

# Applications of multifrequency pulse EPR to transition metal containing systems of relevance to inorganic and bioinorganic chemistry

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Finazzo, Cinzia

**Publication date:**

2005

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004924780>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No.15883

**Applications of multifrequency pulse EPR to transition  
metal containing systems of relevance to inorganic and  
bioinorganic chemistry**

**Dissertation**

Submitted to the

**Swiss Federal Institute of Technology  
Zürich**

For the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by  
Cinzia Finazzo

Laurea in Chimica (University of Palermo)

Born November 10, 1974

Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. A. Schweiger, examiner  
Prof. Dr. B. Jaun, co-examiner  
Prof. Dr. S. Van Doorslaer, co-examiner

Zurich 2005

## *Summary*

In this thesis continuous wave (cw) and pulse electron paramagnetic resonance (EPR) techniques at different microwave frequencies are applied to transition metal containing systems of biological and catalytical relevance.

The first part starts with the characterization of two forms of methyl-coenzyme M reductase (MCR) from the *Methanobacterium marburgensis*, namely MCR<sub>red2</sub>, and MCR<sub>ox1</sub>. MCR catalyses the final reaction of the energy-conserving pathway of the methanogenic archaea in which methyl-coenzyme M (CH<sub>3</sub>-S-CoM) and coenzyme B (HS-CoB) are converted to methane and CoM-S-S-CoB. MCR operates under strictly anaerobic conditions. It is composed of three different subunits in a  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  arrangement and contains the nickel porphinoide F<sub>430</sub>, which is the prosthetic group of MCR. This study is aimed at determining the molecular (both geometric and electronic) structure and ultimately how those two forms are related to proposed catalytic mechanisms. For this purpose the active site (co-factor F<sub>430</sub>) of MCR needs to be characterized. Hence, *g* values and hyperfine and nuclear quadrupole couplings were measured. To help in the assignment of the various signals and to determine conclusively if the substrate analog coenzyme M (HS-CoM) is directly bound to the nickel porphinoide F<sub>430</sub>, selective isotopic labelings of HS-CoM are used. These data enabled the determination of the spin density, the SOMO character and the ligand

environments around the metal center in these two different forms of the enzyme. This information is of importance to understand the properties and the role of the complexes.

MCR<sub>red2</sub> exhibits two very different hyperfine couplings of the F<sub>430</sub> 'corphin' nitrogens. This finding is ascribed to a distortion of the F<sub>430</sub> macrocycle. The use of the labeled substrate analog (H<sup>33</sup>S-CoM), allows us to detect the interaction of Ni (I) F<sub>430</sub> with the thiol group of HS-CoM. The principal values of the hyperfine matrix were measured which enabled the spin density on the sulfur to be estimated to 7-17%. Information on the geometric location of HS-CoM was obtained by determining the hyperfine couplings of the β-methylene protons of HS-CoM. This is aided by deuteration of these two β-protons. By simulating the experimental spectra the isotropic and the dipolar part of the deuterium hyperfine matrix could be extracted. From the dipolar part the Ni-H distances (H-β<sub>1</sub>: 0.27 nm, H-β<sub>2</sub>: 0.37 nm) for the two β-protons are calculated. Furthermore, by growing MCR<sub>red2</sub> in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, an exchangeable proton with a very large anisotropy was identified. It is tentatively assigned to a sulphhydryl proton of HS-CoM. Values for the <sup>61</sup>Ni hyperfine interaction are also given.

For MCR<sub>ox1</sub> the same approach as for MCR<sub>red2</sub> was used, which brings us to a different and interesting outcome. Coordination of the Ni-F<sub>430</sub> with the thiol group of the HS-CoM is proved by using H<sup>33</sup>S-CoM. From the isotropic and the dipolar part of the hyperfine matrix of <sup>33</sup>S the spin density was calculated to be 5.7 %. In contrast to MCR<sub>red2</sub>, the spin density is smaller and the sulphur p-orbital carrying the spin density was found to be oriented parallel to the F<sub>430</sub> macrocycle. This implies a contribution from a d<sub>yz</sub> or d<sub>xz</sub> nickel orbital. The hyperfine matrix and the quadrupole tensor of the 'corphin' nitrogens were determined. Four different types of nitrogens could be identified. MCR<sub>ox1</sub> grown in <sup>61</sup>Ni medium allowed us to determine the principal values of the hyperfine matrix and the quadrupole tensor. The largest coupling was observed perpendicular to the F<sub>430</sub> macrocycle. This interaction was larger than the one found in MCR<sub>red2</sub> implying more spin density on the Ni and less on the ligands. Using <sup>2</sup>H-labeled HS-CoM enabled us to determine the hyperfine couplings of the β-protons. From the

