

DISS. ETH No. 18303

# Development of New Methods in Pulse EPR and their Application to Multi-Nuclear Spin Systems

A dissertation submitted to

**ETH Zurich**

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**Besnik Kasumaj**

Dipl. Natw. ETH Zurich

Born November 19, 1978  
Citizen of Zurich, Switzerland

supervised by

Prof. Dr. Arthur Schweiger (deceased on January 4, 2006)

Prof. Beat H. Meier

Prof. Gunnar Jeschke

Accepted on the recommendation of

Prof. Gunnar Jeschke, examiner

Prof. François Diederich, co-examiner

2009

# Abstract

Pulse electron paramagnetic resonance (EPR) has developed into a widely used experimental tool in structure determination of biological, chemical and physical systems, but the theoretical understanding of the used pulse sequences is not yet complete. Up to date, most pulse EPR sequences have only been discussed in detail for the simplest spin system consisting of an electron spin  $1/2$  coupled to a nuclear spin  $1/2$ . The main purpose of this thesis is the investigation of spin systems where many nuclei with spin  $1/2$  are coupled to the same electron spin. Multinuclear spin systems can exhibit effects of strong level mixing, which can lead to the suppression of spectral peaks and therefore to loss of information on the structure. The effect of level mixing is based on the pseudo secular terms in the static spin Hamiltonian. Properties of multinuclear spin system are first reinvestigated in order to clarify the conditions at which level mixing is observed. These conditions are frequently fulfilled for transition metal compounds at standard X-band excitation frequencies ( $\sim 9.5$  GHz). The investigation of level mixing requires a model system where this effect is strong. Ideal model systems were found in dioxygen adducts of cobalt substituted myoglobin and in synthetic model compounds for the dioxygen binding pockets of myoglobin and hemoglobin. The study of level mixing was extended to include three groups of pulse EPR experiments: Electron spin echo envelope modulation (ESEEM), electron nuclear double resonance (ENDOR) and free induction decay (FID)-detected hole-burning. In ESEEM level mixing manifests itself as the cross-suppression effect, whereas in ENDOR it results in the implicit-TRIPLE effect. Level mixing is also manifest in electron electron double resonance (ELDOR) as to an effect known as dipolar truncation in NMR.

ESEEM sequences were investigated in detail, as the information is created by level mixing in these pulse sequences. The comprehensive treatment of multinuclear spin systems is straightforward if product rules are used. Such rules apply strictly to those ESEEM sequences which can be described by ideal pulses solely and allow for the computation of modulation formulas for multinuclear spin systems, if the analogous formulas for a spin system consisting of one electron spin coupled to one nuclear spin are known. Modulation formulas and product rules for 5-pulse ESEEM and 6-pulse hyperfine sublevel correlation

spectroscopy (HYSCORE) are derived and discussed. The behavior of multinuclear spin systems in 2-, 3- and 5-pulse ESEEM and 4- and 6-pulse HYSCORE has been investigated with focus on the cross-suppression effect. These formulas are found to be in excellent agreement with experimental results. 5-pulse ESEEM and 6-pulse HYSCORE are found to be very efficient in reducing the impact of the cross-suppression effect.

The modulation formula for 5-pulse ESEEM is related to symmetries in the pulse sequence, which in turn can conveniently be characterized by corresponding electron coherence transfer pathways. It is shown that modulation formula for multipulse ESEEM sequences can be derived from the formula for the 5-pulse ESEEM parent sequence by making use of these symmetries. Furthermore, one can derive analogue product rules. It is thus possible to comprehensively discuss the behavior of these multipulse ESEEM sequences by relating it to the behavior of 5-pulse ESEEM. The properties of multipulse ESEEM sequences, including the impact of level mixing, are discussed and compared to experimental findings. Finally, the extension to corresponding HYSCORE experiments is demonstrated.

Relaxational effects reduce the signal obtained by an ESEEM pulse sequence, as longitudinal and transverse relaxation takes place during preparation, evolution and detection. The study of the relaxation behavior for a multinuclear spin system is complicated because of an apparent break-down of product rules. The break-down of the product rule for 2-pulse ESEEM is found to be bound to a specific condition, which is examined by single crystal measurements. Approximative formulas for 2-, 3- and 5-pulse ESEEM and 4- and 6-pulse HYSCORE are derived.

In spite of the break-down of the product rules, it is possible to discuss the impact of level mixing in matched ESEEM and hole-burning techniques, based on the analytical results for multinuclear spin systems derived before. Matched ESEEM has the ability to reduce the impact of level mixing and is based on hard pulses. Hole-burning pulses are selective and lead to a different manifestation of level mixing in the spectra. Both strategies can successfully be applied, as experimentally adjustable parameters, namely the lengths and strengths of the applied pulses, allowed to modify the modulation depths of selected nuclei.

