hat{S}\hat{r}}{r^5} \right). \quad (2.22)$$

Der Vektor  $\vec{r}$  ist der Abstandsvektor vom Kern zum Elektronenspin. Um die Abhängigkeit des Hamiltonoperators vom Abstand zu eliminieren, kann der obige Ausdruck über die gesamte Wellenfunktion des Elektronenspins integriert werden. Das Ergebnis kann in Form eines Tensors ausgedrückt werden:

$$\tilde{A}_{dip} = g_e \mu_e g_K \mu_K \begin{pmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{yx} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{zx} & A_{zy} & A_{zz} \end{pmatrix}, \text{ mit} \quad (2.23)$$

$$A_{ij} = \left\langle \frac{3ij - \delta_{ij} r^2}{r^5} \right\rangle. \quad (2.24)$$

Die eckigen Klammern bedeuten die Mittelung über den Raum, in dem die Wellenfunktion des Elektrons ungleich Null ist. Wie aus Gleichung (2.24) zu erkennen ist, ist der dipolare Hyperfeintensor spurlos. Daraus folgt, dass bei schneller Rotation der betrachteten Systeme die anisotrope Hyperfeinkopplung ausgemittelt wird, wie dies zum Beispiel bei flüssigen Lösungen der Fall ist. Darüber hinaus ist der dipolare Hyperfeintensor symmetrisch. Es lässt sich also immer ein Koordinatensystem finden, in dem die Nebendiagonalelemente gleich Null sind. Dies ist das Hauptachsensystem des Hyperfeintensors.

Beide Anteile der Hyperfeinwechselwirkung lassen sich zu einem gemeinsamen Tensor zusammenfassen:

$$\tilde{A} = a_{iso} + \tilde{A}_{dip}. \quad (2.25)$$

Der resultierende Hamiltonoperator hat dann die Form:

$$H_{HF} = \hat{S}\tilde{A}\hat{I}. \quad (2.26)$$

### 2.5.3 Die Nullfeldaufspaltung

Ist der Gesamtspin  $S > 1/2$ , so setzt er sich zwangsläufig aus mehreren Elektronenspins zusammen, welche dann als ein einziger Spin betrachtet werden. In diesem Fall muss aber die gegenseitige Beeinflussung der Spins untereinander berücksichtigt werden, welche paarweise einer Dipol-Dipol Wechselwirkung unterliegen. Der entsprechende Hamiltonoperator kann als



$$H_{NF} = \hat{S} \tilde{D} \hat{S} \quad (2.27)$$

ausgedrückt werden. Der diese Wechselwirkung beschreibende Nullfeldtensor  $\tilde{D}$  ist ebenso wie der dipolare Hyperfeintensor symmetrisch und spurlos und wird daher bei genügend schneller Rotation des betrachteten Moleküls ausgemittelt. Der Effekt des Nullfeldtensors ist unabhängig vom äußeren Magnetfeld  $B_0$ , sodass auch bei Abwesenheit eines externen Magnetfelds die Entartung der  $m_S$ -Energieniveaus aufgehoben wird (vgl. Abbildung 3.2). Wird der Nullfeldtensor in sein Hauptachsensystem transformiert, kann er geschrieben werden als

$$\tilde{D} = \begin{pmatrix} -\frac{1}{3}D + E & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{1}{3}D - E & 0 \\ 0 & 0 & \frac{2}{3}D \end{pmatrix}. \quad (2.28)$$

Die Größe  $D$  wird als axialer Nullfeldparameter bezeichnet,  $E$  als rhombischer Nullfeldparameter. Es kann immer ein Hauptachsensystem gefunden werden, in dem gilt:

$$|E| \leq \frac{1}{3}|D|. \quad (2.29)$$

Mit den beiden Nullfeldparametern kann der Hamiltonoperator (2.27) auch geschrieben werden als

$$H_{NF} = \frac{D}{3} [3\hat{S}_z^2 - S(S+1)] + E [\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2]. \quad (2.30)$$

### 2.5.4 Weitere Terme im Hamiltonoperator

Je nach dem betrachteten Spinsystem müssen noch weitere Terme im Spinhamiltonoperator berücksichtigt werden, wie beispielsweise die Kern Zeeman-Aufspaltung, die Elektron-Elektron Austauschwechselwirkung oder die Kern-Quadrupolwechselwirkung. Da diese Terme aber für die hier dargestellte Arbeit ohne Bedeutung sind, soll nicht weiter darauf eingegangen werden.

## 2.6 Hochfeld/Hochfrequenz-EPR

Die einzelnen Beiträge, aus denen sich der Spinhamiltonoperator zusammensetzt, zeigen unterschiedliches Skalierungsverhalten mit dem äußeren Magnetfeld  $B_0$ , sodass es bei vielen EPR-Untersuchungen sinnvoll ist, diese bei verschiedenen Magnetfeldern und damit MW-Frequenzen durchzuführen. Aus Gleichung (2.5) ist ersichtlich, dass der Energieabstand und damit die MW-Frequenz mit zunehmender Magnetfeldstärke zunehmen. In

Abbildung 2.1 sind verschiedene typische MW-Frequenzen mit den dazugehörigen Magnetfeldstärken dargestellt.

Über HF-EPR wurden bereits einige Übersichtsartikel veröffentlicht, die sich im Detail mit technischen Aspekten sowie diversen Anwendungsbeispielen beschäftigen [9,28-30].

Einer der wichtigsten Gründe, EPR-Spektroskopie bei hohen Magnetfeldern zu betreiben, ist die höhere spektrale Auflösung bei Systemen, die eine g-Tensor Anisotropie aufweisen. Aus den Gleichungen (2.5) und (2.10) ergibt sich für zwei verschiedene Signale mit unterschiedlichen g-Werten ein Abstand von

$$\Delta B = \frac{h\nu_{MW}}{\mu_B} \left( \frac{1}{g_1} - \frac{1}{g_2} \right). \quad (2.31)$$

Der Abstand der Signale und damit die Auflösung des Spektrums skaliert also mit der verwendeten MW-Frequenz.

Organische Radikale weisen typischerweise eine g-Tensor Anisotropie auf, welche im X-Band nicht aufgelöst ist, hier dominieren Hyperfeinwechselwirkungen das Spektrum. Bei höheren Magnetfeldstärken dagegen dominiert der anisotrope g-Tensor das EPR-Spektrum, sodass bei verschiedenen MW-Frequenzen die unterschiedlichen Beiträge zum Spinhamiltonoperator einzeln betrachtet werden können. Dieser Effekt ist exemplarisch in Abbildung 2.5 am Naphtochinon Vitamin K<sub>3</sub> gezeigt.

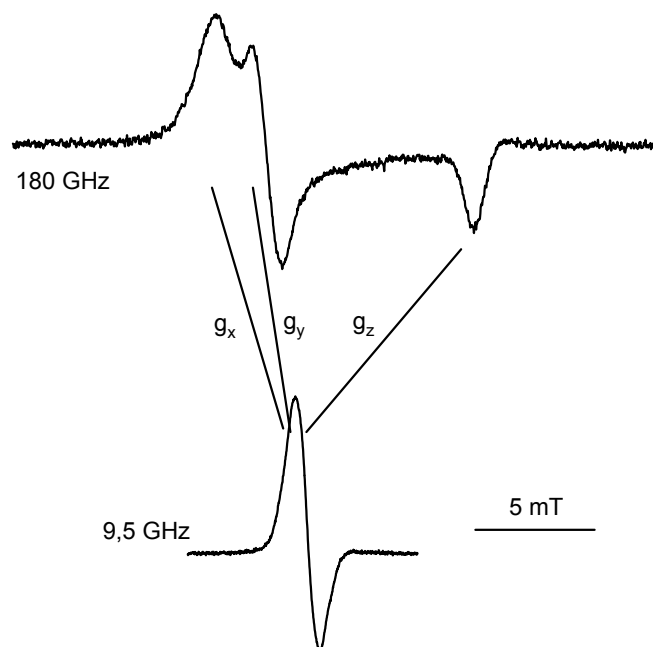


Abb. 2.5 Cw X-Band und G-Band Spektren von Vitamin K<sub>3</sub> in 2-Butanol. Das Spektrum bei 180 GHz wurde mit dem Transmissionsprobenkopf (vgl. Kapitel 5) bei T = 20 K aufgenommen. Parameter: Modulationsamplitude = 0,45 mT, Zeitkonstante des Lock-In Verstärkers: 1 s. Die Strukturformel des Vitamin K<sub>3</sub> ist im Anhang A.6 wiedergegeben.

An jeder Stelle des Spektrums trägt nur ein Teil der Moleküle, die eine ganz bestimmte Orientierung relativ zum äußeren Magnetfeld einnehmen, zum Signal bei. Auf diese Weise ermöglicht es die bei hohen Magnetfeldern aufgelöste g-Tensor Anisotropie, auch an ungeordneten Proben orientierungsselektive Messungen vorzunehmen, was ein wesentlicher Grund dafür ist, HF-EPR zu betreiben.

Ein wichtiger Beitrag zum Relaxationsverhalten der Elektronenspins sind Modulationen der orientierungsabhängigen Anteile des Spinhamiltonians durch Bewegungen der paramagnetischen Spezies. Aus diesem Grunde liefert orientierungsabhängiges Relaxationsverhalten Informationen über anisotrope Bewegungsmoden paramagnetischer Spezies in ihren Bindungstaschen [9-11]. Aus solchen anisotropen Bewegungsmoden können wiederum Informationen über die Bindungsgeometrien gewonnen werden. Vergleichbare Informationen können im X-Band meist nur durch Verwendung einkristalliner Proben erhalten werden, wobei die Orientierung der Probe nach dem Einbau noch verändert werden muss. Auch ist das Züchten von Einkristallen bei biologischen Proben meistens sehr aufwendig und oftmals gar nicht möglich.

Ein anderes Anwendungsgebiet für HF-EPR sind Systeme mit ganzzahligem Spin und einer großen Nullfeldaufspaltung, die bei herkömmlichen X-Band Frequenzen keine EPR-Signale liefern. Wichtige Beispiele sind verschiedene Metalloproteine, bei denen die Metallionen einen ganzzahligen Elektronenspin aufweisen. Beispielhaft seien  $Mn^{III}$ ,  $Fe^{II}$ ,  $Fe^{IV}$ ,  $Ni^{II}$  und  $Mo^{IV}$  genannt, welche in einer Reihe von Metalloproteinen vorkommen [31,32]. Dieselben Ionen können natürlich auch in Modellsystemen oder in verschiedenen Werkstoffen enthalten sein.

Neben der höheren spektralen Auflösung bei höheren Magnetfeldern gibt es auch einen technischen Aspekt, der HF-EPR interessant macht. Mit zunehmender MW-Frequenz steigt die absolute Empfindlichkeit eines EPR-Spektrometers (gemessen in Signal zu Spins) deutlich an [9]. Das ist insbesondere dann ein wichtiger Punkt, wenn nur eine begrenzte Probenmenge zur Verfügung steht, wie dies beispielsweise bei biologischen Proben (insbesondere bei einkristallinen Proben) der Fall sein kann.

## 2.7 ENDOR

Häufig sind die Hyperfeinwechselwirkungen zwischen dem betrachteten Elektronenspin und verschiedenen Kernspins so klein, dass sie in EPR-Spektren nicht aufgelöst sind, sondern nur zu einer inhomogenen Linienverbreiterung führen. Eine Möglichkeit, diese Hyperfeinwechselwirkungen zu untersuchen, stellt die Methode der Elektron-Kernspin Doppelresonanz (engl. *electron nuclear double resonance*, ENDOR) dar. Im Folgenden sollen die beiden am häufigsten verwendeten Puls-ENDOR Varianten vorgestellt und kurz erläutert werden. Für einen tieferen Einstieg in die Theorie sowie für weitere ENDOR-Varianten sei auf die Literatur verwiesen [6,33,34].

### 2.7.1 Davies-ENDOR

Die Davies-ENDOR Sequenz soll anhand eines Vier-Niveau-Systems erläutert werden, welches in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt ist.

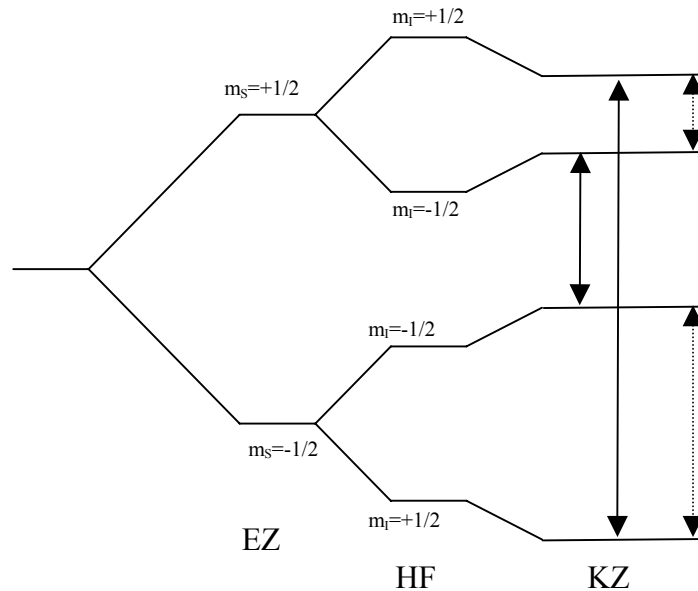


Abb. 2.6 Energieniveauschema für ein  $S=1/2$ ,  $I=1/2$  System mit isotropem  $g$ -Tensor und positivem Vorzeichen der Hyperfeinkopplung. In dem gezeigten Beispiel ist die Hyperfeinkopplung stärker als die Kern Zeeman-Wechselwirkung. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu, die Elektron Zeeman-Aufspaltung ist wesentlich größer als die Kern Zeeman- und die Hyperfein-Aufspaltungen. Eingetragen sind die beiden erlaubten EPR- sowie gestrichelt die beiden NMR-Übergänge.

Bei der von Davies vorgeschlagenen Variante [5] wird zunächst durch einen selektiven  $\pi$ -Puls einer der beiden EPR-Übergänge invertiert, wodurch das Spinsystem nicht mehr im thermischen Gleichgewicht ist. Während der folgenden Evolutionszeit  $T$ , welche typischerweise einige  $\mu\text{s}$  beträgt, wird ein Radiofrequenzpuls auf die Probe eingestrahlt. Dieser soll Übergänge zwischen den Energieniveaus der Kernspins induzieren. Wie in Abbildung 2.7 dargestellt, führt dieses zu einer Entvölkerung des betrachteten EPR-Übergangs. Mit der anschließenden Hahn-Echo Sequenz kann dann keine Magnetisierung mehr detektiert werden.

Werden mit der eingestrahnten Radiofrequenz hingegen keine Übergänge zwischen den Energieniveaus der Kernspins angeregt, verbleibt die Magnetisierung in der  $-z$  Richtung, solange die Evolutionszeit  $T$  klein gegenüber der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  ist. Mit der anschließenden Hahn-Echo Sequenz wird dann die Magnetisierung entlang  $-z$  detektiert. Aus diesem Grunde ist das Echo in Abbildung 2.7 invertiert.

Die beschriebene Pulssequenz ist in Abbildung 2.7 wiedergegeben. Bei einem Davies-ENDOR-Experiment bleibt die Pulssequenz konstant, die einzige variable Größe ist die Radiofrequenz. Um die Bedingung zu erfüllen, dass während der Evolutionszeit  $T$  die Polarisation des EPR-Übergangs erhalten bleibt, muss ein ENDOR-Experiment normalerweise bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden.

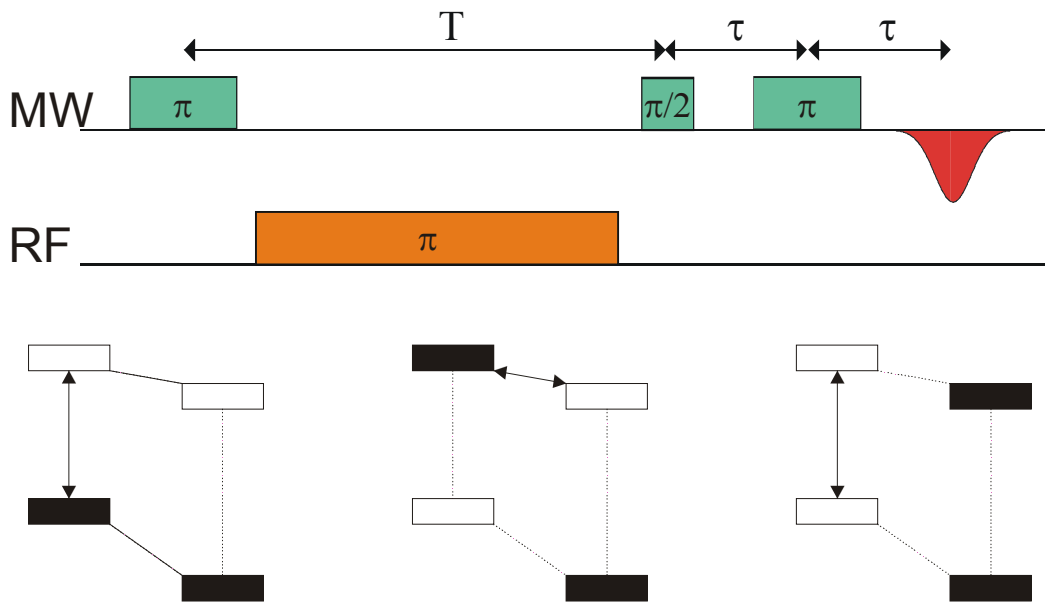


Abb. 2.7 Davies-ENDOR Pulssequenz. Die schwarzen und weißen Kästchen symbolisieren die Besetzungsunterschiede der einzelnen Energieniveaus. Mit dem ersten Puls wird ein EPR-Übergang invertiert. Mit dem Radiofrequenzpuls wird bei passender Frequenz einer der beiden Kernspin-Übergänge invertiert, im dargestellten Falle der obere. Mit der Hahn-Echo Sequenz wird dann die Polarisation des EPR-Übergangs detektiert, welche bei Auftreten des ENDOR-Effekts gleich Null ist.

### 2.7.2 Mims-ENDOR

Eine andere Puls-ENDOR Variante wurde zuvor bereits von Mims vorgeschlagen [4]. Bei dieser Variante wird ein stimuliertes Echo verwendet, bei dem während der Evolutionszeit  $T$  wiederum ein Radiofrequenzpuls eingestrahlt wird. Die nach dem zweiten  $\pi/2$ -Puls auf der z-Achse gespeicherte Magnetisierung wird dabei wieder in der gleichen Weise beeinflusst wie bei der Davies-ENDOR Pulssequenz. Die Pulssequenz ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Auch hier ist die Pulssequenz konstant und die Radiofrequenz wird variiert.

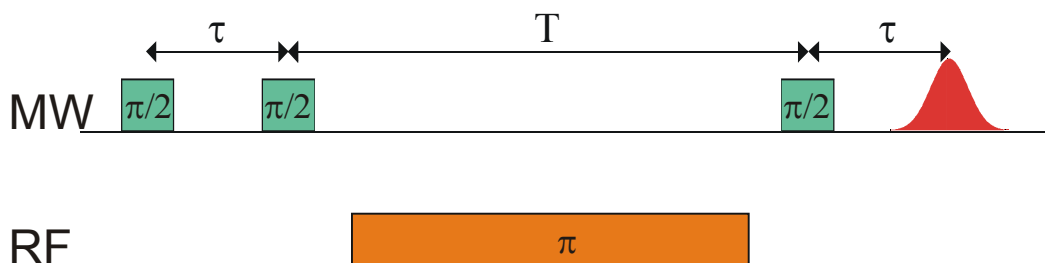


Abb. 2.8 Mims-ENDOR Pulssequenz.

Ein Nachteil der Mims-ENDOR Pulssequenz ist das Auftreten sogenannter *blind spots*. Nach [33] ist die ENDOR-Effizienz für die Mims-Pulssequenz gegeben durch

$$F_{ENDOR} = \frac{1}{2} \sin^2\left(\frac{a}{2}\tau\right), \quad (2.32)$$

sodass für

$$a\tau = 2n\pi \quad (2.33)$$

das ENDOR-Signal verschwindet. Aus diesem Grunde ist es notwendig, ein Mims-ENDOR Experiment mit verschiedenen Werten für  $\tau$  durchzuführen.

Allgemein lässt sich sagen, dass aufgrund der unterschiedlichen Präparationssequenzen die Davies-ENDOR Variante besser geeignet ist, große Hyperfeinwechselwirkungen zu detektieren, die Mims-ENDOR Variante dagegen besser für kleine Hyperfeinwechselwirkungen.

### 3 EPR an $Mn^{2+}$ -Systemen

#### 3.1 Allgemeines

In vielen Organismen spielen Manganionen eine wichtige Rolle, wie beispielsweise bei der Photosynthese, sowie bei einigen Enzymen und Metalloproteinen in tierischen Zellen [31,32,35,36]. Eine für die EPR wichtige Eigenschaft ist, dass das häufiger vorkommende diamagnetische  $Mg^{2+}$ -Ion in vielen Metalloproteinen durch das etwas größere  $Mn^{2+}$ -Ion ersetzt werden kann, ohne dabei die biologische Funktion zu beeinträchtigen [37,38]. Das paramagnetische  $Mn^{2+}$ -Ion hat einen Elektronenspin  $S=5/2$  sowie einen Kernspin  $I=5/2$ , was es für die EPR zu einer interessanten Sonde für Metalloproteine und Enzyme macht. Eine ausführliche Übersicht über die für die EPR relevanten Eigenschaften von  $Mn^{2+}$  ist zum Beispiel in [35] gegeben.

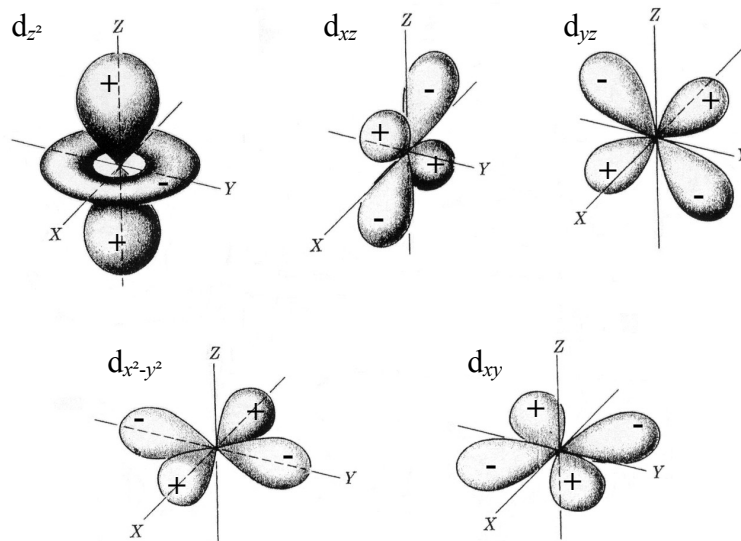


Abb. 3.1 Darstellung und Bezeichnung der fünf 3d-Orbitale. Eingetragen sind auch die Vorzeichen der Wellenfunktionen. Beim  $Mn^{2+}$  ist jedes der Orbitale einfach besetzt (entnommen aus [21,39]).

$Mn^{2+}$  besitzt fünf ungepaarte Elektronen in 3d Orbitalen, was zu einem Gesamtspin von  $S=5/2$  und damit zu sechs Energieniveaus führt. Durch die Hyperfeinwechselwirkung zum Kernspin des  $^{55}Mn$  ( $I=5/2$ ) werden diese Energieniveaus in Sextets aufgespalten, wodurch ein Energieniveauschema mit insgesamt 36 Energieniveaus entsteht. Die Hyperfeinkopplung  $a_{Mn}$  ist normalerweise isotrop (außer bei stark verzerrten Symmetrien) und in der Größenordnung von  $\approx -9,5$  mT für oktaedrisch koordiniertes  $Mn^{2+}$  [35]. Unter Beachtung der Auswahlregeln  $\Delta m_S=1$  und  $\Delta m_I=0$  führt das somit zu insgesamt 30 erlaubten EPR-Übergängen. Das gesamte Energieniveauschema ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die Kern Zeeman-Aufspaltung kann normalerweise vernachlässigt werden, da sie ca. vier Größenordnungen schwächer ist als die Elektron Zeeman-Aufspaltung.

In Metalloproteinen sind  $Mn^{2+}$ -Ionen meistens sechsfach koordiniert, obwohl auch andere Koordinationszahlen beobachtet worden sind [35]. Sobald die Koordinationskugel eine Symmetrie aufweist, die geringer ist als kubisch, hebt diese Asymmetrie die Entartung der Energieniveaus bei Abwesenheit eines Magnetfelds auf, was als Nullfeldaufspaltung bezeichnet wird. Das resultierende Energieniveauschema ist in Abbildung 3.2 dargestellt. In Abwesenheit eines äußeren Magnetfelds liegen die Magnetisierungsrichtungen für die Elektronenspins entlang der Kristallachsen. Ein äußeres Magnetfeld überlagert sich dann mit dem sogenannten Kristallfeld, was dazu führt, dass der Effekt des Kristallfelds mit zunehmender Magnetfeldstärke  $B_0$  immer unbedeutender wird. Ebenso ist auch einsichtig, dass das resultierende effektive Magnetfeld und damit auch das Energieniveauschema orientierungsabhängig sind. In Tabelle 3.1 sind einige typische Werte für Nullfeldaufspaltungen für  $Mn^{2+}$ -Ionen in Metalloproteinen wiedergegeben.

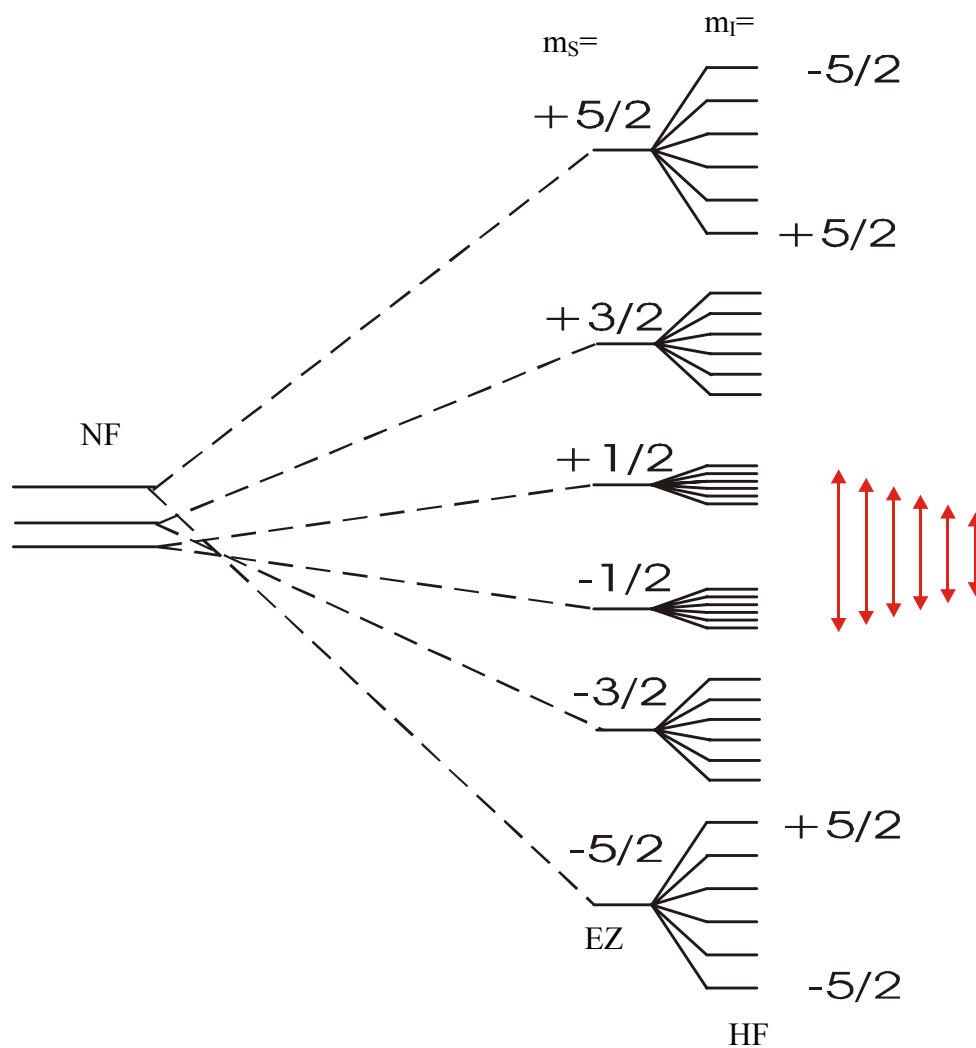


Abb. 3.2 Energieniveauschema für  $Mn^{2+}$  bei Auftreten einer Nullfeldaufspaltung. Da die Nullfeldaufspaltung orientierungsabhängig ist, ist diese Darstellung nur für eine bestimmte Orientierung des  $Mn^{2+}$ -Ions in Bezug zur Magnetfeldrichtung gültig. Aus dem gleichen Grund sind in ungeordneten Proben die Übergänge mit höheren  $m_s$ -Zuständen über einen weiten Bereich verschmiert, nur die mit Pfeilen gekennzeichneten Übergänge  $m_s = -1/2 \leftrightarrow +1/2$  sind aufgelöst und führen zu einem charakteristischen sechs-Linien-Spektrum.



System	D(mT)	E/D	Methode	Referenz
Mn(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	19,8	0	X-Band Puls-EPR, 1,8 K, a	40
Mn(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	15,5	1/3	X-Band EPR, 77 K, a	41
CcO (reduziert)	12,0	0,183	Multifrequenz EPR, 10-140 K, b	42
CcO (oxidiert)	14,5	0,193		
Ras•Mn <sup>2+</sup> •GDP	11,0 ± 2,0	0	Q-Band EPR, 273 K, c	43
Kreatin Kinase	31,5	0,05	Q-Band EPR, 300 K, a	41
Kreatin Kinase	30,0	0,06	Q-Band EPR, 300 K, b	35
Kreatin Kinase	50,0-54,0	0,22±0,2	Q-Band EPR, 269 K, b	44
Lipoxygenase	74,9-107,1	0.13-0.23	X-, W-Band EPR, 9-80 K, a	45
conA	23,2 ± 1,0	0.185	Q-Band EPR, RT, Einkristall, b	46
GS	7,5-15,0	0,1-0,15	X-Band EPR, 274 K, c	47
Enolase	27,0	1/3	Q-Band EPR, 273 K	48
Myosin	24,0	1/3	Q-Band EPR, 276 K	49

Tab. 3.1 Einige Nullfeldparameter für Mn<sup>2+</sup> in Metalloproteinen. Abkürzungen: ccO: Cytochrom c Oxidase, conA: Concanavalin A, GS: Glutamin Synthase, a: vollständige Simulation, b: Störungstheorie, c: Intensität der verbotenen Übergänge.

Das in Abbildung 3.2 gezeigte Energieniveauschema ist nur für eine bestimmte Orientierung des Mn<sup>2+</sup>-Ions in Bezug auf die Magnetfeldrichtung gültig, da die Nullfeldaufspaltung orientierungsabhängig ist. Da bei ungeordneten Proben alle Richtungen vorhanden sind, wird bei Messungen an solchen Proben eine Überlagerung aller Orientierungen beobachtet. Dies führt zu einer Verbreiterung der Übergänge  $m_S = \pm 5/2 \leftrightarrow \pm 3/2$  und  $m_S = \pm 3/2 \leftrightarrow \pm 1/2$  auf einige zehntel Tesla, wodurch sie in cw-EPR Spektren nicht sichtbar sind. Der Übergang  $m_S = -1/2 \leftrightarrow +1/2$  ist nur in zweiter Ordnung von der Nullfeldaufspaltung abhängig, wodurch er auch bei kleinen Magnetfeldern (S- und X-Band) nicht so stark verbreitert wird wie die höheren Übergänge [35]. Dennoch führt die Nullfeldaufspaltung auch bei dem zentralen Übergang zu einer Linienverbreiterung bei kleinen Magnetfeldern.

Auch verbotene Übergänge mit  $\Delta m_S = \pm 1$  und  $\Delta m_I = \pm 1$  werden in zweiter Ordnung durch die Nullfeldaufspaltung verursacht. Da die Effekte zweiter Ordnung mit dem Inversen des Magnetfelds skalieren, spielen sie mit zunehmender Magnetfeldstärke eine immer geringere Rolle, was zu einer starken Vereinfachung der EPR-Spektren bei hohen Magnetfeldern führt. Aus diesen Gründen ist Mn<sup>2+</sup> ein sehr geeignetes System für HF-EPR, was in Abbildung 3.3 am Beispiel des Ras-Proteins (vgl. Kapitel 9) verdeutlicht wird.

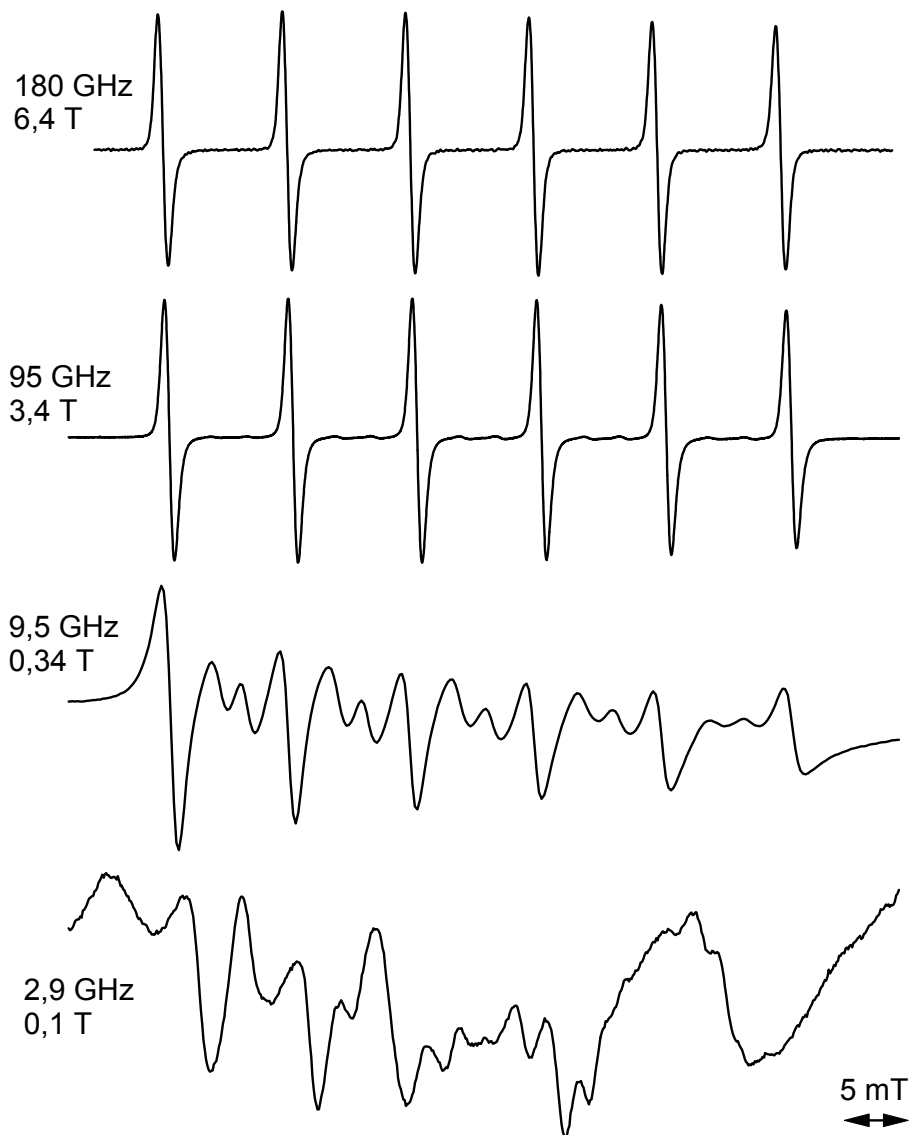


Abb. 3.3 Cw-EPR Spektren des Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexes bei verschiedenen MW-Frequenzen und Magnetfeldern. Das Spektrum bei 2,9 GHz wurde bei 10 K aufgenommen, die anderen bei 20 K.

### 3.2 Simulation von cw-EPR Mn<sup>2+</sup>-Spektren

Für eine vollständige Simulation von Mn<sup>2+</sup>-Spektren ist es notwendig, eine Diagonalisierung einer Matrix der Größe 36×36 durchzuführen. Für die Simulation von Spektren an ungeordneten Proben muss diese Diagonalisierung für eine große Anzahl an Orientierungen durchgeführt werden, was die Berechnung solcher Spektren sehr zeitaufwendig macht. Da bei hohen Magnetfeldern die Elektron Zeeman-Wechselwirkung den größten Beitrag zum Hamiltonoperator darstellt, können die HF-EPR Spektren auch mit einem störungstheoretischen Ansatz beschrieben werden, wobei Terme bis zur dritten Ordnung

berücksichtigt werden müssen [35]. Diese Methode spart viel Rechenzeit und soll im Folgenden beschrieben werden.

Die Herleitung der Formeln kann [35] entnommen werden. Im Folgenden werden nur die Übergänge  $m_S = -1/2 \leftrightarrow +1/2$  betrachtet. Die Übergänge mit höheren  $m_S$ -Zuständen werden in den Simulationen nicht berücksichtigt, da sie in cw-EPR Spektren nicht sichtbar sind.

Die Resonanzpositionen der Übergänge sind gegeben durch

$$\Delta E \left( \left| -\frac{1}{2}, m_I \right\rangle \leftrightarrow \left| +\frac{1}{2}, m_I \right\rangle \right) = g_{Mn} \mu_B B_0 + a_{Mn} m_I + \Delta E_2 + \Delta E_3, \text{ mit} \quad (3.1)$$

$$\Delta E_2 = \frac{1}{g_{Mn} \mu_B B_0} \left( -64 |D_{+1}|^2 + 32 |D_{+2}|^2 + \frac{a_{Mn}^2}{2} \left( \frac{35}{4} - m_I^2 \right) \right) \text{ und} \quad (3.2)$$

$$\Delta E_3 = \frac{m_I}{(g_{Mn} \mu_B B_0)^2} \left( 576 a_{Mn} |D_{+1}|^2 - 32 a_{Mn} |D_{+2}|^2 + 24 a_{Mn}^2 D_0 + \frac{a_{Mn}^3}{2} \left( m_I^2 - \frac{65}{4} \right) \right). \quad (3.3)$$

Die Konstanten bedeuten dabei

$$D_0 = \frac{D}{6!} (3 \cos^2 \vartheta - 1) + \frac{E}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi, \quad (3.4)$$

$$D_{\pm 1} = \left( \frac{1}{4} \sin 2\vartheta \right) (-D + E \cos 2\varphi) \pm \frac{i}{2} E \sin \vartheta \sin 2\varphi, \text{ und} \quad (3.5)$$

$$D_{\pm 2} = \frac{1}{4} [D \sin^2 \vartheta + E \cos 2\varphi (1 + \cos^2 \vartheta)] \pm \frac{i}{2} E \cos \vartheta \sin 2\varphi. \quad (3.6)$$

Die Winkel  $\vartheta$  und  $\varphi$  bezeichnen die Polarwinkel, mit denen die Richtung von  $\vec{B}_0$  im Hauptachsensystem des Nullfeldtensors beschrieben wird.

Zu einem vorgegebenen Satz an Nullfeldparametern wird zunächst ein Pulverspektrum berechnet. Dazu wird mit den Winkeln  $\vartheta$  und  $\varphi$  die Oberfläche einer Halbkugel abgedeckt und für jede Richtung mit Hilfe der Gleichungen (3.1) bis (3.6) die Resonanzpositionen bestimmt. Anschließend wird an jeder Resonanzposition ein Signal mit einer homogenen Linienbreite erzeugt, welche ebenfalls als Parameter vorgegeben wird.

In Kapitel 9 werden W-Band cw-Spektren von  $Mn^{2+}$ -Komplexen gezeigt, die in mit  $H_2^{17}O$  angereichertem Wasser aufgenommen wurden. Mit diesen Messungen soll die Anzahl an koordinierten Wassermolekülen bestimmt werden.

Das Signal  $S_k$  eines  $Mn^{2+}$ -Ions mit  $k$  angelagerten  $^{17}O$ -Kernen erhält man durch Faltung des wie eben erläutert berechneten Signals mit einem Hyperfeinmuster, welches durch zwei

Parameter bestimmt ist. Diese sind die Anzahl  $k$  der  $^{17}\text{O}$ -Kerne sowie die Hyperfeinkopplung  $\tilde{A}_{17\text{o}}$  zu den  $^{17}\text{O}$ -Kernen.

Da der Anreicherungsgrad  $f$  des Wassers mit  $^{17}\text{O}$  kleiner als 1 ist, tragen sowohl Proteinkomplexe mit ausschließlich  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ -Liganden als auch solche mit verschiedenen vielen  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ -Liganden zu dem Gesamtspektrum bei.

Für die Simulation eines  $\text{Mn}^{2+}$ -Spektrums für insgesamt  $N$  Wasserliganden muss zunächst mit einer Binomialverteilung die Wahrscheinlichkeit bestimmt werden, mit der jeweils genau  $k$  Koordinationsplätze mit  $^{17}\text{O}$  besetzt sind. Die Variable  $k$  läuft dabei von 0 bis  $N$ .

Anschließend muss zu einer gegebenen Anzahl an Koordinationsplätzen  $N$  das endgültige Spektrum  $S_{\text{ges}}$  durch Überlagerung der gewichteten Spektren  $S_k$  berechnet werden [50]:

$$S_{\text{ges}} = \sum_{k=0}^N \binom{N}{k} f^k (1-f)^{N-k} S_k, \quad (3.7)$$

Zusätzlich zu der Hyperfeinkopplung zum  $^{17}\text{O}$  können noch weitere Hyperfeinkopplungen in die Simulation integriert werden, zum Beispiel für  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  oder  $^1\text{H}$ .

Zum Anfitten der cw-EPR Spektren wurde dieses Simulationsprogramm in eine Fitroutine implementiert, welche einen Simplex-Algorithmus verwendet. Je nach Fragestellung gab es verschieden viele Parameter, welche mit dem Simplex-Algorithmus optimiert worden sind. Diese sind im Einzelnen:

- D,E Nullfeldparameter
- lw homogene Linienbreite
- $\tilde{A}_{17\text{o}}$  Hyperfeinkopplung zum  $^{17}\text{O}$
- weitere Hyperfeinkopplungen
- $\alpha$  zur Berücksichtigung nicht optimaler MW-Detektionsphase des Experiments

Zu einem vorgegebenen Wert für die Anzahl der direkt angelagerten Wassermoleküle müssen somit mehrere Parameter optimiert werden. Um sicherzustellen, dass der Fitalgorithmus das globale Minimum in dem mehrdimensionalen Parameterraum findet, wird zum einen der Fitprozess für jede der sechs Manganlinien einzeln durchgeführt, zum anderen wird jede Linie 100mal angefittet. Mit den erhaltenen Werten kann die Signifikanz der erhaltenen Parameter beurteilt werden.

## Teil II – Aufbau eines cw- / Puls-EPR Spektrometers bei 180 GHz

### 4 Der Supraleitende Magnet

Der Magnet (Teslatron<sup>H</sup>, Oxford Instruments) besteht im Wesentlichen aus zwei supraleitenden Spulen, wobei die Hauptspule ein statisches Magnetfeld zwischen 0 und 7 T erzeugen kann. Nach Einstellen der gewünschten Feldstärke können die Stromzuführungen zur Hauptspule entfernt werden, um den Verbrauch an flüssigem Helium zu minimieren. Die zweite supraleitende Spule hat einen Bereich von  $\pm 0,08$  T und wird zum Durchstimmen des Magnetfelds während der Experimente verwendet. Eine Übersicht mit den Maßen des Magneten ist in Abbildung 4.1 gegeben.

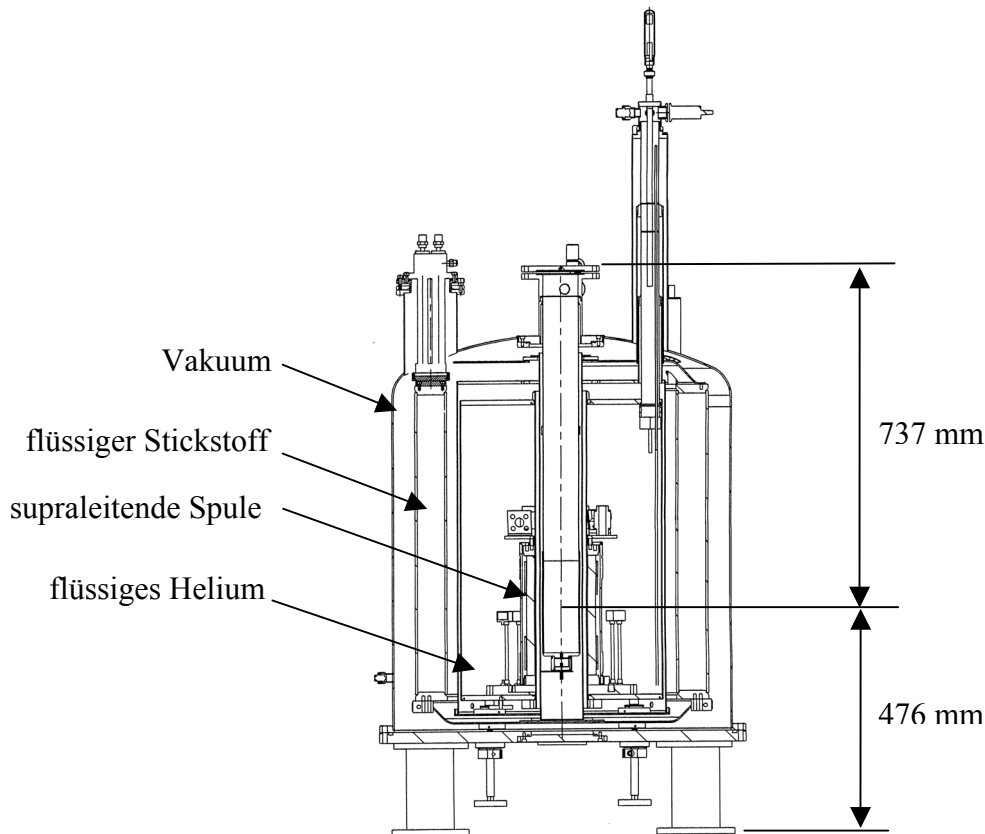


Abb. 4.1 Querschnitt durch den supraleitenden Magneten (Quelle: Oxford Instruments).

In die Bohrung des Magneten ist ein Kryostat integriert (VTI, Oxford Instruments), welcher es ermöglicht, die Temperatur am Probenort zu regulieren. Zu diesem Zweck wird dem Reservoir des Magneten flüssiges Helium entnommen, welches am unteren Ende des Kryostaten mit Hilfe eines Nadelventils in den Probenraum gelassen wird. Direkt oberhalb der Einlassöffnung befindet sich ein Heizelement, dessen Temperatur mit Hilfe einer Kontrolleinheit (ITC 503, Oxford Instruments) geregelt wird. Die Bohrung des Kryostaten hat einen Durchmesser von 74,2 mm.

Da der fest installierte Temperatursensor am Boden des Kryostaten eingebaut ist, herrscht zwischen diesem und der Probe ein Temperaturunterschied. Da es bei temperaturabhängigen Messungen wichtig sein kann, die Probentemperatur genau zu kennen, wurde der Temperaturunterschied zwischen dem installierten Sensor und der Probe bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein zweiter Temperatursensor (CX-1050-AA, LakeShore) direkt am Resonator (vgl. Kapitel 6.4) befestigt und dessen Temperatur mit der Temperatur des fest installierten Sensors verglichen. Bei Temperaturen oberhalb von 20 K ist die Temperatur am Probenort weniger als 3 K höher als am Boden des Kryostaten.

Ein allgemeines Problem bei supraleitenden Magneten sind Hystereseeffekte, welche beim Durchstimmen des Magnetfelds auftreten können [17,51]. Anhand der Abbildung 4.2 werden die Hystereseeffekte des verwendeten Magneten demonstriert. Gezeigt sind Spektren von  $Mn^{2+}$ -Ionen in MgO. Bei der oberen Messung (a) wurde das Spektrum von rechts nach links aufgenommen, bei den beiden unteren (b,c) in der entgegengesetzten Richtung. Bei den Spektren a und b gab es einen Vorlauf des Magnetfelds über den maximalen Feldbereich der Sweepspule. Bei dem Spektrum c wurde das Magnetfeld von oben zu dem Startpunkt der Messung gefahren und unmittelbar vor dem ersten Signal mit der Messung begonnen. Zwei Effekte sind zu erkennen:

- Die Verschiebung der Spektren a und b beträgt ca. 5 mT,
- Bei zu kleinem Vorlauf des Magnetfelds sind Nichtlinearitäten über einen Bereich von bis zu 50 mT zu beobachten.