dipolar part the Ni-H distances (H- $\beta_1$ : 0.28 nm, H- $\beta_2$ : 0.38 nm) for the two  $\beta$ -protons were calculated. All these data point towards a ground state with predominantly  $d_{x^2-y^2}$  character and a small admixture of the  $d_{yz}$  orbital. The currently discussed hypothesis is that the ground state of  $MCR_{ox1}$  is either a Ni(III)-thiolate or a high-spin Ni(II) coupled to a thyl radical. Our results clearly show that there is only a small percentage of spin density on the thiol sulphur of HS-CoM, the majority is on the Ni ion. From an EPR point of view our data thus support the Ni(III)-thiolate formulation.

This study is novel in that it compares the geometry of enzyme–substrate interactions in the active sites of  $MCR_{red2}$  and  $MCR_{ox1}$ .  $MCR_{ox1}$  may have mechanistic relevance as a  $MCR_{red1}$  precursor since an ox1-like intermediate (a Ni(II)-thiolate) was proposed in one of the anticipated catalytic cycles of MCR.  $MCR_{red2}$  is a good model to mimic conformational changes that presumably could also occur in the catalytic cycle. Indeed, the addition of coenzyme B (HS-CoB), needed to convert  $MCR_{red1c}$  to  $MCR_{red2}$ , induces a conformational change which allows the thiol group of HS-CoM to bind to Ni(I). A similar behavior may occur in the catalytic cycle when HS-CoB binds, which could allow  $CH_3$ -CoM to interact with Ni(I)F<sub>430</sub>. In this respect the origin of the exchangeable proton observed in  $MCR_{red2}$  is important. Perhaps it belongs to one of the tyrosines, Tyr <sup>$\alpha$ 333</sup> or Tyr <sup>$\beta$ 367</sup>. This may give a hint towards their function since the tyrosines are positioned in a way that can be expected to stabilize the negative sulfur of coenzyme M once the methyl radical has been released.

The second part deals with the characterization of metal-containing organic pigments namely copper(II) and cobalt(II) phthalocyanine (CuPc and CoPc, respectively). The influence of the substituents in the Pc's macrocycle and of the matrix on the electronic structure of these metal complexes is analyzed in order to get a better understanding of their chemical functionality. The hyperfine and the nuclear quadrupole couplings of the isoindole nitrogens are determined as well as the hyperfine couplings of the protons and the fluorines of the macrocycle. This is achieved by deuteration of the solvents. The spin density distribution, which influences the catalytic activity, has been determined. Furthermore, density

functional theory (DFT) computations were used to calculate the EPR parameters, which are in agreement with the experimental ones.

The paramagnetic defects in semiconductors or insulators are monitored for novel quasi-one-dimensional platinum compounds based on the structure of Magnus' green salt. Such defect or impurity centers may significantly influence the electrical and optical properties of these materials. The difference in conductivity between  $[\text{Pt}(\text{phen})_2][\text{Pt}(\text{dmit})_2]$  (phen, or  $L^1$  = phenanthroline and dmit or  $L^2$  = dimercaptoisotrithione) and  $[\text{Pt}(\text{mebipy})_2][\text{Pt}(\text{dmit})_2]$ , (mebipy or  $L^1$  = 4,4-dimethyl-2,2'-dipyridyl, and mnt or  $L^2$  = maleodinitriledithiolate) might be governed by the different amounts of paramagnetic impurities. A combination of EPR with other spectroscopic techniques show the presence of a dimer ( $[\text{Pt}(L^1)_2][\text{Pt}(L^2)_2]$ ), with the majority of the spin density on the ligand and not on the central platinum ion. Furthermore comparison of the conductivity and the spin concentrations for the different samples shows that the  $[\text{Pt}L^1]_2[\text{Pt}(\text{dmit})_2]$  materials are semiconductors, whereas the  $[\text{Pt}L^1]_2[\text{Pt}(\text{mnt})_2]$  compounds are insulators.

## *Zusammenfassung*

Gegenstand dieser Dissertation sind die "continuous wave" und die gepulste paramagnetische Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (EPR) bei verschiedenen Mikrowellen frequenzen von Systemen, die Übergangsmetalle enthalten und die in der Biologie und der Katalyse von Bedeutung sind.