The implicit-TRIPLE effect results in asymmetric peak intensities of Mims ENDOR spectra. Mims ENDOR is derived from 3-pulse ESEEM by fixing the evolution time and including a radio frequency pulse in this time. The preparation subsequences of both pulse sequences are the same, the implicit-TRIPLE effect is therefore related to level mixing.

These results allowed to select proper experimental techniques which were successfully applied to investigate a hydrogen bond interaction between bound dioxygen and a distal hydrogen bond donor in model compounds for myoglobin and hemoglobin and in cobalt-substituted myoglobin. Direct experimental evidence of this hydrogen bond interaction was given. Moreover, the chemical requirements for proper distal hydrogen bonding were inves-

tigated in a series of synthetic model compounds. The polarity and geometry of the distal hydrogen bond donor is essential for hydrogen bonding. It was crucial to optimize the experimental conditions, as all substantial hydrogen interactions were concealed at X-band and for the most frequently used pulse EPR techniques. Most experiments were performed at  $\sim 35$  GHz (Q-band) and with a newly constructed  $TE_{102}$  ENDOR resonator which greatly enhanced the signal-to-noise ratio. The construction and performance of this probehead are discussed.

Porous metal-organic frameworks (MOFs) were investigated with continuous wave EPR. The copper centers were not diluted, which resulted in exchange narrowing and subsequently in the absence of level mixing. Exchange narrowing did not average out the  $g$ -tensor anisotropy in our MOFs as the molecular frames of all copper centers coincide in the crystal structure. It was therefore possible to study their structural flexibility by adsorption and desorption of probe molecules.

# Zusammenfassung

Die gepulste Elektronen-Paramagnetische Resonanz (EPR) hat sich zu einem häufig angewandten experimentellen Werkzeug zur Strukturbestimmung in der Biologie, Chemie und Physik entwickelt. Die verwendeten Pulssequenzen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Bisher wurden die meisten gepulsten EPR Sequenzen nur für die einfachsten Spinsysteme, bestehend aus einem Elektronenspin  $1/2$  gekoppelt an einen Kernspin  $1/2$ , im Detail behandelt. Das Hauptgewicht dieser Dissertation liegt in der Untersuchung von Spinsystemen, in denen mehrere Kernspins mit Spin  $1/2$  an einen Elektronenspin gekoppelt sind. Mehrkernspinsysteme können den Effekt einer starken Zustandsmischung hervorrufen, der zur Unterdrückung von spektralen Signalen führen kann und damit zum Verlust an Information über die zu untersuchende Struktur. Dieser Effekt basiert auf pseudosäkularen Termen im statischen Spin-Hamiltonoperator. Zuerst werden Eigenschaften von Mehrkernspinsystemen behandelt und die Bedingungen für Zustandsmischung diskutiert. Es zeigt sich, dass diese Bedingungen für Übergangsmetallkomplexe häufig unter experimentellen Standardbedingungen, bei einer Anregungsfrequenz von  $\sim 9.5$  GHz, erfüllt sind. Zur Untersuchung der Zustandsmischung ist man auf Modellsysteme angewiesen, in denen dieser Effekt ausgeprägt ist. Diese finden sich in disauerstoff-gebundenem Cobalt-substituiertem Myoglobin und in synthetischen Modellverbindungen für die Disauerstoffbindetasche in Myoglobin und Hämoglobin. Die Untersuchung der Zustandsmischung wird schliesslich auf gepulste EPR Experimente erweitert: Electron-Spin-Echo-Envelope-Modulation (ESEEM), Elektron-Kern-Doppelresonanz (ENDOR) und Lochbrennexperimente. In ESEEM manifestiert sich die starke Zustandsmischung als Kreuzunterdrückungseffekt, in ENDOR als impliziter TRIPLE-Effekt. Effekte der Zustandsmischung in gepulsten Elektronen-Elektronen-Doppelresonanz (ELDOR)-Experimenten wurden analog zum dem in der NMR Spektroskopie als dipolare Abschneidung bekannten Phänomen behandelt.

ESEEM-Pulssequenzen werden im Detail untersucht, weil in diesen Sequenzen die Information generell durch Zustandsmischung generiert wird. Die analytische Behandlung von Mehrkernspinsystemen wird für diese Sequenzen durch Produktregeln stark vereinfacht. Produktregeln gelten strikt für Pulssequenzen, die nur mit idealen Pulsen beschrieben wer-

den können und erlauben die Berechnung von Modulationsformeln für Mehrkernspinsysteme aus der Modulationsformel für ein Einkernspinsystem. Modulationsformeln und Produktregeln für 5-Puls ESEEM und 6-Puls Hyperfein-Korrelationsspektroskopie (HYSCORE) werden hergeleitet und diskutiert. Das Verhalten von Mehrkernspinsystemen in 2-, 3- und 5-Puls ESEEM und 4- und 6-Puls-HYSCORE Experimenten wird unter besonderer Berücksichtigung der Kreuzunterdrückung analysiert. Die gefundenen Formeln stimmen exzellent mit den experimentellen Ergebnissen überein. Mittels 5- und 6-Puls ESEEM kann die ungewollte Kreuzunterdrückung sehr effizient umgangen werden.