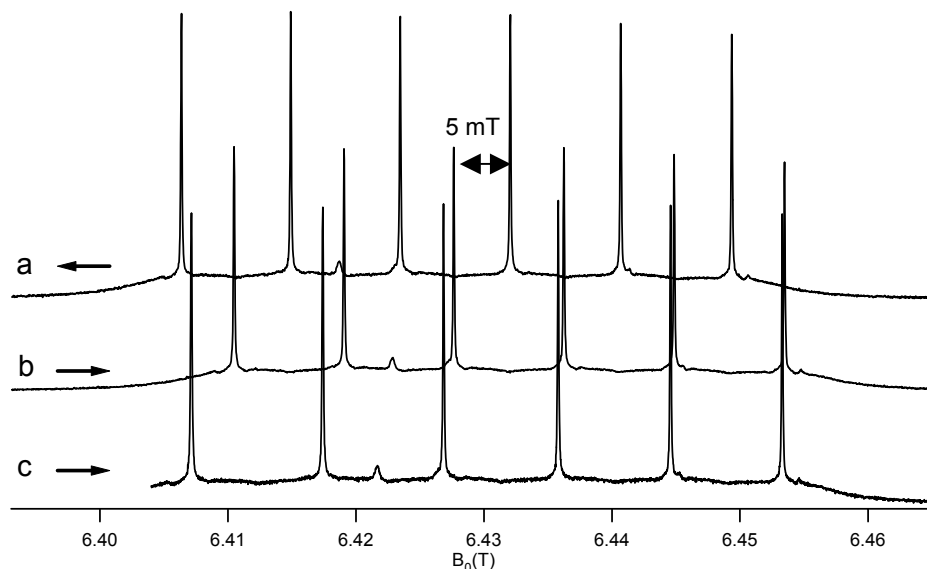


Abb. 4.2 Puls-EPR Spektren an  $Mn^{2+}$  in MgO zur Verdeutlichung der Hystereseeigenschaften des supraleitenden Magneten. Spektrum a wurde von rechts nach links aufgenommen, die Spektren b und c in der entgegengesetzten Richtung. Bei den Spektren a und b wurde das Magnetfeld zuvor einige 10 mT in der selben Richtung verändert wie während der Messung, beim Spektrum c gab es keinen Vorlauf. Das zusätzliche Signal zwischen der zweiten und dritten Linie gehört zu einer Verunreinigung der Probe mit Rußpartikeln.

Um den Effekt der Nichtlinearität bei magnetfeldabhängigen Messungen zu berücksichtigen, muss vor dem Start einer Messung das Magnetfeld mindestens 50 mT in die gleiche Richtung gefahren werden wie während der Messung. Durch diesen Vorlauf kann ausgeschlossen werden, dass nichtlineare Effekte Einfluss auf die Messung haben und beispielsweise Linienverbreiterungen verursachen.

Die Reproduzierbarkeit des Magnetfelds bei aufeinanderfolgenden Messungen, die unter identischen Parametern durchgeführt werden, ist in Abbildung 4.3 demonstriert. Dort sind acht fieldswept-Experimente gezeigt, die in einem Zeitraum von ca. 10 Stunden nacheinander aufgenommen worden sind.

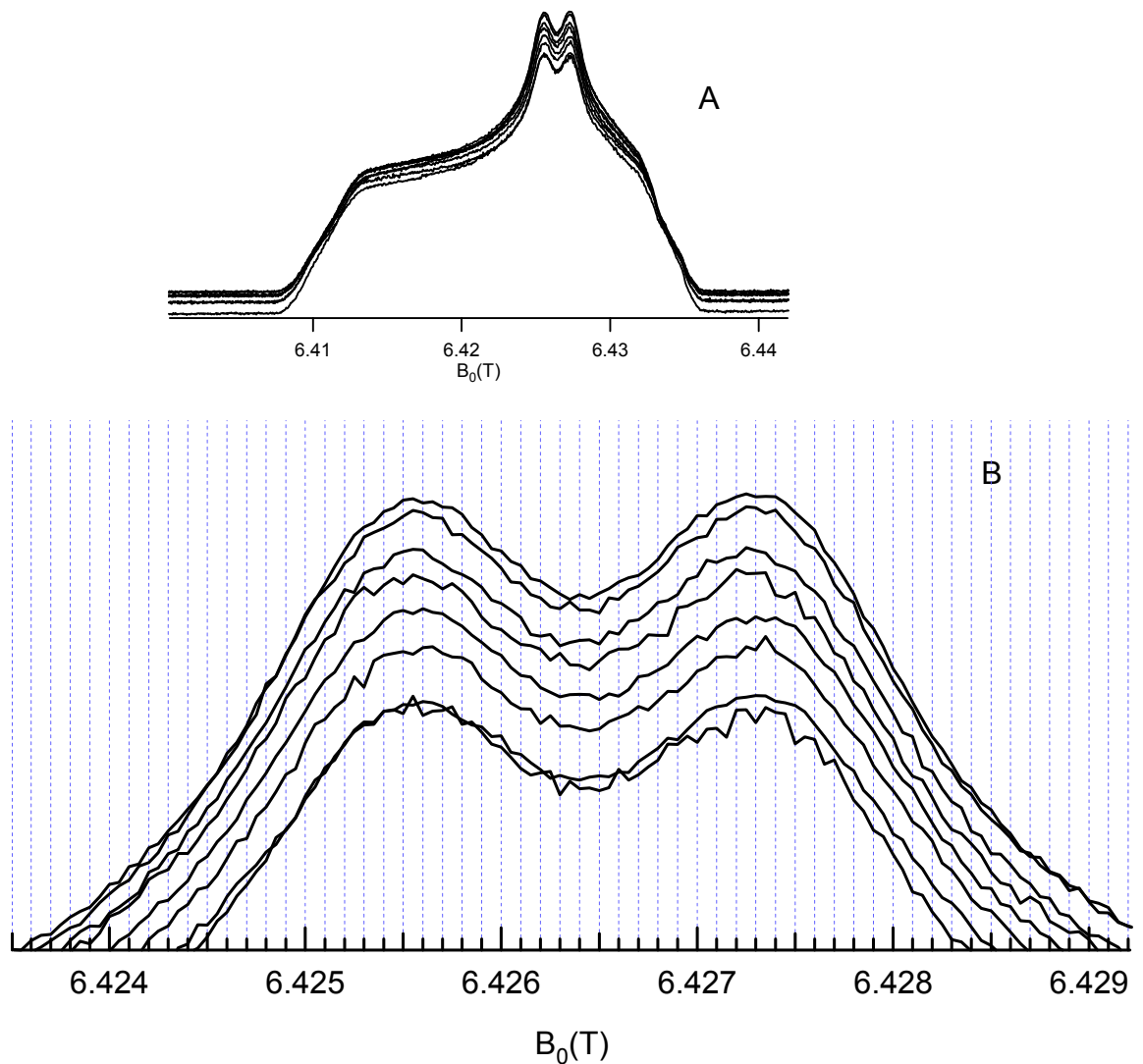


Abb. 4.3 Fieldswept-Spektren vom Tyrosyl-Radikal in der Ribonukleotid-Reduktase aus *E. coli*. Messparameter:  $T = 15$  K, Repetitionsrate 5 ms, stimuliertes Echo mit  $t_p = 70$  ns, Pulsabstand 380 ns, 200 Mittelungen pro Punkt. A: Darstellung der kompletten Spektren, B: vergrößerter Ausschnitt der Spektren.

Mit den dargestellten Spektren kann abgeschätzt werden, dass die Reproduzierbarkeit des Magnetfelds über einen längeren Zeitraum in der Größenordnung von 0,05 mT liegt.

Zur Ansteuerung der supraleitenden Sweepspule wurde in unserer Arbeitsgruppe eine bipolare Stromquelle gebaut, welche  $\pm 25$  A zur Verfügung stellt. Die Stromquelle wird mit Hilfe einer RS232 Schnittstelle an einen Computer angeschlossen, die es somit ermöglicht, Messungen computergesteuert ablaufen zu lassen. Die Genauigkeit der Stromquelle beträgt 18 bit, was einer theoretischen Feldauflösung von  $0,61 \mu\text{T}$  entspricht.

In Tabelle 4.1 sind einige relevante Daten des Magneten zusammengefasst.

Feldbereich der Hauptspule	0 - 7 T	Abdampftrate Helium	$\approx 5$ l / Tag
Feldbereich der Sweepspule	$\pm 0,08$ T	Abdampftrate Stickstoff	$\approx 6$ l / Tag
Feldhomogenität (in einer Kugel mit 5 mm Radius)	$\leq 2 \times 10^{-6}$	Volumen Heliumtank	80 l
Genauigkeit der Sweepspule	$0,61 \mu\text{T}$	Volumen Stickstofftank	50 l
Reproduzierbarkeit	$0,05$ mT	Durchmesser Probenraum	74,2 mm
Temperaturbereich	2 - 270 K	Hysterese der Sweepspule	4,9 mT
Temperaturgenauigkeit	3 K	Induktivität der Sweepspule	0,24 H

Tab. 4.1 Zusammenstellung einiger Eigenschaften des supraleitenden Magneten sowie des Kryostaten.



## 5 Der Transmissionsprobenkopf

### 5.1 Aufbau

Um möglichst rasch einen Probenkopf für EPR-Experimente bei 180 GHz zur Verfügung zu haben, wurde zunächst ein System aufgebaut, welches ohne die Verwendung eines Resonators in Transmission arbeitet. Dieses Konzept wurde erstmals 1973 beschrieben und wird auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet [52-54]. Die Vorteile eines solchen Systems bestehen in den vergleichsweise geringen mechanischen Ansprüchen und der einfachen Handhabung. Der Nachteil ist, dass mit diesem Probenkopf prinzipiell keine Puls-Experimente möglich sind, da ohne Resonator am Probenort nicht genug MW-Leistung zur Verfügung steht. Aus dem gleichen Grunde ist auch die Empfindlichkeit wesentlich geringer als bei Verwendung eines Resonators.

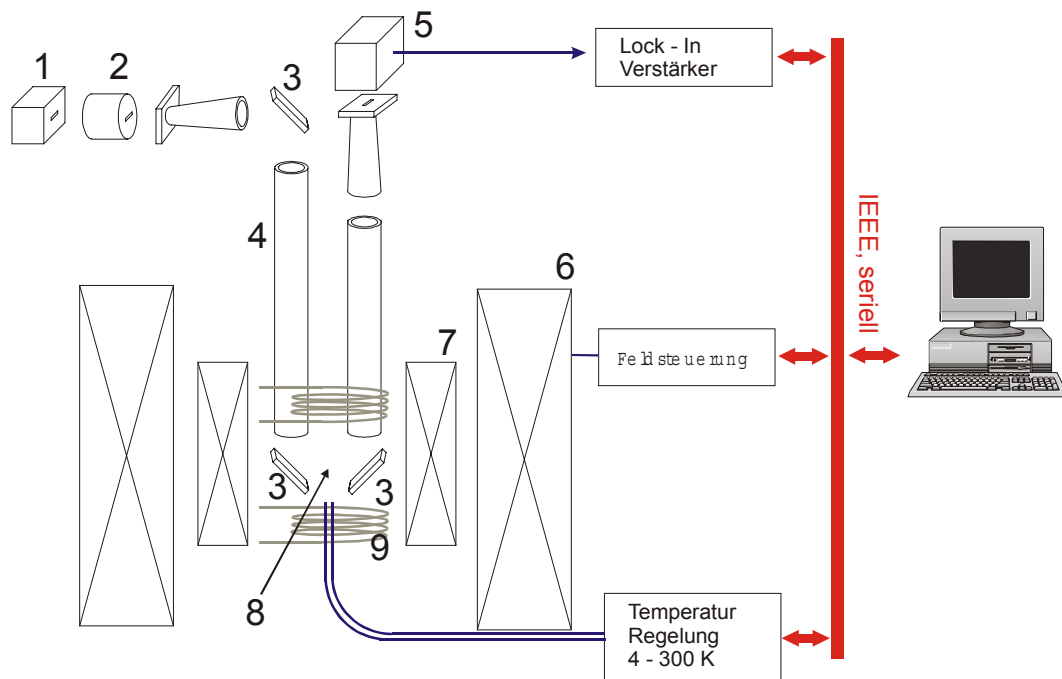


Abb. 5.1 Schematischer Überblick über den Transmissionsaufbau. 1-durchstimmbare Gunn-Oszillatoren (86 bis 91 GHz, 40 mW), 2-Frequenzverdoppler (8 mW bei 180 GHz), 3-vergoldete Spiegel, 4-Messingrohre als Hohlleiter, 5-Diodendetektor, 6-supraleitende Hauptspule ( $B_0 = 6,422$  T), 7-supraleitende Sweepspule ( $\pm 0,08$  T), 8-Probenort, 9-Spulen für Feldmodulation.

In Abbildung 5.1 ist der gesamte Aufbau schematisch dargestellt. Als MW-Quelle wird für diesen Aufbau ein Gunn-Oszillator verwendet, welcher eine Ausgangsleistung von 40 mW bei 90 GHz hat. Nach einem Frequenzverdoppler stehen bei 180 GHz noch 8 mW zur Verfügung. Um die MW-Strahlung möglichst verlustfrei transportieren zu können, werden überdimensionierte zylindrische Hohlleiter (Messing, Innendurchmesser 8 mm) verwendet. Mit Hilfe von vergoldeten Metallplättchen, welche als Spiegel dienen, kann die MW-Strahlung zur Probe und von dort zum Detektor gebracht werden. Die MW-Leistung wird mit einem

Diodendetektor bei 180 GHz detektiert. In Abbildung 5.2 ist die Probenhalterung im Detail gezeigt.

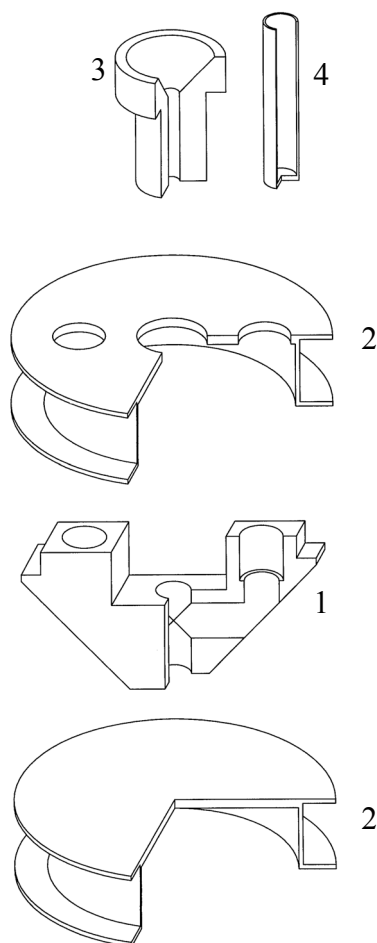


Abb. 5.2 Probenhalterung im Transmissionsprobenkopf. 1-Messingblock, 2-Träger aus Hartgewebe für Modulationsspulen, 3-Zentrierhilfe aus Teflon für Messröhrchen, 4-Teflondose.

Der Messingblock dient sowohl der Aufnahme der von oben kommenden Messingrohre als auch als Halterung für die Spiegel, welche an der Seite festgeschraubt werden.

Bei diesem Aufbau wurde die Geometrie so gewählt, dass als Probenhalter herkömmliche X-Band Röhrchen mit einem Außendurchmesser von ca. 4 mm verwendet werden können. Das effektive Probenvolumen beträgt damit 57  $\mu\text{l}$ . Wie in Abbildung 5.2 dargestellt, werden die Röhrchen von oben in den Probenkopf eingebracht, während die MW-Strahlung von der Seite her auf die Probe fällt. Dieser Aufbau bietet die Möglichkeit, gefrorene Proben in den vorgekühlten Probenhalter einzubauen, was mit dem Resonatoraufbau nicht ohne weiteres möglich ist (vgl. Kapitel 6.4). Statt der X-Band Röhrchen können auch kleine Teflondosen als Probengefäße verwendet werden, wodurch mehr Probenvolumen zur Verfügung steht (ca. 150  $\mu\text{l}$ ). Diese können ebenfalls im gefrorenen Zustand eingebaut werden. Da der Transmissionsaufbau ausschließlich für cw-EPR Messungen verwendet wird, ist zusätzlich ein Paar Modulationsspulen in Helmholtzgeometrie angebracht, wie sie ebenfalls in Abbildung 5.2 dargestellt sind.

## 5.2 Eigenschaften des Transmissionsaufbaus

An  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen in MgO wurden cw-EPR Messungen durchgeführt zur Bestimmung der Spulenkonstanten für die Feldmodulation. Dabei wird die Linienbreite des gemessenen Signals in Abhängigkeit von der an die Modulationsspulen angelegten Spannung bestimmt.

Der Strom in den Modulationsspulen hängt linear mit der angelegten Wechselspannung zusammen und damit auch die Amplitude des erzeugten magnetischen Wechselfeldes. Ist dieses magnetische Wechselfeld kleiner als etwa die Hälfte der Linienbreite, so wird die Linienform und -breite nicht beeinflusst. Lediglich das S/N-Verhältnis wird mit abnehmender Amplitude der Feldmodulation kleiner. Ist die Feldmodulation aber größer als die Linienbreite, so äußert sich dies in einer Linienverbreiterung [55]. Dabei ist der Zusammenhang zwischen der Amplitude der Feldmodulation und der Linienbreite wiederum linear.

Das Ergebnis der Modulationseichung ist in Abbildung 5.3 wiedergegeben. Bei einer typischen Modulationsfrequenz von 7 kHz beträgt die Spulenkonstante  $0,012 \text{ mT/V}_{pp}$ . Die Frequenzabhängigkeit der Spulenkonstanten wird in Kapitel 7.6 diskutiert.

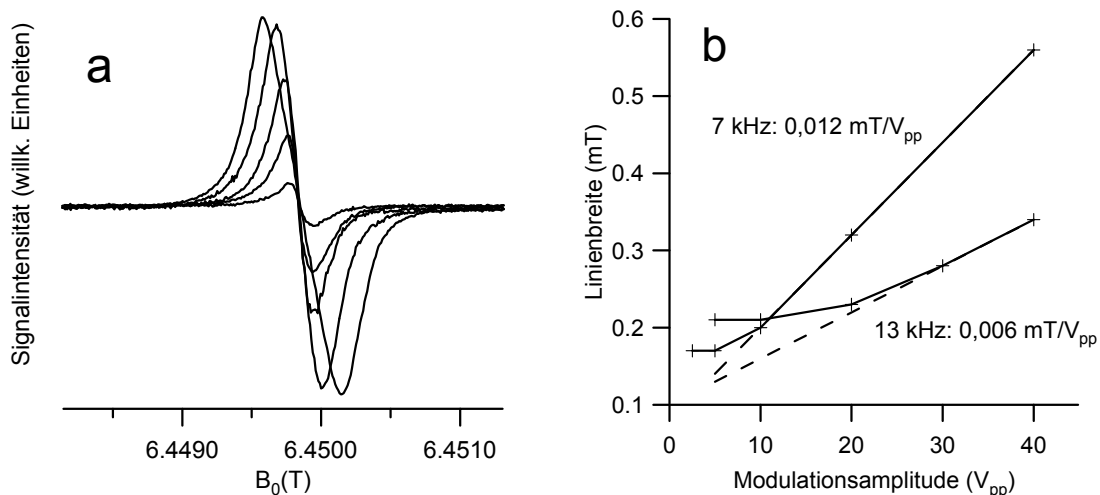


Abb. 5.3 Ermittlung der Spulenkonstanten für die Feldmodulationsspulen mit  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen in MgO. a) Abhängigkeit der Linienbreite und Signalamplitude von der Modulationsamplitude bei 7 kHz gezeigt an einer der sechs Manganlinien, Modulationsspannungen: 40, 20, 10, 5 und 2,5  $\text{V}_{pp}$ , b) Bestimmung der Spulenkonstanten für zwei verschiedene Modulationsfrequenzen.

Dem Vorteil der einfachen Handhabung dieses Aufbaus steht der Nachteil gegenüber, dass bei der verwendeten Leistungsdetektion die Information über die MW-Phase verloren geht. Durch Verdrehen des Detektors gegenüber dem Aufbau kann zwar die MW-Phase verändert werden, allerdings ist dieses nicht reproduzierbar und muss für jede Messung erneut vorgenommen werden. Auf diese Weise ist es sehr zeitaufwendig, die MW-Phase korrekt einzustellen.

Mit Messungen am Vitamin K<sub>3</sub> in verschiedenen Konzentrationen wurde die Empfindlichkeit des Transmissionsaufbaus abgeschätzt. Ein Spektrum ist exemplarisch in Abbildung 2.5 wiedergegeben. Dabei waren bis zu einer Konzentration von ca. 10  $\mu\text{M}$  cw-Spektren

detektierbar, woraus sich eine Empfindlichkeit von ca.  $2 \times 10^{13}$  spins/(mT $\sqrt{\text{Hz}}$ ) bei 20 K abschätzen lässt. Diese Zahl ist vergleichbar mit der Empfindlichkeit, die für eines der ersten EPR-Spektrometer dieser Art bestimmt worden ist [53]. Mit einem neueren Aufbau wurde bei tiefen Temperaturen eine Empfindlichkeit von  $1 \times 10^{11}$  spins/(mT $\sqrt{\text{Hz}}$ ) bestimmt [54], was damit ca. zwei Größenordnungen besser ist, als die für den Transmissionsaufbau erhaltene. Allerdings wird bei diesem Spektrometer die MW-Leistung mit einem Bolometer detektiert, wodurch alleine der Aufbau schon ca. eine Größenordnung empfindlicher ist.

## 6 Aufbau eines EPR-Spektrometers im Reflexionsbetrieb

### 6.1 Überblick

In Kapitel 5 wurde ein Transmissionsprobenkopf vorgestellt, mit dem auf einfache Art und Weise cw-Spektren bei 180 GHz aufgenommen werden können. Sollen aber Puls-Experimente durchgeführt werden, so ist das mit dem vorgestellten Aufbau nicht möglich, da am Probenort nicht genug MW-Leistung vorhanden ist.

Aus diesem Grunde wurde ein zweiter Aufbau entwickelt, welcher mit einem MW-Resonator in Reflexionsgeometrie arbeitet. Als MW-Quelle wird bei diesem Aufbau ein Resonatorstabilisierter Gunn-Oszillator verwendet, der bei 45 GHz arbeitet. Diese MW-Frequenz wird zweimal verdoppelt, um 180 GHz zu erhalten. Statt einer reinen Leistungsdetektion wird die reflektierte MW-Leistung mit einem Teil der Leistung der Quelle zu einer niedrigeren Frequenz heruntergemischt. Nach einem zweiten Mischprozess wird dann ein dc-Signal erzeugt, welches direkt gemessen werden kann. Dieses auf einem Mischprozeß basierende Detektionsprinzip bietet unter anderem den Vorteil, dass die Phaseninformation nicht verloren geht. Des Weiteren ist ein solcher Aufbau wesentlich empfindlicher als eine reine Leistungsdetektion bei 180 GHz, da das hohe Eigenrauschen des Leistungsdetektors bei diesen Frequenzen vermieden wird [9]. Aus diesem Grund wurde ein solches Prinzip bereits von anderen Arbeitsgruppen verwendet [14,15,56].

Um die MW-Strahlung zur Probe und wieder zurück zu transportieren, werden quasioptische Elemente verwendet, da bei einer Frequenz von 180 GHz einige MW-Bauteile entweder nicht erhältlich sind oder hohe intrinsische Verluste aufweisen.

In Abbildung 6.1 ist ein Blockschaltbild des Spektrometers wiedergegeben.

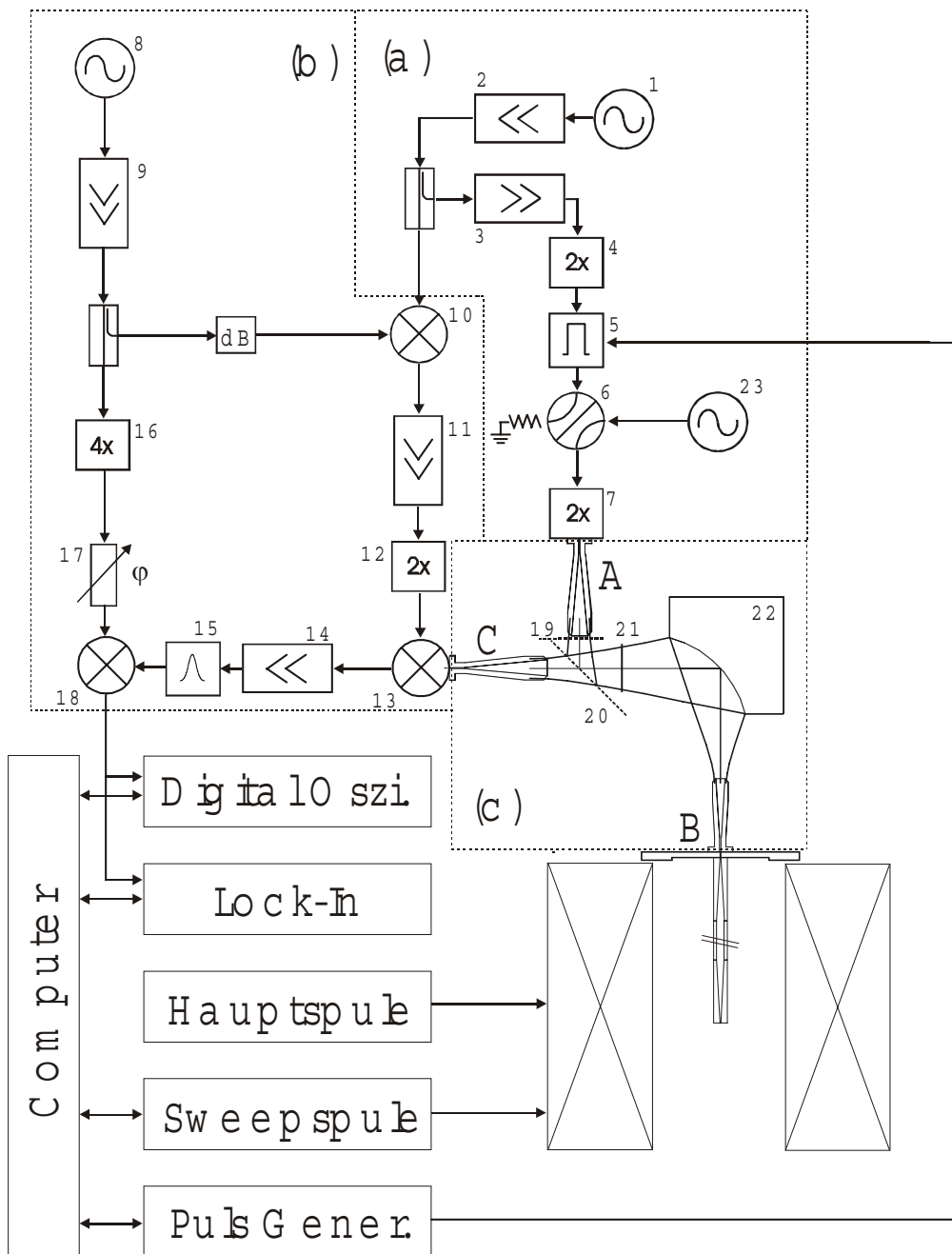


Abb. 6.1 Blockschaltbild des 180 GHz EPR Spektrometers. (a) Anregungsseite der MW-Quelle, (b) Detektionsseite, (c) quasioptische Bauteile, 1-Resonator-stabilisierter Gunn Oszillator, 2-Verstärker, 3-vierstufige Verstärkerkette, 4-Frequenzverdoppler auf 90 GHz, 5-schneller MW-Schalter, 6-mechanischer Hohlleiterschalter, 7-Frequenzverdoppler mit 15 dBm Ausgangsleistung bei 180 GHz, 8-dielektrischer Resonator-stabilisierter Oszillator als 3 GHz Quelle, 9-Verstärker, 10-harmonischer Mischer mit einer Ausgangsfrequenz von 42 GHz, 11-Verstärker, 12-Frequenzverdoppler auf 84 GHz, 13-subharmonischer Detektionsmischer mit 12 GHz Ausgangsfrequenz und einem Konversionsverlust von  $\leq 9$  dB, 14-Verstärker mit 32 dB und einer Rauschzahl von 1 dB, 15-Bandpassfilter mit 200 MHz Bandbreite, 16-Frequenzvervierfacher, 17-mechanischer Phasenschieber, 18-Ausgangsmischer, 19-drehbares Polarisationsgitter, 20-festes Polarisationsgitter, 21-Faraday-Rotator, 22-elliptischer Spiegel, 23-durchstimmbarer W-Band Gunn Oszillator, A, B und C-Rillenhornstrahler.

## 6.2 Die Mikrowellenbrücke

In Abbildung 6.1 ist schematisch die heterodyne MW-Brücke dargestellt, welche sowohl für cw- als auch für Puls-Experimente verwendet werden kann. Die MW-Brücke wurde von Dr. Martin Rohrer zusammen mit der Firma *Millimeter Wave Oscillator* (Longmont, Colorado, USA) entworfen und von dieser Firma gebaut.

Die fundamentale Frequenz wird von einem Resonator-stabilisierten Gunn-Oszillator erzeugt, der bei einer MW-Frequenz von 45 GHz arbeitet. An einer Stirnseite des Resonators ist eine Mikrometerschraube befestigt, welche zum Abstimmen der Frequenz verwendet wird. Nach einer ersten Verstärkungsstufe wird ein Teil der Leistung entnommen, welche für den Referenzarm des Detektionsmischers verwendet wird. Bei 45 GHz ist eine vierstufige Verstärkerkette integriert. Nach einem Frequenzverdoppler auf 90 GHz folgt ein schneller MW-Schalter, welcher die Durchführung von Puls-Experimenten ermöglicht. Dieser wird von einem Pulsgenerator (DG 2020, Sony/Tektronix) mittels TTL-Pegeln angesteuert. Der anschließende Frequenzverdoppler auf 180 GHz liefert eine Ausgangsleistung von 15 dBm. Ebenfalls bei 90 GHz ist ein mechanischer Hohlleiterschalter in die Brücke integriert, mit dessen Hilfe ein durchstimmbarer Gunn-Oszillator als MW-Quelle verwendet werden kann. Mit diesem kann beispielsweise das Modenbild des Resonators auch dann noch untersucht werden, wenn der Probenkopf in den Magneten eingesetzt worden ist. Für diesen Zweck wird der Detektionsmischer entfernt und durch eine 180 GHz Detektordiode ersetzt.

Im Teil b in Abbildung 6.1 sind die Komponenten zusammengefasst, welche zur Detektion der Signale verwendet werden. Dazu wird eine weitere MW-Quelle verwendet, welche bei 3 GHz arbeitet. Ein Teil dieser Leistung wird mit dem ausgekoppelten Anteil der 45 GHz zu einer Frequenz von 42 GHz gemischt. Diese MW-Leistung wird ebenfalls verstärkt und auf 84 GHz verdoppelt. Die 84 GHz dienen als *local input* für den subharmonischen Detektionsmischer, welcher eine Ausgangsfrequenz von 12 GHz erzeugt. Zunächst werden die 12 GHz um 32 dB verstärkt, danach folgt ein Bandpassfilter mit 200 MHz Bandbreite. Der übrige Teil der 3 GHz wird auf 12 GHz vervierfacht und mit den vom Detektionsmischer erzeugten 12 GHz auf ein dc-Signal runtermischt. Zum Einstellen der Detektionsphase ist bei 12 GHz ein manueller Phasenschieber integriert. Der Ausgang des letzten Mischers wird jetzt entweder bei cw-Experimenten auf den Eingang eines Lock-In Verstärkers oder bei Puls-Experimenten auf ein Digitaloszilloskop gegeben.

## 6.3 Die Quasioptischen Komponenten

Bei Frequenzen oberhalb 100 bis 150 GHz degradieren MW-Bauteile in herkömmlicher Hohlleiterbauweise zunehmend in ihren Eigenschaften und weisen immer höhere Verluste auf. Aus diesem Grund haben auch andere Arbeitsgruppen bereits quasioptische Elemente in HF-EPR Spektrometern für Frequenzen oberhalb von 150 GHz verwendet [57-60]. Quasioptische Elemente werden beispielsweise als Strahlteiler eingesetzt oder um MW-Strahlung mit geringen Leistungsverlusten über längere Wegstrecken zu transportieren [61].

Der Ausdruck Quasioptik ist darauf zurückzuführen, dass die hier betrachteten Wellenlängen ca. vier Größenordnungen oberhalb der des sichtbaren Lichts liegen, und damit die Ausmaße der Bauteile sowie der Strahldurchmesser vergleichbar sind mit der Größenordnung der

Wellenlänge [62,63]. Daher verhalten sich die betrachteten elektromagnetischen Wellen anders als in der Strahlenoptik, beispielsweise hinsichtlich der Divergenz der Strahlen.

Ein wichtiger Begriff bei der Betrachtung quasioptischer Systeme sind Gaußsche Strahlen. Diese sind elektromagnetische Wellen, deren elektrische Feldstärke eine Gaußsche Verteilung senkrecht zur Strahlachse aufweist. Mit zunehmender Fortpflanzung des Strahls nimmt dessen Durchmesser rasch zu, und die Intensität in der Strahlmitte damit ab. Dieses ist in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt. Erzeugt werden Gaußsche Strahlen mit Hilfe korrigierter Hornstrahler (oder Rillenhornstrahler), wie eines in Abbildung 6.3 dargestellt ist [64]. Die Rillen in der metallischen Wand dienen der Unterdrückung von Wandströmen und damit der Erzeugung eines möglichst idealen Strahlprofils. Idealerweise sollte die Rillentiefe  $1/4$  der Wellenlänge betragen und der Abstand kleiner als  $1/3$  der Wellenlänge sein. Sind diese Bedingungen erfüllt, so ändert ein Rillenhornstrahler die Polarisationssebene der elektromagnetischen Welle nicht. Die Strahltaile eines Rillenhornstrahlers liegt dabei innerhalb des Horns und nicht in der Ebene der Öffnung. Innerhalb eines Rillenhornstrahlers kann auch eine Modenkonversion von einer rechteckigen zu einer zirkularen Mode stattfinden.

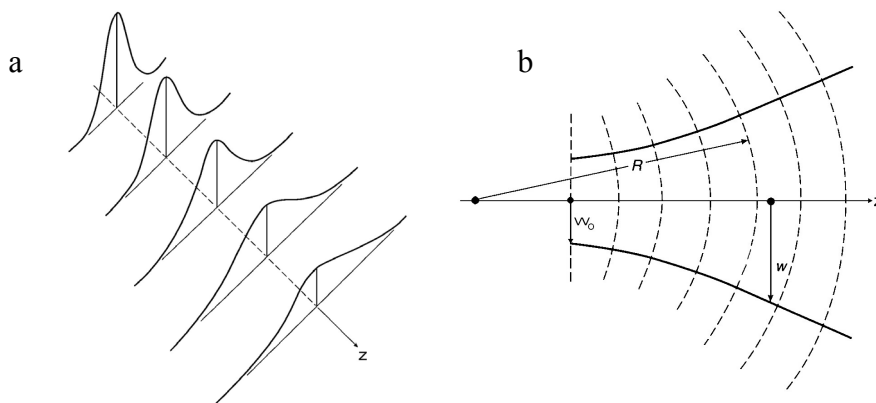


Abb. 6.2 Gaußscher Strahl, a) Amplitudenänderung der elektrischen Feldstärke bei Ausbreitung entlang der z-Achse, b) Entwicklung des Strahlradius und der Phasenfront bei Ausbreitung eines Gaußschen Strahls. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Flächen gleicher Phase mit dem Krümmungsradius  $R$ . Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Strahlradius  $w$ , welcher an der Strahltaile  $w_0$  minimal ist (entnommen aus [63]).

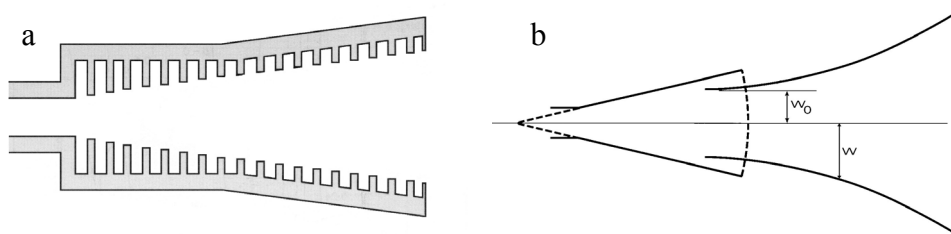


Abb. 6.3 a) Querschnitt eines Rillenhornstrahlers, b) Entstehung eines Gaußschen Strahls mit Hilfe eines Rillenhornstrahlers, eingezeichnet sind der Strahlradius  $w$ , die Strahltaile  $w_0$ , sowie gestrichelt die Wellenfront an der Hornöffnung (entnommen aus [63]).



Da bei einer Frequenz von 180 GHz kein Zirkulator in konventioneller Ferritbauweise erhältlich ist, wurde für das 180 GHz Spektrometer von der Firma *Radiometer Physics GmbH* (Meckenheim, Deutschland) ein quasioptischer Zirkulator aufgebaut. Der Aufbau ist in Abbildung 6.1 (Teil c) schematisch dargestellt.

Direkt auf dem Ausgang des letzten Frequenzverdopplers von 90 auf 180 GHz ist ein Rillenhornstrahler (Teil A, Abbildung 6.1) angebracht, welcher einen Gaußschen Strahl erzeugt. Das Horn hat eine Länge von 10,2 cm und die Öffnung einen Querschnitt von 16 mm. Der Abstand der Rillen beträgt ca. 1 mm, womit die verwendeten Rillenhornstrahler nicht der oben beschriebenen Optimalgeometrie entsprechen. Obwohl der Ausgang des Horns einen kreisförmigen Querschnitt aufweist, ist die MW-Strahlung dennoch linear polarisiert, da das Horn die Polarisationsrichtung nicht beeinflusst. Diese Strahlung trifft auf ein frei stehendes Polarisationsgitter (Teil 20, Abbildung 6.1) und wird vollständig reflektiert. Das Gitter besteht aus Wolframdrähten mit einem Durchmesser von 25  $\mu\text{m}$  in einem Abstand von 80  $\mu\text{m}$ . Anschließend trifft die Strahlung auf einen Faraday-Rotator<sup>12</sup> (Teil 21), welcher aus einer 2 mm dicken Keramikschiicht (*Ferroxdure 330*, [57]) besteht und die Polarisationsrichtung um 45° dreht [63,65]. Der reflektierte Strahl trifft auf einen fokussierenden Spiegel (Teil 22), welcher den Strahl in ein zweites Horn (B) fokussiert, welches auf der Oberseite des Probenhalters angebracht ist. Dieses Horn hat mit einer Länge von 6,9 cm und einem Querschnitt von 9,5 mm eine etwas andere Geometrie als das erste. Der Abstand der Rillen ist in etwa gleich groß. Mit Hilfe dieses Horns wird der Gaußsche Strahl wieder zurück auf die fundamentale Hohlleitermode transformiert.

Kommt die vom Resonator reflektierte Leistung wieder zurück, erzeugt dieses Horn wiederum einen Gaußschen Strahl, welcher auf den fokussierenden Spiegel trifft. Hiernach durchläuft der Strahl nochmals den Faraday-Rotator, wobei die Polarisationsrichtung abermals um 45° gedreht wird. Dies führt dazu, dass nun der reflektierte Strahl gegenüber dem ursprünglichen eine um 90° gedrehte Polarisationsebene aufweist, und nun vom Polarisationsgitter durchgelassen wird. Danach trifft der Strahl wiederum auf ein Horn, welches den Gaußschen Strahl wieder auf die Fundamentalmode transformiert. Auf diese Weise wurde mit optischen Elementen ein Zirkulator aufgebaut [66].

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Bauteilen befindet sich ein weiteres Polarisationsgitter direkt im Anschluss an das erste Horn, welches identisch mit dem oben beschriebenen ist (Teil 19, Abbildung 6.1). Dieses weitere Gitter ist drehbar um die Strahlachse gelagert und dient als variabler Abschwächer. Durch Veränderung des Winkels  $\alpha$  zwischen der Polarisationssebene und dem Polarisationsgitter wird die durchgelassene MW-Leistung mit  $\sin^2(\alpha)$  moduliert. Die maximale Leistung durchquert das Gitter, wenn der E-Vektor der elektromagnetischen Strahlung senkrecht zu den Drähten des Gitters orientiert ist, da in dieser Konfiguration keine Ströme in dem Gitter induziert werden können.

Da ein Teil der quasioptischen Komponenten fest mit der MW-Brücke verbunden ist, ein anderer Teil aber fest mit dem Probenkopf, muss es möglich sein, die Komponenten in einer reproduzierbaren Art und Weise miteinander zu verbinden. Aus diesem Grund ist der elliptische Hohlspiegel auf einer Grundplatte montiert, welche fest auf dem Probenkopf angebracht ist. Die Komponenten, die sich im Strahlengang zwischen dem Spiegel und der MW-Brücke befinden, sind auf einer zweiten Grundplatte fest montiert. Auf diese Weise

---

<sup>12</sup> Michael Faraday: 1791-1867

reduziert sich das Problem darauf, diese beiden Platten reproduzierbar zu verbinden. Das ist dadurch gewährleistet, dass sich diese beiden Platten auf gleicher Höhe befinden und mittels einer Nut und Führungsstiften gegeneinander geführt und verschraubt werden können.

Um die MW-Strahlung vom Ausgang des zweiten Rillenhornstrahlers zum Resonator zu transportieren, wird ein überdimensionierter Hohlleiter (WR-28) verwendet, welcher mittels zweier Übergangsstücke an den Hohlleiterausgang des Rillenhornstrahlers bzw. an den Resonator angebunden ist.

### 6.4 Der Resonator

Wie bereits erwähnt wurde, kann für Puls-EPR Experimente nicht auf einen Resonator verzichtet werden, da sonst nicht genug MW-Leistung am Probenort vorhanden ist. Andere Arbeitsgruppen haben häufig Fabry-Pérot Resonatoren für HF-EPR Spektrometer verwendet, bei 95 GHz [67,68], 250 GHz [61,69], 110 bis 330 GHz [70] und 360 GHz [58]. Dieser Resonatortyp hat den Vorteil, dass die Bauteile vergleichsweise groß sind gegenüber der Wellenlänge und damit der mechanische Aufbau einfacher ist. Der Nachteil ist, dass ein Fabry-Pérot Resonator nicht in der fundamentalen Mode betrieben wird, sondern in einer höheren. Dadurch bleibt ein großer Teil der MW-Leistung ungenutzt, und der Füllfaktor sowie der Konversionsfaktor verkleinern sich. Ein zweites Problem ist das Einbringen der Probe, da diese möglichst flach auf einen der beiden Spiegel aufgebracht werden muss, wodurch das Einbringen gefrorener Proben ausgeschlossen ist.

Ein weiterer Resonatortyp ist der *whispering gallery mode resonator*, welcher sich allerdings bislang in der EPR Spektroskopie nicht durchsetzen konnte, da beispielsweise die Probenpräparation viele interessante Proben prinzipiell ausschließt [71,72].

Aus diesen Gründen wird für das 180 GHz EPR-Spektrometer ein geschlossener zylindrischer Fundamentalmodenresonator verwendet, wie die Arbeitsgruppe von Y. Lebedev dieses erstmals 1983 bei 125 GHz getan hat [30] und auch andere Arbeitsgruppen ihn heute bei Frequenzen von 95 GHz [68,73] und 140 GHz [14] verwenden. Auch in dem einzigen kommerziell erhältlichen W-Band EPR-Spektrometer der Firma Bruker kommt ein solcher Resonator zum Einsatz [16,17]. Dieser Resonatortyp wird in der fundamentalen  $TE_{011}$ -Mode betrieben, die in Abbildung 6.4 gezeigt ist [55]. Bei dieser Mode laufen die Magnetfeldlinien entlang der Zylinderachse, sodass hier die Probe positioniert werden kann.

Die maximale Güte dieser Mode wird erzielt, wenn Durchmesser und Länge des Resonators gleich groß sind, für 180 GHz ergeben jeweils sich 2,2 mm [55].

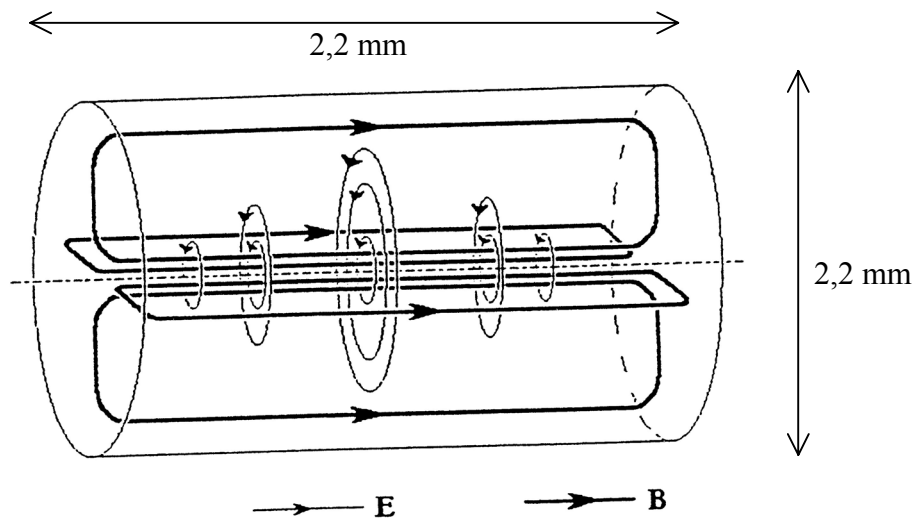


Abb. 6.4 Fundamentale  $TE_{011}$ -Mode eines Zylinderresonators (entnommen aus [10]). Die dünnen Linien stellen die Vektoren der elektrischen Feldstärke dar, die dickeren die magnetischen Feldlinien.

Die  $TE_{011}$ -Mode kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten angeregt werden. Bei der ersten befindet sich in einer der beiden Stirnseiten eine kleine Iris, in die von innen eine dünne Drahtspitze zeigt. In diesem Draht werden Wechselströme induziert, welche im Resonator die Mode anregen. Der Hohlleiter wird außen an der Iris vorbeigeführt. Eine variable Ankopplung wird dadurch erreicht, dass sich kurz hinter der Iris ein verstellbarer Hohlleiterabschluss befindet. Dieses Prinzip wird bei dem W-Band Resonator der Firma Bruker verwendet. Der Nachteil dieser Methode ist die sehr empfindliche Konstruktion der Drahtspitze, welche von innen in den Resonator gelötet werden muss. Außerdem kann das Probenröhrchen dann nicht durch den Resonator hindurchgesteckt werden, sondern kann nur auf einer Seite gehalten werden, was die Stabilität reduziert.

Wegen dieser Nachteile wurde für das aufgebaute 180 GHz Spektrometer die zweite Variante der Ankopplung gewählt. Die MW-Ankopplung an den querliegenden Resonator geschieht dabei mittels einer Iris in der Zylinderwand, welche sich direkt am Ende eines fundamentalen Hohlleiters befindet. In die Mitte der Iris kann eine schmale versilberte Teflonspitze eingelassen werden. Die Teflonplatte wird in einen Schlitten eingespannt, welcher wiederum mittels einer Spindel entlang vierer Führungsstäbe vertikal verschoben werden kann. Auf diese Weise wird eine variable Ankopplung realisiert. Der Ankopplungsmechanismus kann über eine Mechanik bedient werden, nachdem der Probenkopf in den Magneten eingebaut wurde. Ein ähnliches Prinzip wurde bereits bei 95 GHz in leicht veränderter Form verwendet [68]. Eine Darstellung des Resonators zusammen mit einem Probenröhrchen und der MW-Ankopplung ist in Abbildung 6.5 wiedergegeben.