Im ersten Teil werden zwei unterschiedliche Formen von Methyl-Coenzym M Reduktase (MCR) aus *Methanobacterium marburgensis*, charakterisiert, nämlich  $MCR_{red2}$  und  $MCR_{ox1}$ . MCR katalysiert die letzte Reaktion im energieerhaltenden Pfad von methanogenen *archaea*, wobei Methyl-Coenzym M ( $CH_3-S-CoM$ ) und Coenzym B ( $HS-CoB$ ) zu Methan und  $CoM-S-S-CoB$  umgewandelt werden. MCR wirkt unter streng anaeroben Bedingungen und besteht aus drei verschiedenen Untergruppen in einer  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  Anordnung. Es enthält das Nickel-Porphinoid  $F_{430}$ , welches die prosthetische Gruppe von MCR bildet. In der vorliegenden Arbeit werden die geometrische und elektronische Struktur untersucht, mit dem Ziel, diese zwei Formen mit vorgeschlagenen katalytischen Prozessen in Zusammenhang zu bringen. Um dies zu erreichen, muss die aktive Gruppe von MCR (Cofaktor  $F_{430}$ ) charakterisiert werden. Es wurden  $g$ -Werte, Hyperfein- und Kernquadrupol-Kopplungen gemessen. Selektive Isotopenmarkierung des substrat-analogen Coenzym M ( $HS-CoM$ ) wurden eingesetzt, um die verschiedenen Signale zuzuordnen und um

festzustellen, ob HS-CoM direkt an das Nickel-Porphinoid F<sub>430</sub> gebunden ist. Mit diesen Daten wurden die Spindichte, die SOMO Eigenschaften und die Liganden in der Umgebung des Metallzentrums in den zwei unterschiedlichen Formen des Enzyms bestimmt. Es handelt sich dabei um wichtige Informationen, um die Eigenschaften und die Rolle der Komplexe zu verstehen.

In MCR<sub>red2</sub> weisen die „corphin“ Stickstoffe von F<sub>430</sub> zwei sehr unterschiedliche Hyperfein-Kopplungen auf. Dies wird einer Verzerrung im F<sub>430</sub> Makrozyklus zugeschrieben. Der Einsatz des isotonenmarkierten Substratanalogen H<sup>33</sup>S-CoM erlaubt es, die Wechselwirkung von Ni(D)F<sub>430</sub> mit der Thiolgruppe von HS-CoM zu messen. Durch die Bestimmung der Hauptwerte der Hyperfein-Matrix konnte die Spindichte auf dem Schwefel auf 7-17% geschätzt werden. Durch die Messung der Hyperfein-Kopplung der  $\beta$ -Methylen Protonen von HS-CoM wurden Informationen zur geometrischen Lage von HS-CoM gewonnen. Dies wurde durch eine Deuterierung der zwei besagten  $\beta$ -Protonen möglich gemacht. Die Hyperfein-Matrix des Deuteriums konnte aus einer Simulation der experimentellen Spektren extrahiert werden. Aus dem dipolaren Teil wurden die Ni-H Abstände der zwei  $\beta$ -Protonen berechnet (H- $\beta_1$ : 0.27 nm, H- $\beta_2$ : 0.37 nm). Zudem hat eine Züchtung von MCR<sub>red2</sub> in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O eingegeben, dass ein austauschbares Proton mit einer sehr grossen Hyperfein-Anisotropie vorhanden sein muss. Dieses Proton wurde versuchsweise einem Sulphydryl-Proton von HS-CoM zugeordnet. Es werden auch Werte für die Hyperfein-Wechselwirkung mit <sup>61</sup>Ni angegeben.

Für MCR<sub>ox1</sub> wurde die gleiche Vorgehensweise wie für MCR<sub>red2</sub> angewendet, die zu anderen, sehr interessanten Resultaten geführt hat. Mittels H<sup>33</sup>S-CoM konnte eine Koordination von Ni-F<sub>430</sub> mit der Thiolgruppe des HS-CoM nachgewiesen werden. Die Spindichte konnte aus dem isotropen und dem dipolaren Teil der Hyperfein-Matrix des <sup>33</sup>S zu 5.7% bestimmt werden. Die Spindichte ist im Vergleich zu MCR<sub>red2</sub> geringer und das p-Orbital des Schwefels, welches die Spindichte trägt, liegt parallel zum F<sub>430</sub> Makrozyklus. Diese Tatsache bedingt einen Beitrag von einem d<sub>yz</sub> oder d<sub>xz</sub> Orbital des Nickels. Die Hyperfein-Matrix und die Kernquadrupol-Tensoren der „corphin“ Stickstoffe wurden