Die 5-Puls ESEEM-Modulationsformel weist Symmetrieeigenschaften auf, die durch Analyse der Elektronenkohärenztransferpfade erklärt werden können. Es wird gezeigt, dass Formeln für Multipuls-ESEEM-Sequenzen beliebiger Länge aus der 5-Puls-ESEEM-Formel hergeleitet werden können, indem man von diesen Symmetrien Gebrauch macht. Auch die Produktregeln können analog erhalten werden. Dadurch kann das Verhalten dieser neuen Pulssequenzen durch Vergleich mit dem Verhalten der 5-Puls-ESEEM-Sequenz umfassend diskutiert werden. Die Eigenschaften der neuen Multipuls-ESEEM-Sequenzen werden für Mehrkernspinsysteme diskutiert und mit experimentellen Ergebnissen verglichen. Auch die Erweiterung auf entsprechende HYSCORE-Experimente wird demonstriert.

Das Signal von ESEEM-Pulssequenzen wird durch Relaxation reduziert, die während der Vorbereitungs-, Evolutions- und Detektionsphase stattfindet. Die Untersuchung des Relaxationsverhaltens von Mehrkernspinsystemen wird erschwert weil Relaxation die Produktregeln bricht. Für 2-Puls-ESEEM kann nicht mit Sicherheit gezeigt werden, dass die Produktregel ihre Gültigkeit verliert, da dieser Schluss an einen Unterschied von Relaxationszeiten gebunden ist, der selbst durch Einkristallmessungen nicht sicher nachgewiesen werden kann. Näherungsformeln für 2-, 3- und 5-Puls ESEEM und 4- und 6-Puls HYSCORE werden hergeleitet die in kompakter Form die wesentlichsten Relaxationseffekte beschreiben.

Obwohl die Produktregeln auch bei leistungsangepassten ESEEM- und Lochbrennexperimenten ihre Gültigkeit verlieren, war es möglich, den Einfluss der Zustandsmischung zu diskutieren, da analytische Formeln für Mehrkernspinsysteme bereits vorliegen. Leistungsangepasstes ESEEM kann den Einfluss der Zustandsmischung reduzieren und basiert auf harten Pulse. In Lochbrennexperimenten werden selektive Pulse verwendet, die es auch erlauben, ungewollte Einflüsse der Zustandsmischung zu umgehen. Beide Strategien können erfolgreich angewendet werden, da experimentell einstellbare Parameter, nämlich Pulslänge und -stärke der angewendeten Pulse, eine Verstärkung der gewünschten Modulationstiefen erlauben.

Der implizite TRIPLE-Effekt resultiert in asymmetrischen Peakintensitäten in Mims-ENDOR Spektren. Mims ENDOR basiert auf 3-Puls ESEEM und wird durch einen Radiofrequenzpuls ergänzt. Die Vorbereitungsphase beider Experimente ist gleich, deshalb

kann dieser Effekt auf Zustandsmischung zurückgeführt werden.

Diese experimentellen Techniken werden erfolgreich eingesetzt, um eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen gebundenem Sauerstoff und einem distalen Wasserstoffbrückendonator in Modellverbindungen von Myoglobin und Hämoglobin und in Cobalt-substituiertem Myoglobin zu untersuchen. Durch umgehen der Kreuzunterdrückung kann diese Wechselwirkung direkt nachgewiesen werden. Zudem werden die chemischen Anforderungen für diese Wechselwirkung mittels einer Serie von Modellverbindungen untersucht. Die Polarität und die Geometrie des distalen Wasserstoffbrückendonators ist essenziell für diese Wasserstoffbrücke. Für solche Messungen ist es von höchster Bedeutung, dass alle experimentellen Bedingungen optimiert werden, da alle substanziellen Wasserstoffwechselwirkungen im X-Band und mit den üblicherweise verwendeten gepulsten EPR-Techniken verborgen bleiben können. Viele der zur Aufklärung dieser Wechselwirkung verwendeten Experimente wurden mit einem neu konstruierten  $TE_{102}$  ENDOR-Resonator bei  $\sim 35$  GHz (Q-band) durchgeführt. Die Konstruktion und Leistung dieses Resonators werden diskutiert.

Poröse metallorganische Netzwerke (MOFs) werden mit cw EPR untersucht. In diesen Systemen liegen dicht benachbarte Kupferzentren vor, weshalb die Austauschwechselwirkung zu einer Ausmittelung der Hyperfeinwechselwirkung führt. Diese Austauschwechselwirkung mittelt allerdings die  $g$ -Tensor-Anisotropie nicht aus, da alle Molekularkoordinatensysteme in der Kristallstruktur gleich orientiert sind. Deshalb ist es möglich, die Flexibilität des Netzwerks während der Adsorption und Desorption von Sondenmolekülen zu untersuchen.