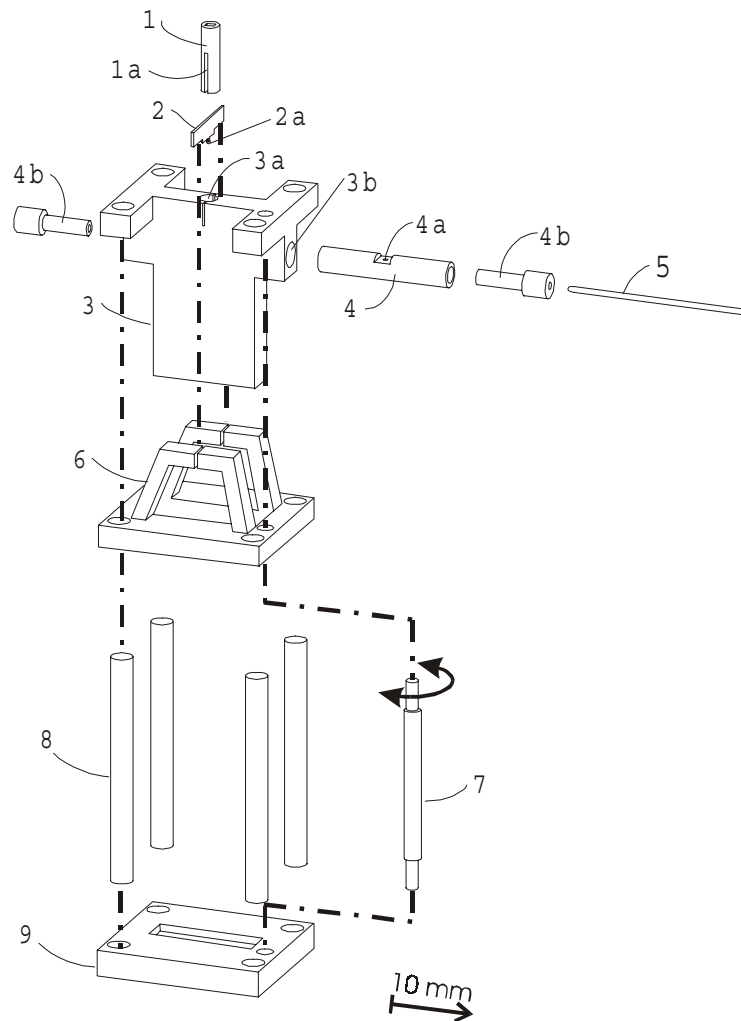


Abb. 6.5 Darstellung des Resonators zusammen mit dem Ankopplungsmechanismus. 1-fundamentaler Hohlleiter, 1a-Schlitz zur Aufnahme des Dielektrikums, 2-Dielektrikum (Teflon), 2a-silberüberzogene Spitze, welche in die Ankoppelöffnung gebracht werden kann, 3-Resonatorträger, 3a-Schlitz zur Führung des Dielektrikums, 3b-Öffnung zur Aufnahme des Resonators, 4-austauschbarer Resonator, 4a-Ankoppelöffnung, 4b-Stempel an den Stirnseiten des Resonators, 5-Probenröhrchen, 6-Träger zur Führung des Dielektrikums, 7-ferngesteuerte Gewindestange, 8-Führungsbolzen, 9-Grundplatte.

In der Praxis hat sich herausgestellt, dass der Resonator auch mit einer festen Ankopplung betrieben werden kann. Dabei wird die Teflonplatte, deren Spitze in die Iris zeigt, entfernt. Auch mit diesem Aufbau ist die MW-Ankopplung so gut, dass der leere Resonator kritisch angekoppelt werden kann, was bedeutet, dass sämtliche Leistung vom Resonator aufgenommen wird. Mit dieser Ankopplung werden Pulslängen von ca. 60 bis 80 ns für  $\pi/2$ -Pulse erzielt (vgl. Kapitel 7.5.1). Der Vorteil liegt in der einfacheren Handhabung, da die aufwendige Justierung entfällt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Spektren wurden mit einer festen Ankopplung ohne die Teflonspitze aufgenommen.

Beide Stempel an den Resonatorstirnseiten enthalten Längsbohrungen, mit denen die Probenröhrchen gehalten werden. Als Probenröhrchen werden Kapillaren aus Quarzglas (Suprasil) verwendet, wobei verschiedene Größen mit Innendurchmessern von 0,3 bis 0,5 mm

zur Verfügung stehen. Einer der beiden Stempel kann über eine Mechanik verschoben werden, wodurch auch nach dem Einbau des Probenkopfes die Eigenfrequenz des Resonators verstellt werden kann. Zu diesem Zweck befindet sich ein Hebel an der Außenseite des Stempels, welcher eine Drehbewegung einer Stange, die durch den oberen Flansch des Probenkopfes führt, in eine horizontale Bewegung des Stempels umsetzt. Auf der Oberseite des Flansches ist an der Stange wiederum ein Hebel befestigt, welcher mit einer Mikrometerschraube verstellt werden kann. Auf diese Weise wird verhindert, dass sich eine Längenänderung der Führungsstange, welche durch Temperaturänderungen hervorgerufen wird, auf die Eigenfrequenz des Resonators auswirkt.

Um auch mit diesem Probenkopf cw-Experimente durchführen zu können, befindet sich ober- bzw. unterhalb des Resonators ein Spulenpaar in Helmholtzgeometrie, mit dem eine Feldmodulation durchgeführt werden kann. Um Mikrophonieeffekte zu minimieren, sind die Modulationsspulen mit drei Führungsstangen an dem oberen Flansch befestigt. Der Resonator und alle anderen Teile sind mit drei weiteren Führungsstangen ebenfalls an dem Flansch befestigt, wodurch der mechanische Kontakt zwischen dem Resonator und den Modulationsspulen minimiert wird.



## 7 Eigenschaften des Spektrometers

### 7.1 Die Mikrowellenbrücke

#### 7.1.1 Anregung

Bei der Wahl der Art der MW-Quelle müssen verschiedene Faktoren wie Leistung, Phasen- und Frequenzstabilität berücksichtigt werden. In Abbildung 7.1 sind für verschiedene Arten von MW-Quellen die erzielten Leistungen wiedergegeben.

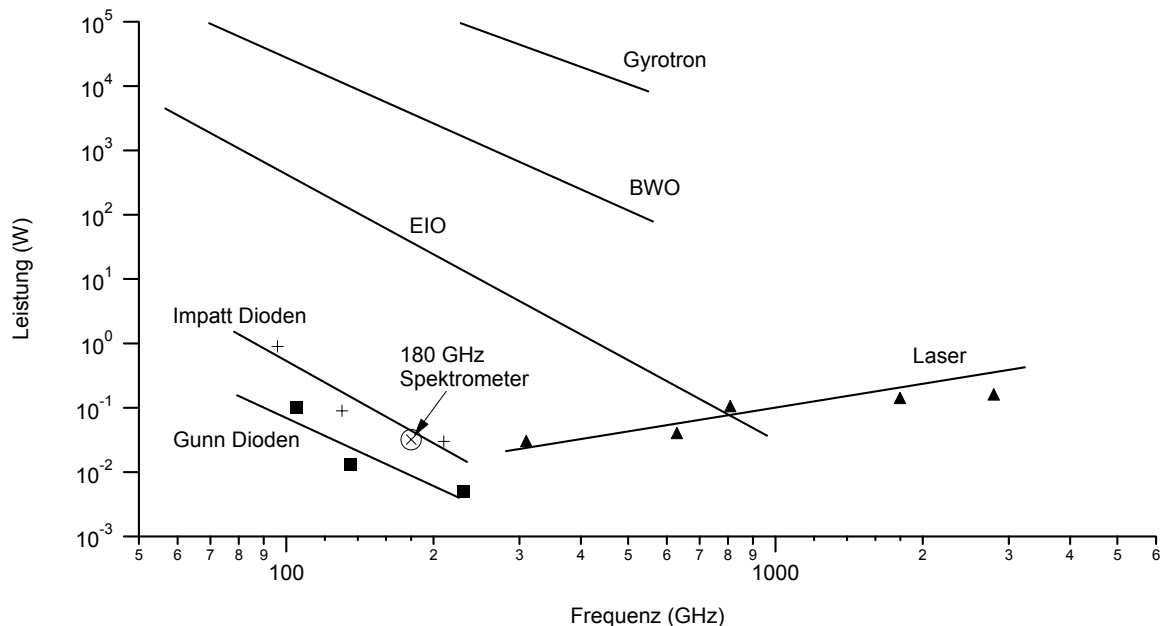


Abb. 7.1 Erzielbare Leistungen verschiedener MW-Quellen als Funktion der Frequenz. Die Abkürzungen bedeuten: BWO: *backward wave oscillator*, EIO: *extended interaction oscillator* (Daten von Dr. M. Bennati).

Wie weiter unten noch gezeigt wird, ist es vorteilhaft, möglichst viel MW-Leistung zur Verfügung zu haben, damit die Pulslängen so kurz wie möglich werden. Auf der anderen Seite wird es mit zunehmender MW-Leistung immer schwieriger, diese noch zu handhaben und beispielsweise Schalter zu erhalten, die solche Leistungen genügend schnell schalten können. Stattdessen können auch die MW-Quellen selber geschaltet werden, dadurch geht aber normalerweise die Phasenkohärenz zwischen den einzelnen Pulsen verloren. Aus diesen Gründen werden bislang in EPR-Spektrometern nur in Einzelfällen Hochleistungsquellen eingesetzt. FIR-Laser haben meistens Probleme mit Amplitudenrauschen, sodass auch diese nur selten verwendet werden. Für das aufgebaute 180 GHz Spektrometer wird daher das oben beschriebene Design verwendet, mit dem eine Ausgangsleistung von ca. 30 mW bei 180 GHz erzielt wird.

In der Anregungsseite der MW-Brücke sind bei 45 GHz mehrere Verstärker integriert, die nach dem *injection-locked* Verfahren arbeiten. Jeder einzelne dieser Verstärker hat nur einen eingeschränkten Frequenzbereich, innerhalb dessen er *geloockt* ist und stabil arbeitet. Aus diesem Grunde ist der Arbeitsbereich der gesamten Quelle auf  $(180 \pm 0,2)$  GHz eingeschränkt. Außerhalb dieser Bandbreite sind einzelne oder mehrere der Verstärker nicht mehr in ihrem Arbeitsbereich, was dazu führt, dass nicht mehr eine einzige Frequenz erzeugt wird, sondern ein breites Frequenzrauschen. Um solche Effekte zu untersuchen, ist in der Anregungsseite der MW-Quelle bei 90 GHz ein Richtkoppler integriert. An dieser Stelle kann beispielsweise mit Hilfe eines Mischkopfs ein Spektrumanalysator angeschlossen werden.

Mit dem Spektrumanalysator kann auch die erzeugte MW-Frequenz ausgelesen werden. In Abbildung 7.2 ist das Langzeitverhalten der MW-Quelle demonstriert. Dazu wurde alle halbe Sekunde ein Frequenzspektrum der Quelle aufgenommen und automatisch das Maximum detektiert und dessen Frequenz ausgelesen. Gezeigt ist die erzeugte Frequenz über einen Zeitraum von ca. 2,5 Tagen. Direkt nach dem Einschalten der Quelle ist zu erkennen, dass etwa zwei bis drei Stunden vergehen, bis die erzeugte Frequenz stabil ist. Nach dieser Einschaltphase liegen die Frequenzschwankungen innerhalb einer Bandbreite von etwa 1 MHz, was deutlich innerhalb der Resonatorbandbreite liegt. Auf die Magnetfeldstärke umgerechnet bedeutet dies eine Ungenauigkeit von 0,036 mT, wodurch die Reproduzierbarkeit von aufeinanderfolgenden oder sehr lange dauernden Messungen auf diesen Wert eingeschränkt wird. Bei den meisten Untersuchungen ist diese Ungenauigkeit kein Problem, da die betrachteten Signale deutlich größere Linienbreiten aufweisen. Sollen aber Signale mit einer entsprechend kleinen Linienbreite über mehrere Stunden aufgenommen werden, müssen die Frequenzschwankungen der MW-Quelle berücksichtigt werden.

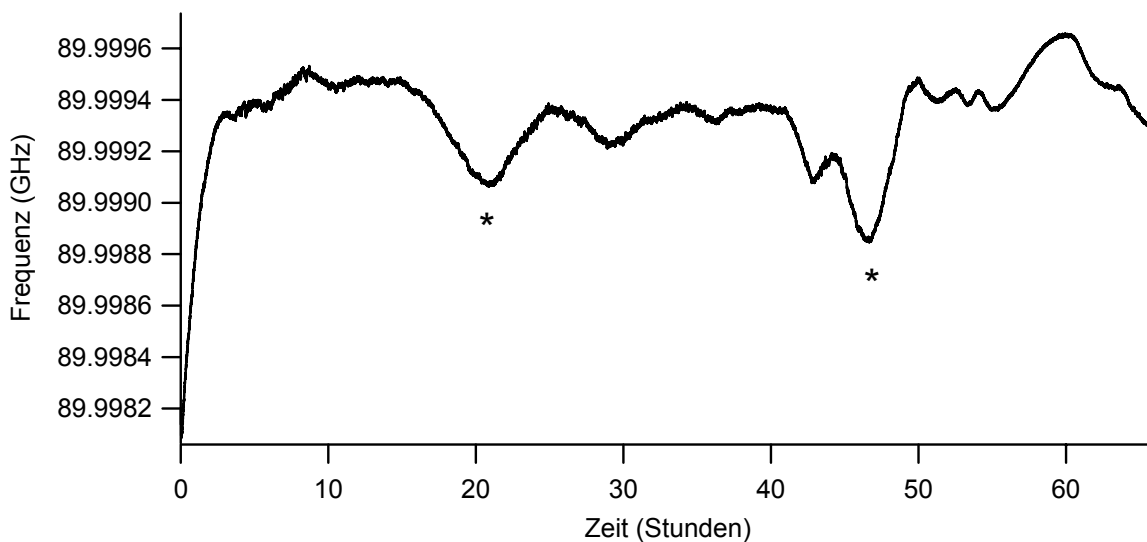


Abb. 7.2 Erzeugte MW-Frequenz der Quelle vor dem letzten Frequenzverdoppler in Abhängigkeit von der Betriebsdauer.

In Abbildung 7.2 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Frequenz mit einer Periodizität von ca. 24 Stunden kurzfristig kleiner wird, was mit zwei Sternen gekennzeichnet ist. Diese Zeit liegt in den Nachmittagsstunden, während der die Umgebungstemperatur im Labor am größten ist. Dieser Effekt kann zwei verschiedene Ursachen haben. Zum einen können durch Temperaturschwankungen Längenänderungen des Resonators verursacht werden, welcher zur



Frequenzstabilisierung dient. Wird die Umgebungstemperatur größer, so dehnt sich der Resonator aus und die Frequenz nimmt ab. Eine andere mögliche Erklärung für die Schwankungen der MW-Frequenz ist die Temperaturabhängigkeit des Gunn-Effekts. Sollen die Frequenzschwankungen der MW-Quelle weiter reduziert werden, muss die Quelle also temperaturstabilisiert werden, was beispielsweise mit einer Wasserkühlung erreicht werden könnte.

Der bei 90 GHz in die MW-Brücke integrierte Schalter hat eine Isolation von  $\approx 55$  dB. In Abbildung 7.3 ist dessen Schaltverhalten demonstriert. Dargestellt ist die Leistung, die von einem nicht angepassten Resonator reflektiert wird. Die Schaltflanken beim Einschalten betragen ca. 3 ns, beim Ausschalten ca. 5 ns. Die minimale Pulslänge beträgt 15 ns, bei kürzeren Schaltzeiten öffnet der Schalter nicht.

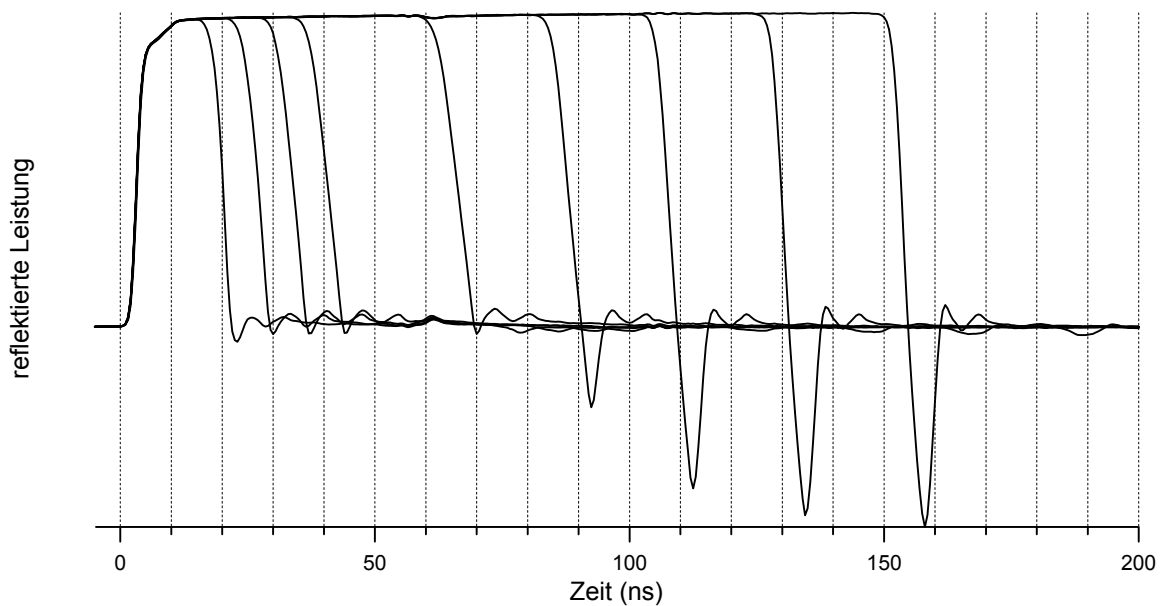


Abb. 7.3 Schaltverhalten des MW-Schalters bei verschiedenen langen Pulsdauern. Gezeigt sind Pulse mit 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 125 und 150 ns Länge.

### 7.1.2 Detektion

Die Rauschzahl eines Bauteils ist das Verhältnis zwischen dem S/N am Eingang zu dem S/N am Ausgang des Bauteils. Somit ist ein Bauteil umso besser je kleiner dessen Rauschzahl ist. Sind mehrere signalverarbeitende Bauteile mit den Rauschzahlen  $F_i$  und den Verstärkungsfaktoren  $G_i$  hintereinander geschaltet, so ergibt sich die Rauschzahl der gesamten Anordnung aus [74]

$$F_{ges} = F_1 + \frac{F_2 - 1}{G_1} + \frac{F_3 - 1}{G_1 G_2} + \dots + \frac{F_n - 1}{G_1 G_2 \dots G_{n-1}}. \quad (7.1)$$

Die Rauschzahl der Detektion des aufgebauten Spektrometers ist im Wesentlichen bestimmt durch den Konversionsverlust des ersten Detektionsmischers (Teil 13 in Abbildung 6.1),

welcher  $\leq 9$  dB beträgt. Nach dem Detektionsmischer folgt ein Verstärker mit 32 dB Verstärkung, somit fallen alle nachfolgenden Bauteile nicht mehr so stark ins Gewicht. Werden die Verluste beim Transport der Mikrowelle vom Resonator zum Detektionsmischer sowie die Verluste oder Verstärkungsfaktoren aller nachfolgenden Bauteile berücksichtigt, so kann eine Rauschzahl von 13 dB für den gesamten Detektionsarm der MW-Brücke abgeschätzt werden.

Für eines der ersten Puls HF-EPR Spektrometer, welches in Leiden gebaut wurde und bei 95 GHz arbeitet, wurde eine Rauschzahl von 16,8 dB angegeben [12]. Zwei weitere selbstgebaute Spektrometer in Berlin (95 GHz) und am MIT in Boston (140 GHz) haben Rauschzahlen von 15 dB bzw. 10 dB [15,14].

### 7.2 Die Quasioptischen Komponenten

Wie weiter unten noch erläutert wird, ist die am Resonator ankommende MW-Leistung zusammen mit dessen Konversionsfaktor entscheidend für die erzielten Pulslängen und damit für die Zeitauflösung des Spektrometers im Pulsbetrieb. Aus diesem Grunde müssen die intrinsischen Verluste der optischen Komponenten und der Komponenten, welche die Strahlung zum Resonator transportieren, so gering wie möglich gehalten werden.

Der quasioptische Zirkulator hat für einen einzelnen Durchlauf einen Verlust von ca. 1,4 dB. Etwa die Hälfte davon entfällt auf den Faraday-Rotator, die übrigen Verluste entstehen durch Kreuzpolarisation und nicht optimale Justierung der optischen Komponenten. Zum Vergleich für diese Zahl: Ein konventioneller Zirkulator für 140 GHz in Ferritbauweise hat einen intrinsischen Verlust von 2,0 dB [75]. Für einen vergleichbaren quasioptischen Vier-Kanal-Zirkulator, der allerdings bei 90 GHz arbeitet, wurde ein intrinsischer Verlust von 0,5 dB angegeben [66].

Der in den Zirkulator integrierte optische Abschwächer hat eine vernachlässigbare Dämpfung, im Vergleich zu einem W-Band Abschwächer in konventioneller Hohlleiterbauweise, der einen Verlust von bis zu 1 dB aufweist [75]. Dagegen ist die maximale Abschwächung, die mit diesem Aufbau erreicht werden kann, abhängig von der Genauigkeit der Orientierung und der Stärke der Kreuzpolarisation des Gaußschen Strahls.

Für den Transport der MW-Strahlung vom Flansch des Probenkopfes zum Resonator wird kein fundamentaler Hohlleiter verwendet, da dieser bei der erforderlichen Länge von ca. 70 cm einen theoretischen Verlust von 5 dB für einen einzelnen Durchlauf hätte [74]. Der statt dessen verwendete überdimensionierte Hohlleiter weist inklusive der beiden Übergangsstücke einen Verlust von 0,8 dB für einen einzelnen Durchgang auf.

Die Gesamtverluste für einen einzelnen Durchlauf vom Ausgang des letzten Frequenzverdopplers bis zum Resonator belaufen sich damit auf  $\approx 2,4$  dB. Zum Vergleich: Für ein EPR-Spektrometer, welches bei 140 GHz mit einem konventionellen Zirkulator betrieben wird, wurde für diese Strecke ein Verlust von 8 bis 9 dB angegeben [76]. Für zwei andere HF-EPR Spektrometer, die mit vergleichbaren quasioptischen Komponenten arbeiten, wurden Verluste von  $\approx 1$  dB (90 GHz [57]) bzw. 2,5 dB (360 GHz [58]) angegeben. Dieser Vergleich zeigt, warum bei diesen Frequenzen auf quasioptische Komponenten nicht verzichtet werden kann.

In Abbildung 7.4 ist ein Modenbild des Resonators gezeigt. Zu erkennen sind auch stehende Wellen auf beiden Seiten des Resonator dips. Aus dem Abstand der stehenden Wellen lässt sich ableiten, dass diese sich zwischen den beiden Übergängen vom fundamentalen zum überdimensionierten Hohlleiter ausbilden. Prinzipiell wirken sich die stehenden Wellen nicht nachteilig auf die Eigenschaften des Spektrometers aus, solange die verwendete MW-Frequenz nicht genau in einem Minimum einer solchen stehenden Welle liegt. In diesem Fall wird ein Teil der Leistung, welche in dem Hohlleiter transportiert wird, von den stehenden Wellen absorbiert und steht damit am Resonator nicht mehr zur Verfügung.

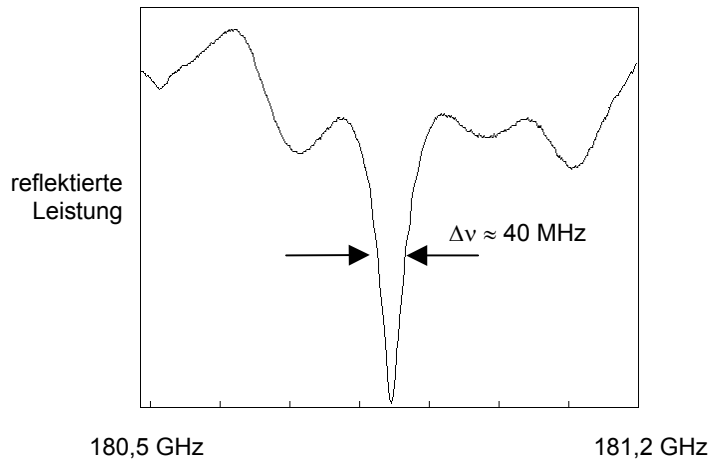


Abb. 7.4 Modenbild des Resonators zur Verdeutlichung der Güte. Zu erkennen sind auch die im Text erwähnten stehenden Wellen.

### 7.3 Der Resonator

Die Eigenschaften eines MW-Resonators für die EPR-Spektroskopie werden durch verschiedene Größen bestimmt. Das sind der Füllfaktor, die Güte und der Konversionsfaktor.

Der Füllfaktor eines Resonators ist definiert als

$$\eta = \frac{V_S \langle B_1^2 \rangle_S}{V_R \langle B_1^2 \rangle_R}, \quad (7.2)$$

er ist also ein Maß dafür, wie viel Raum die Probe innerhalb des effektiven Volumens einnimmt. Die Indizes S und R bezeichnen die Probe bzw. den Resonator, V ist das Volumen,  $B_1$  ist das oszillierende Magnetfeld im Resonatorinnern, und die eckigen Klammern stehen für eine räumliche und zeitliche Mittelung.

Der Füllfaktor des 180 GHz Resonators kann mit einem Verfahren abgeschätzt werden, welches ausführlich in [55] beschrieben wird. Für die typischerweise verwendeten Probenröhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,3 mm ergibt sich ein Füllfaktor von  $\eta = 0,09$ . In Tabelle 7.1 sind für die verwendeten Probenröhrchen sowohl das Probenvolumen als auch der Füllfaktor aufgelistet.

$\varnothing_i$ (mm)	$\varnothing_a$ (mm)	$V_S$ ( $\mu$ l)	$\eta$
0,3	0,40	0,16	0,09
0,4	0,55	0,28	0,16
0,5	0,70	0,43	0,25

Tab. 7.1 Probenvolumen und abgeschätzter Füllfaktor des Resonators für verschiedene Probenröhrchen.

Die Güte eines Resonators kann ausgedrückt werden als der Quotient der Resonanzfrequenz und der Halbwertsbreite der Resonatormode, wie sie in Abbildung 7.4 eingetragen ist. Die Güte des leeren Resonators ist in der Größenordnung von 2500 bis 4500, wie es aus Abbildung 7.4 ersichtlich ist. Wird eine Probe in den Resonator eingebracht, verringert sich dessen Güte nur unwesentlich, lediglich die Ankopplung wird schlechter. Während mit einem leeren Resonator eine kritische Ankopplung erzielt werden kann, bei der keine Leistung reflektiert wird, gilt dies nicht für den geladenen Resonator mit einer festen Ankopplung.

Der Konversionsfaktor eines MW-Resonators beschreibt den Anteil der ankommenden MW-Leistung, welcher in den Resonator gelangt. Für den Zusammenhang zwischen dem im Innern des Resonators erzeugten Wechselfeld und der von außen anliegenden MW-Leistung gilt folgender Zusammenhang [15]:

$$B_1 = c\sqrt{QP_0} . \quad (7.3)$$

$B_1$  bezeichnet das Magnetfeld im Resonatorinnern,  $c$  ist der Konversionsfaktor des Resonators,  $Q$  die Güte und  $P_0$  die von außen anliegende MW-Leistung. Da die  $B_1$ -Feldstärke invers proportional zur benötigten Pulslänge bei Puls-Experimenten ist, kann der Konversionsfaktor mit Hilfe der Gleichungen (2.11), (2.17) und (7.3) abgeschätzt werden. Mit einer Pulslänge von ca. 60 ns für einen  $\pi/2$ -Puls (vgl. Kapitel 7.5.1), einer anliegenden Leistung von 15 mW und einer Resonatorgüte von 3000 kann ein Konversionsfaktor von  $30 \mu\text{T/W}^{1/2}$  abgeschätzt werden.

Der Konversionsfaktor eines Resonatortyps ist abhängig von der verwendeten MW-Frequenz [15]:

$$c \propto \sqrt{\frac{\mu_0}{V_R v_{MW}}} \approx v_{MW} \sqrt{\mu_0} , \quad (7.4)$$

wobei  $\mu_0$  die Vakuumpermeabilität ist. Verglichen mit einem W-Band Resonator, für den ein Konversionsfaktor von  $50 \mu\text{T/W}^{1/2}$  angegeben wurde [15], sollte nach Gleichung (7.4) für den 180 GHz Resonator ein Wert von ca.  $100 \mu\text{T/W}^{1/2}$  erwartet werden. Dass der tatsächliche Wert einen Faktor drei kleiner ist, liegt vermutlich daran, dass die Probe zusammen mit dem Probenröhrchen ein vergleichsweise großes Volumen im Resonator einnimmt. Dadurch kommt es zu einer Störung der idealen Feldverteilung im Resonator, wodurch sowohl die MW-Leistung als auch die Homogenität am Probenort reduziert werden. Dieser Effekt kann auch bei einem vergleichbaren zylindrischen Resonator für 140 GHz beobachtet werden, für den ein Konversionsfaktor von  $40 \mu\text{T/W}^{1/2}$  bestimmt wurde [56].

Möglicherweise zeigt dieser Vergleich die Limitationen, die bei der Verwendung dieses Resonatortyps bei immer höheren MW-Frequenzen auftreten. Zum einen werden die Ausmaße des Resonators immer kleiner, sodass die Handhabung immer diffiziler wird. Auf der anderen Seite wird das relative Volumen der Probe innerhalb des Resonators immer größer, wodurch es zu einer zunehmenden Störung der Resonatormode kommt.

## 7.4 Genauigkeit der Bestimmung von g-Werten

Ein wesentlicher Grund, HF-EPR zu betreiben, ist die Erhöhung der spektralen Auflösung bei Proben, die eine g-Tensor Anisotropie aufweisen (vgl. Abbildung 2.5). Um den g-Wert eines Signals zu bestimmen, müssen sowohl die verwendete MW-Frequenz als auch das absolute Magnetfeld bekannt sein. Da in Kapitel 4 gezeigt wurde, dass der verwendete supraleitende Magnet eine Hysterese aufweist, deren Stärke von den jeweiligen Messparametern abhängt, ist es nicht möglich, durch Bestimmung des Spulenstroms das absolute Magnetfeld zu ermitteln. Sollen die g-Werte einer Probe bestimmt werden, muss statt dessen ein Verfahren verwendet werden, welches in [68] beschrieben wurde. Zu diesem Zweck wird der Probe eine zusätzliche paramagnetische Spezies hinzugegeben, welche mehrere Signale mit bekannten g-Werten aufweist. Mit dieser Probe kann eine Feldeichung vorgenommen werden.

Als Feldstandard wird typischerweise  $\text{Mn}^{2+}$  in MgO verwendet, da diese Probe zum einen starke Signale liefert und somit nur sehr wenig Probenmenge benötigt wird. Außerdem hat das  $\text{Mn}^{2+}$ -Ion sechs Signale, die über einen Bereich von ca. 50 mT verteilt sind, somit kann dieser Bereich für Messungen verwendet werden, bei denen g-Werte bestimmt werden sollen. Die Positionen der sechs Signale sind gegeben durch [68]

$$B_{m_I} = B_{Mn} - am_I - \frac{a^2}{2B_{Mn}} [I(I+1) - m_I^2], \quad (7.5)$$

wobei  $B_{Mn}$  den Schwerpunkt des Manganspektrums bezeichnet.

In [68] ist der g-Wert des Manganstandards mit einer relativen Genauigkeit von  $2,5 \times 10^{-5}$  angegeben. Die verwendete MW-Frequenz muss während des Experiments mit dem in Kapitel 7.1.1 beschriebenen Aufbau gemessen werden. Die langfristigen Frequenzschwankungen betragen maximal 1 MHz, was einer relativen Ungenauigkeit von  $5 \times 10^{-6}$  entspricht. Die kurzfristigen Instabilitäten sind mindestens eine Größenordnung kleiner, was verdeutlicht, dass die MW-Frequenz nicht der genauigkeitsbestimmende Faktor ist. Der Abstand zweier Signale wird über den Abstand zweier Manganlinien kalibriert, welcher in erster Näherung durch die Hyperfeinkopplungskonstante des  $\text{Mn}^{2+}$  gegeben ist. Diese ist in [68] mit einer relativen Genauigkeit von  $3 \times 10^{-4}$  angegeben. Aus den gemachten Angaben lässt sich abschätzen, dass sich bei optimalen Bedingungen der g-Wert eines Signals mit einer Genauigkeit von maximal  $\approx 5 \times 10^{-5}$  bestimmen lässt.

Ein Beispiel für die Bestimmung von g-Werten wird in Kapitel 10.2 gezeigt.

## 7.5 Empfindlichkeit im Puls-Betrieb

Für die Qualität eines Puls-EPR Spektrometers sind zwei verschiedene Kriterien entscheidend. Das ist zum einen die Zeitauflösung, welche durch die Pulslängen und die Totzeit bestimmt wird, und zum anderen die Empfindlichkeit, also die Signalintensität, die mit einer gegebenen Probe erzielt werden kann. Zunächst soll auf die Zeitauflösung eingegangen werden.

### 7.5.1 Zeitauflösung

Die Zeitauflösung wird hauptsächlich durch die Länge der MW-Pulse bestimmt, welche wiederum mit der MW-Leistung am Probenort zusammenhängen. Nach Gleichung (7.3) ist die Pulslänge durch den Konversionsfaktor des Resonators sowie die verfügbare MW-Leistung bestimmt. Experimentell wird die optimale Pulslänge dadurch bestimmt, dass beispielsweise bei einem stimulierten Echo die Pulslängen so eingestellt werden, dass die Echointensität maximal ist. In diesem Fall betragen alle Pulslängen genau  $\pi/2$ .

Mit dem beschriebenen Aufbau betragen typische  $\pi/2$ -Pulslängen ca. 60 bis 80 ns für Systeme mit  $S=1/2$ .

Für ein Spektrometer, das bei 140 GHz betrieben wird, wurde eine Pulslänge von 60 bis 70 ns angegeben [76], für ein selbstgebautes W-Band Spektrometer wurden 40 ns bestimmt [15].

Für die Zeitauflösung eines Spektrometers ist neben den Pulslängen auch die Totzeit entscheidend. Damit wird allgemein die Zeit bezeichnet, die nach einem MW-Puls vergeht, bevor ein Signal detektiert werden kann. Zur Verdeutlichung der Totzeit des aufgebauten Spektrometers ist in Abbildung 7.5 ein FID-Signal an  $Mn^{2+}$ -Ionen in MgO gezeigt. Nach dem Puls vergeht eine Totzeit von etwa 20 ns, bevor der FID zu erkennen ist.

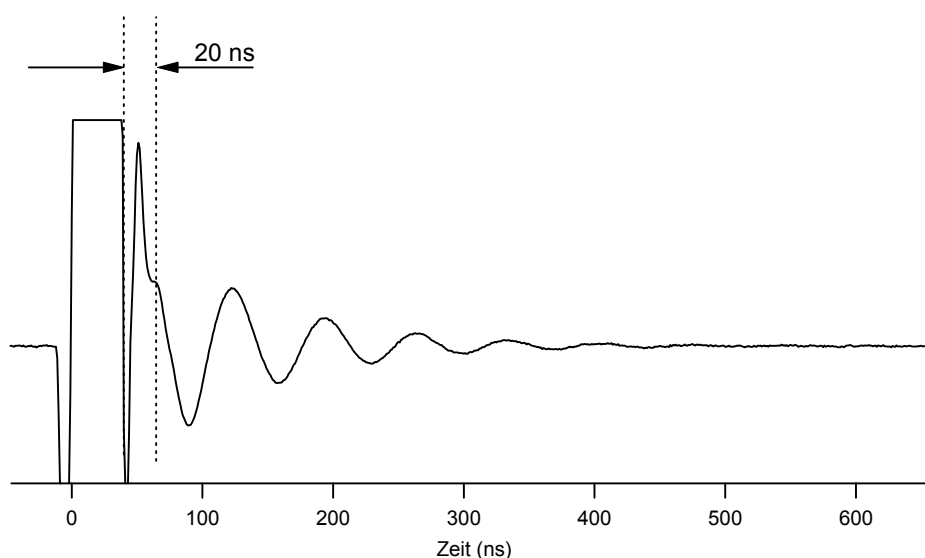


Abb. 7.5 Off-resonanter FID einer  $Mn^{2+}$  Probe in MgO bei  $T = 60$  K. Die Pulslänge beträgt 35 ns. Gezeigt sind 10 Mittelungen. Die Totzeit ist mit gestrichelten Linien markiert und beträgt etwa 20 ns.

Der angegebene Wert von 20 ns ist nur ein grober Richtwert, der stark von der jeweiligen Probe und den Messparametern abhängen kann. In [15] wird beispielsweise beschrieben, wie mit Hilfe eines Differenzverfahrens die Totzeit deutlich verringert werden kann.

Verglichen mit X-Band Spektrometern ist die Totzeit bei hohen MW-Frequenzen wesentlich kleiner. Das liegt im Wesentlichen daran, dass aufgrund der geringeren MW-Leistungen während der MW-Pulse der Detektionsarm nicht gesättigt ist. Bei X-Band Spektrometern ist auch nach dem MW-Puls noch innerhalb einer Zeit von zehn bis 100mal der Resonatorabklingzeit die Detektion gesättigt, wodurch die Spektrometertotzeit bestimmt wird. Ein weiterer Grund ist, dass bei gleicher Resonatorgüte mit zunehmender MW-Frequenz die Resonatorbandbreite linear zunimmt. Die Resonatorabklingzeit, welche invers proportional zur Bandbreite ist, nimmt somit ab. Für eine Resonatorbandbreite von 50 MHz ergibt sich bei 180 GHz eine Resonatorabklingzeit von  $\approx 3$  ns, wodurch deutlich wird, dass dieser Effekt bei hohen MW-Frequenzen vernachlässigbar ist.

Sowohl die Sättigung der Detektion als auch die Resonatorabklingzeit spielen bei hohen MW-Frequenzen keine Rolle mehr, sodass hier die Zeitauflösung des Spektrometers durch die Störungen an den Pulsflanken bestimmt wird. Für ein selbstgebautes W-Band Spektrometer wurde eine Zeitauflösung von 5 bis 20 ns angegeben, welche mit der für das 180 GHz Spektrometer vergleichbar ist [15]. In der gleichen Veröffentlichung wird auch ein Beispiel gezeigt, in dem ein FID-Signal bereits 3 ns nach dem Pulsende detektiert werden kann.

### 7.5.2 Empfindlichkeit

Während im cw-Betrieb die Eigenschaften der MW-Quelle Einfluss auf die Empfindlichkeit des Spektrometers haben, ist dieses im Pulsbetrieb nicht der Fall, da zum Zeitpunkt der Datenaufnahme der MW-Schalter geschlossen ist. Der Schalter selber hat eine Isolation von 55 dB. Da der nachfolgende Frequenzverdoppler ein nicht-lineares Bauteil ist, beträgt der Abstand zwischen ein- und ausgeschalteter MW-Quelle mindestens 60 dB bei 180 GHz.

Es hat sich als nützlich herausgestellt, die Empfindlichkeit im Puls-Betrieb mit dem S/N-Verhältnis eines Echos in einem Einzelschussexperiment zu bestimmen [9]. Die Empfindlichkeit ist damit ein Maß dafür, wie viele Spins benötigt werden, um in einem Einzelschussexperiment ein S/N-Verhältnis von 1 zu erzielen. Dabei muss noch auf die Breite des Signals normiert werden. In Tabelle 7.2 sind für verschiedene Proben die mit dem aufgebauten Spektrometer jeweils erzielten Empfindlichkeiten wiedergegeben.

Probe	Temperatur	Empfindlichkeit (Spins/mT)	Methode
BDPA in Toluol, 150 $\mu$ M	20 K	$8,7 \times 10^{10}$	3-Puls Echo
TEMPO in Wasser/Glycerol	15 K	$1 - 2 \times 10^{10}$	3-Puls Echo
Y $\cdot$ in RNR	15 K	$1,4 \times 10^{10}$	3-Puls Echo

Tab. 7.2 Bestimmung der Empfindlichkeit im Pulsbetrieb mit verschiedenen Proben. Abkürzungen: Y $\cdot$ : Tyrosyl-Radikal, RNR: Ribonukleotid Reduktase aus *E.coli*. Die Strukturen von BDPA und TEMPO sind im Anhang A.6 wiedergegeben.

Als Durchschnitt verschiedener Messungen kann eine Empfindlichkeit von 1 bis  $10 \times 10^{10}$  Spins/mT bestimmt werden.

Die Performance des Spektrometers im Pulsbetrieb ist in Abbildung 7.6 demonstriert. Gezeigt ist ein 3-Puls Echo eines Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexes bei T = 20 K (vgl. Kapitel 9). Der Abstand zwischen den Pulsen beträgt jeweils 150 ns und die Pulslängen sind 20 ns. Das Probenröhrchen hat einen Innendurchmesser von 0,3 mm, die Probe hat eine Konzentration von 1 mM.

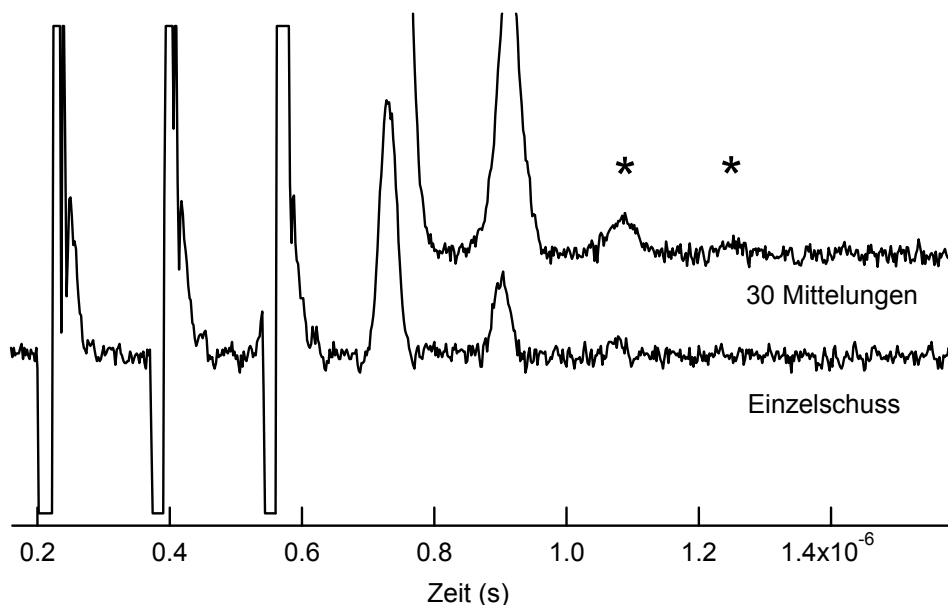


Abb. 7.6 3-Puls Echo eines Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexes bei T = 20 K. Die Pulslängen betragen 20 ns mit einem Abstand von 150 ns. Die untere Messung ist ein Einzelschussexperiment, die obere wurde über 30 Wiederholungen gemittelt. Die mit einem Stern gekennzeichneten Echos stammen von Magnetisierungseffekten der Probe. Die Anzahl der Spins beträgt ca.  $1,5 \times 10^{10}$  Mol.

Das erste und stärkste Echo ist das stimulierte 3-Puls Echo, das zweite Echo ist ein 2-Puls Echo des ersten und des dritten Pulses. Zu erkennen sind noch zwei weitere Echos, welche mit einem Stern gekennzeichnet sind. Diese sind darauf zurückzuführen, dass die Probe stark magnetisiert wird und diese Magnetisierung selber wieder wie ein MW-Puls wirkt. Solche Effekte spielen eine zunehmende Rolle bei höheren Magnetfeldern und MW-Frequenzen aufgrund der höheren Güte des Resonators, des hohen Füllfaktors  $\eta$  und der stärkeren Probenmagnetisierung. Bereits 1958, also kurz nach der Demonstration des ersten Puls-EPR Experiments wurde dieser Effekt beobachtet [77]. Auch bei der bislang höchsten Frequenz von 604 GHz, bei der ein Puls-EPR Experiment demonstriert wurde, konnte dieser Effekt beobachtet werden [19].

## 7.6 Empfindlichkeit im cw-Betrieb

Um mit dem Resonatoraufbau cw-Experimente durchführen zu können, sind wie in Kapitel 6.4 beschrieben Modulationsspulen angebracht. Wie bei dem Transmissionsaufbau wurde zunächst mit Mn<sup>2+</sup> in MgO die Spulenkonstante der Modulationsspulen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 7.7 wiedergegeben.



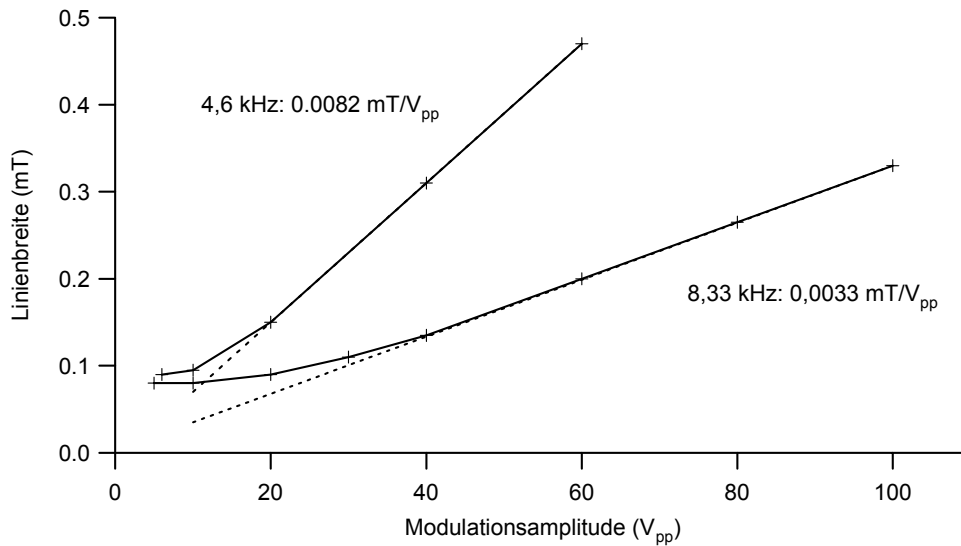


Abb. 7.7 Bestimmung der Spulenkonstante bei zwei verschiedenen Modulationsfrequenzen.

Der Effekt der abnehmenden Spulenkonstante bei zunehmender Modulationsfrequenz ist auf Gegeninduktion in den Resonatorwänden zurückzuführen. Durch das von den Modulationsspulen erzeugte Wechselfeld werden in den Resonatorwänden Ströme induziert, die dem von außen angelegten Feld entgegenwirken, es also abschirmen. Je höher nun die Modulationsfrequenz, desto schneller sind die zeitlichen Änderungen des angelegten Wechselfeldes und desto effektiver ist die Induktion. Aus diesem Grund ist die Verwendung hoher Modulationsfrequenzen bei außerhalb des Resonators angebrachten Modulationsspulen schwierig. Bei einem typischen rechteckigen X-Band Resonator dagegen sind die Modulationsspulen im Innern des Resonators untergebracht, sodass hier die Erzeugung der Feldmodulation wesentlich effektiver ist.

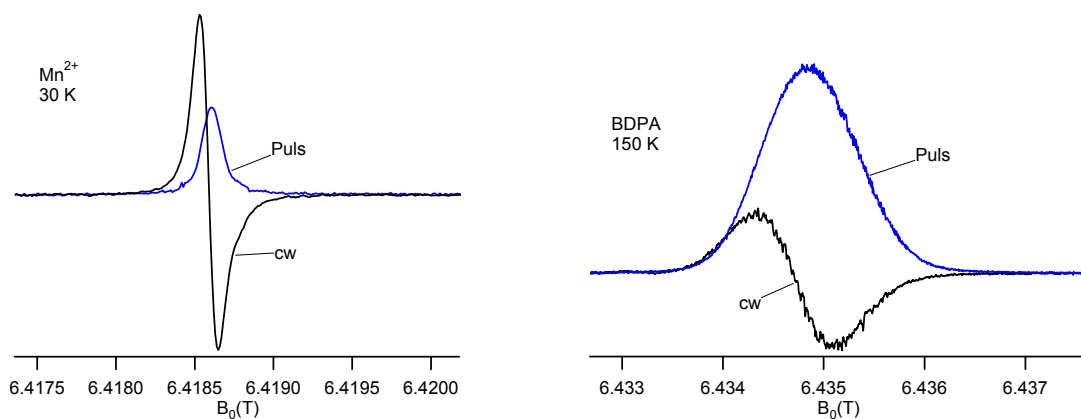


Abb. 7.8 Vergleich zwischen Spektren, die im cw- und im Puls-Betrieb aufgenommen worden sind. Die Spektren wurden so normiert, dass das Rauschen jeweils die gleiche Amplitude hat. Links ist eine der sechs Linien von  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen in MgO bei 30 K gezeigt, rechts die Spektren von BDPA in Polystyrol bei 150 K. Bei dem *Fieldswept*-Experiment am  $\text{Mn}^{2+}$  wurden 16 Mittelungen durchgeführt, bei der BDPA-Probe wurde ein Einzelschussexperiment durchgeführt. Die cw-Experimente wurden mit einer Modulationsfrequenz von 4,6 kHz durchgeführt.

Mit BDPA in einer Polystyrolmatrix und  $Mn^{2+}$ -Ionen in MgO wurde die Empfindlichkeit des Spektrometers im cw-Betrieb mit der im Puls-Betrieb verglichen. Diese Vergleiche sind in Abbildung 7.8 dargestellt. Bei den cw-Experimenten wurden die MW-Leistung und die Modulationsamplitude jeweils so gewählt, dass das maximale S/N-Verhältnis erhalten wird, ohne die Linienform zu verändern. Die cw-Experimente wurden mit einer Zeitkonstanten des Lock-In Verstärkers von 1 s durchgeführt.

Bei der Messung am  $Mn^{2+}$  ist das S/N-Verhältnis der cw-Messung ca. einen Faktor vier besser als bei dem Puls-Experiment. Wird berücksichtigt, dass bei dem Puls-Experiment 16 Mittelungen pro Datenpunkt durchgeführt worden sind, und dass die Messung etwa 1,5 mal so lange gedauert hat, so ergibt sich ein um den Faktor 24 besseres S/N-Verhältnis für das cw-Experiment.

Bei der Messung am BDPA ist dagegen das S/N-Verhältnis des Puls-Experiments besser als beim cw-Experiment. Unter der Berücksichtigung der verschieden langen Messzeiten weist das Puls-Experiment ein um den Faktor 1,5 besseres S/N-Verhältnis auf.

Die unterschiedlichen Ergebnisse für die beiden Proben können mit den unterschiedlichen Linienbreiten erklärt werden. Für die mit etwa 0,1 mT relativ schmale Linie des  $Mn^{2+}$ -Systems ist es einfacher, eine optimale Modulationsamplitude zu erreichen. Die BDPA-Probe hat dagegen eine Linienbreite von ca. 0,75 mT, wodurch eine etwa sieben mal so große Modulationsamplitude verwendet werden sollte, um ein optimales S/N-Verhältnis zu erzielen. Bei diesen großen Modulationsamplituden treten vermutlich starke Mikrophonieeffekte auf, was zu Linienverbreiterungseffekten führt. Ein Hinweis auf starke Mikrophonieeffekte ist auch die Tatsache, dass bei den betrachteten Modulationsfrequenzen und -amplituden ein starkes Pfeifen zu hören ist, was auf mechanische Schwingungen des Probenkopfs hindeutet.

Für Proben mit schmalen EPR-Signalen ist also die Empfindlichkeit im cw-Betrieb besser als bei Puls-Experimenten. Diese Aussage gilt aber nur für schmale EPR-Signale mit maximal 0,2 bis 0,3 mT Linienbreite, bei denen es möglich ist, eine optimale Modulationsamplitude einzustellen. Bei breiten Signalen ist dieses nicht möglich, da das von den Modulationsspulen erzeugte magnetische Wechselfeld dafür zu klein ist. Bei solchen Systemen wird also ein Puls-Experiment empfindlicher sein.

Mit den genannten Einschränkungen ist die Empfindlichkeit im cw-Betrieb etwa um den Faktor 20 größer als bei Puls-Experimenten, was zu einer Abschätzung der Empfindlichkeit von  $5\text{-}50 \times 10^8$  spins/(mT $\sqrt{\text{Hz}}$ ) führt. Wie gesagt, gilt diese Angabe nur für Proben mit schmalen Linienbreiten.

Für ein selbstgebautes W-Band Spektrometer mit Zylinderresonator wurde eine cw-Empfindlichkeit von  $4 \times 10^8$  spins/(mT $\sqrt{\text{Hz}}$ ) angegeben [15], was etwa eine Größenordnung empfindlicher ist als ein Spektrometer bei 140 GHz, für welches  $1,4 \times 10^9$  spins/(mT $\sqrt{\text{Hz}}$ ) angegeben wurden [76]. Für das einzige kommerziell erhältliche W-Band Spektrometer der Firma Bruker wird eine cw-Empfindlichkeit von  $2 \times 10^8$  spins/(mT $\sqrt{\text{Hz}}$ ) bestimmt [17].

Die theoretische Empfindlichkeit eines EPR-Spektrometers im cw-Betrieb ist gegeben durch

$$N^* = \frac{c_1 (k_B T)^{3/2} V_S}{Q \eta B_0} \sqrt{\frac{F_{\text{Det}} \Delta f}{P_0}}, \quad (7.6)$$

wobei  $\Delta f$  die Detektionsbandbreite,  $F_{\text{Det}}$  die Rauschzahl des Detektionsarms,  $Q$  die Güte des Resonators,  $P_0$  die Anregungsleistung,  $B_0$  das externe magnetische Feld,  $V_S$  das Probenvolumen und  $\eta$  der Füllfaktor sind [78]. Die Konstante  $c_1$  ist gegeben durch

$$c_1 = \frac{1}{\mu_0 g^2 \beta_e^2 S(S+1)}, \quad (7.7)$$

wobei die Konstanten die üblichen Bedeutungen haben. Mit diesen Formeln kann eine theoretische Empfindlichkeit abgeschätzt werden, welche im Rahmen der Unsicherheiten bis auf eine Größenordnung mit der experimentell abgeschätzten übereinstimmt.

Verschiedene Faktoren stellen bei dem vorgestellten cw-Betrieb die limitierenden Faktoren für die Empfindlichkeit dar:

Das Rauschen der MW-Quelle, hauptsächlich bestimmt durch das Phasen- und Amplitudenrauschen der 45 GHz Quelle, geht nicht in Formel (7.6) ein. Auch die Verstärker bei 45 GHz können Rauschbeiträge liefern, welche nicht berücksichtigt sind. Bei einem Frequenzoffset von einigen kHz befindet man sich noch innerhalb des Frequenzrauschens der MW-Quelle, weshalb dieser Effekt durchaus einen Beitrag zum Rauschen liefern kann. Um den Beitrag der MW-Quelle zum Rauschniveau zu reduzieren, müssen größere Modulationsfrequenzen verwendet werden. Mit den derzeit verwendeten Modulationsspulen ist das nicht möglich, da bei größer werdenden Modulationsfrequenzen die Spulenkonstante abnimmt, wie in Abbildung 7.7 zu erkennen ist und bereits diskutiert wurde. Bei einer wie im X-Band typischen Modulationsfrequenz von 100 kHz ist die Spulenkonstante so klein, dass keine ausreichende Modulationsamplitude mehr erzeugt werden kann.

Da es mit dem derzeitigen Aufbau nicht möglich ist, die Modulationsspulen mechanisch vollständig vom Resonator zu entkoppeln, können Mikrophonieeffekte ebenfalls zum Rauschen beitragen. Um diese Effekte weiter zu unterdrücken, könnte beispielsweise versucht werden, die Modulationsspulen vollständig vom Probenkopf zu trennen und am Boden des Kryostaten unterzubringen [76].



## 8 Spektrometersteuerung mit LabVIEW

Die Steuerung des Spektrometers wurde mit LabVIEW (Version 5.1, *National Instruments*) programmiert, sodass sämtliche Messungen vollständig computergesteuert aufgenommen werden können. LabVIEW basiert auf der grafischen Programmiersprache G, welche im Gegensatz zu textbasierten Programmiersprachen wie C oder Pascal nur mit grafischen Elementen arbeitet. Anstatt Informationen in Variablen zu speichern, werden einzelne Elemente mit Linien verbunden, welche den Informationsfluss repräsentieren. Die Art und die Farbe der Linien repräsentieren dabei verschiedene Datentypen wie Zeichenketten, Zahlen oder Felder. Ein einfaches Beispiel ist in Abbildung 8.1 gezeigt, bei dem in einem Eingabedisplay eine Zahl eingegeben werden kann, woraufhin in zwei weiteren Displays sowohl die Wurzel als auch das Doppelte dieser Zahl ausgegeben werden.



Abb. 8.1 Ein einfaches LabVIEW Programm, bei dem zu einer eingegebenen Zahl sowohl die Wurzel als auch das Doppelte der Zahl ausgegeben werden. Auf der linken Seite ist die Benutzeroberfläche zu sehen, auf der rechten Seite das dazugehörige Programm.

Diese Art der grafischen Programmierung bietet den Vorteil, dass einfache Strukturen leichter zu überschauen sind, da der Datenfluss übersichtlicher ist und der Programmierer sich nicht viele verschiedene Variablennamen merken muss. Auch logische Strukturen wie Schleifen oder IF Anweisungen können realisiert werden, indem um die entsprechenden Piktogramme bestimmte Rahmen gezogen werden. Dabei ist der große Nachteil wiederum, dass nicht immer alle Programmteile gleichzeitig sichtbar sind, was die Übersichtlichkeit erschwert. Dennoch wurde die Spektrometersteuerung mit LabVIEW geschrieben, da zum einen die Programmiersprache vergleichsweise intuitiv und einfach zu erlernen ist, zum anderen schon viele benötigte Komponenten mitgeliefert werden, sodass man sich bei der Programmierung auf die eigentliche Funktionalität konzentrieren kann. Dies sind beispielsweise alle benötigten Befehle zur Kommunikation mit den Messgeräten oder die grafischen Gestaltungselemente.

Die in unserer Arbeitsgruppe selbstgebaute Stromquelle für die Sweepspule ist über eine serielle RS232 Schnittstelle an einen PC (AMD Athlon, 1600 MHz) angeschlossen. Alle anderen verwendeten Geräte wie das Digitaloszilloskop (TDS 520C, Tektronix), der Pulsgenerator (DG 2020, Sony/Tektronix) und der Lock-In Verstärker (SR 530, Stanford Research Systems) sind über eine GPIB (IEEE 488.2) Leitung an eine PCI-Schnittstellenkarte angeschlossen.

## 8.1 Die Benutzeroberfläche der Spektrometersteuerung

Nach dem Starten des Programms wird eine Benutzeroberfläche geöffnet, die in Abbildung 8.2 wiedergegeben ist. Auf der linken Seite sind einige Schalter angeordnet, mit denen die eigentliche Steuerung der Messung vorgenommen wird. Auf der rechten Seite befindet sich eine grafische Anzeige der aktuellen Messung. Zusätzlich zu den Schaltern auf der linken Seite können noch weitere Funktionen über die Menüleiste erreicht werden. Im Folgenden soll ein grober Überblick über die verschiedenen Elemente des Programms gegeben werden.

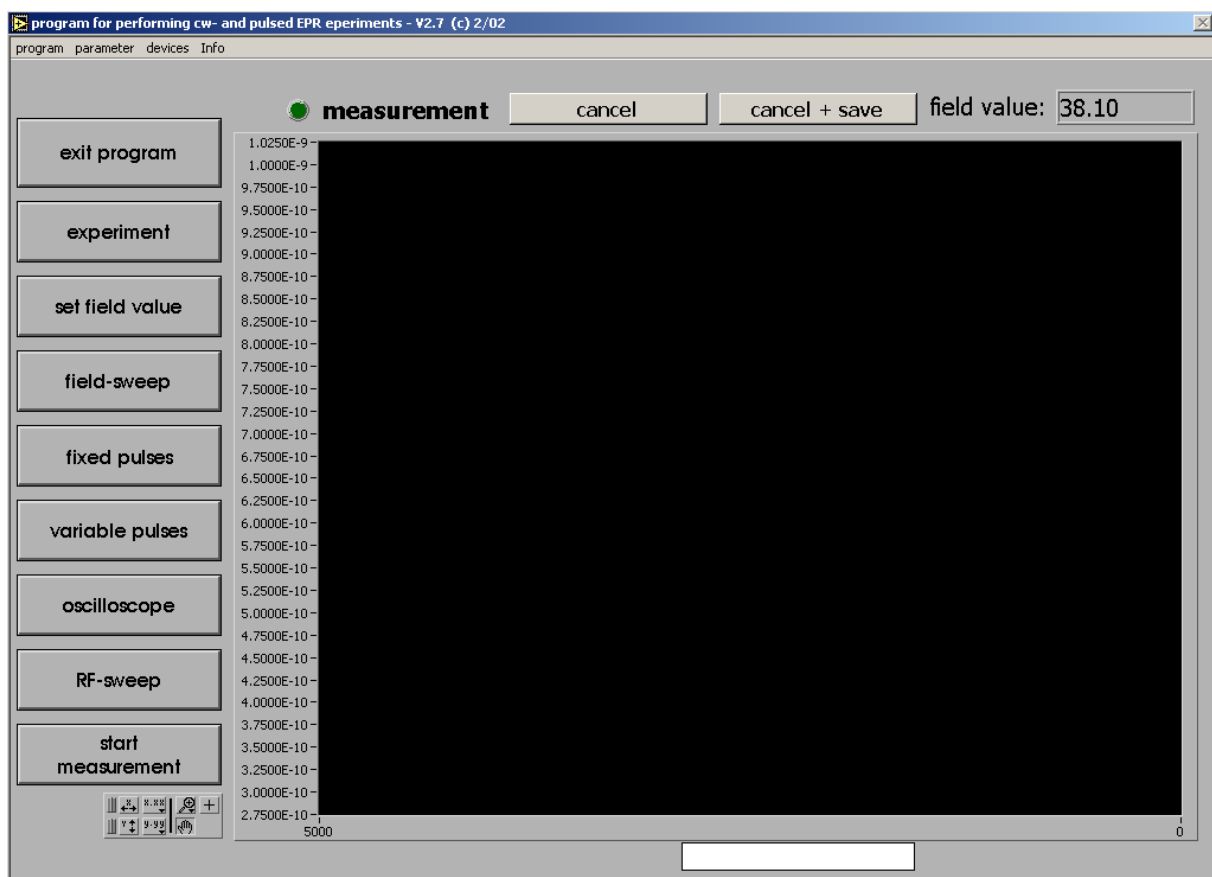


Abb. 8.2 Die Benutzeroberfläche des Programms zur Spektrometersteuerung.

Die Schalter auf der linken Seite haben folgende Funktionen:

- exit program                      Beendet das Programm.
- experiment                        Hier kann festgelegt werden, welche Art von Experiment durchgeführt werden soll. Dies kann entweder ein cw- oder verschiedene Puls-Experimente sein. Bei Puls-Experimenten wird zwischen magnetfeldabhängigen und solchen mit veränderlichem Pulsmuster unterschieden.
- set field value                    Erlaubt es dem Benutzer, das Magnetfeld auf einen bestimmten Wert zu setzen.

- field-sweep            Hier werden die Parameter für feldabhängige Messungen eingegeben. Das sind der Startwert, der Endwert und die Schrittweite des Magnetfeldes. Zusätzlich kann sowohl vor als auch nach der Messung ein Feldsweep durchgeführt werden, um die Hystereseeffekte der Sweepspule (vgl. Kapitel 4) zu berücksichtigen.
- fixed pulses            Hier kann ein festes Pulsmuster im Pulsgenerator gesetzt werden. Eine Einheit entspricht dabei einem Bit des Pulsgenerators, was typischerweise einer Zeitauflösung von 5 ns entspricht.
- variable pulses        Dient ebenfalls zum Setzen eines Pulsmusters. Zusätzlich werden hier noch Parameter für Messungen mit veränderlichem Pulsmuster festgelegt. Zum Einen wird festgelegt, welche Größe sich ändern soll, zum Anderen werden das Zeitinkrement und die Anzahl der Punkte eingegeben.
- oscilloscope           Hier können verschiedene Parameter festgelegt werden, die für das Auslesen des Signals benötigt werden. Dies sind insbesondere die Anzahl der Mittelungen pro Datenpunkt sowie der Bereich des Echos, der integriert werden soll.
- RF-sweep                Hier kann festgelegt werden, welcher Frequenzbereich bei einem ENDOR-Experiment benutzt werden soll. Zum Zeitpunkt der Abgabe der Arbeit existiert der ENDOR-Aufbau noch nicht vollständig. Da aber in Zukunft ENDOR-Experimente durchgeführt werden sollen, wurde dieser Punkt in dem Programm bereits integriert.
- start measurement     Startet die Messung.

Grundsätzlich können alle diese Funktionen auch über die Menüleiste erreicht werden, welche aber noch einige weitere Funktionen enthält. Die zusätzlichen Menüpunkte sind im Einzelnen:

- program/cw-testmode    Hier gelangt der Benutzer zu einem weiterem Fenster, in dem kontinuierlich Signale aus dem Lock-In Verstärker ausgelesen werden. Hier können alle Parameter eines cw-Experiments optimiert werden.
- program/quit LabVIEW   Hier wird nicht nur das Steuerungsprogramm beendet, sondern im Anschluss daran auch LabVIEW.

- devices/spectrum analyzer Hier kann ein Spektrum aus dem Spektrum Analysator (HP 8563A) ausgelesen werden.
- devices/oscilloscope Zusätzlich zu den Funktionen, welche über die Schalter erreicht werden können, kann auch eine Zeitreihe des Oszilloskops ausgelesen und abgespeichert werden. Dies ist insbesondere zum Speichern eines Echos oder FIDs nützlich.
- parameter/file parameter Hier werden der Dateiname und der Pfad festgelegt, unter dem die aktuelle Messung gespeichert werden soll. Zusätzlich können auch verschiedene Kommentare eingegeben werden, welche im Parameterfile gespeichert werden.
- parameter/general parameter Hier werden verschiedene Parameter festgelegt, welche die allgemeine Steuerung des Spektrometers beeinflussen. Dies sind insbesondere Parameter für Sweeps des Magnetfelds wie Wartezeiten zwischen zwei Feldwerten und Schrittweiten.

## 8.2 Ablaufsteuerung von Experimenten

### 8.2.1 Cw-Experimente

Zur Durchführung von cw-Experimenten gibt es einen Modus, bei dem kontinuierlich Daten aus dem Lock-In Verstärker ausgelesen werden. Der verwendete Lock-In Verstärker besitzt zwei Ausgänge, welche eine feste Phasenbeziehung von  $90^\circ$  aufweisen. Wahlweise können beide oder nur ein Kanal ausgelesen werden. In diesem Modus kann das Magnetfeld in einem festgelegten Bereich mit vorgegebener Geschwindigkeit auf- und abgefahren werden. Alle Einstellungen, die für ein cw-Experiment benötigt werden, können in diesem Modus optimiert werden. Dazu gehören die Zeitkonstante des Lock-In Verstärkers, die Einstellung der Modulationsphase, die MW-Phase, die MW-Leistung, die Modulationsamplitude und -frequenz sowie die Schrittweite und -geschwindigkeit des Magnetfeldes. Die hier aufgenommenen Daten können aber nicht abgespeichert werden.

Nach dem Einstellen aller Parameter muss der Benutzer wieder zum Hauptfenster wechseln, hier kann dann die eigentliche Messung durchgeführt und abgespeichert werden.

Die Messung läuft dabei so ab, dass direkt nach dem Setzen eines neuen Magnetfelds wahlweise einer oder beide Ausgangskanäle des Lock-In Verstärkers ausgelesen werden. Optional kann zwischen dem Setzen des Magnetfelds und dem Auslesen des Lock-In Verstärkers eine beliebige Wartezeit eingestellt werden, da bei großen Schrittweiten das Magnetfeld eine Zeit lang braucht, um stabil zu sein.



### 8.2.2 Messungen im Pulsbetrieb

Der Aufbau des Spektrometers im Pulsbetrieb ist schematisch in Abbildung 8.3 dargestellt.

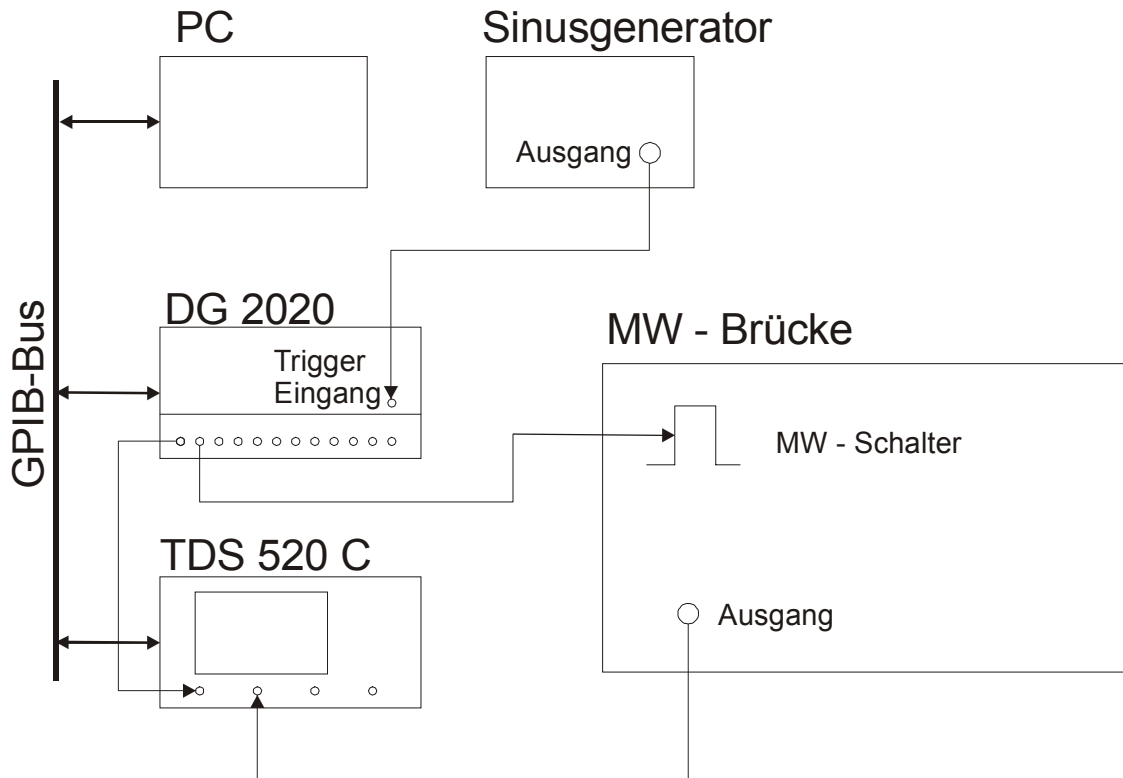


Abb. 8.3 Blockschaltbild des EPR-Spektrometers im Puls-Modus.

Bei Puls-Experimenten wird mit einem Kanal des Datengenerators der MW-Schalter angesteuert. Ein zweiter Kanal wird direkt auf das Digitaloszilloskop gegeben. Mit diesem wird das Oszilloskop getriggert, damit das Signal immer an der gleichen Stelle dargestellt wird. Die Repetitionsrate des Experiments wird manuell mit einem Funktionsgenerator eingestellt, mit dessen Signal der Pulsgenerator getriggert wird. Mit Hilfe des Steuerungsprogramms wird festgelegt, wie viele Mittelungen das Oszilloskop pro Datenpunkt durchführen soll. Vor Beginn der Messung muss der Benutzer noch festlegen, welcher Bereich des Signals integriert werden soll. Wahlweise kann auch ein Bereich außerhalb des Signals festgelegt werden, der als Untergrund von dem integrierten Signal abgezogen wird. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass eine langsame Drift des Untergrunds keine Auswirkungen auf das gemessene Spektrum hat.

Sowohl bei cw- als auch bei Puls-Experimenten werden zwei Dateien abgespeichert. In der ersten wird die Messung als ASCII-Datei abgelegt, diese hat die Endung *.dat*. In der zweiten Datei mit der Endung *.par* werden eine Reihe von Parametern abgespeichert. Bei cw-Messungen sind dies die Einstellungen des Lock-In Verstärkers wie Modulationsfrequenz, Eingangsempfindlichkeit oder Zeitkonstante. Bei Puls-Messungen werden die Anzahl der Mittelungen und das Pulsmuster automatisch abgespeichert. Des weiteren besteht bei beiden Arten von Experimenten die Möglichkeit, Kommentare abzuspeichern. Dies können beispielsweise die Temperatur der Messung oder die Probenbezeichnung sein.

## 8.3 Eigenschaften der Spektrometersteuerung

### 8.3.1 Cw-Experimente

In Abbildung 8.4 ist wiedergegeben, welche Messzeiten für cw-Experimente unter verschiedenen Bedingungen benötigt werden. Bei den gestrichelten Kurven wurde nur ein Kanal des Lock-In Verstärkers ausgelesen, bei den durchgezogenen hingegen beide Kanäle. Da aus Sicherheitsgründen in den Ausgang der Stromversorgung für die Sweepspule ein Tiefpassfilter integriert ist, dauert es eine gewisse Zeit, bis nach dem Setzen eines neuen Spulenstroms dieser auch wirklich erreicht ist. Aus diesem Grunde ist es bei großen Magnetfeldschritten sinnvoll, zwischen dem Setzen des Felds und dem Auslesen der Daten eine gewisse Zeit zu warten. Die Messzeiten in Abbildung 8.4 sind für verschiedene Wartezeiten und verschieden viele Datenpunkte angegeben.

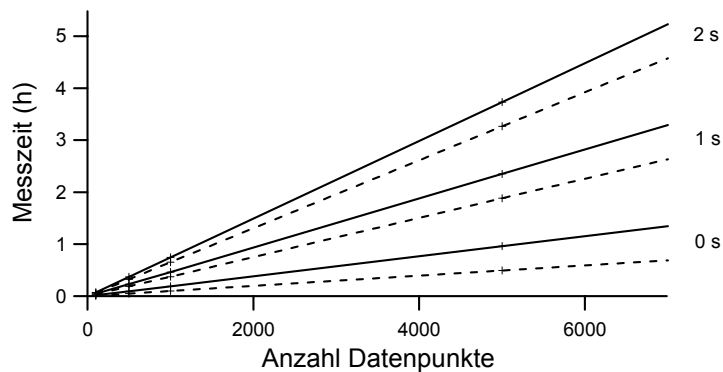


Abb. 8.4 Experimentdauer für verschiedene cw-Experimente bei Verwendung verschiedener Wartezeiten zwischen zwei Feldpunkten. Bei den durchgezogenen Linien wurden beide Kanäle des Lock-In Verstärkers ausgelesen, bei den gestrichelten nur einer.

Den Daten kann entnommen werden, dass das Auslesen eines Messpunkts 0,34 Sekunden für einen Kanal und 0,68 Sekunden für beide Kanäle dauert. Diese Werte sind extrem groß und damit der zeitlimitierende Faktor bei cw-Messungen. Warum das Auslesen so lange dauert, ist unklar. Um das Auslesen der Datenpunkte und damit das gesamte Experiment zu beschleunigen, kann beispielsweise ein schneller A/D-Wandler eingesetzt werden, der an die analogen Ausgänge des Lock-In Verstärkers angeschlossen wird. Dies kann entweder durch eine in den PC eingebaute Karte oder mit einem Einzelgerät, welches dann wieder über den IEEE-Bus an den Rechner angeschlossen wird, realisiert werden. Mit beiden Varianten sollte es möglich sein, cw-Experimente wesentlich zu beschleunigen.

### 8.3.2 Puls-Experimente

Bei Puls-Experimenten ist zwischen zwei verschiedenen Arten zu unterscheiden, zum einen solchen Experimenten mit konstanter Pulsfolge (also insbesondere *Fieldswept*-Experimenten) und solchen mit veränderlichem Pulsmuster.

Zunächst soll die Performance der Spektrometersteuerung für Experimente mit konstanter Pulsfolge gezeigt werden. In den Abbildungen 8.5 und 8.6 sind die Messzeiten und die

dazugehörigen *duty cycle* für verschiedene Experimente in Abhängigkeit von der Repetitionsrate und der Anzahl an Mittelungen wiedergegeben. Als *duty cycle* wird in diesem Zusammenhang das Verhältnis zwischen der theoretisch notwendigen Experimentdauer und der tatsächlichen Messzeit definiert.

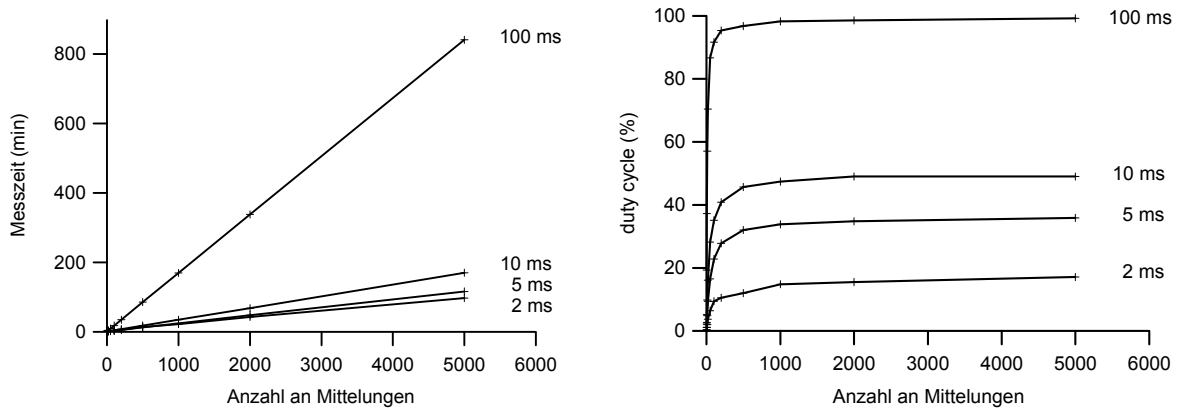


Abb. 8.5 Messzeiten und *duty cycle* für verschiedene Experimente mit fester Pulsfolge in Abhängigkeit von der Anzahl an Mittelungen. Die Messzeiten gelten für die Aufnahme von 100 Datenpunkten. Die Daten wurden mit verschiedenen Repetitionsraten aufgenommen.

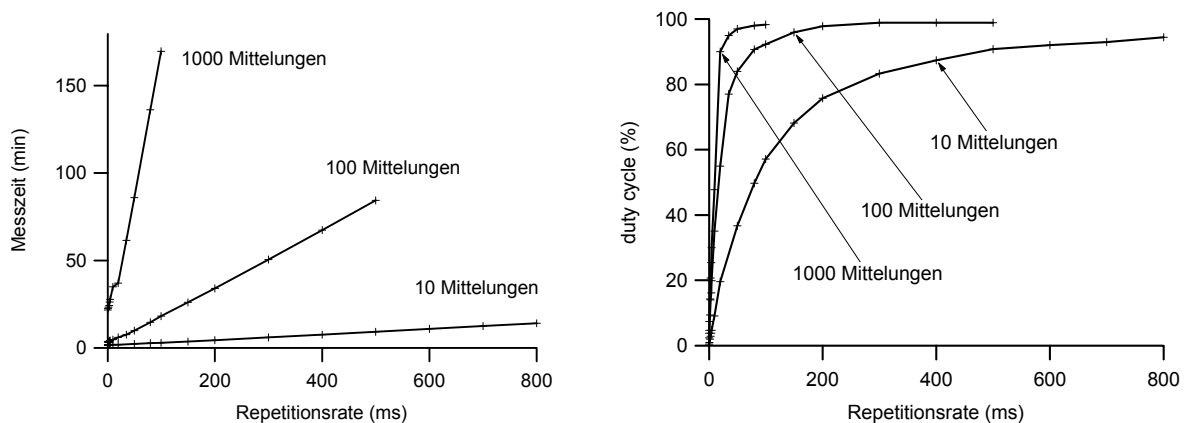


Abb. 8.6 Messzeiten und *duty cycle* für verschiedene Experimente mit fester Pulsfolge in Abhängigkeit von der Repetitionsrate. Die Messzeiten gelten für die Aufnahme von 100 Datenpunkten.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass bei einer kleinen Anzahl an Mittelungen der *duty cycle* sehr stark abnimmt. Bei solchen Experimenten stellt also die Zeit, die gebraucht wird, um das Signal und den Untergrund zu integrieren und um die Daten an den Computer zu übermitteln, den wesentlichen Beitrag zu der Messzeit dar. Bei Repetitionsraten von weniger als 10 ms ist der maximal erzielbare *duty cycle* kleiner als 50 %.

Diese Zahlen machen deutlich, dass mit dem derzeitigen Aufbau die Durchführung von Puls-Experimenten nicht optimal ist, da ein großer Anteil der Messzeit für die Steuerung der verschiedenen Geräte und den Datentransfer zwischen den Geräten und dem Computer verwendet wird. Eine einfache Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, besteht in der

Verwendung eines Boxcar-Integrators. Mit einem solchen Gerät sollte das Integrieren der Signale wesentlich schneller möglich sein als mit dem Digitaloszilloskop.

Bei Puls-Experimenten, bei denen sich zwischen zwei Datenpunkten die Pulsfolge ändert, gibt es prinzipiell zwei verschiedene Möglichkeiten, diese durchzuführen:

- Zu jedem Datenpunkt wird das gesamte Pulsmuster neu berechnet und alle Kanäle, bei denen sich etwas geändert hat, werden an den Pulsgenerator geschickt. Diese Methode hat den großen Nachteil, dass insbesondere bei langen Pulssequenzen der Datentransfer (hauptsächlich innerhalb des Pulsgenerators) sehr viel Zeit beansprucht und damit der *duty cycle* der Experimente stark herabgesetzt wird.
- Der Pulsgenerator bietet die Möglichkeit, innerhalb des Pulsmusters Blöcke zu definieren und aus diesen Blöcken sogenannte Sequenzen zusammenzusetzen. Dabei können einzelne Blöcke beliebig oft (bis zu 64000 mal) hintereinander ausgeführt werden. Anstatt wie bei der ersten Methode das Pulsmuster für jeden Messpunkt neu zu berechnen, kann beispielsweise zwischen zwei Pulsen eine Schleife definiert werden und zwischen zwei Messpunkten wird nur der Zähler dieser Schleife verändert. Der Vorteil dieser Methode liegt in einem wesentlich schnelleren Datentransfer. Der Nachteil ist, dass die Blöcke eine Länge von mindestens 64 bit (entspricht 320 ns) haben müssen, was die Zeitauflösung des Experiments auf diesen Wert einschränkt.

Im Folgenden sollen an einem Beispiel die beiden Methoden direkt miteinander verglichen werden. Als Pulsfolge wurde dabei eine *saturation recovery* Sequenz gewählt, mit der die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  eines Spinsystems bestimmt werden kann [8]. Die Pulssequenz mit den verwendeten Pulsängen und -abständen ist in Abbildung 8.7 gezeigt.



Abb. 8.7 Pulsfolge zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  mittels *saturation recovery*. Der Sättigungspuls hat eine Länge von 70  $\mu\text{s}$ , die Pulssequenz des Hahn-Echos ist 80-200-160 ns. Der Abstand  $T$  zwischen dem Sättigungspuls und der Detektionssequenz beträgt 350 ns und wird in 100 Schritten mit je 350 ns vergrößert.

Das in Abbildung 8.7 dargestellte Experiment wurde in drei verschiedenen Varianten durchgeführt:

- In Variante 1 wurde für jeden Datenpunkt die Pulssequenz neu berechnet und in den Pulsgenerator übertragen. Die verwendete Speichergröße im Pulsgenerator betrug 21220 bit.
- Bei Variante 2 wurde ebenfalls für jeden Datenpunkt die Pulssequenz neu berechnet und in den Pulsgenerator übertragen. Der Unterschied zur ersten

Variante besteht darin, dass der Sättigungspuls nicht in der gesamten Länge im Pulsmuster enthalten ist, sondern nur als ein Puls mit 350 ns Länge, der aber innerhalb einer Schleife liegt, welche 200 mal durchlaufen wird. Der Vorteil besteht darin, dass die verwendete Speichergröße mit 7280 bit wesentlich kleiner gehalten werden kann.

- Bei der dritten Variante wird zwischen dem Sättigungspuls und der Detektionssequenz eine Schleife mit einer Länge von 350 ns definiert. Während des Experiments bleibt das Pulsmuster konstant, zwischen zwei Datenpunkten wird nur der Zähler der Schleife erhöht. Die benötigte Speichergröße beträgt in diesem Fall nur 280 bit.

In Tabelle 8.1 sind für die verschiedenen Varianten die benötigten Messzeiten und die erzielten *duty cycle* mit verschiedenen Messparametern wiedergegeben.

Rep. (ms)	Mittelungen	Variante 1		Variante 2		Variante 3	
		Zeit (s)	d.c. (%)	Zeit (s)	d.c. (%)	Zeit (s)	d.c. (%)
2	10	894,5	0,2	403,8	0,5	161,4	1,2
2	100	1451	1,4	958,0	2,1	704,3	2,8
10	10	909,6	1,1	422,3	2,4	177,8	5,6
10	100	1634	6,1	1138	8,8	901,2	11,1
50	10	1029	4,9	541,7	9,2	293,2	17,1
50	100	2807	17,8	2311	21,6	2087	24,0

Tab. 8.1 Messzeiten und *duty cycle* des in Abbildung 8.6 dargestellten Experiments mit verschiedenen Repetitionsraten und Anzahl an Mittelungen.

Das gleiche Experiment wurde zum Vergleich auch mit einem Spektrometer durchgeführt, welches mit einer Konsole der Firma Bruker ausgestattet ist. Das Experiment dauert unter den Bedingungen, welche in der ersten Zeile wiedergegeben sind, ca. 2,3 Sekunden (87 % *duty cycle*), mit den Parametern in der letzten Zeile 503 Sekunden (99 % *duty cycle*).

Wie mit den hier dargestellten Untersuchungen gezeigt wurde, ist der erzielte *duty cycle* bei typischen Puls-Experimenten meistens deutlich unter 50 %. Bei Puls-Experimenten mit veränderlichem Pulsmuster ist der *duty cycle* noch kleiner und meistens unter 10 %. Sowohl das Auslesen der Signalintensitäten als auch das Setzen eines neuen Pulsmusters beanspruchen einen Großteil der Messzeit.

Eine Möglichkeit, die Durchführung von Puls-Experimenten zu beschleunigen, wurde bereits genannt, nämlich die Verwendung eines Boxcar-Integrators. Bei Experimenten mit veränderlichem Pulsmuster stellt auch der interne Datentransfer innerhalb des Pulsgenerators einen wesentlichen Beitrag zur Messzeit dar. Um solche Experimente zu beschleunigen, bieten sich verschiedene Lösungen an. Eine Möglichkeit besteht in der Integration der kompletten Steuerungskonsole der Firma Bruker in den Spektrometernaufbau. Dieses wurde erst kürzlich bei einem anderen selbstgebauten Spektrometer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Eine andere Variante zur Beschleunigung solcher Versuche ist die Verwendung von programmierbaren Delay-Generatoren. Die Experimentsteuerung ist damit zwar ein wenig komplizierter, dafür ist diese Variante aber kostengünstiger als die zuerst genannte.

Eine weitere Möglichkeit zur Beschleunigung von Puls-Experimenten besteht darin, das bestehende Spektrometer nicht wie bisher mit *stand-alone* Geräten zu betreiben, sondern ein PXI-System aufzubauen. Dabei handelt es sich um ein Steckkartensystem, welches intern vergleichbar aufgebaut ist wie ein normaler PC. Dieses System baut auf dem aus dem PC bekannten PCI-Bus auf und hat eine Übertragungsgeschwindigkeit von 132 MB/s. Der schon aus den 1960er Jahren stammende GPIB-Bus hat dagegen nur einen Datendurchsatz von 1 MB/s. Mittlerweile sind alle für das Spektrometer benötigten Komponenten auch in einer PXI-Version erhältlich. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Software an das neue System angepasst werden muss, während diese bei der Brukerkonsole mitgeliefert wird. Außerdem ist davon auszugehen, dass auch mit einem PXI-System nicht die gleichen *duty cycle* wie mit der Bruker-Konsole erreicht werden können. Vermutlich werden die Messzeiten nur um einen Faktor zwei bis drei schneller werden gegenüber dem beschriebenen Aufbau.

## Teil III – Anwendungsbeispiele für HF-EPR

### 9 Das Ras Protein

#### 9.1 Motivation

Kleine Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (GNB-Proteine) mit einer Masse von 20 bis 25 kDa spielen eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung und regulieren Prozesse wie Zellwachstum, Vesikel Transport, Proliferation, Zelldifferentiation und Zytokinese [79-81]. Neue Ergebnisse zeigen, dass auch die Zellapoptose von diesen Proteinen beeinflusst wird [82,83]. Das erste identifizierte Protein dieser Art war Ras<sup>13</sup>. Mittlerweile ist eine ganze Reihe von Proteinen bekannt, welche zur Ras-Superfamilie gezählt werden. Diese wird derzeit unterteilt in acht Unterfamilien: Ras, Rho, Arf, Rab, Rac, Rad, Rif und Ran, jeweils mit bis zu 30 Mitgliedern [84,85].

Allen GNB-Proteinen ist gemeinsam, dass sie als Schalter fungieren und somit in mindestens zwei stabilen Konformationen vorliegen können, einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen. Durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl. *guanine nucleotide exchange factor*, GEF) kann das GDP gegen GTP ausgetauscht und somit das Protein aktiviert werden [86]. Im aktivierten Zustand können sich in der Signalkette nachgeschaltete Effektor-Proteine an das aktivierte GNB-Protein anlagern, wodurch diese selbst wiederum eine Strukturveränderung erfahren. Auf diese Weise kann jedes einzelne der GNB-Proteine sehr komplexe Effektor-Kaskaden aktivieren, welche sich auch gegenseitig beeinflussen und noch nicht vollständig entschlüsselt worden sind [87-92].

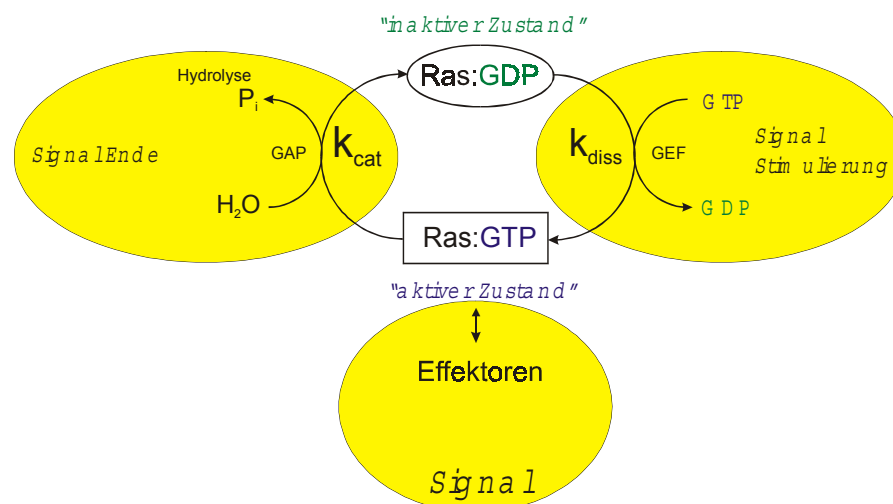


Abb. 9.1 Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus des Ras. Durch Austausch des gebundenen GDP mit einem GTP wird das Protein aktiviert und kann mit Effektoren wechselwirken. Die natürliche Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP wird durch GTPase-aktivierende Proteine beschleunigt, wodurch das Protein wieder in den inaktiven Zustand gelangt.

<sup>13</sup> Aufgrund seiner Masse von 21 kDa wurde das Protein früher als p21<sup>ras</sup> bezeichnet.

Durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und einem Phosphor wird das aktivierte GNB-Protein wieder in den inaktiven Zustand überführt. Dabei wird die intrinsische Hydrolyse durch die Anlagerung eines GTPase-aktivierenden Proteins (GAP) um mehrere Größenordnungen beschleunigt [93]. Dieser Aktivierungszyklus ist schematisch in Abbildung 9.1 dargestellt.

Die Mitglieder der Ras-Familie gehören zu den membranständigen GNB-Proteinen (G-Proteine [94]) an der Zellmembran von Säugetierzellen, welche Signale von außerhalb in das Zellinnere weiterleiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ras untersucht, welchem eine bedeutende Rolle bei vielen menschlichen Tumoren zukommt. In ca. 30 % aller menschlichen Tumore werden Punktmutationen des Ras gefunden, wobei Mutationen der Aminosäuren an den Positionen 12, 13 und 61 besonders häufig vorliegen [88,95-98]. Bei diesen onkogenen Mutanten des Ras wird der Deaktivierungsmechanismus blockiert, wodurch das Protein im aktiven GTP-gebundenen Zustand verbleibt, was letztlich zu einer ständigen Wachstumsstimulierung der Zelle und damit zur Bildung eines Tumors führt. Trotz dieser sehr wichtigen Funktion konnte der genaue Mechanismus der GTP-Hydrolyse noch nicht aufgeklärt werden. Zahlreiche Arbeitsgruppen arbeiten mit den verschiedensten Methoden wie NMR [99,100], Röntgenkristallografie<sup>14</sup> [101-104], EPR-Spektroskopie [50,105,106], FTIR [107-110], Raman-Spektroskopie [111], Fluoreszenzspektroskopie [112,113], biochemischen Methoden [114] oder Molekulardynamik (MD) Simulationen [115-118] an der Aufklärung des Mechanismus und damit der Frage, auf welche Weise die verschiedenen onkogenen Mutanten diesen blockieren.

Bisher haben sich fast alle Arbeiten nur mit dem GTP-gebundenen aktiven Zustand des Proteins beschäftigt. Da dieser Zustand unter physiologischen Bedingungen beim Wildtyp nicht stabil ist, werden normalerweise nicht-hydrolysierbare Analoga für das GTP verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dagegen der GDP-gebundene inaktive Zustand des Proteinkomplexes untersucht. Sollten sich für diesen Zustand unterschiedliche Konformationen für den Wildtyp und die onkogenen Mutanten nachweisen lassen, liefern diese Unterschiede möglicherweise ebenfalls Hinweise darauf, wie die onkogenen Mutanten den Hydrolysemechanismus unterbinden können.

Das aktive Zentrum der Proteinkomplexe besteht aus einem diamagnetischen  $Mg^{2+}$ -Ion, welches gegen ein paramagnetisches  $Mn^{2+}$ -Ion ausgetauscht werden kann, ohne dabei die Funktion des Proteins zu zerstören [120]. Auf diese Weise können die Proteinkomplexe auch mittels EPR-Spektroskopie untersucht werden. Im Gegensatz zu Röntgenstrukturuntersuchungen und NMR-Messungen wird mit der EPR-Spektroskopie dabei nicht das gesamte Protein betrachtet, sondern nur die lokale Umgebung des aktiven Zentrums. Auf diese Weise kann mit Hilfe der EPR-Spektroskopie zwar keine globale Struktur bestimmt werden, dafür ist sie aber wesentlich empfindlicher im Bezug auf sehr kleine Änderungen in der lokalen Struktur des aktiven Zentrums und kann hier wesentlich genauere Aussagen treffen.

In Abbildung 9.2 sind zwei Röntgenstrukturen des Ras gegenübergestellt. Auf der linken Seite ist der GDP-gebundene inaktive Zustand zu sehen, auf der rechten dagegen der aktive Zustand mit dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analog GppNHp. Anhand dieser Strukturen

---

<sup>14</sup> Wilhelm Conrad Röntgen: 1845 bis 1923, Nobelpreis für Physik 1901



sollen die wesentlichen globalen Unterschiede zwischen den beiden Zuständen erläutert werden.

Der deutlichste Unterschied ist in einer Region zu erkennen, welche die Aminosäure 32 bis 40 beinhaltet und als Schleife L2 bezeichnet wird. Diese Schleife ist im inaktiven Zustand weit vom aktiven Zentrum entfernt, im aktiven Zustand hingegen liegt sie deutlich dichter an dem aktiven Zentrum und die Aminosäure Threonin-35 ist ein direkter Ligand des Metallions geworden.

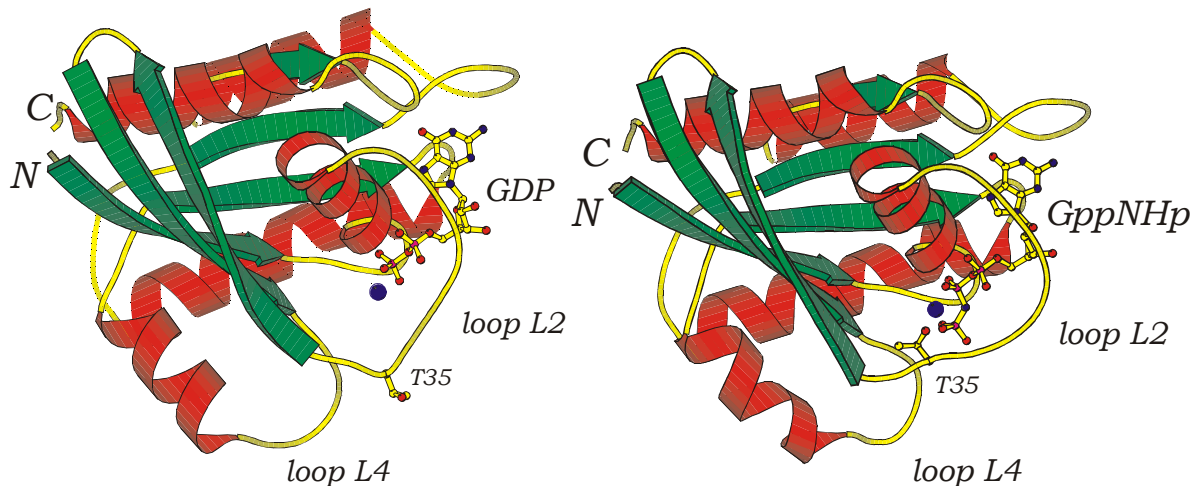


Abb. 9.2 Zwei verschiedene Röntgenstrukturen des Ras. Auf der linken Seite der GDP-gebundene Zustand, auf der rechten Seite der aktive Zustand mit einem GTP-Analog [101,102]. Die Strukturen wurden der *Brookhaven Protein Data Bank* entnommen [Strukturen 4Q21, 5P21].

Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente soll die lokale Struktur des Metallzentrums untersucht werden. Ein Ausschnitt mit der lokalen Umgebung dieses Zentrums aus einer Röntgenstruktur des Ras(wt)•Mg<sup>2+</sup>•GDP Komplexes ist in Abbildung 9.3 dargestellt.

Die Aminosäure Threonin-35 kommt in fast allen GNB-Proteinen vor, daher wird ihr eine wichtige Funktion zugeschrieben. Aus diesem Grund ist die Aminosäure Threonin-35 eine der Positionen, an denen im Rahmen dieser Arbeit Mutationen eingeführt worden sind.

Die zweite Position ist die Aminosäure Glycin-12, wobei ein Austausch dieser Aminosäure gegen Valin zu einer onkogenen Variante des Ras führt. Auch diese Mutante wurde untersucht, da die Frage, auf welche Weise diese Mutante den Deaktivierungsmechanismus blockiert, immer noch nicht beantwortet ist. Eine neuere MD-Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass bei der Mutante Ras(G12V) die Struktur des aktiven Zentrums weniger stabil ist und ständigen Fluktuationen unterliegt [115]. Aufgrund dieser Instabilität ist es den GTPase-aktivierenden Proteinen nicht möglich, sich an den Proteinkomplex anzulagern und damit die Hydrolyse des GTP einzuleiten. In anderen Arbeiten wird dagegen berichtet, dass Mutationen an der Position 12 zu einer Verdrängung eines Wassermoleküls führen, welches für die Hydrolyse des Nukleotids wichtig ist [103]. In weiteren Arbeiten wird davon ausgegangen, dass im Laufe der Hydrolyse ein Übergangszustand gebildet wird, welcher durch Mutationen an der Position 12 sterisch gehindert ist [104,113]. Alle diese Ergebnisse zeigen, dass der

genaue Mechanismus, durch den die onkogenen Mutanten die GTP-Hydrolyse verhindern, noch nicht aufgeklärt werden konnte.

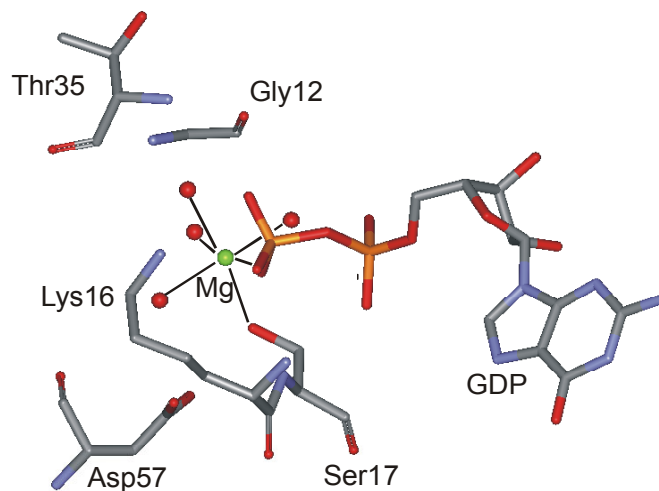


Abb. 9.3 Ausschnitt aus einer Röntgenstruktur des Ras(wt)•Mg<sup>2+</sup>•GDP Komplexes [121]. Direkte Liganden des Metallions sind ein Sauerstoff der  $\beta$ -Phosphatgruppe und die Aminosäure Serin-17. Die Koordinationssphäre des Mg<sup>2+</sup>-Ions wird nach dieser Struktur durch vier Wassermoleküle vervollständigt.

## 9.2 Probenpräparation

Die Proben wurden von Dr. Michael Spörner (Arbeitsgruppe Prof. Kalbitzer, Universität Regensburg) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wittinghofer (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund) hergestellt. Details der Probenherstellung können [119,122,123] entnommen werden. Für die EPR-Spektroskopie muss das natürlich vorkommende Mg<sup>2+</sup>-Ion gegen ein Mn<sup>2+</sup>-Ion ausgetauscht werden, was durch die Zugabe eines 100fachen Überschusses an MnCl<sub>2</sub> und anschließender Gelfiltration zur Entfernung freier Metallionen geschieht. Die Proteinkomplexe wurden in HEPES (pH 7,4, 40 mM) mit DTE (2 mM) gelöst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein gekürztes Proteingerüst verwendet (Aminosäuren 1 bis 166), von dem bekannt ist, dass es die volle Funktionalität des Proteins besitzt [124]. Der entfernte Rest bis zur Aminosäure 189 dient lediglich zur Verankerung des Proteins in der Zellmembran und weist in flüssiger Lösung eine starke Flexibilität auf.

Proben in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O angereichertem Wasser wurden durch Gefriertrocknen und anschließender Zugabe von mit <sup>17</sup>O angereichertem Wasser (46,3 %, *Isotec*) hergestellt.

Alle im Folgenden gezeigten cw W-Band Messungen wurden von Dr. Hanno Käb an einem Bruker W-Band Spektrometer (Elexsys E680) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dinse an der TU Darmstadt durchgeführt. Die gezeigten ENDOR-Experimente wurden zusammen mit Dr. Marina Bennati und Dr. Norbert Weiden an dem gleichen Spektrometer durchgeführt. Für Messungen an gefrorener Lösung wurden Standard-Messröhrchen mit einem Innen-

durchmesser von 0,4 mm verwendet. Für die Raumtemperaturmessungen wurden dünnere Röhren verwendet, welche selber hergestellt wurden.

### 9.3 Cw-EPR an Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexen bei Raumtemperatur

Mit Hilfe von W-Band cw-EPR Messungen sollte die Anzahl der Wassermoleküle, die direkte Liganden des Mn<sup>2+</sup>-Ions sind, bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden die Protein-komplexe sowohl in normalem Wasser als auch in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O-angereichertem Wasser gelöst. Die zusätzliche Hyperfeinkopplung zum <sup>17</sup>O (I=5/2) verursacht ein zusätzliches Signal mit größerer Linienbreite. Über die relativen Intensitäten der <sup>16</sup>O- und der <sup>17</sup>O-Signale sind Rückschlüsse über die Anzahl der Wasserliganden möglich [50,128]. Ausschnitte aus den W-Band cw-EPR Spektren bei Raumtemperatur sind in Abbildung 9.4 gezeigt.

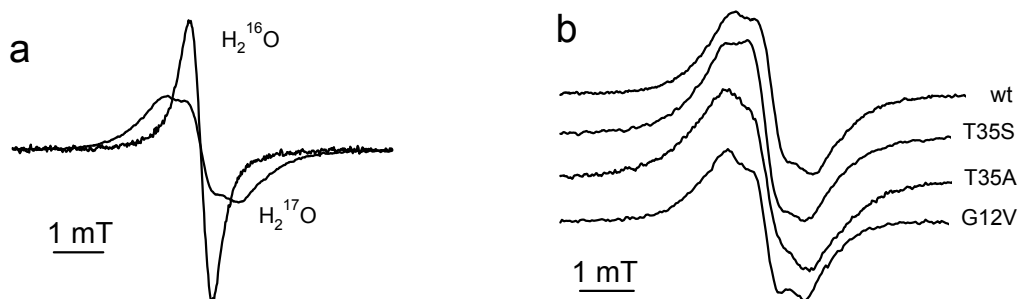


Abb. 9.4 Cw W-Band Spektren verschiedener Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe bei Raumtemperatur. a) Vergleich der Linienform der Spektren mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O und H<sub>2</sub><sup>17</sup>O für den Wildtyp, b) Vergleich der verschiedenen Mutanten in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O. Gezeigt ist jeweils nur die vierte der sechs Manganlinien.

Im linken Teil der Abbildung 9.4 werden die Spektren des Ras(wt)•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexes in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O und in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O miteinander verglichen. Bei den Spektren mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O ist eine Überlagerung zweier Signale zu erkennen. Das schmalere der beiden Signale stammt von Proteinkomplexen, die vollständig mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O umgeben sind. Ist mindestens eines der Wassermoleküle, welche das Mn<sup>2+</sup>-Ion umgeben, mit <sup>17</sup>O markiert, ist das Signal aufgrund der Hyperfeinwechselwirkung zum Kernspin des <sup>17</sup>O verbreitert.

#### 9.3.1 Simulation der Spektren mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O

Die Simulation der Spektren wurde mit Hilfe des in Kapitel 3.2 vorgestellten Simulationsprogramms durchgeführt. Bei der Spektrensimulation wurden dabei zunächst keine Hyperfeinwechselwirkungen berücksichtigt. Effekte, die durch Hyperfeinwechselwirkungen zu entfernten Kernen hervorgerufen werden, fließen in den Linienbreitenparameter ein.

In Abbildung 9.5 sind die Ergebnisse der Simulationen für die cw-EPR Spektren der verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O gezeigt. Für den Wildtyp und die beiden Mutanten Ras(T35S) und Ras(T35A) sind jeweils drei verschiedene Reihen von Residuen gezeigt. In der jeweils obersten Reihe wurde neben der Dispersionsphase nur die Linienbreite

als freier Parameter zugelassen. In der jeweils mittleren Reihe wurde zusätzlich der axiale Nullfeldparameter D freigelassen, in der jeweils untersten zusätzlich noch der rhombische Nullfeldparameter E.

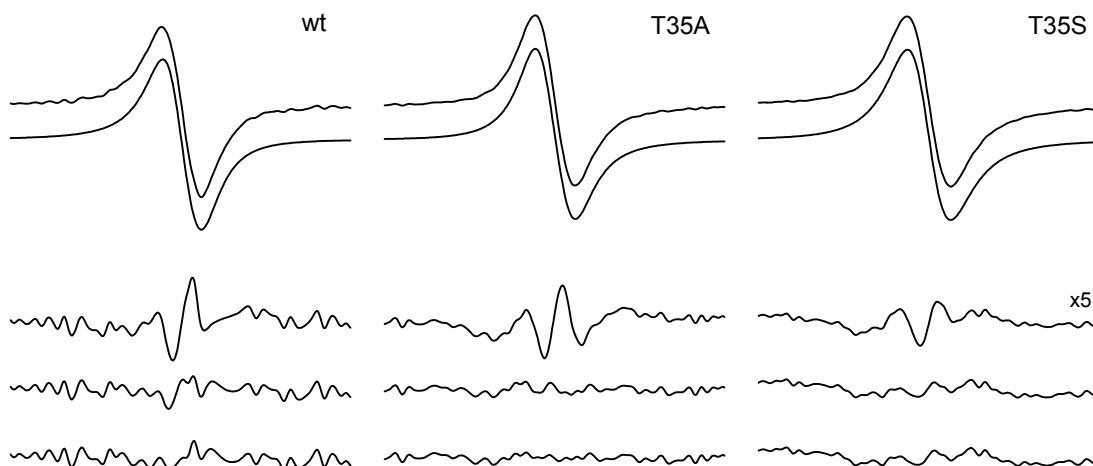


Abb. 9.5 Darstellung der Fitergebnisse für die Spektren verschiedener Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O bei Raumtemperatur. Für jede der drei Proben sind die Messung zusammen mit der Simulation unter Berücksichtigung des axialen Nullfeldparameters D gezeigt. Darunter sind die Differenzen zwischen der Messung und den jeweils besten Simulationen gezeigt. In der jeweils obersten Zeile wurden nur die Dispersionsphase und die Linienbreite freigelassen, in der zweiten zusätzlich der axiale Nullfeldparameter D, in der untersten zusätzlich der rhombische Nullfeldparameter E. Die Skalierung der Residuen ist um den Faktor 5 größer als für die Messungen und Simulationen. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für die vierte der sechs Manganlinien, die vollständigen Ergebnisse sind im Anhang A.4 (Abbildung A.1) wiedergegeben.

Für die onkogene Mutante Ras(G12V) wurden keine Spektren mit vergleichbarem S/N-Verhältnis aufgenommen, weshalb diese Probe in Abbildung 9.5 nicht wiedergegeben ist.

Zunächst fällt auf, dass ohne die Berücksichtigung der Nullfeldparameter keine zufriedenstellenden Simulationen erzielt werden können, wie in der jeweils obersten Zeile zu erkennen ist. Unter Hinzunahme des axialen Nullfeldparameters D werden die Simulationen deutlich besser. Die Hinzunahme des rhombischen Nullfeldparameters E zeigt nur einen sehr geringen Einfluss auf die Qualität der Simulationen, weshalb dieser in den folgenden Simulationen nicht berücksichtigt wird. In Tabelle 9.1 sind die Parameter, die zu den Simulationen unter Verwendung des axialen Nullfeldparameters gehören, wiedergegeben.

Probe	Linienbreite (mT)	D (mT)
wt	$0,64 \pm 0,03$	$12,4 \pm 0,7$
T35S	$0,63 \pm 0,02$	$13,0 \pm 0,3$
T35A	$0,80 \pm 0,02$	$10,9 \pm 0,8$

Tab. 9.1 Parameter der in Abbildung 9.5 gezeigten Simulationen unter Berücksichtigung des axialen Nullfeldparameters D. Der Fehler gibt die Abweichungen über fünf der sechs Manganlinien wieder. Da bei vielen Messungen im Bereich der dritten Manganlinie ein Sprung in der Baseline zu erkennen ist, wird diese Linie oftmals nicht vernünftig simuliert. Aus diesem Grund wurde die dritte Linie bei der Mittelwertbildung und der Berechnung der Parameterstreuung nicht berücksichtigt.

In Tabelle 3.1 wurden einige veröffentlichte Nullfeldparameter für  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen in Proteinumgebungen zusammengestellt. In einer Arbeit wurde für den  $\text{Ras(G12V)} \bullet \text{Mn}^{2+} \bullet \text{GDP}$  Komplex mit Hilfe der Intensitäten der verbotenen Übergänge ein axialer Nullfeldparameter von  $11,0 \pm 2,0$  mT bestimmt [43]. Dieser Wert stimmt gut mit den oben bestimmten Werten überein und ist damit eine unabhängige Bestätigung der Ergebnisse. Die veröffentlichten Nullfeldparameter für die anderen Systeme sind mit einer einzigen Ausnahme alle größer als die hier bestimmten.

In den gezeigten Simulationen ist die erhaltene Linienbreite unabhängig davon, ob der rhombische Nullfeldparameter E berücksichtigt wird.

Auffällig ist, dass die Linienbreite für die Probe  $\text{Ras(T35A)}$  etwa 0,15 mT größer ist als für die beiden anderen.

### 9.3.2 Simulation der Spektren mit $\text{H}_2^{17}\text{O}$

Um Aussagen über die Anzahl an Wasserliganden zu erhalten, wurden die verschiedenen Proteinkomplexe in  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ -angereichertem Wasser gelöst. Der Effekt des  $^{17}\text{O}$  auf die Spektren wurde in Abbildung 9.4 demonstriert. Die Spektren wurden ebenfalls mit dem in Kapitel 3.2 vorgestellten Simulationsprogramm angefitet, zusätzlich wurde hier die Hyperfeinwechselwirkung zum  $^{17}\text{O}$  berücksichtigt. Für einen ersten Satz an Simulationen wurden folgende Parametergrenzen vorgegeben: Der axiale Nullfeldparameter D liegt zwischen 8 und 20 mT, die Linienbreite zwischen 0,2 und 2 mT und die isotrope Hyperfeinkopplung zum  $^{17}\text{O}$  zwischen 0 und 0,5 mT. Die mit diesen Parametergrenzen erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 9.6 und 9.7 wiedergegeben.

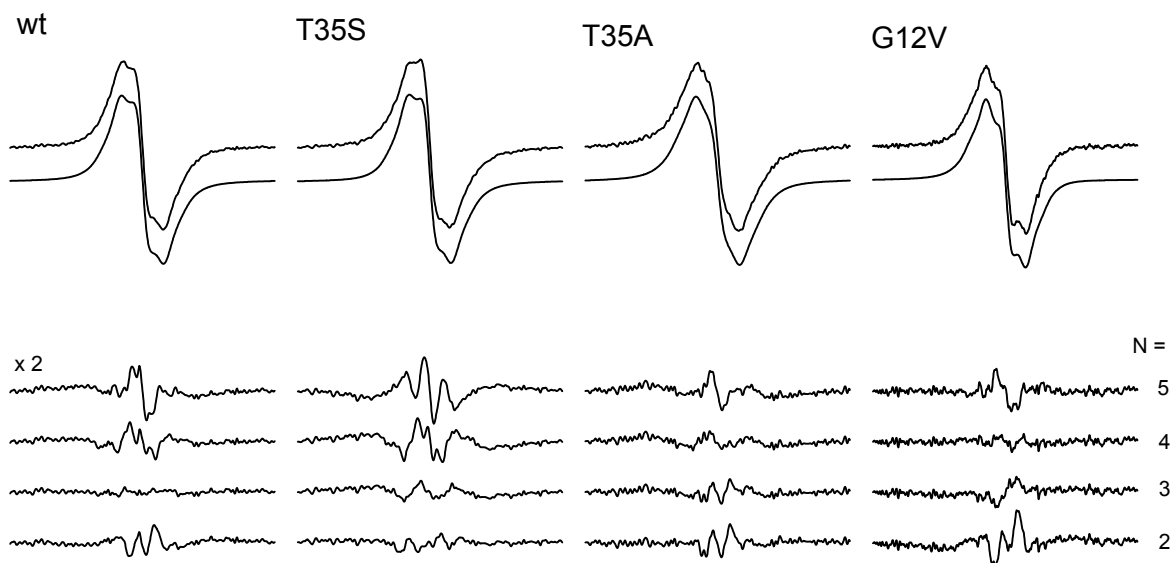


Abb. 9.6 Ergebnisse der Simulationen der Spektren für die verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O bei Raumtemperatur unter der Annahme unterschiedlich vieler Wasserliganden. Gezeigt sind jeweils die Messung, die beste Simulation und die Residuen für verschieden viele angenommene Wasserliganden. Die Skalierung der Residuen ist um den Faktor zwei größer als für die Messung und die Simulation. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für die vierte der sechs Manganlinien, die vollständigen Ergebnisse sind im Anhang A.4 (Abbildung A.2) wiedergegeben.

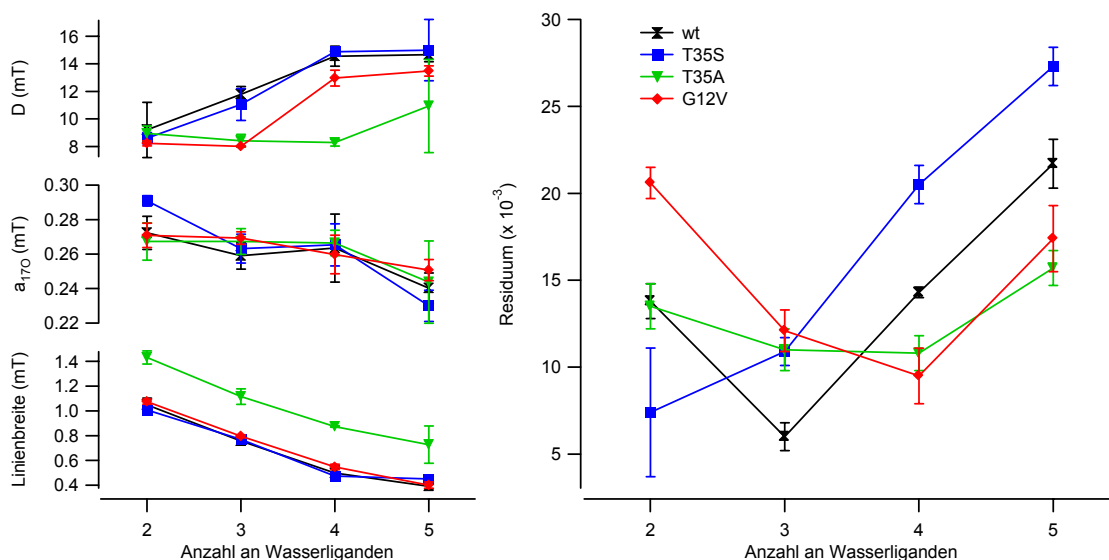


Abb. 9.7 Darstellung der Parameter, die zu den Simulationen in der Abbildung 9.6 gehören. Gezeigt sind die Mittelwerte der Parameter der jeweils besten Simulation für fünf der sechs Manganlinien. Die Fehlerbalken geben die Streuung der Parameter wieder. Wie bei der Darstellung der Ergebnisse für die Messungen mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O wurde die dritte Linie bei der Mittelwertbildung und der Berechnung der Parameterstreuung nicht berücksichtigt.

Aus den Simulationen und den Ergebnissen der Abbildungen 9.6 und 9.7 lassen sich einige Aussagen ableiten.

Beim Ras(wt)•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplex liegen bei Raumtemperatur drei Wasserliganden vor. Sowohl in Abbildung 9.7 als auch bei der Darstellung der Residuen in Abbildung 9.6 zeigt sich, dass unter der Annahme von drei Wasserliganden die besten Ergebnisse erzielt werden.

Für die Proben Ras(T35A) und Ras(G12V) werden die besten Ergebnisse unter der Annahme von vier Wasserliganden erzielt, wenn auch das Minimum bei der Auftragung der Residuen in der Abbildung 9.7 nicht so deutlich ausgeprägt ist wie beim Wildtyp. Wie schon bei den Messungen in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O ist auch hier wieder die Linienbreite für die Mutante Ras(T35A) größer als für den Wildtyp und die Mutante Ras(T35S), diesmal ist der Effekt sogar noch stärker.

Bei den zuletzt gezeigten Simulationen wurden alle Parameter in den angegebenen Grenzen freigelassen. Da der einzige Unterschied zwischen den Messungen mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O und H<sub>2</sub><sup>17</sup>O in der zusätzlichen Hyperfeinwechselwirkung zum <sup>17</sup>O liegen sollte, kann aber vermutet werden, dass die anderen Parameter wie der Nullfeldtensor und die Linienbreite unabhängig davon sind, ob die Proteinkomplexe in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O oder in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O gelöst sind.

Aus diesem Grund wird im Folgenden ein weiterer Satz an Simulationen gezeigt, bei denen die Parametergrenzen für die Linienbreite geändert wurden. Die Linienbreite liegt bei diesen Simulationen innerhalb eines Bereiches, welcher der <sup>16</sup>O-Linienbreite ± 0,05 mT entspricht. Die erhaltenen Simulationen und Parameter sind in den Abbildungen 9.8 und 9.9 wiedergegeben.

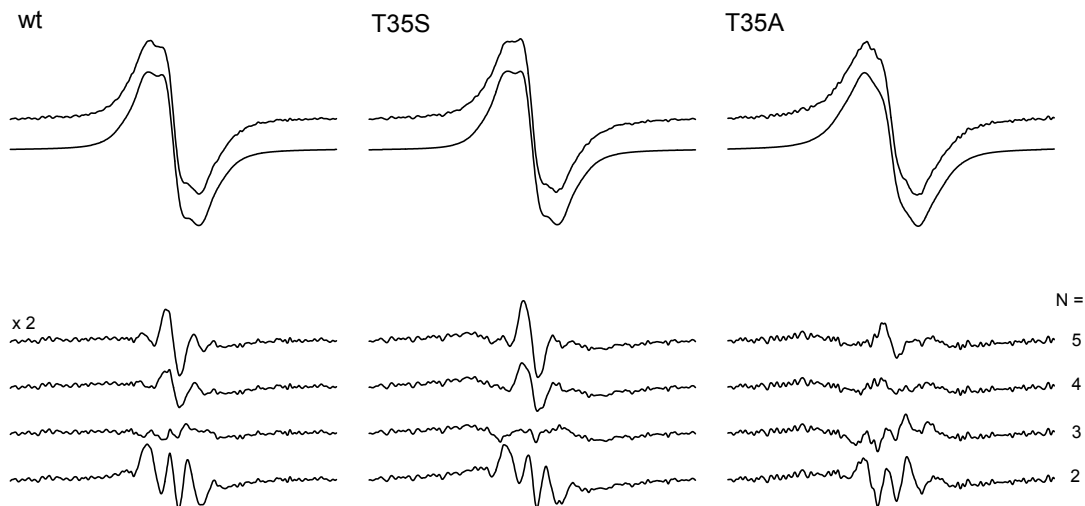


Abb. 9.8 Ergebnisse der Simulationen der Spektren für die verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O bei Raumtemperatur bei Einschränkung des Linienbreitenparameters. Die Probe Ras(G12V) fehlt in dieser Abbildung, da keine Simulationen für die Messung in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O durchgeführt wurden. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für die vierte der sechs Manganlinien, die vollständigen Ergebnisse sind im Anhang A.4 (Abbildung A.3) wiedergegeben.

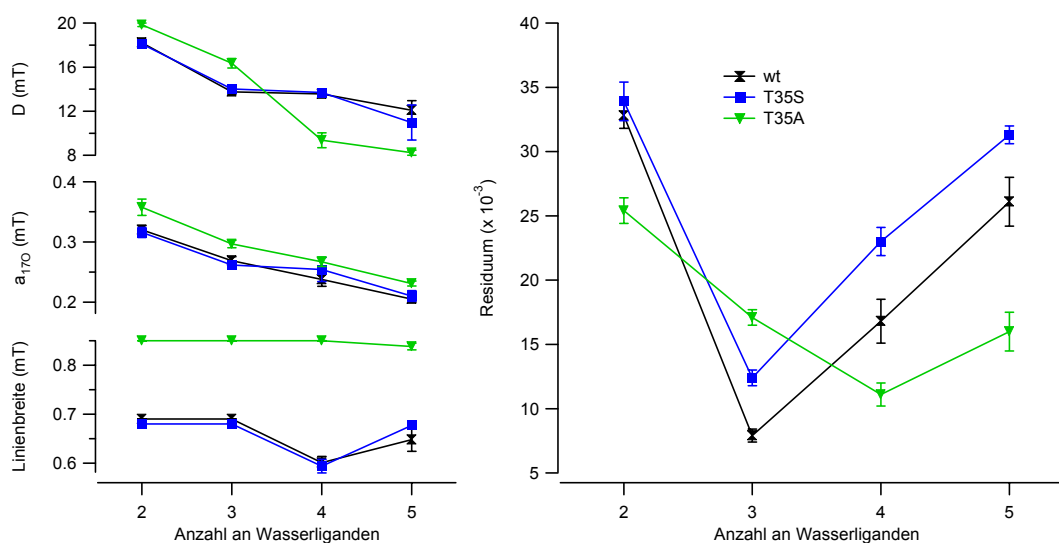


Abb. 9.9 Darstellung der Parameter, die zu den Simulationen in der Abbildung 9.8 gehören. Gezeigt sind die Parameter der jeweils besten Simulation, gemittelt über die Manganlinien. Die Fehlerbalken geben die Streuung der Parameter wieder. Wie bei der Abbildung 9.7 wurde die jeweils dritte der sechs Manganlinien bei der Mittelwertbildung und bei der Parameterstreuung nicht berücksichtigt.

Im Vergleich mit der Abbildung 9.7 zeigen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch einige deutliche Unterschiede.

Bei der Betrachtung der Residuen fällt auf, dass sich für den Wildtyp und die Probe Ras(T35A) keine Änderungen ergeben, lediglich die Minima sind jetzt deutlicher ausgeprägt als bei den zuvor gezeigten Simulationen. Das liegt hauptsächlich an der Tatsache, dass die Residuen für zwei Wasserliganden wesentlich größer sind als zuvor. Die Probe Ras(T35S) zeigt jetzt ein deutliches Minimum bei drei Wasserliganden, was zuvor nicht zu erkennen war. Auch hier ist die Simulation mit zwei Wasserliganden wesentlich schlechter als bei den davor gezeigten Simulationen.

Der Wert für die Hyperfeinkopplung zum  $^{17}\text{O}$  ist für die Probe Ras(T35A) ca. 0,04 mT größer als für die anderen beiden.

Eine deutliche Änderung ergibt sich bei der Abhängigkeit des axialen Nullfeldparameters von der Anzahl an Wasserliganden. Bei den zuerst gezeigten Simulationen nahm der Nullfeldparameter mit der Anzahl an Wasserliganden zu, diese Tendenz hat sich nun umgekehrt.

Bei allen vier Teilabbildungen in Abbildung 9.9 zeigt sich deutlich eine Einteilung der verschiedenen Proben in zwei Gruppen. Der Wildtyp und die Mutante Ras(T35S) zeigen stets ein sehr ähnliches Verhalten, während sich die Mutante Ras(T35A) von den beiden anderen unterscheidet. Diese Einteilung in zwei Gruppen wird auch später bei der Betrachtung von Spektren an gefrorenen Lösungen wieder auftauchen.

Es wurden auch eine Reihe weiterer Simulationen unter der Verwendung anderer Parametergrenzen und der Einschränkung weiterer Parameter durchgeführt. Die erhaltenen Aussagen



sind aber stets vergleichbar mit den zuletzt gezeigten, weshalb hier darauf verzichtet wird, weitere Simulationen zu zeigen.

Aus den gezeigten Ergebnissen für die Simulationen der Spektren mit  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  kann für die Anzahl an Wasserliganden bei Raumtemperatur folgende Aussage getroffen werden: Beim Wildtyp und bei der Probe Ras(T35S) liegen drei Wasserliganden vor, bei den beiden anderen Proben dagegen vier.

### 9.3.3 Auswertung mit der Faltungsmethode

Wie oben bereits erwähnt, sollte der einzige Unterschied zwischen den Spektren mit  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  in der zusätzlichen Hyperfeinkopplung zum  $^{17}\text{O}$  liegen. Sämtliche Parameter, die in die Spektren mit  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  einfließen, sollten identisch sein. Aus diesem Grund wurde die Auswertung der experimentellen Spektren mit einer weiteren Methode vorgenommen, welche im Folgenden als Faltungsmethode bezeichnet wird. Diese Methode stellt eine unabhängige Überprüfung der bisher gezeigten Ergebnisse dar.

Zu jeder möglichen Anzahl an koordinierten Wassermolekülen, die mit  $^{17}\text{O}$  markiert sind, wird ein entsprechendes Hyperfeinmuster berechnet. In einem zweiten Schritt werden zu einer vorgegebenen Anzahl an Koordinationsplätzen die zuvor berechneten Hyperfeinmuster entsprechend der statistischen Besetzungswahrscheinlichkeit gewichtet und addiert (vgl. Gleichung (3.7)). Im Gegensatz zu der bisher gezeigten vollständigen Simulation der Spektren wird nun das experimentelle  $^{16}\text{O}$ -Spektrum für die Berechnung verwendet. Dieses wird mit dem berechneten Hyperfeinmuster gefaltet, um auf diese Weise die Messungen mit  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  zu simulieren.

Mathematisch gesehen ist diese Methode nicht ganz korrekt, da der Hyperfeinwechselwirkungstensor dem Nullfeldtensor überlagert ist. Aufgrund der Größe des Nullfeldtensors wird dieser durch die Rotation der Proteinkomplexe nicht vollständig ausgemittelt. Dadurch ist es nicht korrekt, die Effekte der Hyperfeinwechselwirkung als isotrop anzunehmen. Um die Effekte einer anisotropen Hyperfeinkopplung anzudeuten, werden die gemessenen Manganlinien mit einer Gaußlinie gefaltet und damit verbreitert. Die Breite dieser Gaußlinie ist dabei ein freier Parameter des Fitalgorithmus.

Die beiden weiteren Parameter, die von dem Fitalgorithmus optimiert werden, sind die MW-Phase und die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante zum  $^{17}\text{O}$ .

Bei dieser Methode sind alle Effekte, welche die Linienbreite beeinflussen, automatisch berücksichtigt und müssen nicht explizit berechnet werden. Insbesondere die intrinsische Linienbreite, die Nullfeldparameter und weitere Hyperfeinwechselwirkungen zu entfernten Kernen müssen auf diese Weise nicht in die Berechnung integriert werden. Aus diesem Grund müssen bei der Faltungsmethode wesentlich weniger Annahmen gemacht werden als bei der vollständigen Simulation der Spektren. Dadurch ist diese Methode eine unabhängige Überprüfung der zuvor gezeigten Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Faltungsmethode sind in Abbildung 9.10 wiedergegeben.

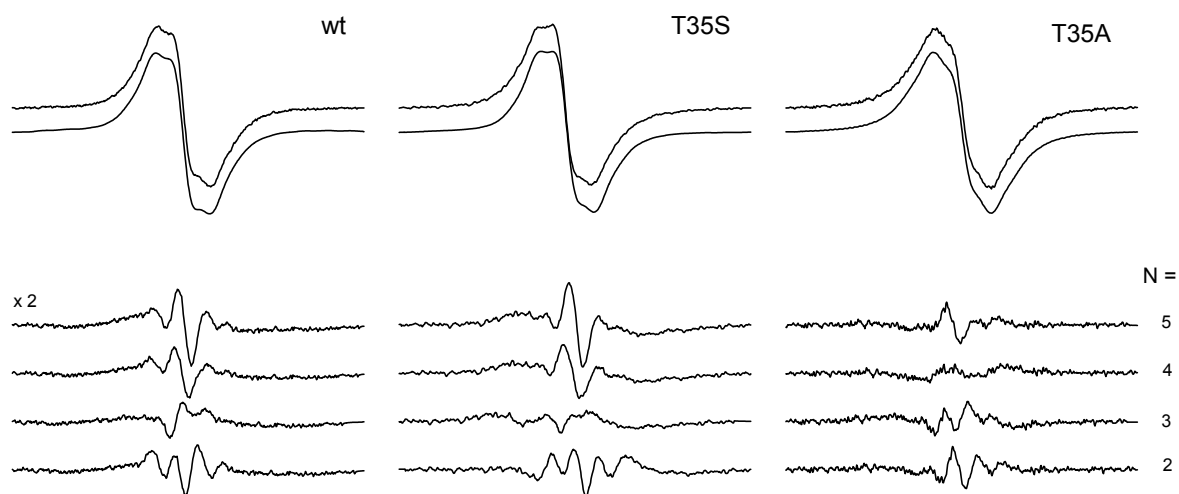


Abb. 9.10 Berechnung der Spektren der Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O bei Raumtemperatur mit der Faltungsmethode. Gezeigt sind jeweils die Messung, der beste Fit und die Residuen für Fits mit verschiedenen Anzahlen an koordinierten Wassermolekülen. Gezeigt sind nur die Daten für die jeweils vierte der sechs Manganlinien. Die gesamten Ergebnisse sind im Anhang A.4 (Abbildung A.4) wiedergegeben.

In Abbildung 9.11 sind die Parameter, welche mit der Faltungsmethode erhalten wurden, wiedergegeben.

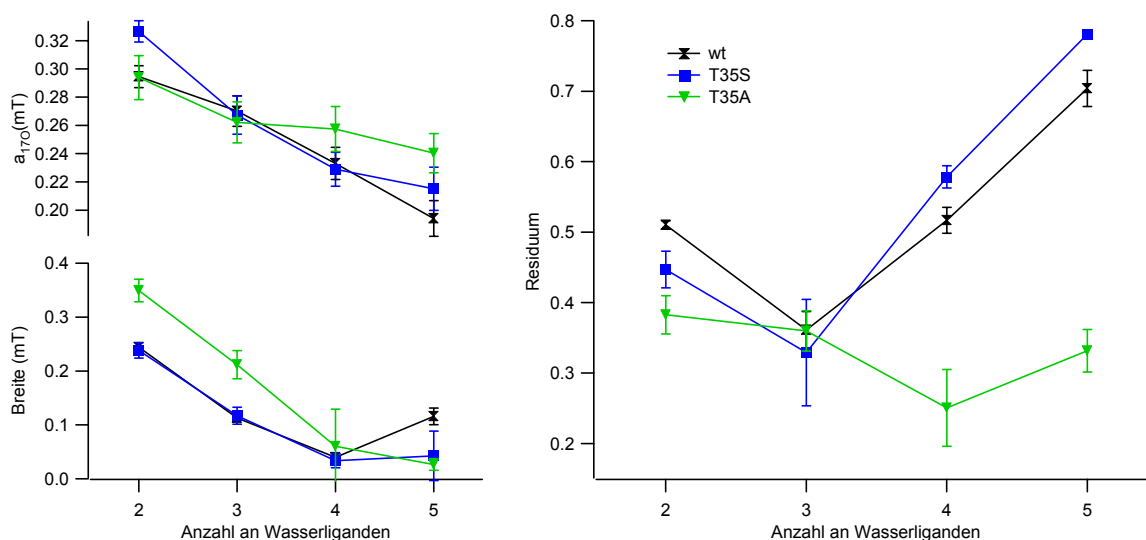


Abb. 9.11 Darstellung der Parameter, die zu den Ergebnissen der Faltungsmethode in Abbildung 9.10 gehören. Wie auch bei der Darstellung der Ergebnisse der vollständigen Simulationen wurden bei der Mittelwertbildung und bei der Parameterstreuung die Ergebnisse der dritten Manganlinie nicht berücksichtigt.

Wie schon bei der vollständigen Simulation der Spektren in  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  ist auch bei der Auswertung mit der Faltungsmethode der Linienbreitenparameter für die Mutante Ras(T35A) größer als bei den anderen beiden Proben.

Wie den Abbildungen 9.10 und 9.11 zu entnehmen ist, sind mit der Faltungsmethode die Spektren für den Wildtyp und die Mutante Ras(T35S) unter der Annahme von drei direkten Wasserliganden am besten zu fitten, für die Mutante Ras(T35A) werden vier Wasserliganden erhalten. Dieses Ergebnis ist in voller Übereinstimmung mit den oben vorgestellten Ergebnissen der vollständigen Simulationen der Raumtemperaturspektren. Da bei der Faltungsmethode weniger Annahmen gemacht werden als bei der vollständigen Simulation der Spektren, ist dies eine unabhängige Bestätigung der zuvor gemachten Aussagen.

#### 9.4 Cw-EPR an Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexen bei tiefen Temperaturen

Um die Struktur des aktiven Zentrums weiter zu untersuchen, wurden cw W-Band Messungen auch an gefrorenen Proteinlösungen bei 20 K vorgenommen. Sollen weitergehende EPR-Methoden, wie beispielsweise ESEEM<sup>15</sup> oder ENDOR zur Untersuchung der Proteinkomplexe angewendet werden, so müssen diese Untersuchungen an gefrorener Lösung durchgeführt werden. Durch die Auswertung dieser Messungen sollte untersucht werden, inwieweit Kristallbildungseffekte, die möglicherweise beim Ausfrieren der Proteinlösung auftreten können, die Struktur des aktiven Zentrums beeinflussen bzw. verändern.

In Abbildung 9.12 ist für die verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe bei 20 K jeweils eine der sechs Manganlinien gezeigt. Daran sollen die Effekte, die bei Messungen an gefrorenen Lösungen auftreten, gezeigt werden.

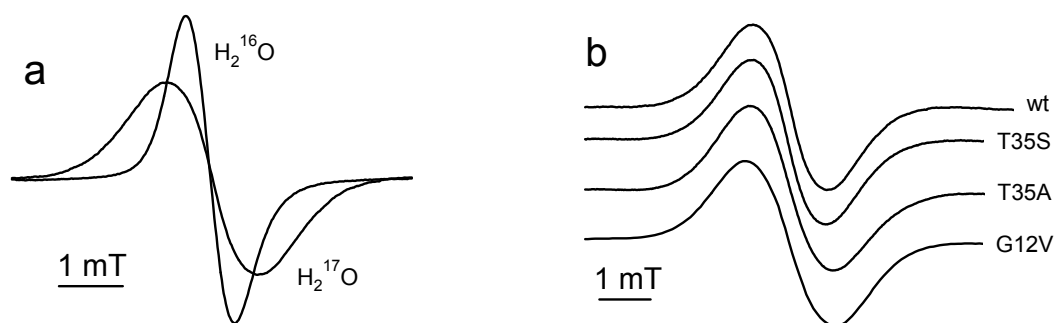


Abb. 9.12 Vergleich der verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe bei 20 K. a) Vergleich zwischen den Messungen in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  für den Wildtyp, b) Vergleich der  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  Spektren der verschiedenen Mutanten. Gezeigt ist jeweils die vierte Linie der Manganspektren.

<sup>15</sup> ESEEM-Spektroskopie ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung von Hyperfeinwechselwirkungen.

Im linken Teil sind die Spektren mit  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  bei 20 K gegenübergestellt. Deutliche Unterschiede zu den Spektren bei Raumtemperatur sind die größeren Linienbreiten und das wesentlich bessere S/N-Verhältnis der Spektren. Die verschiedenen experimentell bestimmten Linienbreiten sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst. Bei den Messungen in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  sind die Linienbreiten bei den gefrorenen Lösungen ca. 70 % größer als bei Raumtemperatur.

	wt	T35S	T35A	G12V
RT, $\text{H}_2^{16}\text{O}$	$0,44 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,01$	—
20 K, $\text{H}_2^{16}\text{O}$	$0,78 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,03$
20 K, $\text{H}_2^{17}\text{O}$	$1,48 \pm 0,04$	$1,46 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,04$

Tab. 9.2 Experimentell bestimmte Linienbreiten der verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in mT.

Als Resultat dieser größeren Linienbreite sind die Spektren mit  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  bei 20 K mehr oder weniger strukturlos. Die zusätzliche Linie, die bei Raumtemperatur zu erkennen ist, wird bei 20 K nur als eine Linienverbreiterung wahrgenommen, wodurch die Auswertung der cw-Spektren wesentlich erschwert wird. Bei Raumtemperatur waren die verschiedenen Intensitäten der beiden überlagerten Signale ein wesentliches Merkmal, mit dessen Hilfe die Auswertung möglich war. Der Vergleich der Spektren für die verschiedenen Mutanten in  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  zeigt wesentlich geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren als es bei Raumtemperatur der Fall ist.

Deutlich zu erkennen ist, dass die verschiedenen Proteinkomplexe bei 20 K unterschiedliche Linienbreiten aufweisen. Bei den Spektren in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  hat der Wildtyp eine etwas kleinere Linienbreite als die anderen drei Mutanten. Bei den Messungen in  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  hingegen teilen sich die verschiedenen Proben in zwei Gruppen. Der Wildtyp und die Mutante Ras(T35S) haben vergleichbare Linienbreiten und die beiden Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) weisen ähnliche Linienbreiten auf. Diese Einteilung in zwei Gruppen entspricht den Ergebnissen, die bei Raumtemperatur erhalten wurden.

#### 9.4.1 Simulation der cw-Spektren mit $\text{H}_2^{16}\text{O}$ bei 20 K

Wie bei den Raumtemperaturmessungen wurden auch bei den Messungen an gefrorener Lösung zunächst die Spektren in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  angefüttet, um zu überprüfen, inwieweit das Model, welches den Berechnungen zu Grunde liegt, die Verhältnisse korrekt beschreibt. Die Ergebnisse der Simulationen sind in Abbildung 9.13 wiedergegeben.

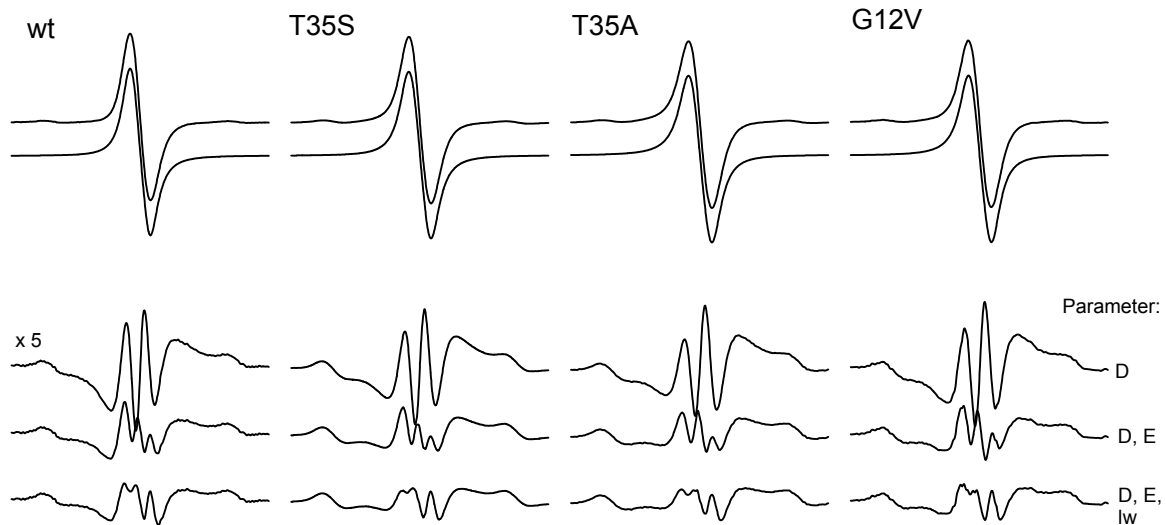


Abb. 9.13 Ergebnisse der Simulationen der cw-Spektren der Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O bei 20 K. Zu jeder Probe sind das experimentelle Spektrum, die beste Simulation und drei verschiedene Residuen wiedergegeben. Gezeigt sind wieder nur die Ergebnisse für die vierte der sechs Manganlinien, die vollständigen Daten sind im Anhang A.4 (Abbildung A.5) wiedergegeben.

Im Vergleich mit Abbildung 9.5 zeigt sich, dass der relative Fehler der Simulationen bei 20 K größer ist als bei den Simulationen der Raumtemperaturspektren mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O.

Auf den ersten Blick ist der einzige Unterschied zwischen Raumtemperatur und 20 K die Tatsache, dass die Proteinkomplexe in gefrorener Lösung nicht mehr beweglich sind, und somit anisotrope Anteile der Hyperfeinkopplungen nicht ausgemittelt werden können. Solche anisotropen Anteile der Hyperfeinwechselwirkungen sind in der Berechnung der Spektren nicht berücksichtigt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Proteinkomplexe in einer Konformationsverteilung ausfrieren, was damit zu einer Verteilung der Parameter führen würde. Auch eine solche Parameterverteilung ist in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Auch unter Hinzunahme weiterer isotroper Hyperfeinwechselwirkungen, welche die Wechselwirkungen zu den Protonen der Wassermoleküle sowie zum Phosphor des GDP wiedergeben sollen, werden die Simulationen nicht besser.

An diesen Beobachtungen lässt sich bereits erkennen, dass das Modell, welches der vollständigen Simulation der Spektren zu Grunde liegt, zumindest bei gefrorenen Lösungen nicht vollständig ist.

#### 9.4.2 Simulation der cw-Spektren mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O bei 20 K

Obwohl die Simulation der Spektren mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O nicht genauso gut sind wie bei Raumtemperatur, wurden auch die Spektren mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O angefitet. In Abbildung 9.14 sind die Ergebnisse für die verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe dargestellt. Da sich im

Gegensatz zu den Ergebnissen bei Raumtemperatur eine geringfügige Verbesserung der Simulationen bei Hinzunahme des rhombischen Nullfeldparameters ergibt, werden Simulationen gezeigt, bei denen dieser Parameter berücksichtigt wurde.

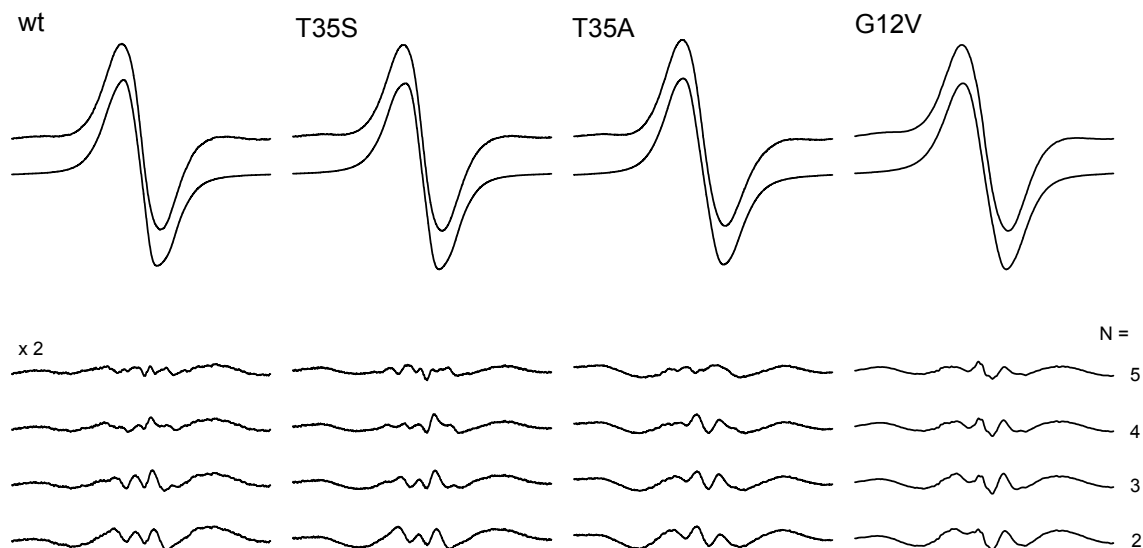


Abb. 9.14 Ergebnisse der Simulation der Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe in H<sub>2</sub><sup>17</sup>O bei 20 K. Die Parametergrenzen für den Fitalgorithmus waren: D=0.40 mT, E=0.8 mT, Linienbreite=0.3 mT, <sup>17</sup>O-Hyperfeinkopplung=0,1..0,5 mT. Gezeigt sind wieder nur die Ergebnisse für die vierte Linie, die vollständigen Daten sind im Anhang A.4 (Abbildung A.6) wiedergegeben.

Die zu den Simulationen gehörenden Parameter sind in Abbildung 9.15 zusammengefasst. Bei der Betrachtung der Parameter in Abbildung 9.15 sind einige interessante Effekte zu erkennen.

Zunächst fällt auf, dass die Residuen kein Minimum zeigen, wie dies bei Raumtemperatur der Fall war. Bei tiefen Temperaturen werden die Residuen immer kleiner je mehr Wasserliganden in der Simulation berücksichtigt werden. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass tatsächlich fünf Wasserliganden vorliegen, da der Proteinkomplex dann am aktiven Zentrum nicht zusammengehalten würde. Die Betrachtung der Residuen alleine liefert also keine Aussage über die absolute Anzahl an Wasserliganden.

Bei der Simulation der Spektren mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O ist aufgefallen, dass bei 20 K die Residuen größer sind als bei Raumtemperatur. Bei den Spektren mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Die Residuen für die Spektren bei tiefen Temperaturen mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O sind deutlich kleiner als die für die Spektren mit H<sub>2</sub><sup>16</sup>O.

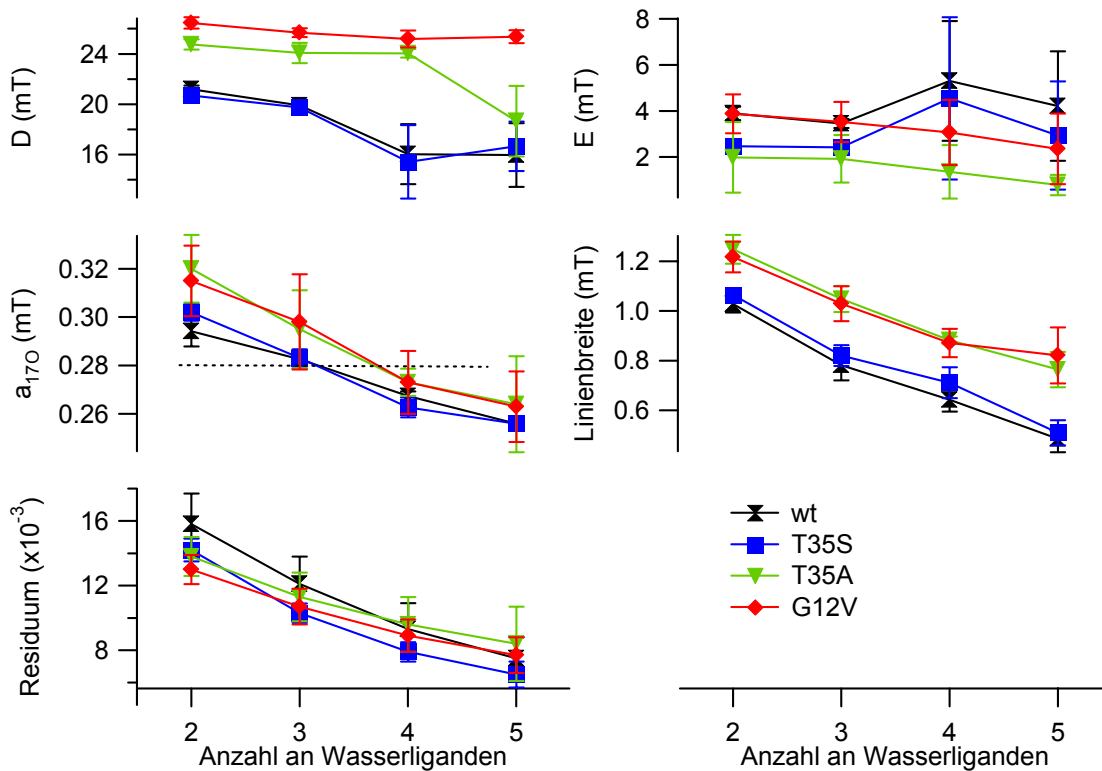


Abb. 9.15 Darstellung der Parameter, die mit den in Abbildung 9.14 gezeigten Simulationen erhalten wurden. Die gestrichelte Linie wird bei den ENDOR-Untersuchungen in Kapitel 9.5 erläutert.

Bei den Parametern, die bei den Simulationen frei gelassen worden sind, ist wieder deutlich eine Einteilung in zwei Gruppen zu erkennen. Wie schon bei der Betrachtung der Linienbreiten und wie den Ergebnissen für die Raumtemperaturspektren zeigen der Wildtyp und die Mutante Ras(T35S) ähnliches Verhalten. Die zweite Gruppe wird von den beiden Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) gebildet, die ebenfalls jeweils ähnliches Verhalten zeigen. Mit Ausnahme des rhombischen Nullfeldtensors E, der nur einen geringen Einfluss auf die Qualität der Simulationen hat, sind die erhaltenen Parameter bei der zweiten Gruppe stets größer als bei der ersten. Bei der Linienbreite und bei der  $^{17}\text{O}$ -Hyperfeinkopplung sind die Parameter der zweiten Gruppe ungefähr um eine Einheit zu einer höheren Anzahl an Wasserliganden verschoben. Wenn davon ausgegangen wird, dass die intrinsische Linienbreite und die  $^{17}\text{O}$ -Hyperfeinkopplung unabhängig von der Anzahl an Wasserliganden sind, bestätigt diese Beobachtung die Aussage, dass bei den Mutanten Ras(G12V) und Ras(T35A) ein Wasserligand mehr vorliegt als beim Wildtyp und der Mutante Ras(T35S).

Um eine unabhängige Aussage über die absolute Anzahl an Wasserliganden zu erhalten, ist es notwendig, Parameter wie die Linienbreite oder die  $^{17}\text{O}$ -Hyperfeinkopplung mit anderen Methoden zu bestimmen. Weiter unten in Kapitel 9.5 werden ENDOR-Untersuchungen gezeigt, mit denen die  $^{17}\text{O}$ -Hyperfeinkopplung bestimmt wurde.

Wie schon bei den Raumtemperaturspektren wurden noch eine Reihe weiterer Simulationen mit unterschiedlichen Parametergrenzen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse liefern die

gleichen Aussagen wie die gezeigten Simulationen, daher wird darauf verzichtet, weitere Simulationen zu zeigen.

Auch durch die Hinzunahme weiterer isotroper Hyperfeinkopplungen ändern sich die erhaltenen Aussagen nicht.

### 9.4.3 Auswertung mit der Faltungsmethode

Auch bei den Messungen bei 20 K wurde versucht, die Spektren mit Hilfe der Faltungsmethode auszuwerten und unabhängig von der vollständigen Simulation der Spektren die Anzahl an Wasserliganden zu bestimmen.

Wie bei den Raumtemperaturmessungen werden die Messungen mit  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  zunächst mit einer Gaußlinie gefaltet, was zu einer Linienverbreiterung führt. Hiermit soll die Anisotropie der Hyperfeinwechselwirkung simuliert werden. Die Breite der Gaußlinie ist wiederum ein freier Parameter des Faltungsalgorithmus. Zusammen mit der MW-Phase und der isotropen Hyperfeinkopplung zum  $^{17}\text{O}$  gibt es somit drei freie Parameter.

Die Ergebnisse der Faltungsmethode sind in den Abbildungen 9.16 und 9.17 wiedergegeben.

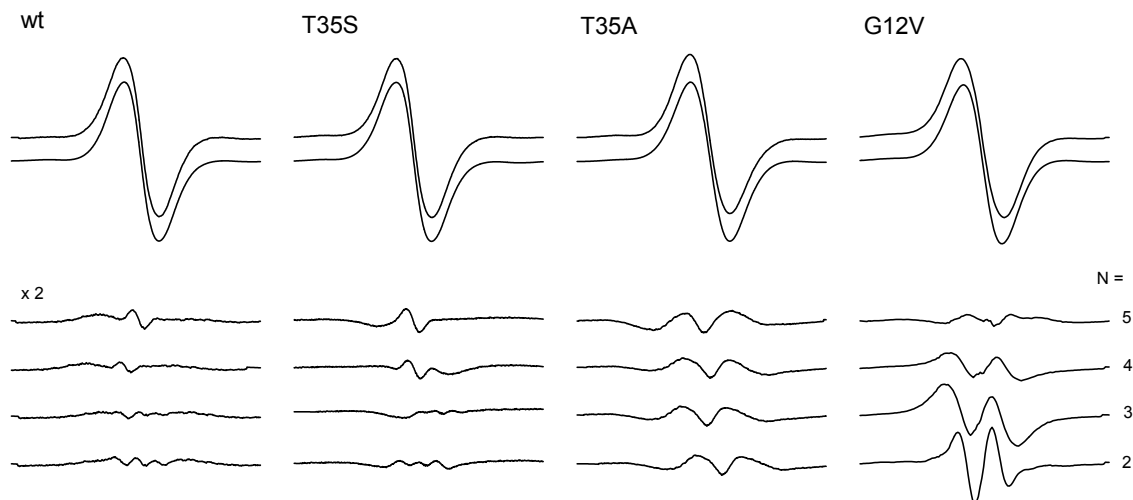


Abb. 9.16 Ergebnisse der Faltungsmethode für die verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexe bei 20 K unter der Annahme verschieden vieler Wasserliganden. Gezeigt ist nur das Ergebnis für die jeweils vierte der sechs Manganlinien. Die vollständigen Daten sind wieder im Anhang A.4 (Abbildung A.7) wiedergegeben.



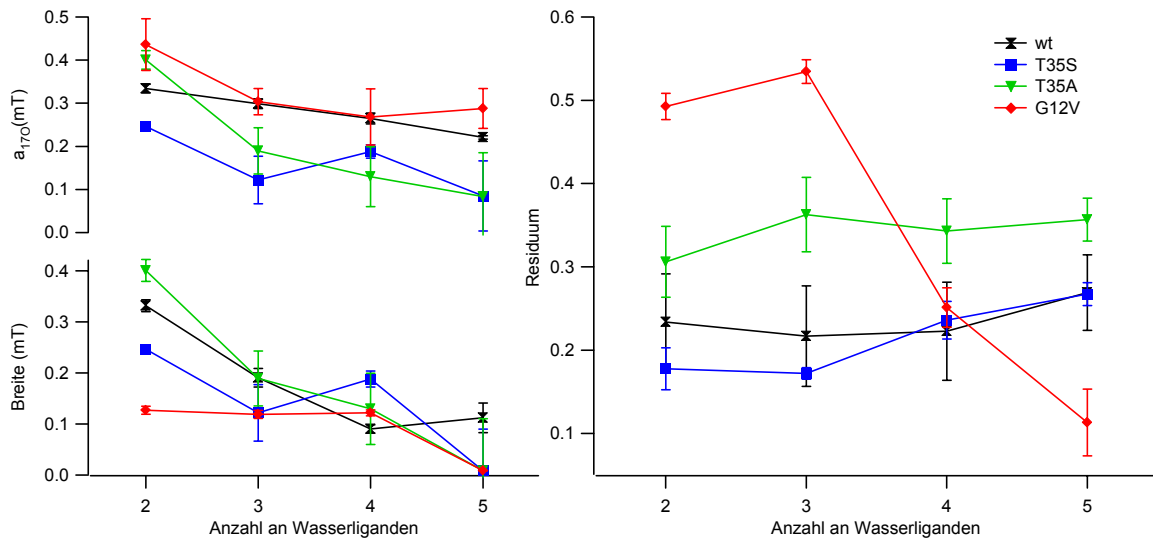


Abb. 9.17 Darstellung der mit der Faltungsmethode erhaltenen Ergebnisse bei 20 K.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse in den Abbildungen 9.16 und 9.17 fällt auf, dass mit der Faltungsmethode bei den Tieftemperaturspektren keine weiterführenden Erkenntnisse gewonnen werden können. In Abbildung 9.16 scheint es so, als ob für den Wildtyp und die Mutante Ras(T35S) mit drei Wasserliganden die besten Ergebnisse erzielt werden können, wie dies auch bei Raumtemperatur der Fall ist. In Abbildung 9.17 bestätigt sich diese Beobachtung jedoch nicht, hier sind keine Minima bei der Darstellung der Residuen zu erkennen. Für die Mutante Ras(T35A) werden mit der Faltungsmethode überhaupt keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt. Bei der Mutante Ras(G12V) werden die Residuen umso kleiner, je mehr Wasserliganden zugelassen werden. Bei keiner der drei Teilabbildungen in Abbildung 9.17 ist eine Einteilung in zwei Gruppen zu erkennen, wie dies bei der vollständigen Simulation der Spektren oder bei der Auswertung der Raumtemperaturspektren der Fall war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Faltungsmethode bei den Raumtemperaturspektren Ergebnisse liefert, welche die Ergebnisse der vollständigen Spektrensimulation bestätigen. Bei den Spektren in gefrorener Lösung hingegen liefert diese Methode keine Aussage über die Anzahl der Wasserliganden. Ein wichtiger Grund, warum die Faltungsmethode bei den Tieftemperaturspektren versagt, kann die Tatsache sein, dass bei 20 K die anisotropen Anteile der Hyperfeinwechselwirkung nicht mehr ausgemittelt werden, und somit zu der Linienform beitragen. Mit der Faltungsmethode können diese Anteile nicht entsprechend berücksichtigt, sondern nur angedeutet werden.

## 9.5 <sup>17</sup>O-ENDOR Untersuchungen an Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexen

Bei der Darstellung der Ergebnisse aus der vollständigen Simulation der Spektren mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O wurde bereits darauf hingewiesen, dass eine unabhängige Bestimmung der verschiedenen Parameter notwendig ist, um die absolute Anzahl an Wasserliganden zu bestimmen.

Mittels Davies-ENDOR Spektroskopie wurde die Hyperfeinwechselwirkung zwischen dem  $Mn^{2+}$ -Ion und den  $^{17}O$ -Kernen des angereicherten Wassers bestimmt. Sowohl der  $Ras(wt) \bullet Mn^{2+} \bullet GDP$  Komplex als auch die onkogene Mutante  $Ras(G12V)$  wurden dabei untersucht. Die Spektren sind in Abbildung 9.18 gezeigt.

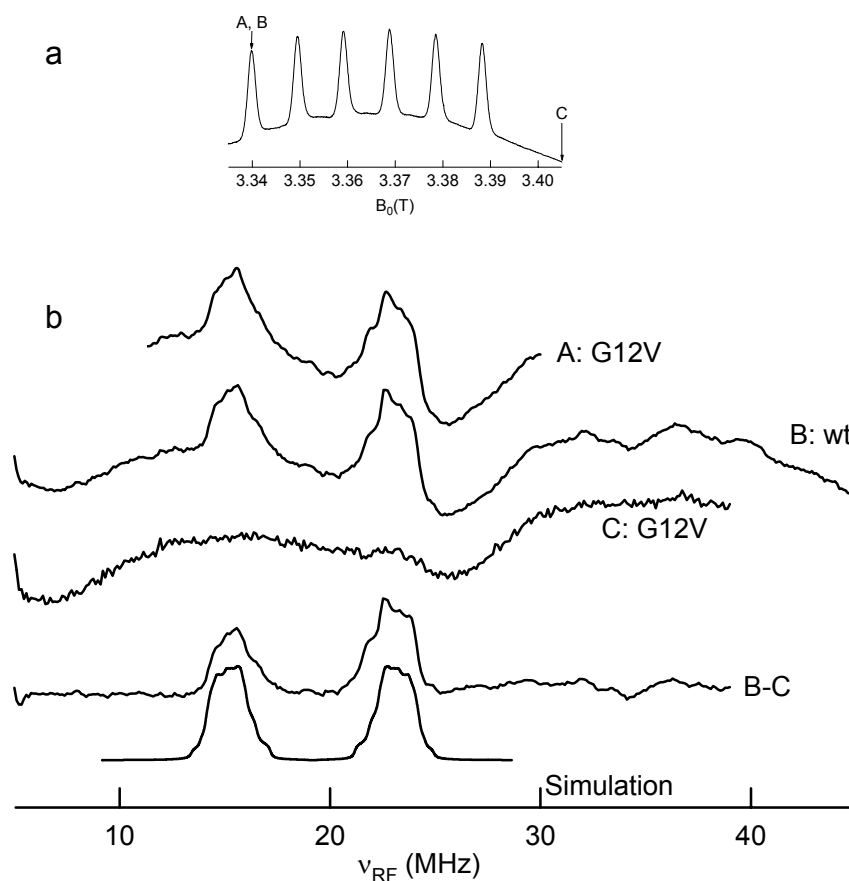


Abb. 9.18 W-Band  $^{17}O$ -ENDOR Spektrum des  $Ras(G12V) \bullet Mn^{2+} \bullet GDP$  Komplexes (A und C) und des Wildtyps (B) in  $H_2^{17}O$  bei  $T = 4$  K. a) *Fieldswept*-Spektrum des Wildtyps und Kennzeichnung der Feldpositionen, an denen die ENDOR-Spektren aufgenommen wurden. b) ENDOR-Spektren. Spektrum A sind 45 Mittelungen, Spektrum B sind 30 Mittelungen, Spektrum C sind 6 Mittelungen. Die RF-Pulslänge betrug jeweils  $22 \mu s$ .

Im Teil a) der Abbildung 9.18 ist ein 2-Puls *fieldswept*-Spektrum des  $Ras(wt) \bullet Mn^{2+} \bullet GDP$  Komplexes zu sehen. Mit den Buchstaben A und C sind zwei verschiedene Feldpositionen gekennzeichnet, an denen die entsprechenden ENDOR-Spektren aufgenommen wurden. An der Position A tragen sowohl die  $m_S = \pm 1/2$ -Übergänge als auch die Übergänge mit höheren  $m_S$ -Zuständen zu dem Signal bei. Um den Effekt der höheren  $m_S$ -Übergänge in den ENDOR-Spektren zu bestimmen, wurde auch an einer Feldposition, bei der nur diese zu dem Signal beitragen, ein ENDOR-Spektrum aufgenommen. Die entsprechenden ENDOR-Spektren an den beiden Feldpositionen sind im Teil b) der Abbildung 9.18 gezeigt.

Zwischen dem Wildtyp und der onkogenen Mutante  $Ras(G12V)$  sind bei den ENDOR-Messungen keinerlei Unterschiede zu erkennen.

Ebenfalls ist die Differenz der ENDOR-Spektren B und C gezeigt, die nur die Beiträge der  $m_S = \pm 1/2$  Übergänge enthält. Auch Schwankungen im Untergrundsignal, welche durch den Frequenzgang des RF-Verstärkers verursacht werden, sind auf diese Weise eliminiert. In Abbildung 9.18 ist auch eine Simulation des Differenzspektrums wiedergegeben, welche mit einem Programm von Dr. Marina Bennati durchgeführt worden ist. In Tabelle 9.3 sind die verwendeten Parameter wiedergegeben. Für die Hyperfeinkopplung ergibt sich mit den angegebenen Werten ein isotroper Anteil von 0,28 mT.

A [mT]	-0,224	-0,245	-0,362
Q [mT]	-0,0085	0,0085	0
$[\alpha, \beta, \gamma]$	$15^\circ$	$35^\circ$	$0^\circ$

Tab. 9.3 Parameter, die für die in Abbildung 9.18 gezeigte Simulation des ENDOR-Spektrums verwendet wurden. Die Winkel sind die Eulerwinkel, mit welchen der Quadrupoltensor relativ zum Hyperfeintensor gedreht ist. Die Genauigkeit der Werte beträgt ca. 20 %.

In Tabelle 9.4 ist ein Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Hyperfeinkopplungen zwischen  $Mn^{2+}$  und  $^{17}O$  im  $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ -Komplex sowie in vergleichbaren Proteinumgebungen zusammengestellt.

System	$^{17}O$ Label	$a_{17O,i}$ (mT)	Methode	Referenz
$[Mn(H_2O)_6]^{2+}$	$H_2^{17}O$	0,27	ENDOR, 2 K, 9 GHz	125
Ras• $Mn^{2+}$ •GDP	$H_2^{17}O$	0,25	cw-EPR, 180 K, 140 GHz	50
Ras• $Mn^{2+}$ •GMPPNP	$H_2^{17}O$	0,28	cw-EPR, 180 K, 140 GHz	50
Ras• $Mn^{2+}$ •GDP	$[^{17}O_\beta]GDP$	0,16 – 0,22	cw-EPR, 274 K, Q-Band	106
Ras• $Mn^{2+}$ •GMPPNP	$[^{17}O_\gamma]Thr$	0,11	Puls-EPR, 20 K, 140 GHz	126
EF-Tu• $Mn^{2+}$ •GTP	$[^{17}O_\beta]GTP$	0,19 – 0,26	cw-EPR, 300 K, 34 GHz	127
EF-Tu• $Mn^{2+}$ •GDP	$[\beta-^{17}O_3]GDP$	0,25	cw-EPR, 274 K, 34 GHz	128
AK• $Mn^{2+}$ •ATP	$[\beta-^{17}O_4]ATP$	0,22	cw-EPR, 274 K, 34 GHz	128
CK• $Mn^{2+}$ •ADP	$[\beta-^{17}O]ADP$	0,3 – 0,4	cw-EPR, 274 K, 9 GHz	129

Tab. 9.4 In der Literatur veröffentlichte isotrope Hyperfeinkopplungen zwischen  $Mn^{2+}$  und  $^{17}O$  in verschiedenen Proteinumgebungen. Abkürzungen: EF-Tu – Elongationsfaktor Tu, AK – Adenylat Kinase, CK – Creatin Kinase, ADP/ATP – Adenosin-di(tri)phosphat, Thr – Threonin.

Mit zwei Ausnahmen sind alle bisher veröffentlichten isotropen Hyperfeinkopplungen zwischen  $Mn^{2+}$  und  $^{17}O$  kleiner als 0,28 mT. Eine der beiden Ausnahmen bildet eine Arbeit am Ras• $Mn^{2+}$ •GppNHp Komplex, in der zum  $^{17}O$  von Wasser ebenfalls eine isotrope Hyperfeinkopplung von 0,28 mT bestimmt wurde. In derselben Veröffentlichung wird für den Ras• $Mn^{2+}$ •GDP Komplex hingegen eine etwas kleinere isotrope Hyperfeinkopplung von 0,25 mT angegeben [50]. Allerdings stammen mit einer Ausnahme alle Ergebnisse aus EPR-Untersuchungen und sind damit ungenauer als die Bestimmung mittels ENDOR-Spektroskopie. Darüber hinaus wurden die meisten Ergebnisse bei niedrigen MW-Frequenzen (X- und Q-Band) erhalten, bei denen die Breite der Manganlinien die Auswertung zusätzlich erschwert (vgl. Abbildung 3.3). Um solche Hyperfeinkopplungen eindeutig zu bestimmen, ist

HF-ENDOR die beste Methode. Die meisten der angegebenen Werte wurden für  $^{17}\text{O}$ -markierte Nukleotide, in einem Fall auch für eine markierte Aminosäure bestimmt. Diese sind kleiner als die Werte, die für  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ -Liganden gefunden werden.

In Abbildung 9.15 wurde bei der Auswertung der vollständigen Simulation der Spektren mit  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  bei 20 K bereits ein Wert von 0,28 mT für die isotrope Hyperfeinkopplung eingetragen.

Gut zu erkennen ist, dass eine isotrope Hyperfeinkopplung von 0,28 mT für den Wildtyp und die Mutante Ras(T35S) auf drei Wasserliganden hinweist. Die Ergebnisse für die beiden Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) sind zu einer höheren Anzahl an Wasserliganden verschoben. Der Wert von 0,28 mT wird zwar nicht genau bei vier Wasserliganden geschnitten, dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bei den beiden Mutanten ein Wasserligand mehr vorhanden ist als beim Wildtyp.

Die Bestimmung der  $^{17}\text{O}$ -Hyperfeinkopplungskonstanten zusammen mit der vollständigen Simulation der Spektren bestätigt damit die Resultate, die bei Raumtemperatur erhalten wurden. Beim Wildtyp und der Mutante Ras(T35S) liegen drei Wasserliganden vor, bei den beiden Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) deuten die Ergebnisse hingegen auf vier direkte Wasserliganden. Es muss dabei aber auch darauf hingewiesen werden, dass die Auswertung und Interpretation der cw-Spektren bei 20 K aufgrund der größeren Linienbreiten wesentlich erschwert ist. Die Aussage über die absolute Anzahl der Wasserliganden beruht fast ausschließlich auf Abbildung 9.15, bei der die Parameter für die beiden Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) fast immer größer sind als bei den anderen beiden Proben.

## 9.6 Diskussion und Ausblick

Zunächst soll die mögliche Ursache für die Linienverbreiterung bei tiefen Temperaturen diskutiert werden. Eine Ursache hierfür sind sicherlich die anisotropen Anteile der Hyperfeinwechselwirkungen zu den benachbarten Kernen. Aufgrund der Starrheit der Proteinkomplexe in gefrorener Lösung können diese anisotropen Anteile nicht mehr ausgemittelt werden. Bei den Messungen mit  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  spielen die Hyperfeinkopplungen zum Phosphor des GDP eine Rolle, sowie die Wechselwirkungen mit den Wasserprotonen. Beide Hyperfeinkopplungen wurden mit weiteren ENDOR-Experimenten bereits untersucht und zeigen anisotrope Anteile<sup>16</sup>.

Daraus ergibt sich auch automatisch eine Möglichkeit, die Linienbreiten zu verkleinern und damit die Auswertung zu erleichtern. Werden die Proteinkomplexe nicht in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ , sondern in  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2^{17}\text{O}$  gelöst, entfallen die Hyperfeinwechselwirkungen zu den Wasserprotonen. Deuterium hat einen Kernspin  $I=0$  und zeigt somit keine Hyperfeinwechselwirkung. In einem ersten Experiment bei 95 GHz konnte bereits gezeigt werden, dass die Linienbreite selbst bei Raumtemperatur um ca. 30 % kleiner wird, wenn  $\text{D}_2\text{O}$  statt  $\text{H}_2\text{O}$  als Lösungsmittel verwendet wird.

Eine andere Ursache für die Linienverbreiterung kann darin liegen, dass die Proteinkomplexe in gefrorener Lösung nicht alle in einer identischen Konformation vorliegen. Wie weiter unten noch dargelegt wird, ist aus NMR-Untersuchungen bekannt, dass in flüssiger Lösung ein

---

<sup>16</sup> M. Bennati, unveröffentlichte Daten.

Konformationsgleichgewicht vorliegen kann [119,142]. Denkbar ist, dass nicht nur die beiden beobachteten Konformationen ausfrieren, sondern auch die Übergangszustände. Ebenso kann es durch Kristallbildungseffekte zu einer Verteilung an Konformationen kommen. Dieses würde bedeuten, dass auch die verschiedenen Hyperfeinwechselwirkungen und genauso auch der Nullfeldtensor in einer Verteilung vorliegen können, was zu einer Linienverbreiterung führen würde.

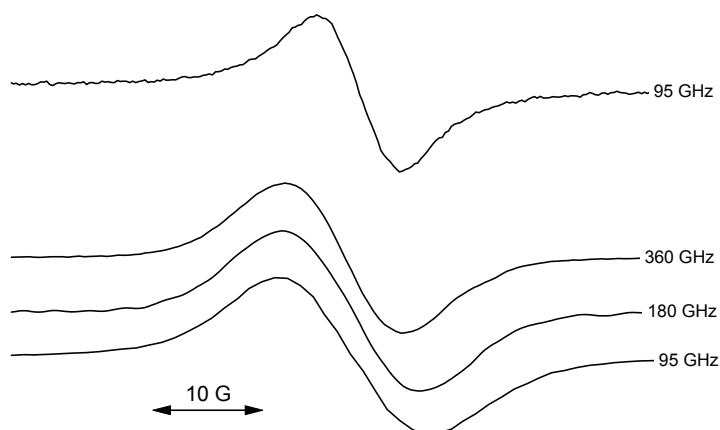


Abb. 9.19 Vergleich der Linienbreite des Ras(wt)•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexes in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O bei 95, 180 und 360 GHz. Das oberste Spektrum wurde bei Raumtemperatur aufgenommen, die drei unteren Spektren an gefrorener Lösung. Mit zunehmender MW-Frequenz nimmt die Linienbreite ab.

Dass der Nullfeldtensor auch bei der HF-EPR noch einen Beitrag zu der Linienbreite liefert, wurde mit Multifrequenz-Experimenten nachgewiesen. In Abbildung 9.19 ist die vierte der sechs Manganlinien bei 95, 180 und 360 GHz wiedergegeben. Das Spektrum bei 360 GHz wurde mit einem selbstgebauten Spektrometer in der Arbeitsgruppe von Prof. Möbius an der FU Berlin durchgeführt. In der Tabelle 9.5 sind die experimentellen Linienbreiten bei verschiedenen MW-Frequenzen zusammengefasst.

MW-Frequenz [GHz]	95	180	360
Linienbreite [mT]	0,82	0,74	0,66

Tab. 9.5 Vergleich der Linienbreite des Ras(wt)•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexes in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O bei 95, 180 und 360 GHz bei gefrorener Lösung. Der angegebene Wert ist der Mittelwert über alle sechs Manganlinien.

Deutlich zu erkennen ist der Effekt, dass mit zunehmender MW-Frequenz die Linienbreite abnimmt. Da der Nullfeldtensor der einzige Beitrag zum Spin-Hamiltonian ist, der mit zunehmender MW-Frequenz kleiner wird, zeigen diese Werte, dass der Nullfeldtensor noch einen Beitrag zu der Linienbreite liefert.

Aus der Auswertung der Spektren, welche mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O aufgenommen worden sind, kann abgelesen werden, dass die verschiedenen Mutanten im inaktiven GDP-gebundenen Zustand unterschiedlich viele Wassermoleküle als direkte Liganden zum Metallion aufweisen. Bei

Raumtemperatur liegen beim Wildtyp und der Mutante Ras(T35S) drei Wasserliganden vor, bei den Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) hingegen vier. Die Auswertung der Spektren von gefrorenen Lösungen erweist sich aufgrund der größeren Linienbreiten als schwierig, die gezeigten Ergebnisse bestätigen aber die bei Raumtemperatur gemachten Aussagen. Auffällig dabei ist insbesondere die Einteilung der verschiedenen Proben in zwei Gruppen, die sich nicht nur bei der Anzahl an Wasserliganden, sondern auch bei den anderen Parametern wiederfindet.

Einer der Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ist die größere Linienbreite für die Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V). Eine mögliche Erklärung dafür könnte das Ergebnis sein, dass bei den beiden Proteinkomplexen ein Wasserligand mehr vorhanden ist als bei den beiden anderen. Wenn dem so ist, so sind auch zwei weitere Protonen zu dem Metallion gekoppelt. Für den  $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Komplex in Wasser wurde mittels ENDOR-Spektroskopie eine isotrope Hyperfeinkopplung der Wasserprotonen zum  $\text{Mn}^{2+}$ -Ion von 0,014 mT bestimmt [40,131]. Diese Kopplung ist allerdings so klein, dass zwei Protonen-Kopplungen alleine nicht die unterschiedlichen Linienbreiten erklären können.

Das Ergebnis, das der Wildtyp im GDP-gebundenen Zustand drei Wasserliganden aufweist, wurde bisher mit einer Ausnahme bei keiner anderen Strukturuntersuchung erhalten.

Bislang ist in einer einzigen Röntgenstrukturuntersuchung von *Schlichting et al.* berichtet worden, dass in dem GDP-gebundenen Zustand des Wildtyps die Aminosäure Aspartat-57 ein direkter Ligand des Metallions ist [132]. Mit Serin-17 und der  $\beta$ -Phosphatgruppe als weitere Liganden bleibt dann nur noch Platz für drei Wassermoleküle. Bei dieser Röntgenstrukturuntersuchung sollte der Hydrolysemechanismus des GTP untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein nicht-hydrolysierbares *caged* GTP in den Kristall eingebaut. Nach einer Photoreaktion wird die Schutzgruppe am GTP abgespalten und das übrig bleibende GTP kann nun hydrolysiert werden. Zeitaufgelöste Untersuchungen wurden mit der Laue-Diffraktionsmethode<sup>17</sup> durchgeführt, bei der keine monochromatische Strahlung verwendet wird, wodurch die Datenaufnahme nur ca. zwei Minuten dauert [164]. Die auf diese Weise erhaltenen Kristalle des GDP Komplexes zeigen, wie oben erwähnt, einen direkten Kontakt zwischen dem Metallion und der Aminosäure Aspartat-57.

Da bis auf diese eine Strukturuntersuchung alle anderen Arbeiten keinen Kontakt zwischen der Aminosäure Aspartat-57 und dem Metallion gefunden haben, und somit vier Wassermoleküle als Liganden bestimmen, widersprechen die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit dem bisher allgemein anerkannten Bild über die Struktur des aktiven Zentrums. Während bei einer Reihe von Untersuchungen am aktiven GTP-gebundenen Proteinkomplex unterschiedliche Konformationen für den Wildtyp und onkogene Mutanten bestimmt worden sind, wurden bisher beim GDP-gebundenen Zustand keine Unterschiede festgestellt.

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nicht mit dem bisherigen Bild vom aktiven Zentrum, welches mittels Röntgenstrukturuntersuchungen gewonnen wurde, übereinstimmen, kann folgende Ursache haben:

Die Röntgenstrukturdaten wurden notwendigerweise an einkristallinen Proteinproben erhalten. Dabei ist es vorstellbar, dass das Züchten eines Kristalls die Proteinstruktur

---

<sup>17</sup> Max von Laue: 1879 bis 1960, Nobelpreis für Physik 1914

verändert. Insbesondere an der Oberfläche können dabei Effekte auftreten, welche die lokale Struktur verändern. Da sich das aktive Zentrum aber an der Oberfläche des Proteinkomplexes befindet, wäre es möglich, dass gerade hier durch die Kristallbildung die Struktur verändert wird. In der Literatur sind Beispiele zu finden, bei denen mittels *x-ray absorption fine structure* Spektroskopie nachgewiesen wurde, dass beispielsweise *Concanavalin A* und *Carboxypeptidase* unter bestimmten Bedingungen im Kristall und in flüssiger Lösung in unterschiedlichen Strukturen vorliegen [133,134]. Mittels NMR-Spektroskopie wurden beim Protein *Ca3* unterschiedliche Konformationen für die Kristallstruktur und die Struktur in flüssiger Lösung bestimmt [135].

Dieses Argument kann nicht geltend gemacht werden für Untersuchungen, die an flüssigen Proben durchgeführt wurden. Um den Unterschied zwischen den oben vorgestellten Röntgenstrukturen weiter zu untersuchen, wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen verschiedene EPR-Untersuchungen vorgenommen. Bei diesen Arbeiten wurden die betrachteten Proteinkomplexe ebenfalls in  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  angereichertem Wasser gelöst. Die Auswertung wurde allerdings nicht mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode vorgenommen. Wie in Kapitel 3 vorgestellt, bestehen die erhaltenen Spektren aus einer Überlagerung von Spektren mit reinem  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und solchen mit  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ . Durch entsprechende Gewichtung und anschließender Subtraktion dieser Spektren voneinander wurde die Anzahl der Wassermoleküle in der Koordinationssphäre des  $\text{Mn}^{2+}$ -Ions bestimmt [43,136].

*Smithers et al.* haben in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen mit cw Q-Band EPR und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  markiertem Wasser vier Wassermoleküle als direkte Liganden des  $\text{Ras(G12V)}\cdot\text{Mn}^{2+}\cdot\text{GDP}$  Komplexes bei  $0^\circ\text{C}$  bestimmt [43]. Ebenfalls mit cw Q-Band EPR bei  $0^\circ\text{C}$  kommen *Latwesen et al.* für die Mutante *Ras(G12V)* zu dem gleichen Ergebnis mit vier Wassermolekülen als direkte Liganden [136]. Über den Wildtyp wird in beiden Arbeiten keine Aussage getroffen.

*Bellew et al.* haben die gleiche Methode angewendet, allerdings bei 140 GHz und an gefrorener Lösung bei 180 K [50]. In dieser Arbeit wurde der  $\text{Ras(wt)}\cdot\text{Mn}^{2+}\cdot\text{GDP}$  Komplex untersucht, und es wurden vier Wassermoleküle als direkte Liganden bestimmt. Um Kristallbildungseffekte beim Einfrieren zu vermeiden, sowie um schmalere EPR-Linien zu erhalten, wurde der Lösung bei dieser Untersuchung 15 % Frostschutzmittel zugegeben. Dennoch ist es vorstellbar, dass beim Einfrieren des Proteins Effekte auftreten, welche die lokale Umgebung des aktiven Zentrums beeinflussen könnten. In einer späteren Arbeit wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, dass einige Frostschutzmittel Wassermoleküle aus der direkten Koordinationssphäre verdrängen, was bei dem zuvor verwendeten aber nicht der Fall ist [137]. Auch wenn ein Reagenz, welches als Frostschutzmittel hinzugegeben wird, kein Wassermolekül aus der direkten Koordinationssphäre verdrängt, ist es vorstellbar, dass dennoch die Konformation des aktiven Zentrums beeinflusst wird. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass die in den vorherigen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse eine andere Anzahl an Wasserliganden liefern.

Um zu überprüfen, inwieweit die Methode der Auswertung Einfluss auf die Bestimmung der Anzahl der Wasserliganden hat, wurde die oben erwähnte Subtraktionsmethode auch auf die cw W-Band Spektren angewendet. Mit dieser Methode ist es allerdings schwer, eine eindeutige Aussage zu treffen. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen für drei und vier Wasserliganden sind so gering, dass keine signifikante Aussage getroffen werden kann.

Insgesamt gesehen ist damit die Auswertung mit Hilfe der Subtraktionsmethode nicht sehr aussagekräftig.

In der Arbeitsgruppe von David Singel (Harvard University, Cambridge, Massachusetts) sind in den letzten zehn Jahren eine Reihe von Untersuchungen mittels ESEEM-Spektroskopie durchgeführt worden, mit denen die lokale Umgebung des  $\text{Mn}^{2+}$ -Ions sowohl im aktiven als auch im inaktiven Zustand untersucht worden ist [137,138]. Aufgrund des Elektronenspins von  $S=5/2$  des  $\text{Mn}^{2+}$ -Ions tragen an jeder Stelle des Spektrums Signale unterschiedlicher Elektronenniveaus zu dem experimentellen Spektrum bei, was die Interpretation und Auswertung von ESEEM-Spektren erschwert [139]. In [138] wird ausführlich darüber diskutiert, ob die Aminosäure Aspartat-57 ein direkter Ligand zum Metallion ist oder nicht. Zu diesem Zweck wurde das Aspartat mit  $^{13}\text{C}$  ( $I=1/2$ ) markiert. Da in den ESEEM-Spektren keine isotrope Hyperfeinwechselwirkung zu erkennen ist und die dipolare Wechselwirkung auf einen Abstand von 0,41 nm schließen lässt, wird davon ausgegangen, dass Aspartat-57 kein direkter Ligand ist. Der angegebene Abstand ist allerdings fast identisch mit der erwähnten Röntgenstruktur von *Schlichting et al.*, bei der von einer direkten Koordination ausgegangen wird. Allerdings wurde auch diese EPR-Untersuchung wieder bei tiefen Temperaturen durchgeführt, und der Lösung wurde ein Frostschutzmittel zugegeben.

In diesen ESEEM-Arbeiten wurden immer die Wechselwirkungen zu möglichen Liganden des Proteins untersucht. Eine andere Möglichkeit, mit ESEEM die Struktur des aktiven Zentrums zu untersuchen, besteht darin, durch den Vergleich zwischen Spektren mit  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  die Anzahl an Wasserliganden abzuzählen [165]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls versucht, X-Band ESEEM-Messungen durchzuführen. Es stellte sich heraus, dass es sehr schwer ist, reproduzierbare Bedingungen einzustellen, was vermutlich daran liegt, dass immer alle Elektronenniveaus zu dem Echosignal beitragen. Da die verschiedenen Elektronenniveaus verschiedene Übergangsmomente aufweisen, tragen diese je nach Einstellungen der MW-Leistung und der Pulslängen unterschiedlich stark zu dem Echo und den beobachteten Modulationen bei. Bei den ESEEM-Spektren mit  $\text{D}_2\text{O}$  war außerdem die Relaxation so schnell, dass maximal zwei bis drei Modulationen zu erkennen waren, bevor das Signal auf die Baseline abgeklungen war.

In einer NMR-Untersuchung des  $\text{Ras}\cdot\text{Mn}^{2+}\cdot\text{GDP}$  Komplexes wurde ein Abstand zwischen Aspartat-57 und dem Metallion von mindestens  $0,43 \pm 0,09$  nm bestimmt, was wiederum auf eine indirekte Wechselwirkung schließen lässt [140]. In einer weiteren NMR-Arbeit am  $\text{Ras}\cdot\text{Mn}^{2+}\cdot\text{GDP}$  Komplex wurde gezeigt, dass die Region um die Aminosäure 57 flexibel ist, was wiederum den Ergebnissen der Röntgenstrukturuntersuchungen widerspricht [141]. Diese Flexibilität wurde auch in einer weiteren NMR-Untersuchung bestätigt [140].

*Geyer et al.* haben mit  $^{31}\text{P}$ -NMR Experimenten gezeigt, dass der  $\text{Ras}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$  Komplex in flüssiger Lösung in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann, und dass die Gleichgewichtskonstante zwischen den beiden Zuständen temperaturabhängig ist [142]. Eine Mutation an der Position Glycin-12 verlagert das Gleichgewicht vollständig zu einem der beiden Zustände. In der Arbeitsgruppe von Prof. Kalbitzer an der Universität Regensburg wurden  $^{31}\text{P}$ -NMR Experimente auch an den GDP-gebundenen Proteinkomplexen vorgenommen [119]. Auch bei diesen Untersuchungen wurde eine Überlagerung zweier Zustände gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Protein in flüssiger Lösung in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann, welche sich höchstwahrscheinlich auch in der Struktur des aktiven Zentrums unterscheiden. Möglicherweise



kristallisieren die Proteinkomplexe nur in einem dieser Zustände, was die unterschiedlichen Strukturen zwischen flüssiger Lösung und den Einkristallen erklären kann.

Die in [119] ermittelten Gleichgewichtsverteilungen zwischen den Zuständen 1 und 2 sind in Tabelle 9.6 wiedergegeben.

wt	T35S	T35A	G12V
30 / 70	20 / 80	50 / 50	0 / 100

Tab. 9.6 Die mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR ermittelten Gleichgewichtsverteilungen zwischen den beiden beobachteten Zuständen in den verschiedenen Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexen bei Raumtemperatur [119].

Aufgrund der in NMR-Untersuchungen gefundenen Überlagerung zweier Konformationen wurde die Faltungsmethode dahingehend erweitert, dass die Überlagerung zweier Zustände zugelassen wurde. Dabei konnte jedem der beiden Zustände eine beliebige Anzahl an Wasserliganden zugewiesen werden. Die relative Verteilung der beiden Konformationen wurde ein weiterer Fitparameter. Mit dieser erweiterten Version der Faltungsmethode konnten weder die Spektren bei Raumtemperatur noch die Spektren bei tiefen Temperaturen besser simuliert werden.

Wie bei den  $^{17}\text{O}$ -ENDOR Untersuchungen bereits erwähnt, wurden auch schon erste  $^{31}\text{P}$ -ENDOR Experimente durchgeführt. Diese zeigen bislang keinen Hinweis darauf, dass in gefrorener Lösung eine Überlagerung zweier Konformationen vorliegt und widersprechen damit den NMR-Untersuchungen, welche an flüssiger Lösung durchgeführt worden sind.

Eine andere Möglichkeit für einen weiteren Liganden des Metallions neben dem Aspartat-57 ist ein zweiter Sauerstoff der  $\beta$ -Phosphatgruppe. Von *Feuerstein et al.* wurden cw Q-Band Messungen an  $^{17}\text{O}$ -markierten GDP Komplexen durchgeführt [106]. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Sauerstoff der  $\beta$ -Phosphatgruppe ein direkter Ligand des Metallions ist. Die Autoren stellen selber dar, dass die vorgestellten Daten auch mit einem Modell erklärt werden können, bei dem zwei Sauerstoffe der  $\beta$ -Phosphatgruppe an das Metallion koordiniert sind. Dieses Modell widerspricht aber wiederum den Röntgenstrukturdaten. In früheren EPR-Arbeiten, die von Prof. Prisner bei 95 GHz durchgeführt worden sind, wurde ebenfalls kein Hinweis darauf gefunden, dass mehr als ein Sauerstoffatom der  $\beta$ -Phosphatgruppe an das Metallion ligandiert ist<sup>18</sup>.

Zusammengefasst ist es nicht eindeutig klar, warum die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen widersprüchliche Aussagen zu den bisherigen Untersuchungen liefern. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen drei Wasserliganden beim Wildtyp sowohl bei Raumtemperatur als auch in gefrorener Lösung. Die Röntgenstrukturuntersuchungen liefern möglicherweise andere Ergebnisse, da bei der Kristallzüchtung die lokale Struktur des aktiven Zentrums gestört wird. NMR-Untersuchungen, die an flüssiger Lösung durchgeführt werden, liefern Hinweise auf eine Überlagerung zweier Zustände, wobei einer der beiden Zustände vermutlich drei Wasserliganden aufweist, der andere Zustand hingegen vier. Auch hierfür wurde bei den vorgestellten Untersuchungen kein Hinweis gefunden.

<sup>18</sup> T. Prisner, persönl. Mitteilung, unveröffentlichte Daten.

Um die Struktur der Proteinkomplexe in gefrorener Lösung weiter zu untersuchen, und die Frage zu klären, ob diese mit der Struktur bei Raumtemperatur übereinstimmt, müssen weitere ENDOR-Untersuchungen durchgeführt werden. Mit gezielt Isotopen-markierten Aminosäuren können beispielsweise potentielle Liganden des Metallions untersucht werden.

Ebenso kann der Algorithmus zur vollständigen Simulation der Spektren erweitert werden, um eventuell weitere Aussagen über die Struktur des aktiven Zentrums zu erhalten. In einem ersten Schritt sind zwei Erweiterungen denkbar. Zum einen können anisotrope Hyperfeinwechselwirkungen in der Simulation berücksichtigt werden. Der erste Schritt würde darin bestehen, die Daten aus der Simulation der  $^{17}\text{O}$ -ENDOR Spektren als feste Werte zu integrieren. Möglicherweise können damit auch Informationen über die Orientierung der verschiedenen Hyperfeinwechselwirkungstensenoren und damit der Wassermoleküle gewonnen werden. Um die Spektren nicht zu kompliziert zu machen, sollten diese Untersuchungen mit  $\text{D}_2^{17}\text{O}$  wiederholt werden, um die Wechselwirkung zu den Wasserprotonen zu eliminieren. Eine andere mögliche Erweiterung des Simulationsalgorithmus besteht darin, eine Verteilung an Parametern, insbesondere der Nullfeldparameter zuzulassen, um damit einer Konformationsverteilung gerecht zu werden.

Eine Möglichkeit, die strukturellen Unterschiede der Proteinkomplexe zwischen flüssiger Lösung und Einkristallen zu untersuchen, besteht darin, ENDOR-Spektroskopie direkt an den einkristallinen Proben vorzunehmen. Mittels W-Band ENDOR Spektroskopie konnte beispielsweise beim *Concavalin A* nicht nur die Anzahl an Wasserliganden an einem  $\text{Mn}^{2+}$ -Zentrum bestimmt werden, sondern auch deren Positionen [143]. Um solche Untersuchungen durchführen zu können, muss das Spektrometer allerdings die Möglichkeit aufweisen, die eingebauten Kristalle um mindestens eine Achse drehen zu können, was mit dem verwendeten EPR-Spektrometer in der Arbeitsgruppe von Prof. Dinse nicht möglich ist.

Die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurden alle an GDP-gebundenen inaktiven Proteinkomplexen durchgeführt. Für die biologische Funktion der Proteine ist natürlich der GTP-gebundene aktive Zustand der interessanter, weshalb sich ein Großteil der bisher veröffentlichten Arbeiten mit diesem Zustand auseinandersetzt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sollen daher auch auf den aktiven Zustand angewendet werden. Die cw W-Band Spektren der GTP-gebundenen Proteinkomplexe zeigen sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 20 K eine wesentlich größere Linienbreite und ein schlechteres S/N-Verhältnis. Beide Effekte erschweren damit die Auswertung und Interpretation der Daten.

## 10 Anwendungsbeispiele des 180 GHz EPR-Spektrometers

### 10.1 Nitroxid-Spinlabel

Spinlabel werden häufig künstlich in Systeme eingebaut, um Strukturinformationen zu gewinnen. In biologischen Systemen werden dafür häufig Nitroxide verwendet [144-146]. Mit Hilfe eines einzelnen Spinlabels können Informationen über die Dynamik der untersuchten Probe gewonnen werden [147-149]. Sind in der Probe dagegen mehrere paramagnetische Zentren vorhanden, können aufgrund der Austausch-Wechselwirkung oder der dipolaren Kopplung Informationen über den Abstand und über relative Orientierungen gewonnen werden [150-155].

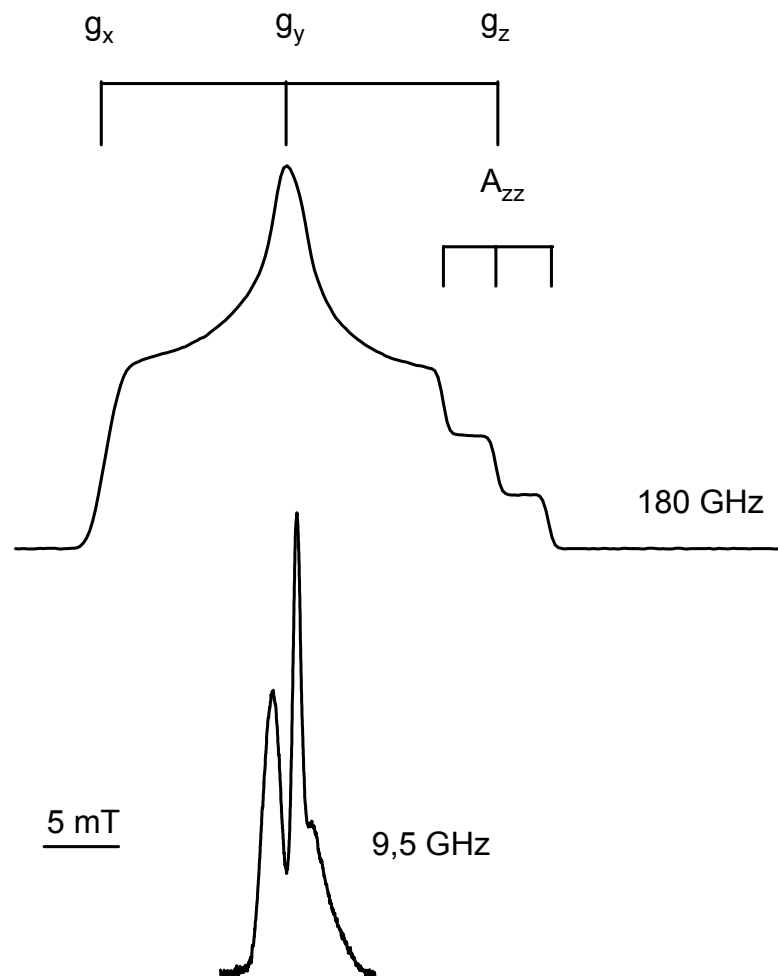


Abb. 10.1 *Fieldswept*-Spektren von TEMPO in einer Polystyrolmatrix im X-Band und bei 180 GHz. Parameter für das 180 GHz-Spektrum:  $T = 20$  K, Repetitionsrate 10 ms, 30 Mittelungen pro Punkt, Pulslänge 80 ns, Pulsabstand 170 ns. Die Struktur von TEMPO ist im Anhang A.6 wiedergegeben.

Um die experimentellen Spektren zu verstehen, müssen zunächst die Eigenschaften der Spinlabel bekannt sein. Hier kann die HF-EPR einen entscheidenden Beitrag leisten, da Nitroxid-Spinlabel hauptsächlich durch zwei EPR-relevante Eigenschaften charakterisiert sind, zum einen durch ihren  $g$ -Tensor, zum anderen durch den Hyperfeinwechselwirkungstensor des Stickstoffatoms [28,30,156]. Da im Vergleich zum Hochfeld im X-Band der  $g$ -Tensor nicht aufgelöst ist, sind diese Informationen schwerer zugänglich. Dieser Effekt ist in Abbildung 10.1 am Beispiel des TEMPO gezeigt. Wie in Kapitel 2.6 erläutert, besteht durch den aufgelösten  $g$ -Tensor bei hohen Magnetfeldern wiederum die Möglichkeit, orientierungsabhängige Informationen zu erhalten.

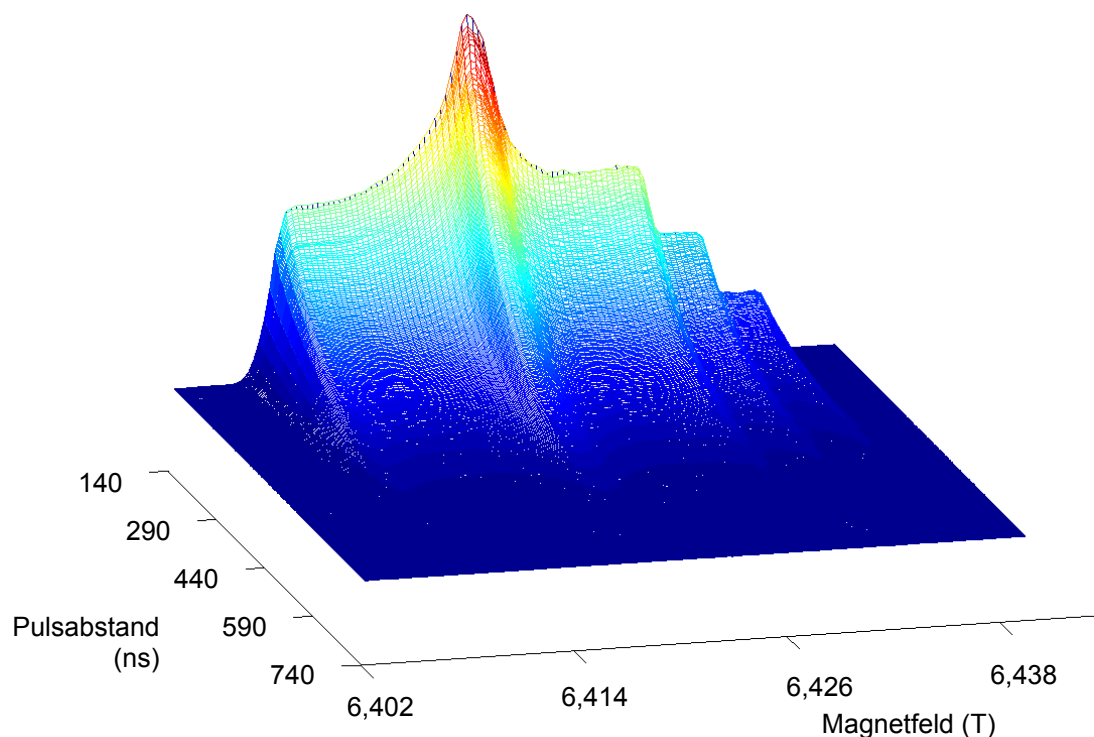


Abb. 10.2 2D-Spektrum von TEMPO in einer Polystyrolmatrix. Gezeigt ist der  $T_2$ -Echo Zerfall in Abhängigkeit vom Magnetfeld bei  $T = 30$  K. Die Pulslängen betragen 110 ns mit einem Abstand von 30 ns. Pro Punkt wurden 16 Mittelungen aufgenommen.

In Abbildung 10.2 ist ein magnetfeldabhängiger Echozerfall des TEMPO-Radikals gezeigt. Gut zu erkennen ist der aufgelöste  $g$ -Tensor sowie die Aufspaltung der  $g_{zz}$ -Kante in drei Signale aufgrund der großen  $A_{zz}$  Hyperfeinwechselwirkung zum  $^{14}\text{N}$  ( $I=1$ ). Die Echozerfallskurven wurden mit einem monoexponentiellen Zerfall angefitet, das Ergebnis ist in Abbildung 10.3 wiedergegeben. Zu erkennen ist eine Anisotropie der Relaxationszeiten von ca. 30 %.

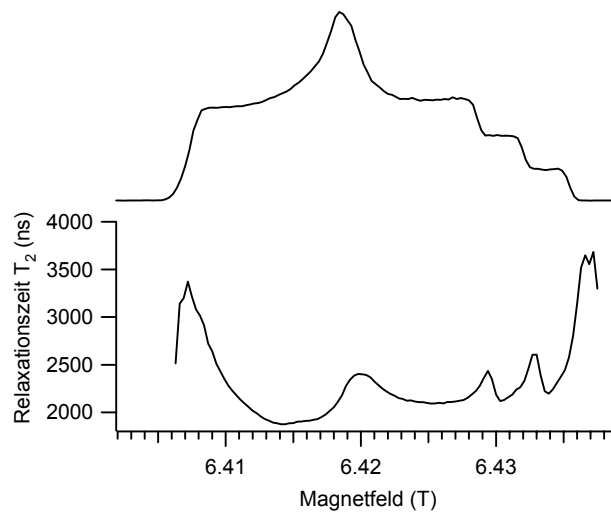


Abb. 10.3 Magnetfeldabhängigkeit der Relaxation von TEMPO bei 180 GHz und  $T = 30$  K. In der oberen Hälfte ist die erste Zeile des 2D-Spektrums aus Abbildung 10.2 wiedergegeben, in der unteren sind die feldabhängigen Relaxationszeiten dargestellt.

Werden Nitroxid-Spinlabel in biologische Systeme eingebaut, können mit ihrer Hilfe beispielsweise Informationen über Abstände zu anderen paramagnetischen Zentren gewonnen werden [144]. In letzter Zeit wird dafür immer häufiger die PELDOR-Methode<sup>19</sup> verwendet, mit der Abstände bis zu 6 nm bestimmt werden können [146,157,158]. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Pulsmethode, bei der zwei verschiedene MW-Frequenzen verwendet werden, um die unterschiedlichen paramagnetischen Spezies anzuregen. Bei niedrigen Magnetfeldstärken und damit MW-Frequenzen besteht allerdings der Nachteil, dass den PELDOR-Modulationen der Echoamplitude häufig auch ESEEM-Modulationen überlagert sind, was die Interpretation der Signale wesentlich erschwert [146,163].

Eine wichtige Voraussetzung für das Auftreten von ESEEM-Modulationen ist das Erfüllen der *cancellation* Bedingung, die besagt, dass die betrachtete Hyperfeinwechselwirkung ungefähr genauso groß sein muss wie die Kern Zeeman-Wechselwirkung des dazugehörigen Kerns. Aufgrund der ca. 20fach größeren Kern Zeeman-Aufspaltung ist diese Bedingung bei 6,4 T fast nicht zu erfüllen. Nur sehr spezielle Systeme mit einer großen Hyperfeinkopplung kommen daher für HF-ESEEM in Betracht [15,159,160]. Bei dem TEMPO-Spektrum in Abbildung 10.2 können keine ESEEM-Modulationen festgestellt werden.

Da im Vergleich zum X-Band im Hochfeld die störenden ESEEM-Modulationen wesentlich schwächer bis gar nicht ausgeprägt sind, bietet es sich an, die PELDOR-Methode auch im Hochfeld zu implementieren [161]. Die in Kapitel 9 dargestellten Untersuchungen am Ras-Protein können durch solche Abstandsmessungen weitergeführt und ergänzt werden [105]. Es wurde bereits eine Probe hergestellt, bei der an der Aminosäureposition 32 ein Spinlabel eingeführt wurde. Diese Position befindet sich innerhalb der Schleife L2, die beim Wechsel vom aktiven in den inaktiven Zustand eine große strukturelle Veränderung erfährt. Auf diese Weise kann der Konformationsübergang weiter untersucht werden. In Abbildung 10.4 sind cw W-Band Spektren des Ras-Proteins mit und ohne Spinlabel gegenübergestellt.

<sup>19</sup> Die PELDOR-Methode wird von einigen Arbeitsgruppen auch als DEER bezeichnet.

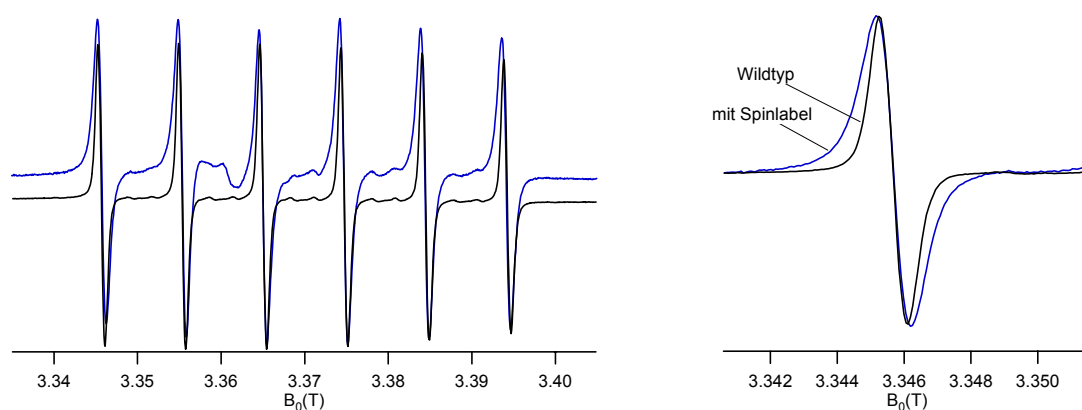


Abb. 10.4 cw W-Band Spektren von Ras•Mn<sup>2+</sup>•GDP Komplexen bei 20 K. Links das gesamte Spektrum, rechts nur die erste der sechs Linien. Das obere Spektrum gehört zum Ras Protein mit Spinlabel an der Position 32, das untere zum Wildtyp.

In den Spektren mit dem Spinlabel ist eine Linienverbreiterung der Manganlinien zu erkennen, die auf die zusätzliche Kopplung zu dem Spinlabel zurückzuführen ist. Dass in dem linken Spektrum das Signal des Spinlabels nur schwach zu erkennen ist, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das System gesättigt ist. Die gezeigte Messung wurde für das Mangansignal optimiert. Um genauere Informationen über den Abstand der beiden paramagnetischen Zentren zu erhalten, können weitere Untersuchungen mit der PELDOR-Methode vorgenommen werden.

## 10.2 Quinoloxidase

Im Folgenden sollen Experimente an der *bo<sub>3</sub>-Quinoloxidase* aus *E.coli* gezeigt werden. Dieses System wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Doktorarbeit von Stéphane Grimaldi untersucht [162]. Mittels Puls HF-EPR Experimenten können beispielsweise die Bewegungsmoden von Quinonen in ihren Bindungstaschen untersucht werden [9-11].

Nachdem im letzten Kapitel TEMPO als Testprobe verwendet worden ist, soll hiermit demonstriert werden, dass die Empfindlichkeit des aufgebauten Spektrometers ausreicht, um auch an biologischen Proben Untersuchungen vorzunehmen. Die Proteinkonzentration beträgt 560  $\mu$ M, wobei ca. 30 bis 50 % der Quinone im reduzierten Zustand vorliegen und damit ein EPR-Signal liefern.

In Abbildung 10.5 sind 2-Puls *fieldswept*-Spektren bei verschiedenen Temperaturen zwischen 5 und 140 K gezeigt. Zum Vergleich der unterschiedlichen Spektren wurden diese auf das maximale Signal normiert.

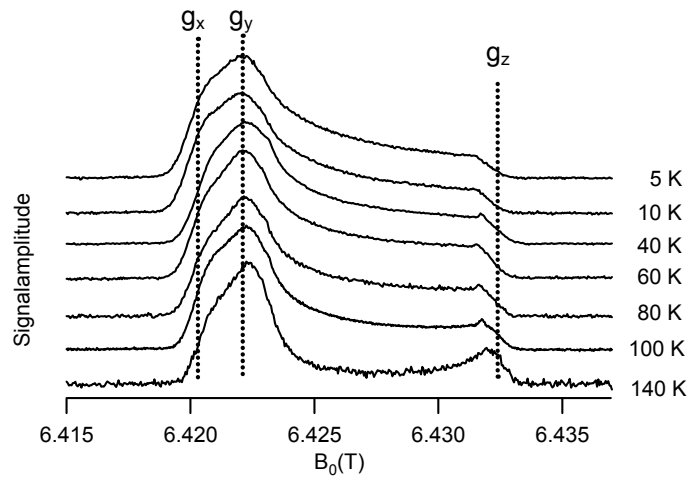


Abb. 10.5 2-Puls fieldswept-Spektren am  $Q_H^\bullet$  in der *bo3-Quinoloxidase* bei verschiedenen Temperaturen. Messparameter: 5 K: 60/390/60 ns, 10 Mit., 150 ms Rep., 10 K: 60/390/60 ns, 20 Mit., 150 ms Rep., 40 K: 55/295/55 ns, 300 Mit., 20 ms Rep., 60 K: 55/270/55 ns, 200 Mit., 15 ms Rep., 80 K: 80/220/80 ns, 200 Mit., 3 ms Rep., 100 K: 80/400/80 ns, 2000 Mit., 1,5 ms Rep., 140 K: 80/355/80 ns, 400 Mit., 0,8 ms Rep.

Von dieser Probe wurden auch cw-Spektren zur Bestimmung der g-Werte aufgenommen. Zu diesem Zweck wurde der Probe ein wenig  $Mn^{2+}$  in MgO zugegeben. Mit dem in [68] und Kapitel 7.4 beschriebenen Verfahren wurden die g-Werte bestimmt, welche in Tabelle 10.1 wiedergegeben sind.

$g_x$	$g_y$	$g_z$
2,0060	2,0053	2,0022

Tab. 10.1 Bestimmte g-Werte des  $Q_H^\bullet$  in der *bo3-Quinoloxidase*.

Die Linienformen der Spektren zwischen 5 und 80 K sind weitgehend identisch, während oberhalb von 80 K deutliche Abweichungen zu erkennen sind. In dem Bereich zwischen dem  $g_y$ - und dem  $g_z$ -Signal nimmt die Signalintensität deutlich ab, während sie in den anderen Bereichen des Spektrums wenig beeinflusst wird. Dass die Signalintensität an diesen Stellen bei steigender Temperatur abnimmt, bedeutet, dass während der Evolutionszeit  $\tau$  zwischen den beiden Pulsen die Magnetisierung relaxiert. Die Beobachtung, dass dieser Effekt an unterschiedlichen Stellen des Spektrums unterschiedlich stark ausgeprägt ist, bedeutet, dass das Relaxationsverhalten anisotrop ist. Dieses anisotrope Relaxationsverhalten wurde mittels zweidimensionaler Puls-EPR Spektroskopie weiter untersucht.

In Abbildung 10.6 ist ein feldabhängiger Zwei-Puls Echo-Zerfall bei 90 K gezeigt, in Abbildung 10.7 ist das entsprechende Spektrum bei 40 K dargestellt.

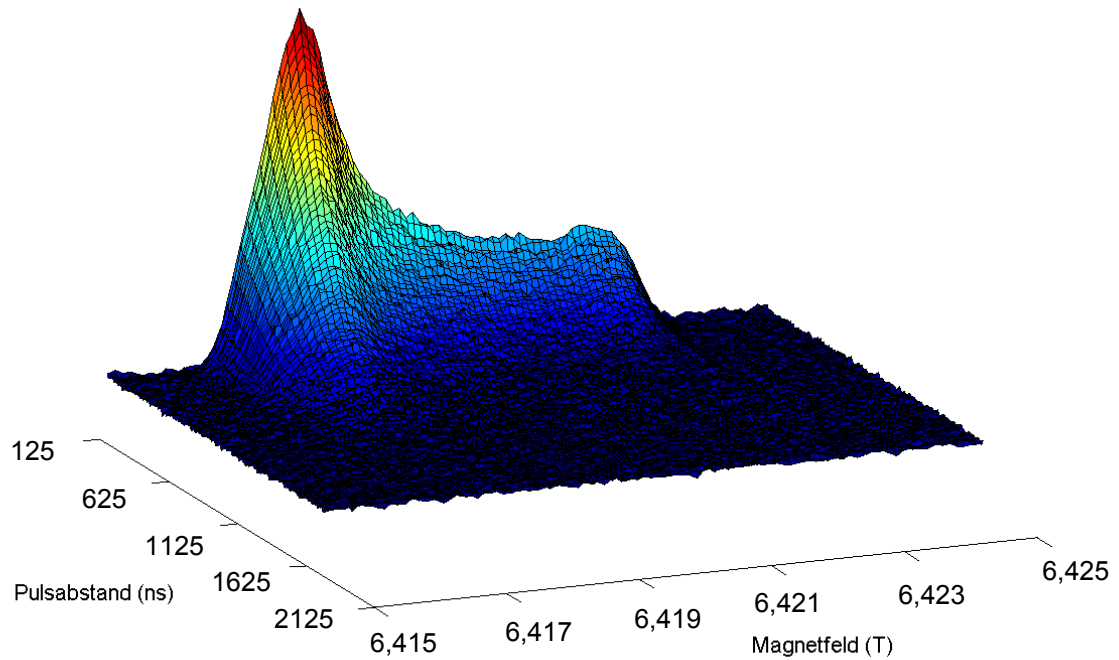


Abb. 10.6 Zwei-Puls Echo-Zerfall von  $Q_H^{\bullet-}$  in der *bo3-Quinoloxidase* bei 90 K. Schrittweite zwischen zwei Feldwerten: 0,2 mT, Pulslängen: 55 ns, Pulsabstand:  $\tau_0 = 125$  ns, 160 Punkte je 10 ns, Repetitionsrate: 3 ms, 200 Mittelungen pro Punkt.



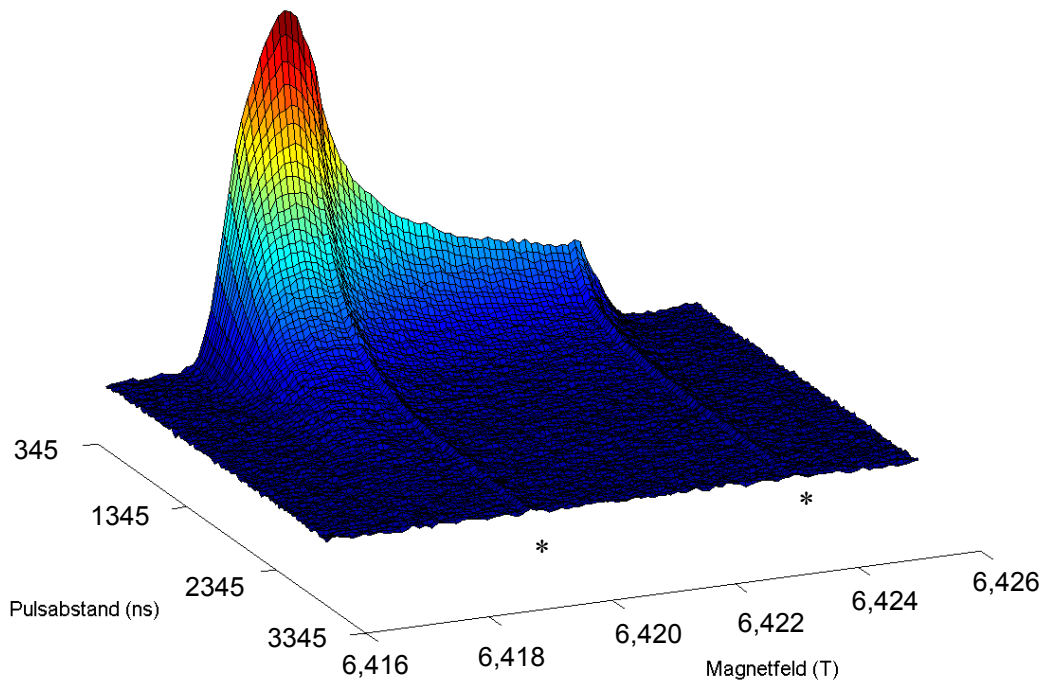


Abb. 10.7 Zwei-Puls Echo-Zerfall von  $QH^{\bullet}$  in der *bo3-Quinoloxidase* bei 40 K. Schrittweite zwischen zwei Feldwerten: 0,2 mT, Pulslängen: 55 ns, Pulsabstand:  $\tau_0 = 345$  ns, 125 Punkte je 20 ns, Repetitionsrate: 15 ms, 200 Mittelungen pro Punkt. Die zwei mit einem Stern gekennzeichneten Signale stammen von  $Mn^{2+}$ -Ionen, die zur Feldeichung in der Probe vorhanden waren.

Um die transversale Relaxationszeit  $T_2$  aus diesen Spektren auszuwerten, wurden die einzelnen Zeitreihen mit einem exponentiellen Echozerfall angefitzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 10.8 wiedergegeben.

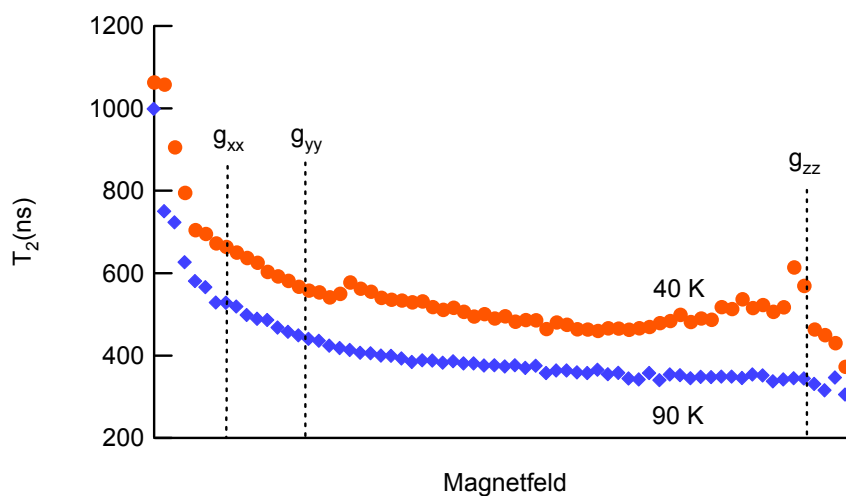


Abb. 10.8 Temperaturabhängigkeit der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  des  $QH^{\bullet}$  in der *bo3-Quinoloxidase* bei 180 GHz.

In Abbildung 10.8 ist eindeutig eine Anisotropie in der transversalen Relaxationszeit zu erkennen, die bei den betrachteten Temperaturen leicht unterschiedlich ausgeprägt ist. Um die Bewegungsmoden des gebundenen Quinons genauer zu untersuchen und daraus Rückschlüsse auf die Wasserstoffbrückenbindungen ziehen zu können, müssen diese Untersuchungen auch bei anderen MW-Frequenzen durchgeführt werden [162].

Die vorgestellten Messungen sollen zeigen, dass mit dem aufgebauten Puls-HF-Spektrometer nicht nur, wie mit TEMPO demonstriert, Untersuchungen an Testproben vorgenommen werden können. Auch an biologischen Systemen, die normalerweise nicht in beliebiger Konzentration hergestellt werden können, sind Untersuchungen möglich, wie am Beispiel der Quinoloxidase gezeigt worden ist.

## Teil IV – Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Aufbau eines HF-EPR Spektrometers beschrieben, welches bei einer MW-Frequenz von 180 GHz arbeitet. Dieses ist derzeit die höchste Frequenz, bei der routinemäßig Puls-EPR betrieben wird. Es konnte gezeigt werden, dass die technischen Anforderungen, die sowohl bei den Spezifikationen der MW-Komponenten als auch insbesondere bei der Konstruktion des Resonators auftreten, erfüllt werden können.

Da bei solchen Frequenzen einige MW-Bauteile nicht mehr in konventioneller Bauweise mit den erforderlichen Spezifikationen erhältlich sind, wurde ein Zirkulator mit quasioptischen Elementen aufgebaut. Die Verluste für einen einzelnen Durchlauf von der Quelle zum Resonator belaufen sich mit diesem Aufbau auf 2 bis 3 dB. Am Resonator liegt eine Leistung von ca. 15 mW an, wodurch  $\pi/2$ -Pulsängen von 60 bis 80 ns erzielt werden. Diese kurzen Pulsängen sind nur durch die Verwendung eines Zylinderresonators zusammen mit dem Einsatz der quasioptischen Elemente möglich. Die Empfindlichkeit des Spektrometers sowohl für cw- als auch für Puls-Messungen wurde bestimmt. Die Eigenschaften des aufgebauten Spektrometers sind vergleichbar mit denen anderer selbstgebaute Spektrometer, die bei Frequenzen oberhalb 90 GHz arbeiten.

Für die Zukunft sind einige Erweiterungen bzw. Umbauten des Spektrometers geplant:

In Kapitel 7.2 wurde das Problem der stehenden Wellen im Probenkopf erläutert. Um dieses Problem zu lösen, wird ein zweiter Probenkopf aufgebaut, welcher statt einem überdimensionierten rechteckigen Hohlleiter einen korrigierten zylindrischen Hohlleiter verwendet, um die MW-Strahlung vom Flansch zum Resonator zu leiten. Mit diesem Aufbau kann die MW-Strahlung, welche vom elliptischen Hohlspiegel reflektiert wird, direkt in den korrigierten Wellenleiter fokussiert werden, ohne dabei einen Rillenhornstrahler zu verwenden. Auf diese Weise kann auf der oberen Seite des Probenkopfes auf einen Übergang zwischen verschiedenen Hohlleiterdurchmessern verzichtet werden, und die Ausbildung stehender Wellen wird unterdrückt. Ein solcher Probenkopf befindet sich bereits im Aufbau und in Kürze können erste Tests durchgeführt werden. Auch die Verluste innerhalb des Strahlengangs sollten reduziert werden, wodurch am Resonator mehr Leistung zur Verfügung steht und die Pulsängen ca. 30 % kürzer werden sollten.

In Kapitel 9 sind Hochfeld-ENDOR-Messungen, die bei 95 GHz in der Arbeitsgruppe von Prof. K.-P. Dinse durchgeführt wurden, gezeigt. Auch bei ENDOR-Untersuchungen ist es meistens hilfreich, diese bei hohen Magnetfeldern durchzuführen, aus den gleichen Gründen, die auch für reine EPR-Untersuchungen gelten. Aufgrund der aufgelösten g-Tensor Anisotropie vieler organischer Radikale können auch an ungeordneten Proben orientierungsabhängige Informationen gewonnen werden. Des Weiteren sind bei hohen Magnetfeldern die Larmor-Frequenzen der verschiedenen Kerne weiter voneinander getrennt, sodass man keine überlagerten Signale mehr erhält, was die Interpretation wesentlich erleichtert. Um in Zukunft ENDOR-Untersuchungen auch bei 180 GHz durchführen zu können, soll der beschriebene Probenkopf dahingehend erweitert werden. Auch hier ist der erweiterte Aufbau bereits in der Entstehung.

In den letzten Jahren haben sich Abstandsuntersuchungen mit Hilfe von Spinlabeln in der EPR immer weiter verbreitet. Eine wichtige Methode stellt die gepulste Elektronen-

Doppelresonanz-Methode PELDOR dar. Gegenüber Untersuchungen im X-Band bietet die HF-EPR dabei zwei Vorteile. Der erste ist, wie in Kapitel 10 dargestellt, die Unterdrückung von ESEEM-Modulationen bei hohen Magnetfeldern, der andere ist wiederum die erhöhte Orientierungsinformation. Erst kürzlich wurde eine Feldsprungeinheit für ein W-Band Spektrometer vorgestellt, mit der PELDOR-Experimente durchgeführt werden sollen [161]. Auch für das 180 GHz Spektrometer ist die Erweiterung um eine PELDOR-Einheit geplant. In diesem Falle soll aber eine zweite MW-Quelle integriert werden.

Wie in Kapitel 8.3 dargelegt wurde, ist die Performance der Spektrometersteuerung insbesondere bei Puls-Messungen nicht optimal. Hier bietet sich als einfachste, wenn auch teuerste Lösung an, von der Firma Bruker deren Steuerungskonsole zu kaufen. Mit dieser können Puls-Experimente wesentlich schneller durchgeführt werden. Eine andere einfache Lösung zur schnelleren Durchführung von Puls-Experimenten ist der Einsatz eines Boxcar-Verstärkers.

Bei der Vorstellung der Untersuchungen an den Ras-Proteinkomplexen wurde bereits auf mögliche weitergehende Untersuchungen eingegangen. Bislang konnte immer noch nicht die Frage geklärt werden, ob die Proteinkomplexe bei tiefen Temperaturen in der gleichen Konformation vorliegen, wie in flüssiger Lösung.

Es wurde gezeigt, dass in flüssiger Lösung ein Wassermolekül weniger am Metallzentrum anliegt als in den Einkristallen. Dieses Ergebnis wurde durch zwei voneinander unabhängige Auswertungsmethoden erhalten. Bislang ist aber unklar, welcher Ligand statt dessen auftritt. Zwei Möglichkeiten wurden in der Diskussion der Ergebnisse bereits genannt, zum einen die Aminosäure Aspartat-57, zum anderen ein Sauerstoff der  $\beta$ -Phosphatgruppe. Um diese beiden Möglichkeiten weiter zu untersuchen, sind Isotopen-markierte Proben notwendig, an denen cw-Messungen an flüssigen Lösungen durchgeführt werden müssen. Mit Hilfe solcher Untersuchungen sollte es möglich sein, den weiteren Liganden, der bei Raumtemperatur vorliegt, zu identifizieren.

Die Struktur der Proteinkomplexe in gefrorener Lösung kann durch weitere ENDOR-Messungen untersucht werden. Auch hier können mit Isotopen-markierten Proben direkte Liganden des Metallzentrums identifiziert werden. Auf diese Weise sollte die Frage beantwortet werden können, ob es strukturelle Unterschiede zwischen den Proteinkomplexen in flüssiger und gefrorener Lösung gibt.

Alle bislang vorgestellten Untersuchungen wurden an den GDP-gebundenen inaktiven Proteinkomplexen durchgeführt. Entsprechende Untersuchungen sollen auch an den GTP-gebundenen Proteinkomplexen durchgeführt werden, da diese Untersuchungen ebenfalls Hinweise liefern sollten, auf welche Weise die onkogenen Mutanten die Struktur des aktiven Zentrums beeinflussen.

## Anhang

### A.1 Spezifikationen des 180 GHz EPR-Spektrometers:

Mikrowellenfrequenz:	180 GHz $\pm$ 200 MHz
Statisches Magnetfeld:	0 - 7 T
Magnetfeld für ein Signal mit $g=2$ :	6,422 T
Feldbereich der Sweepspule:	$\pm$ 80 mT
Hysterese der Sweepspule:	5 mT
Reproduzierbarkeit der Sweepspule:	0,05 mT
Induktivität der Sweepspule:	0,24 H
Homogenität des Magnetfelds:	$\leq$ 2 ppm
Temperatur des Kryostaten:	2 - 270 K
Ungenauigkeit der Temperaturmessung:	$\leq$ 3 K (für $T > 20$ K)
Innendurchmesser des Kryostaten:	74,2 mm
Resonatortyp:	Zylinderresonator, TE <sub>011</sub>
Resonatorgüte:	2500 - 4500
Konversionsfaktor des Resonators:	30 $\mu$ T/W <sup>1/2</sup>
Probenröhrchen:	Suprasil, Innendurchmesser 0,3 - 0,5 mm
Probenvolumen:	0,16 - 0,43 $\mu$ l
Füllfaktor:	0,09 - 0,25
Leistung der Mikrowellenquelle:	15 dBm
Leistung am Resonator:	13 dBm
Schaltflanken des Mikrowellenschalters:	2 - 10 ns
Isolation des Mikrowellenschalters:	55 dB
Rauschzahl der Detektion:	13 dB
Detektionsbandbreite:	200 MHz
$\pi/2$ – Pulslänge ( $S=1/2$ ):	60 - 80 ns
Totzeit:	20 ns
Empfindlichkeit im Pulsbetrieb:	1 - 10 $\times 10^{10}$ spins/mT
Empfindlichkeit im cw-Betrieb:	5 - 50 $\times 10^8$ spins/(mT Hz <sup>1/2</sup> )
Empfindlichkeit des Transmissionsaufbaus:	2 $\times 10^{13}$ spins/(mT Hz <sup>1/2</sup> )
Probenvolumen des Transmissionsaufbaus:	57 - 150 $\mu$ l

## A.2 Geräteliste des 180 GHz EPR-Spektrometers

Magnet	Teslatron <sup>H</sup>	Oxford Instruments
Stromversorgung Hauptspule	IPS120-3	Oxford Instruments
Stromversorgung Sweepspule		Eigenbau
Temperaturkontrolleinheit	ITC 503	Oxford Instruments
Lock-In Verstärker	SR 530	Stanford Research Systems
Digitaloszilloskop	TDS 520 C	Tektronix
Pulsgenerator	DG 2020	Sony/Tektronix

## A.3 Liste der in dieser Arbeit erwähnten MW-Bänder, der dazugehörigen Magnetfeldstärken und Hohlleiter

Bezeichnung	Frequenzbereich (GHz)	Hohlleiter	Dimension (mm)	Magnetfeld
S	2,6 - 4	WR-284	72,14 × 34,04	0,1 T
X	8 - 12	WR-90	22,86 × 10,16	0,3 T
Ka	26,4 - 40	WR-28	7,11 × 3,56	1,1 T
W	75 - 110	WR-10	2,54 × 1,27	3,4 T
G	140 - 220	WR-5	1,30 × 0,648	6,4 T

#### A.4 Ergebnisse der Simulationen der Ras-Spektren

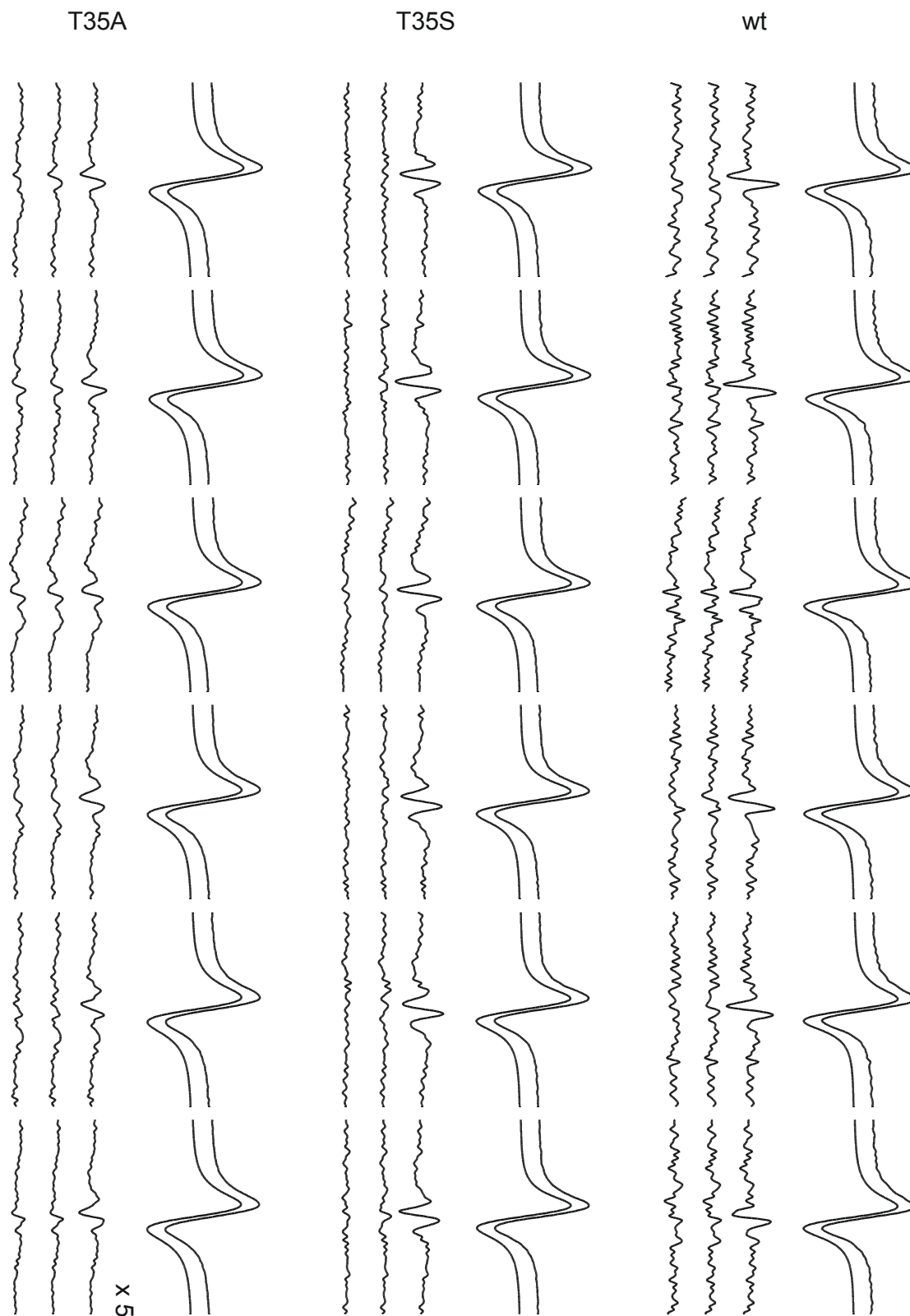


Abb. A.1 Vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.5.

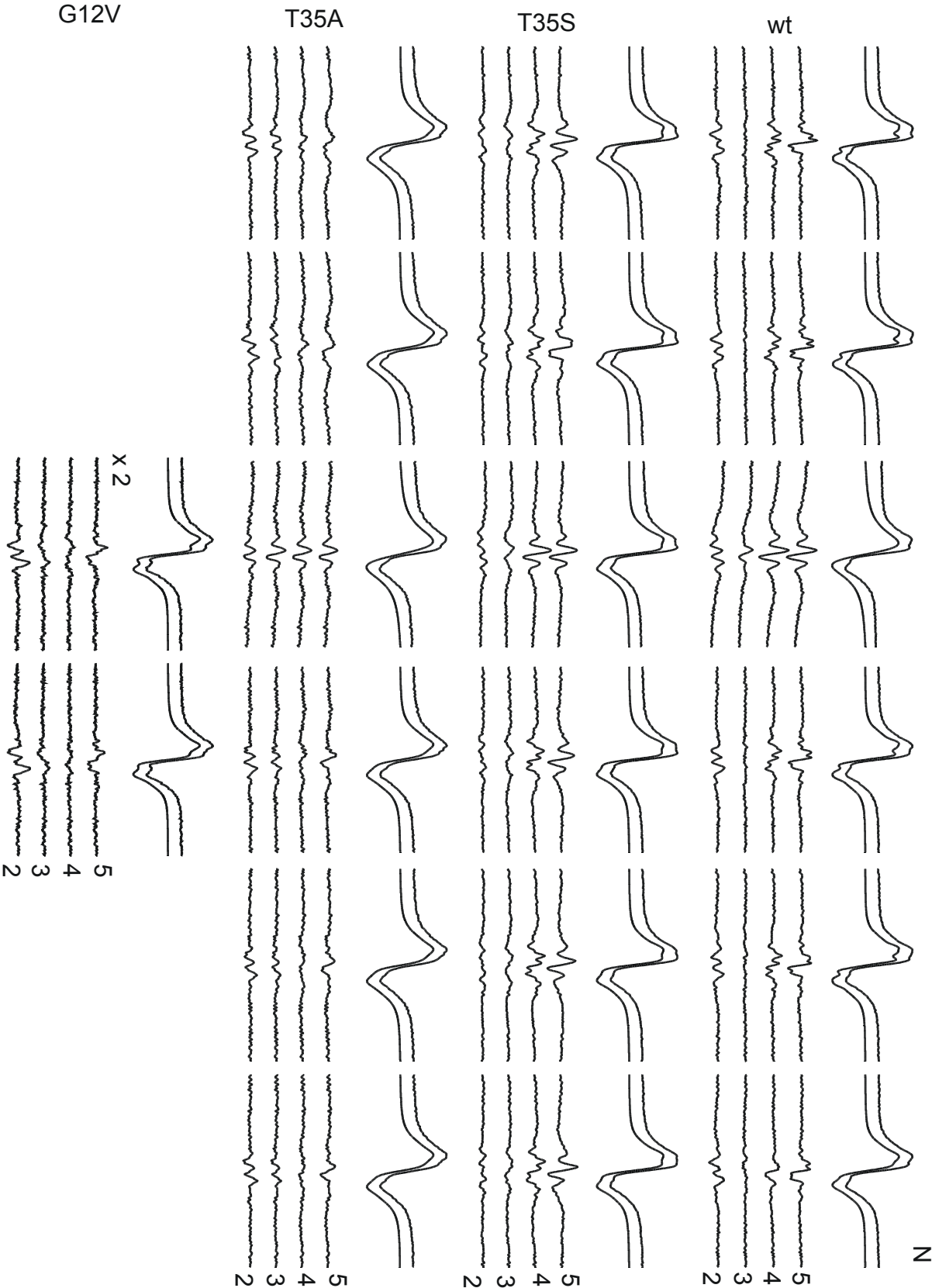


Abb. A.2 vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.6.



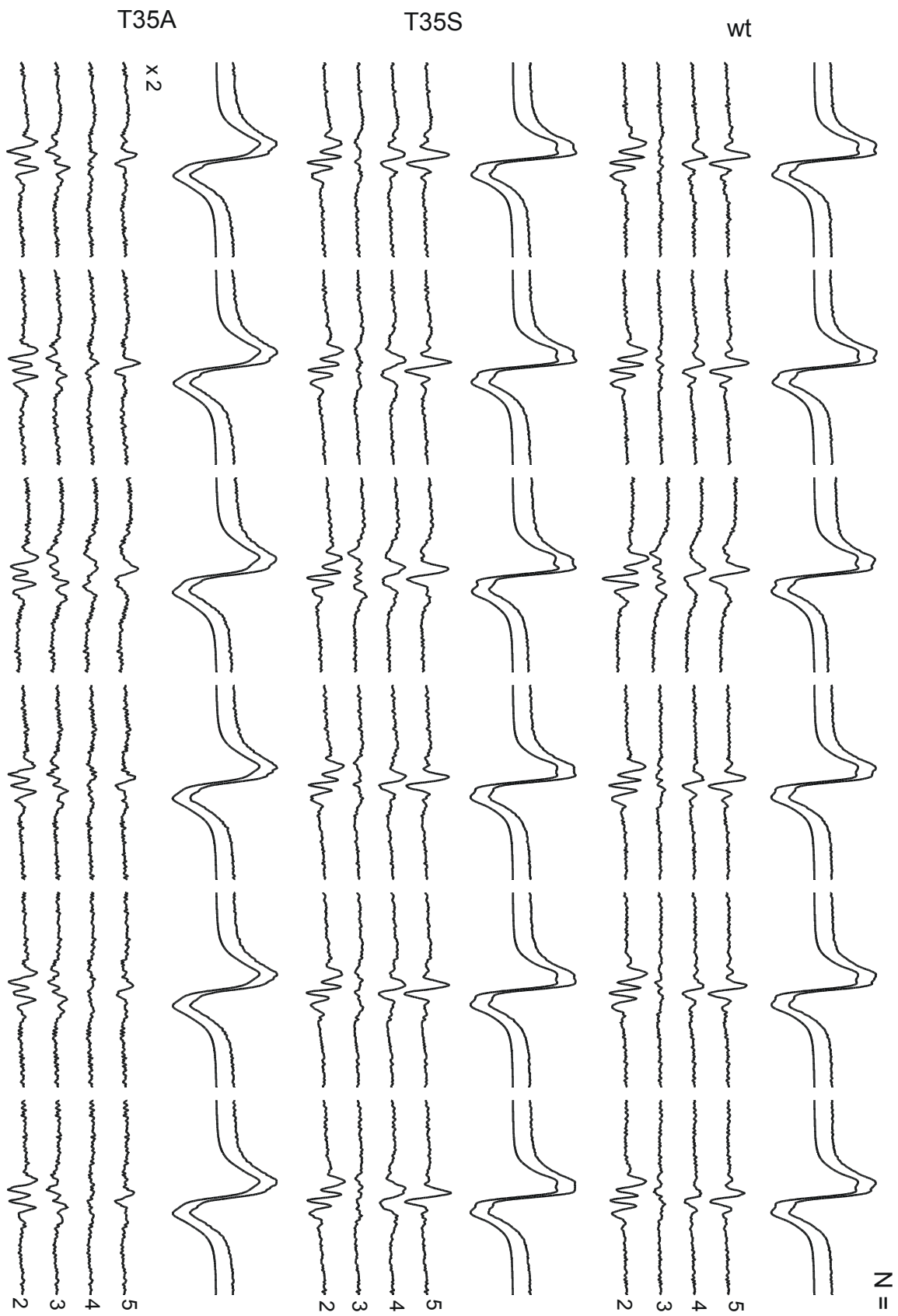


Abb. A.3 vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.8.

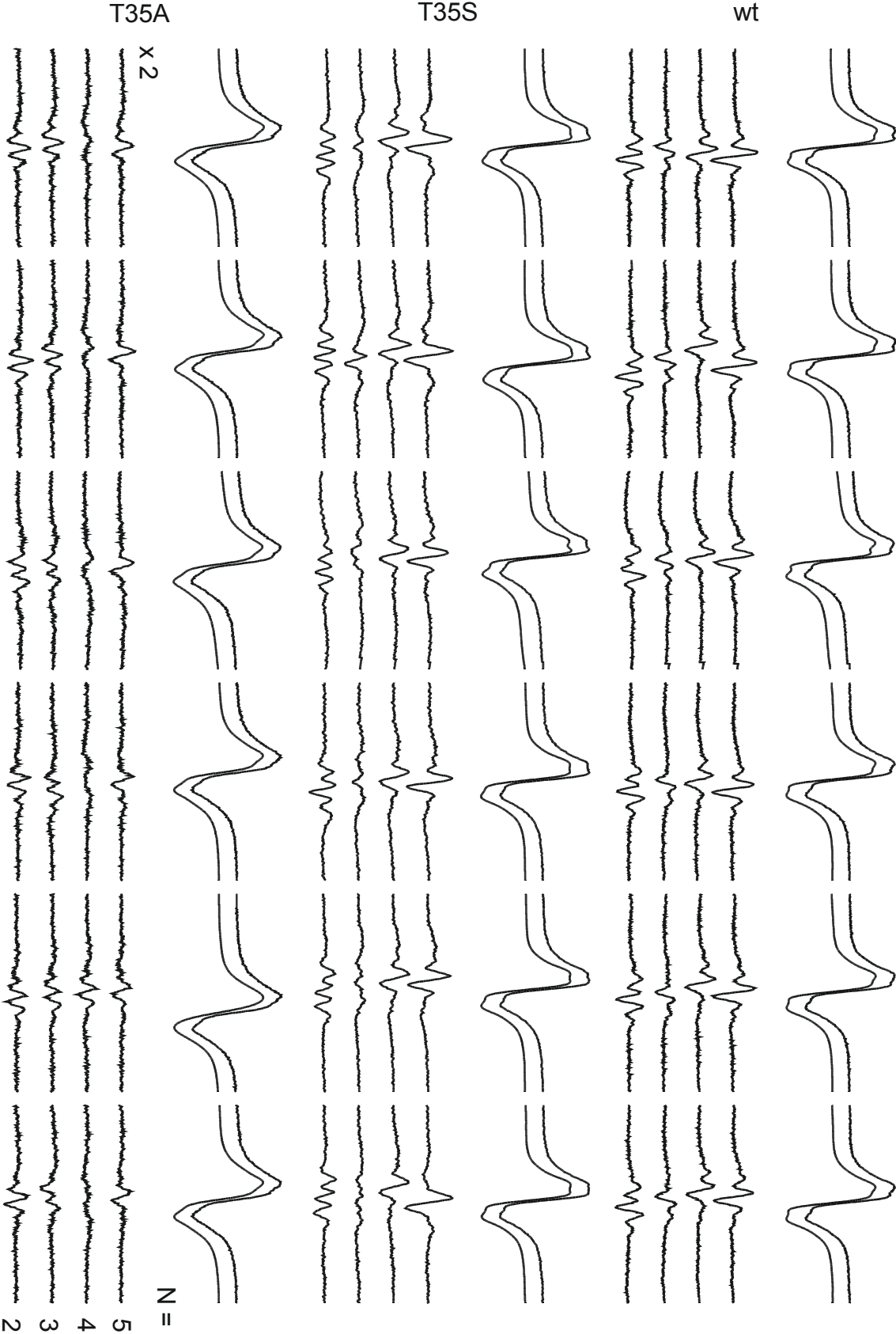


Abb. A.4 vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.10.

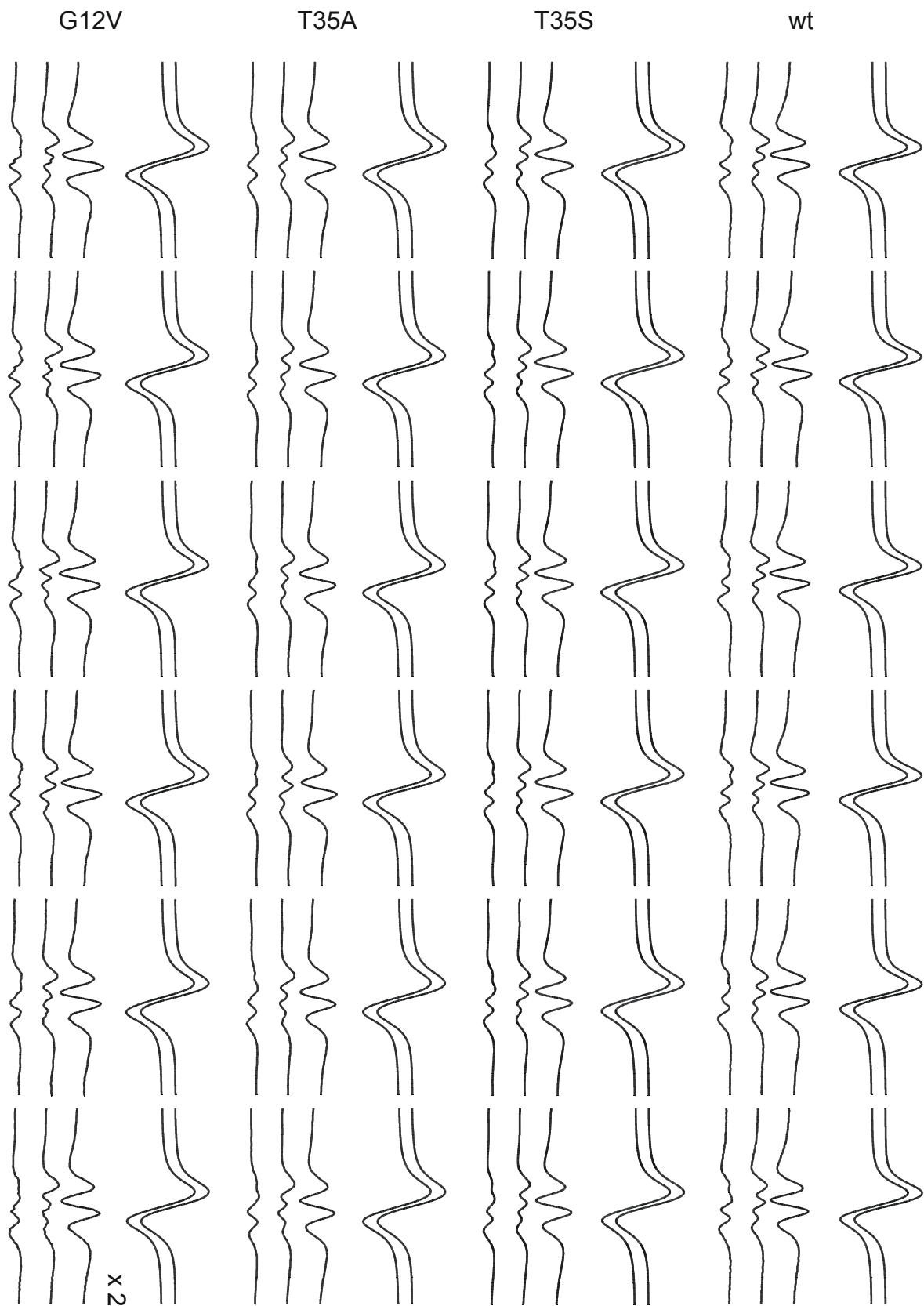


Abb. A.5 vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.13.

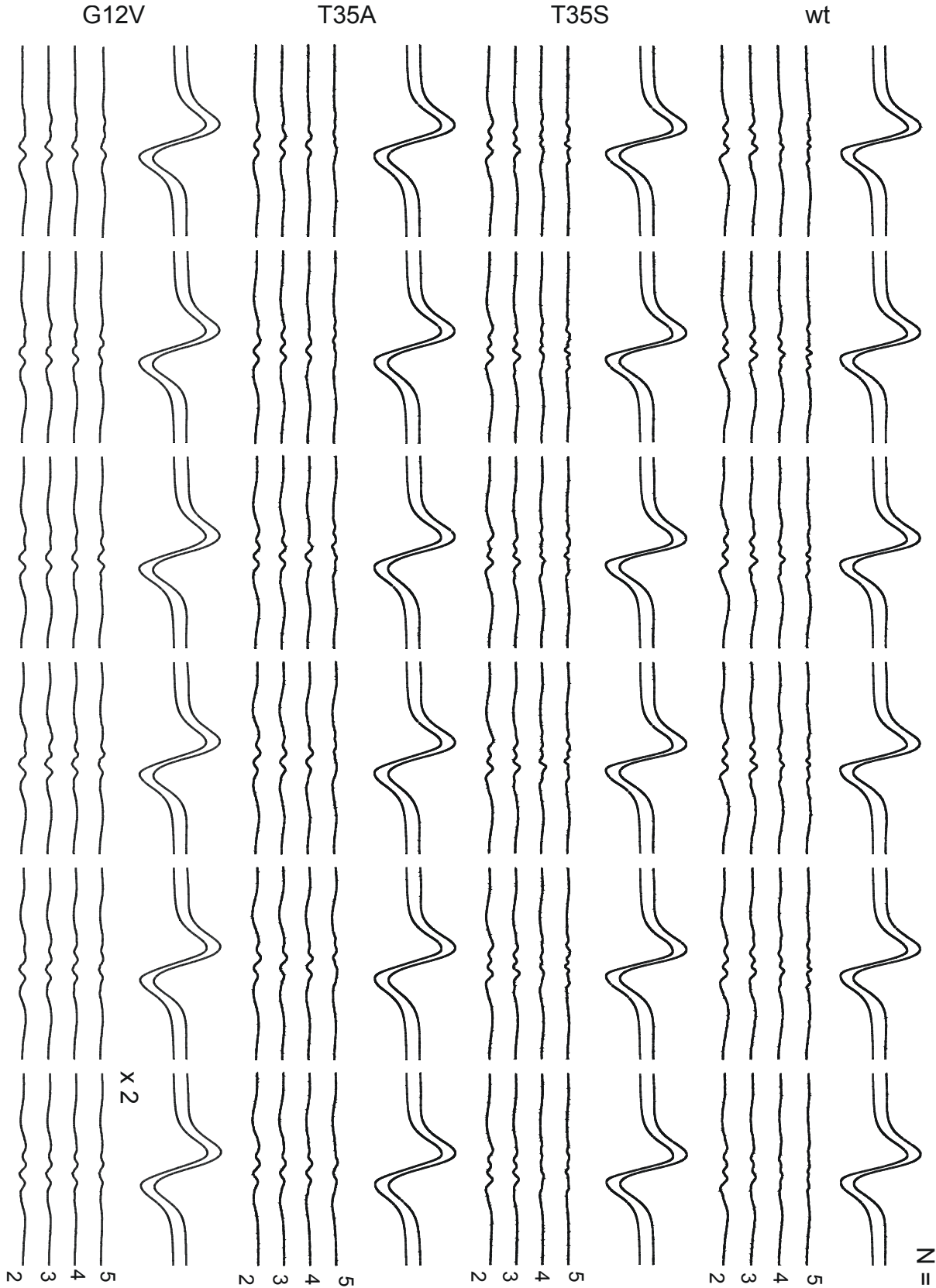


Abb. A.6 vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.14.

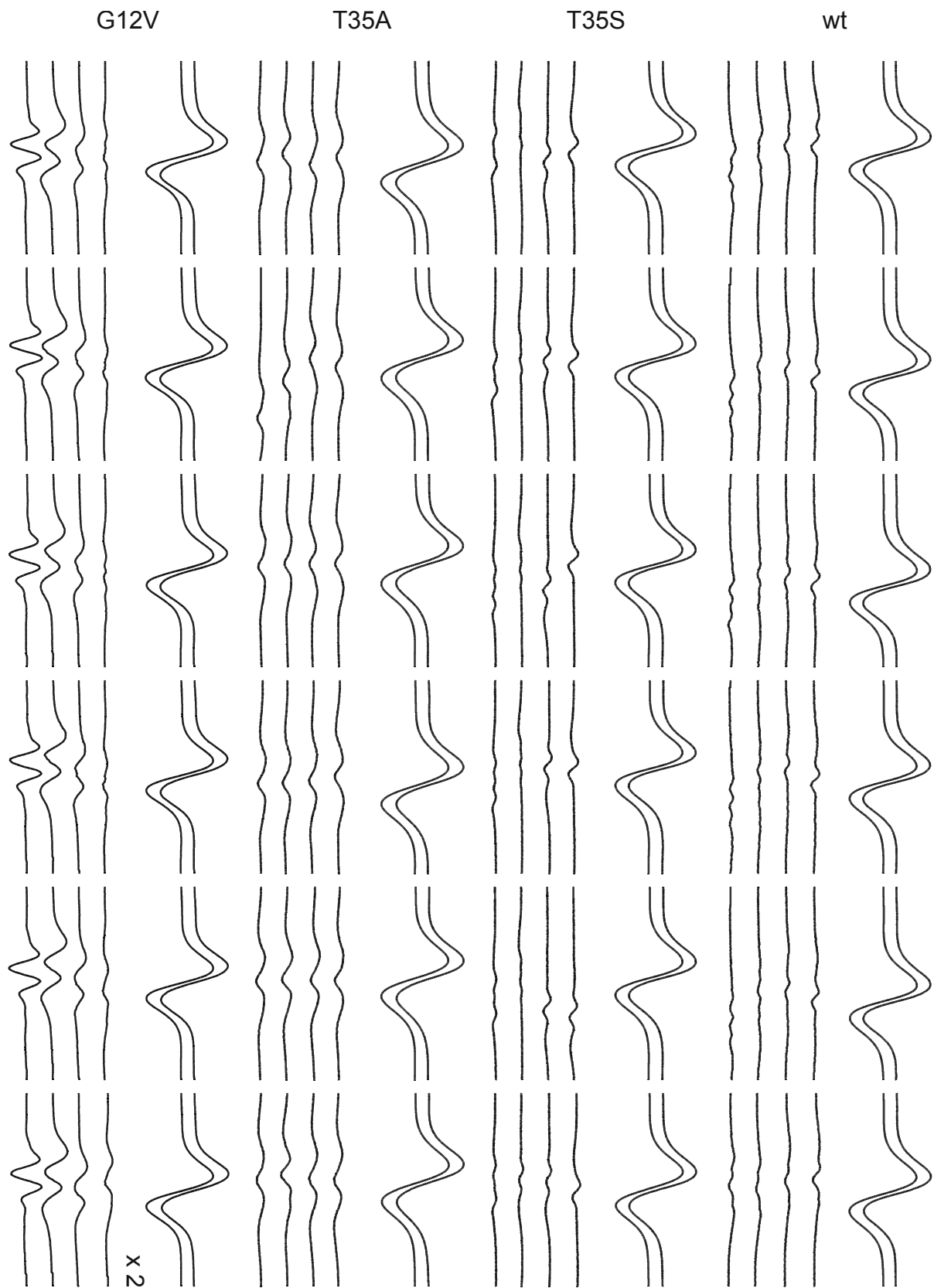


Abb. A.7 vollständige Darstellung der Ergebnisse aus der Abbildung 9.16.

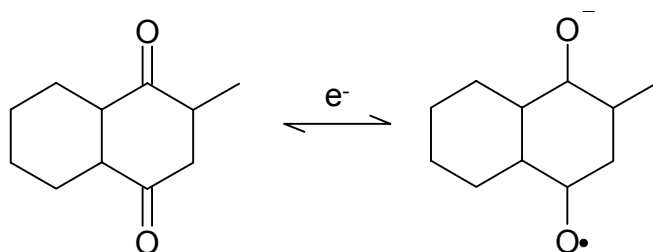
**A.5 Liste der in dieser Arbeit erwähnten Aminosäuren:**

Aminosäure		Säurerest
Alanin	(Ala, A)	-CH <sub>3</sub>
Aspartat	(Asp, D)	-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>
Cystein	(Cys, C)	-CH <sub>2</sub> SH
Glycin	(Gly, G)	-H
Serin	(Ser, S)	-CH <sub>2</sub> OH
Threonin	(Thr, T)	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---C---CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Valin	(Val, V)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{---C---CH}_3 \\   \\ \text{H} \end{array}$

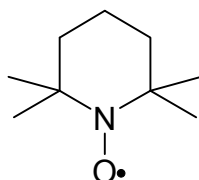
## A.6 Strukturformeln einiger verwendeter Substanzen:

Vitamin K3:

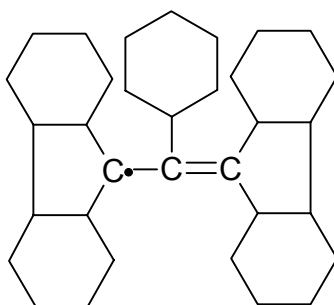
(2-Methyl-1,4-naphthochinon)



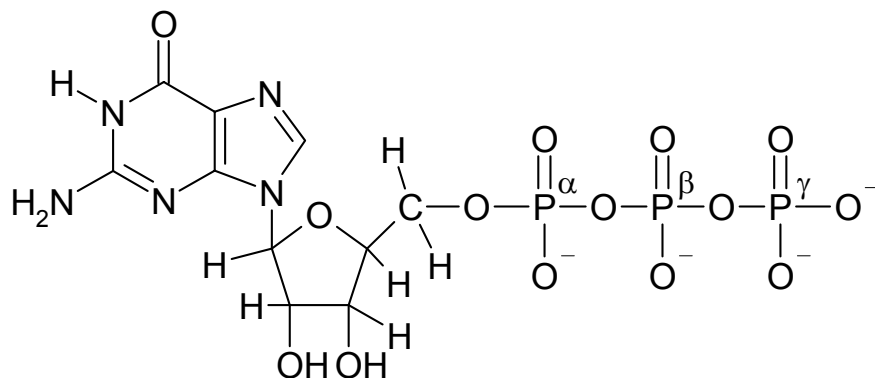
TEMPO:



BDPA:



GTP:







## Literaturverzeichnis

- 1 E. Zavoisky, *J.Phys. USSR* **9**, 211-245, 1945
- 2 D.P. Goldberg, J. Telser, J. Krzystek, A.G. Montalban, L.C. Brunel, A.G.M. Barret, B.M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8722-8723, 1997
- 3 L.G. Rowan, E.L. Hahn, W.B. Mims, *Phys. Rev. A* **137**, 61-71, 1965
- 4 W.B. Mims, *Proc. Roy. Soc.* **283**, 452-457, 1965
- 5 E.R. Davies, *Physics Letters* **47A**, 1-2, 1974
- 6 A. Schweiger, G. Jeschke, *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*, Oxford University Press, New York, 2001
- 7 T. Prisner, M. Rohrer, F. MacMillan, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 279-313, 2001
- 8 A. Schweiger, *Angewandte Chemie* **103**, 223-350, 1991
- 9 T.F. Prisner, *Adv. Magn. Optic. Reson.* **20**, 245-299, 1997
- 10 M. Rohrer, *EPR und ENDOR bei 95 GHz an organischen Radikalen*, Dissertation, Freie Universität Berlin, 1995
- 11 M. Rohrer, P. Gast, K. Möbius, T. Prisner, *Chem. Phys. Lett.* **259**, 523-530, 1996
- 12 R.T. Weber, J.A.J.M. Disselhorst, L.J. Prevo, J. Schmidt, W.T. Wenckebach, *J. Magn. Reson.* **81**, 129-144, 1989
- 13 A.Y. Bresguenov, A.A. Dubinskii, V.N. Krimov, Y.G. Petrov, O.G. Poluektov, Y.S. Lebedev, *Appl. Magn. Reson.* **2**, 715-728, 1991
- 14 T.F. Prisner, S. Un, R.G. Griffin, *Isr. J. Chem.* **32**, 357-363, 1992
- 15 T.F. Prisner, M. Rohrer, K. Möbius, *Appl. Magn. Reson.* **7**, 167-183, 1994
- 16 *Bruker Report* **142**, 20-21, 1996
- 17 D. Schmalbein, G.G. Maresch, A. Komlowski und P. Höfer, *Appl. Magn. Reson.* **16**, 185-205, 1999
- 18 R.J. Wagner, A.M. White, *Solid State Comm.* **32**, 399-401, 1979
- 19 C. Kutter, H.P. Moll, J. van Tol, H. Zuckermann, J.C. Maan, P. Wyder, *Phys. Rev. Lett.* **74**, 2925-2928, 1995

- 20 K. Scheffler, H.B. Stegmann, *Elektronenspinresonanz*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1970
- 21 A. Carrington, A.D. McLachlan, *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper & Row, London, 1967
- 22 N.M. Atherton, *Principles of Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1993
- 23 W. Gerlach und O. Stern, *Zeitschrift für Physik* **9**, 349-352, 1922
- 24 P.A.M. Dirac, *Proc. Roy. Soc. London* **A117**, 610-624, 1928
- 25 J. Schwinger, *Phys. Rev.* **73**, 416-417, 1948
- 26 E.L. Hahn, *Phys. Rev.* **80**, 580-594, 1950
- 27 R.J. Blume, *Phys. Rev.* **109**, 1867-1873, 1958
- 28 Y.S. Lebedev, *Appl. Magn. Reson.* **7**, 339-362, 1994
- 29 K. Möbius, *Biol. Magn. Reson.* **13**, (L.J. Berliner, J. Reuben, Hrsg.), 253-274, 1993
- 30 O. Grinberg, A.A. Dubinskii, Y.S. Lebedev, *Russian Ch. Rev.* **52**, 850-865, 1983
- 31 W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner Verlag, Stuttgart, 1995
- 32 A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt (Hrsg.), *Handbook of Metalloproteins*, Wiley, Chichester, 2001
- 33 C. Gemperle, A. Schweiger, *Chem. Rev.* **91**, 1481-1505, 1991
- 34 A. Grupp, M. Mehring, *Pulsed ENDOR Spectroscopy in Solids*, in *Modern Pulsed and CW Electron Spin Resonance*, L. Kevan, M. Bowman (Hrsg.), 195-227, 1990
- 35 G.H. Reed und G.D. Markham, *Biol. Magn. Reson.* **6**, 73-142, 1984
- 36 J.R. Pilbrow, *Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance*, Oxford University Press, New York, 1990
- 37 G.H. Reed, *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 567-571, 1985
- 38 C.W. Bock, A. Kaufman Katz, G.D. Markham, J.P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7360-7372, 1999
- 39 M. Alonso, E.J. Finn, *Physics*, Addison-Wesley, 1992
- 40 X. Tan, M. Bernardo, H. Thomann, C.P. Schooles, *J. Chem. Phys.* **98**, 5147-5157, 1993

- 41 A.R. Coffino, J. Peisach, *J. Magn. Reson. B* **111**, 127-134, 1996
- 42 H. Käss, F. MacMillan, B. Ludwig, T.F. Prisner, *J. Phys. Chem. B* **104**, 5362-5371, 2000
- 43 G.W. Smithers, M. Poe, D.G. Latwesen, G.H. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 416-420, 1990
- 44 T.S. Leyh, P.J. Goodhart, A.C. Nguyen, G.L. Kenyon, G.H. Reed, *Biochemistry* **24**, 308-316, 1985
- 45 B.J. Gaffney, C. Su, E.H. Oliw, *Appl. Magn. Reson.* **21**, 411-422, 2001
- 46 E. Meirovitch, Z. Luz, A.J. Kalb (Gilboa), *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7538-7542, 1974
- 47 J.J. Villafranca, D.E. Ash, F.C. Wedler, *Biochemistry* **15**, 544-553, 1976
- 48 R.R. Poyner, G.H. Reed, *Biochemistry* **31**, 7166-7173, 1992
- 49 M.R. Webb, D.E. Ash, T.S. Leyh, D.R. Trentham, G.H. Reed, *J. Biol. Chem.* **257**, 3068-3072, 1982
- 50 B.F. Bellew, C.J. Halkides, G.J. Gerfen, R.G. Griffin, D.J. Singel, *Biochemistry* **35**, 12186-12193, 1996
- 51 S. Un, J. Bryant und R.G. Griffin, *J. Mag. Reson. A* **101**, 92-94, 1993
- 52 Y. Alpert, Y. Couder, J. Tuchendler, H. Thomé, *Biochim. Biophys. Acta* **322**, 34-37, 1973
- 53 F. Muller, M.A. Hopkins, N. Coron, M. Grynberg, L.C. Brunel, G. Martinez, *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 3681-3684, 1989
- 54 A.K. Hassan, L.A. Pardi, J. Krzystek, A. Sienkiewicz, P. Goy, M. Rohrer, L.C. Brunel, *J. Magn. Reson.* **142**, 300-312, 2000
- 55 C.P. Poole, *Electron Spin Resonance*, Wiley, New York 1967
- 56 L.R. Beccera, G.J. Gerfen, B.F. Bellew, J.A. Bryant, D.A. Hall, S.J. Inati, R.T. Weber, S. Un, T.F. Prisner, A.E. McDermott, K.W. Fishbein, K.E. Kreisler, R.J. Temkin, D.J. Singel, R.G. Griffin, *J. Magn. Reson. A* **117**, 38-40, 1995
- 57 G.M. Smith, J.C.G. Lesurf, R.H. Mitchell, P.C. Riedi, *Rev. Sci. Instrum.* **69**, 3924-3937, 1998
- 58 M.R. Fuchs, T.F. Prisner, K. Möbius, *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 3681-3683, 1999
- 59 K.A. Earle, D.S. Tipikin, J.H. Freed, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 2502-2513, 1996

- 60 E.J. Reijerse, P.J. van Dam, A.A.K. Klaassen, W.R. Hagen, P.J.M. van Bentum, G.M. Smith, *Appl. Magn. Reson.* **14**, 153-167, 1998
- 61 W.B. Lynch, K.A. Earle, J.H. Freed, *Rev. Sci. Instrum.* **59**, 1345-1351, 1988
- 62 J. Lesurf, *Millimetre-wave Optics, Devices and Systems*, IOP Publishing Ltd, Bristol, 1990
- 63 P.F. Goldsmith, *Quasioptical Systems*, IEEE Press, New York, 1998
- 64 R.J. Wylde, *IEEE Proceedings* **131**, 258-262, 1984
- 65 M. Faraday, *Phil. Trans. Roy. Soc.* **136**, 1-20, 1846
- 66 M.R. Webb, *Int. J. Infrared and Millimeter Waves* **12**, 45-63, 1991
- 67 E. Haindl, K. Möbius, H. Oloff, *Z. Naturforschung* **40a**, 169-172, 1985
- 68 O. Burghaus, M. Rohrer, T. Götzinger, M. Plato, K. Möbius, *Meas. Sci. Technol.* **3**, 765-774, 1992
- 69 J.P. Barnes, J.H. Freed, *Rev. Sci. Instrum.* **69**, 3022-3027, 1998
- 70 M. Rohrer, J. Krzystek, V. Williams, L.C. Brunel, *Meas. Sci. Technol.* **10**, 275-284, 1999
- 71 G. Annino, M. Cassetari, I. Longo, M. Martinelli, *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 1787-1793, 1999
- 72 G. Annino, M. Cassetari, I. Longo, M. Martinelli, *Chem. Phys. Lett.* **281**, 306-311, 1997
- 73 J.A.J.M. Disselhorst, H. van der Meer, O.G. Poluektov, J. Schmidt, *J. Magn. Reson. A* **115**, 183-188, 1995
- 74 G. Käs, P. Pauli, *Mikrowellentechnik*, Franzis-Verlag, München, 1991
- 75 millitech, *Produktkatalog*, 1995
- 76 M. Bennati, C.T. Farrar, J.A. Bryant, S.J. Inati, V. Weiss, G.J. Gerfen, P. Riggs-Gelasco, J. Stubbe, R.G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **138**, 232-243, 1999
- 77 J.P. Gordon, K.D. Bowers, *Phys. Rev. Lett.* **1**, 368-370, 1958
- 78 G. Feher, *Bell Syst. Tech. J.* **36**, 449-484, 1957
- 79 W.E. Balch, *Trends Biochem. Sci.* **15**, 473-477, 1990

- 80 A. Hall, *Science* **249**, 635-640, 1990
- 81 P.J. Casey, A.G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **263**, 2577-2580, 1988
- 82 J. Downward, *Curr. Opin. Genetics & Development* **8**, 49-54, 1998
- 83 A. Khokhlatchev, S. Rabizadeh, R. Xavier, M. Nedwidek, T. Chen, X. Zhang, B. Seed, J. Avruch, *Current Biology* **12**, 253-265, 2002
- 84 J.H. Exton, *J. Biol. Chem.* **273**, 19923, 1998
- 85 J. Downward, *Trends Biochem. Sci.* **15**, 469-472, 1990
- 86 S.S. Sprang, *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 639-678, 1997
- 87 A.B. Vojtek und C.J. Der, *J. Biol. Chem.* **273**, 19925-19928, 1998
- 88 D.R. Lowy und B.M. Willumsen, *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 851-891, 1993
- 89 A. Wittinghofer, C. Herrmann, *FEBS Lett.* **369**, 52-56, 1995
- 90 A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 4192-4214, 2000
- 91 B.M.T. Burgering, J.L. Bos, *TIBS* **20**, 18-22, 1995
- 92 M. Macaluso, G. Russo, C. Cinti, V. Bazan, N. Gebbia, A. Russo, *J. Cell. Phys.* **192**, 125-30, 2002
- 93 S. Donovan, K.M. Shannon, G. Bollag, *Biochim. Biophys. Acta* **1602**, 23-45, 2002
- 94 M.E. Linder und A.G. Gilman, *Spektrum der Wissenschaft*, 54-62, September 1992
- 95 M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827, 1987
- 96 M. Trahey und F. McCormick, *Science* **238**, 542-545, 1987
- 97 K.V. Visvanathan, R.D. Pockock, I.C. Summerhayes, *Oncogene Research* **3**, 77-86, 1988
- 98 J.L. Bos, *Cancer Research* **49**, 4682-4689, 1989
- 99 J.-S. Hu, A.G. Redfield, *Biochemistry* **32**, 6763-6772, 1993
- 100 M. Spoerner, C. Herrmann, I.R. Vetter, H.R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4944-4949, 2001
- 101 M.V. Milburn, L. Tong, A.M. de Vos, A. Brünger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.H. Kim, *Science* **247**, 939-945, 1990

- 102 E.F. Pai, U. Krengel, G.A. Petsko, R.S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, *EMBO J.* **9**, 2351-2359, 1990
- 103 U. Krengel, I. Schlichting, A. Scherer, R. Schumann, M. Frech, J. John, W. Kabsch, E.F. Pai, A. Wittinghofer, *Cell* **62**, 539-548, 1990
- 104 G.G. Privé, M.V. Milburn, L. Tong, A.M. de Vos, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3649-3653, 1992
- 105 M. Haller, U. Hoffmann, T. Schanding, R.S. Goody, P.D. Vogel, *J. Biol. Chem.* **272**, 30103-30107, 1997
- 106 J. Feuerstein, H.R. Kalbitzer, J. John, R.S. Goody, A. Wittinghofer, *Eur. J. Biochem.* **162**, 49-55, 1987
- 107 H. Cheng, S. Sukal, H. Deng, T.S. Leyh, R. Callender, *Biochemistry* **40**, 4035-4043, 2001
- 108 C. Allin, M.R. Ahmadian, A. Wittinghofer, K. Gerwert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7754-7759, 2001
- 109 C. Allin, K. Gerwert, *Biochemistry* **40**, 3037-3046, 2001
- 110 X. Du, H. Frei, S.H. Kim, *J. Biol. Chem.* **275**, 8492-8500, 2000
- 111 J.H. Wang, D.G. Xiao, H. Deng, M.R. Webb, R. Callender, *Biochemistry* **37**, 11106-11116, 1998
- 112 H. Rensland, A. Lautwein, A. Wittinghofer, R.S. Goody, *Biochemistry* **30**, 11181-11185, 1991
- 113 R. Mittal, M.R. Ahmadian, R.S. Goody, A. Wittinghofer, *Science* **273**, 115-117, 1996
- 114 K.M. Maegley, S.J. Admiraal, D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8160-8166, 1996
- 115 N. Futatsugi, M. Tsuda, *Biophys. Journal* **81**, 3483-3488, 2001
- 116 J. Ma, M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11905-11910, 1997
- 117 T.M. Glennon, J. Villà, A. Warshel, *Biochemistry* **39**, 9641-9651, 2000
- 118 T.A. Soares, J.H. Miller, T.P. Straatsma, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **45**, 297-312, 2001
- 119 M. Rohrer, T.F. Prisner, O. Brüggemann, H. Käss, M. Spoerner, A. Wittinghofer, H.R. Kalbitzer, *Biochemistry* **40**, 1884-1889, 2001

- 120 T. Schweins, K. Scheffzek, R. Aßheuer, A. Wittinghofer, *J. Mol. Biol.* **266**, 847-856, 1997
- 121 L. Tong, A.M. deVos, M.V. Milburn, S.-H. Kim, *J. Mol. Biol.* **217**, 503-516, 1991
- 122 M. Spörner, *Konformationelle Dynamik des Ras-Proteins und ihre Bedeutung für die Effektor-Wechselwirkung*, Dissertation, Universität Regensburg, 2002
- 123 J. Tucker, G. Sczakiel, J. Feuerstein, J. John, R.S. Goody, A. Wittinghofer, *EMBO J.* **5**, 1351-1358, 1986
- 124 J. Fujita-Yoshigaki, Y. Ito, K. Yamasaki, Y. Muto, T. Miyazawa, S. Nishimura, S. Yokoyama, *J. Protein Chem.* **11**, 731-739, 1992
- 125 X. Tan, M. Bernardo, H. Thomann, C.P. Schooles, *J. Chem. Phys.* **102**, 2675-2689, 1995
- 126 C.J. Halkides, B.F. Bellew, G.J. Gerfen, C.T. Farrar, P.H. Carter, B. Ruo, D.A. Evans, R.G. Griffin, D.J. Singel, *Biochemistry* **35**, 12194-12200, 1996
- 127 H.R. Kalbitzer, J. Feuerstein, R.S. Goody, A. Wittinghofer, *Eur. J. Biochem.* **188**, 355-359, 1990
- 128 H.R. Kalbitzer, R. Marquetant, B.A. Connolly, R.S. Goody, *Eur. J. Biochem.* **133**, 221-227, 1983
- 129 G.H. Reed, T.S. Leyh, *Biochemistry* **19**, 5472-5480, 1980
- 130 R.G. Larsen, C.J. Halkides, A.G. Redfield, D.J. Singel, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9608-9611, 1992
- 131 B. Epel, P. Manikandan, P.M.H. Kroneck, D. Goldfarb, *Appl. Magn. Reson.* **21**, 287-297, 2001
- 132 I. Schlichting, S.C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E.F. Pai, G.A. Petsko, R.S. Goody, *Nature* **345**, 309-315, 1990
- 133 S.L. Lin, E.A. Stern, A.J. Kalb, Y. Zhang, *Biochemistry* **30**, 2323-2332, 1991
- 134 K. Zhang, B. Chance, D.S. Auld, K.S. Larsen, B.L. Vallee, *Biochemistry* **31**, 1159-1168, 1992
- 135 D.G. Nettlesheim, R.P. Edalji, K.W. Mollison, J. Greer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5036-5040, 1988
- 136 D.G. Latwesen, M. Poe, J.S. Leigh, G.H. Reed, *Biochemistry* **31**, 4946-4950, 1992
- 137 C.J. Halkides, C.T. Farrar, D.J. Singel, *J. Magn. Reson.* **134**, 142-153, 1998

- 138 C.J. Halkides, C.T. Farrar, R.G. Larsen, A.G. Redfield, D.J. Singel, *Biochemistry* **33**, 4019-4035, 1994
- 139 R.G. Larsen, C.J. Halkides, D.J. Singel, *J. Chem. Phys.* **98**, 6704-6721, 1993
- 140 P.J. Kraulis, P.J. Dommille, S.L. Campbell-Burk, T. van Aken, E.D. Laue, *Biochemistry* **33**, 3515-3531, 1994
- 141 Y. Muto, K. Yamasaki, Y. Ito, S. Yajima, H. Masaki, T. Uozumi, M. Wälchli, S. Nishimura, T. Miyazawa, S. Yokoyama, *J. Biomol. NMR* **3**, 165-184, 1993
- 142 M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H.R. Kalbitzer, *Biochemistry* **35**, 10308-10320, 1996
- 143 R. Carmieli, P. Manikandan, A.J. Kalb (Gilboa), D. Goldfarb, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8378-8386, 2001
- 144 L.J. Berliner, G.R. Eaton, S.S. Eaton (Hrsg.), *Distance Measurements in Biological Systems by EPR*, *Biol. Mag. Reson.* **19**, Kluwer Academic, New York, 2000
- 145 L.J. Berliner (Hrsg.), *Spin Labeling, Theory and Applications*, Academic Press, New York, 1976
- 146 A. Weber, *Entwicklung gepulster Elektronendoppelresonanz-Verfahren zur Abstandsmessung im Nanometerbereich*, Dissertation, Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2002
- 147 S.A. Dzuba, A.G. Maryasov, K.M. Salikhov, Y.D. Tsvetkov, *J. Magn. Reson.* **58**, 95-117, 1984
- 148 D. Budil, K.A. Earle, J.H. Freed, *J. Phys. Chem.* **97**, 1294-1303, 1993
- 149 Z. Liang, J.H. Freed, *J. Phys. Chem. B* **103**, 6384-6396, 1999
- 150 J. Voss, W.L. Hubbell, H.R. Kaback, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12300-12303, 1995
- 151 D.E. Budil, S.V. Kolaczowski, A. Perry, C. Varaprasad, F. Johnson, P.R. Strauss, *Biophys. J.* **78**, 430-438, 2000
- 152 H.J. Steinhoff, A. Savitsky, C. Wegener, M. Pfeiffer, M. Plato, K. Möbius, *Biochim. Biophys. Acta* **1457**, 253-262, 2000
- 153 M.D. Rabenstein, Y.-K. Shin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8239-8243, 1995
- 154 M. Bennati, G.J. Gerfen, G.V. Martinez, R.G. Griffin, D.J. Singel, G.L. Millhauser, *J. Magn. Reson.* **139**, 281-286, 1999



- 155 D. Marsh, L.I. Horváth, *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 267-296, 1998
- 156 G. Jeschke, H.W. Spiess, *Chem. Phys. Lett.* **293**, 9-18, 1998
- 157 A.D. Milov, A.B. Ponomarev, Y.D. Tsetkov, *Chem. Phys. Lett.* **110**, 67-72, 1984
- 158 A.D. Milov, A.G. Maryasov, Y.D. Tsetkov, *Appl. Magn. Reson.* **15**, 107-143, 1998
- 159 A. Bloeiß, K. Möbius, T.F. Prisner, *J. Magn. Reson.* **134**, 30-35, 1998
- 160 J.W.A. Coremans, O.G. Poluektov, E.J.J. Groenen, G.W. Canters, H. Nar, A. Messerschmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4726-4731, 1997
- 161 A.A. Dubinskii, Y.A. Grishin, A.N. Savitsky, K. Möbius, *Appl. Magn. Reson.* **22**, 369-386, 2002
- 162 S. Grimaldi, *Multidimensional Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy on Protein-bound Semiquinones*, Dissertation, Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2002
- 163 A. Weber, O. Schiemann, B. Bode, T.F. Prisner, *J. Magn. Reson.* **157**, 277-285, 2002
- 164 A.J. Scheidig, A. Sanchez-Llorente, A. Lautwein, *Acta Cryst. D* **50**, 512-520, 1994
- 165 C.G. Hoogstraten, R.D. Britt, *RNA* **8**, 252-260, 2002



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bei Prof. Thomas Prisner für die Übertragung dieser interessanten Aufgabe und die Betreuung, für viele Diskussionen und Anregungen. Bei Dr. Martin Rohrer, der mit seiner Erfahrung wesentlich zum Aufbau des Probenkopfs und des Puls-Spektrometers beigetragen hat und ohne den die Durchführung dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre. Bei Dr. Marina Bennati, die mit viel Engagement bei der Betreuung des Spektrometers geholfen hat, sowie unter anderem für die Hilfe bei der Aufnahme und der Auswertung der ENDOR-Spektren.

Herr Bernhard Kinzer hat als Elektroniker in unserer Arbeitsgruppe dafür gesorgt, dass stets alle elektrischen Geräte einsatzbereit waren, und war stets bereit, defekte Geräte zu reparieren und so manches Gerät wurde von ihm extra angefertigt. Insbesondere die Stromversorgung der supraleitenden Sweepspule hat ihm so manche Schweißperle auf die Stirn getrieben. In diesem Zusammenhang sei auch Dr. Jens Törring erwähnt für seine Hilfe bei der Entwicklung der Computer-Schnittstelle der Stromversorgung. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei allen Mitarbeitern der Feinmechanischen Werkstatt unseres Instituts für ihre Hilfsbereitschaft, die stets mit Ideen zur Stelle waren und einen wesentlichen Beitrag beim mechanischen Aufbau des Spektrometers geleistet haben. Namentlich erwähnen möchte ich Herrn Jäger, Herrn Ott, Herrn van Tankeren sowie Herrn Eimer.

Ich möchte mich hier bei einer Reihe von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe bedanken, für die Hilfe, die sie im Laufe der Zeit geleistet haben. Stéphane Grimaldi unter anderem für so manchen Messtag, den er für mich an dem Puls X-Band Spektrometer verbracht hat. Dr. Axel Weber hatte immer ein offenes Ohr für Diskussionen über technische Details und auch so manches Bier hat mit ihm einfach besser geschmeckt. Dr. Marina Bennati und Melanie Hertel sei gedankt für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Hochfeld-Labor und jede Art von Unterstützung, die sie mir und dem Spektrometer haben zukommen lassen. Sigrid Kämmerer konnte so manches Literaturzitat organisieren, das ich ohne ihre Hilfe nicht so leicht bekommen hätte.

Dr. Michael Spoerner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Kalbitzer an der Universität Regensburg hat im Rahmen seiner Doktorarbeit die hier vorgestellten Proben des Ras-Proteins präpariert und uns zur Verfügung gestellt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dinse von der TU Darmstadt, in dessen Arbeitsgruppe alle in dieser Arbeit gezeigten W-Band Messungen durchgeführt wurden. Dr. Hanno Käß und Dr. Norbert Weiden gilt mein Dank für die Durchführung dieser Messungen. Auch so manches bei uns nicht vorhandenes Gerät konnten wir uns von der Arbeitsgruppe ausleihen.

Bei der Firma *Radiometer Physics* möchte ich mich für ihre (fast uneigennützig) Hilfe bei der Fehlersuche an unserer MW-Quelle bedanken.

Einige Studenten haben im Rahmen ihres Arbeitskreispraktikums an der Entwicklung des Transmissionsprobenkopfs mitgewirkt. Bärbel Wittel hat beim Vergolden einiger MW-Bauteile geholfen, Tonia Kretz, Kai Ruth, Dominik Margraf und Bela Bode haben bei der Konstruktion des Probenkopfs sowie der Eichung der Modulationsspule mitgewirkt, und Regina Mertens hat eine Reihe von Spektren mit dem Transmissionsaufbau aufgenommen.

Alexander Schnegg und Dr. Martin Fuchs aus der Arbeitsgruppe von Prof. Möbius an der FU Berlin sei gedankt für die Möglichkeit, Messungen bei 360 GHz zu machen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die Förderung dieses Projekts im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1051 „*Hochfeld EPR in Biologie, Chemie und Physik*“. Sowohl meine Stelle als auch viele Geräte, Verbrauchsmaterial und Reisekosten wurden aus diesem Projekt finanziert. Das Land Hessen hat die Finanzierung des supraleitenden Magneten sowie der Mikrowellenbrücke sichergestellt.

Ein ganz besonderer Dank geht an Carmen für ihr teilweise stark strapaziertes Verständnis, das sie mir und meiner Arbeit entgegen gebracht hat, und dass sie mich immer wieder aufgebaut hat.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Oliver Brüggemann  
Anschrift: von-Esmarch-Str. 164  
48149 Münster  
Geburtsdatum: 5. September 1973  
Geburtsort: Lübeck  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1980 – 1984 Grundschole in Reinfeld  
1984 – 1993 Carl-Jacob-Burckhardt Gymnasium in Lübeck  
Juni 1993 Abitur

### Ersatzdienst:

1992 – 2002 Mitgliedschaft in den Freiwilligen Feuerwehren  
Groß Wesenberg,  
Lüneburg,  
Frankfurt am Main – Niederursel,  
sowie beim ABC-Zug des Kreises Stormarn

### Studium

1993 – 1998 Studium der Physik an der Universität Hamburg  
Oktober 1995 Vordiplom in Physik  
1997 – 1998 Diplomarbeit mit dem Titel  
*„Magnetometer aus Josephson-Kontakt-Serienarrays auf  
Bikristall-Substraten“*  
in der Arbeitsgruppe von Prof. U. Merkt am  
Institut für Angewandte Physik und Zentrum für  
Mikrostrukturforsohung, Fachbereich Physik,  
Universität Hamburg  
September 1998 Diplom in Physik  
Oktober 1998 bis Promotionsstudium am  
November 2002 Institut für Physikalische und Theoretische Chemie,  
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften,  
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

meine akademischen Lehrer waren:

G. Andersson-Lindström, R. Anton, J. Bartels, J. Hansen-Schmidt, H. Heyszenau, H. Jung,  
R. Lang, E. Lohrmann, U. Merkt, W. Neuhauser, T.F. Prisner, O. Riemenschneider,  
M. Schilling, H. Schmidt, H. Spitzer, G. Zimmerer