bestimmt. Das in einem  $^{61}\text{Ni}$  Medium gezüchtete  $\text{MCR}_{\text{ox1}}$  erlaubte es, die Hauptwerte der Hyperfein-Matrix und des Kernquadrupol-Tensors von  $^{61}\text{Ni}$  zu bestimmen. Die grösste Kopplung wurde senkrecht zum  $F_{430}$  Makrozyklus beobachtet. Diese Wechselwirkung war stärker als in  $\text{MCR}_{\text{red2}}$ , was auf eine höhere Spindichte am Nickel und eine geringere an den Liganden hinweist. Durch Einsatz von  $^2\text{H}$ -markiertem HS-CoM konnten die Hyperfein-Kopplungen der  $\beta$ -Protonen bestimmt werden. Aus dem dipolaren Teil wurden die Ni-H Abstände der zwei  $\beta$ -Protonen berechnet ( $\text{H-}\beta_1$ : 0.28 nm,  $\text{H-}\beta_2$ : 0.38 nm). Diese Daten weisen auf einen Grundzustand mit vorwiegend  $d_{x^2-y^2}$  Charakter hin, mit einem geringen Anteil des  $d_{yz}$  Orbitals. Gegenwärtig wird angenommen, dass der Grundzustand von  $\text{MCR}_{\text{ox1}}$  entweder ein Ni(III)-thiolat oder ein an ein Thiol-Radikal gekoppeltes high-spin Ni(II) ist. Unsere Resultate beweisen, dass sich nur ein geringer Anteil an Spindichte auf dem Thiol-Schwefel von HS-CoM befindet, und der grösste Teil auf dem Ni Ion lokalisiert ist. Die EPR Daten weisen also auf einen Ni(III)-thiolat Grundzustand hin.

Die vorliegende Studie ist insofern neu, als dass die Geometrien der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen in den aktiven Zentren von  $\text{MCR}_{\text{red2}}$  und  $\text{MCR}_{\text{ox1}}$  verglichen werden.  $\text{MCR}_{\text{ox1}}$  könnte eine mechanistische Relevanz als Vorläufer von  $\text{MCR}_{\text{red1}}$  haben, da ein ox1-ähnlicher Zwischenzustand (ein Ni(II)-thiolat) in einem der vorhergesagten katalytischen Kreisläufe von MCR vorgeschlagen wurde.  $\text{MCR}_{\text{red2}}$  ist ein gutes Modell, um Veränderung in der Konformation, die vermutlich auch im katalytischen Kreislauf von MCR vorkommen, zu simulieren. Die Zugabe von Coenzym B (HS-CoB), das benötigt wird um  $\text{MCR}_{\text{red1c}}$  zu  $\text{MCR}_{\text{red2}}$  zu konvertieren, führt zu einem Wechsel der Konformation, womit die Thiolgruppe von HS-CoM an Ni(I) binden könnte. Ein ähnliches Verhalten kann im katalytischen Kreislauf auch vorkommen wenn HS-CoB bindet, was eine Wechselwirkung zwischen  $\text{CH}_3\text{-CoM}$  und Ni(I) $F_{430}$  erlauben würde. Unter diesem Aspekt ist die Herkunft des austauschbaren Protons, das in  $\text{MCR}_{\text{red2}}$  beobachtet wurde, wichtig. Es könnte zu den Tyrosinen Tyr $^{\alpha 333}$  oder Tyr $^{\beta 367}$  gehören. Dies gibt einen Hinweis auf ihre mögliche Funktion, da diese so angeordnet sind, dass eine Stabilisierung des negativen Schwefels von Coenzym M nach Freisetzung eines Methyl Radikals, möglich wäre.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Charakterisierung von metallhaltigen organischen Pigmenten, nämlich Kupfer(II) und Kobalt(II) Phthalocyanin (CuPc und CoPc). Der Einfluss des Substituenten im Pc-Makrozyklus und der Matrix auf die elektronische Struktur dieser Metallkomplexe wurde analysiert, um tiefere Einsicht in ihre chemische Funktionalität zu erhalten. Die Hyperfein- und die Kernquadrupol-Kopplungen der isoindol-Stickstoffe wurden bestimmt, sowie die Hyperfein-Kopplung der Protonen und der Fluor kernen des Makrozyklus. Das wird durch die Deuterierung der Lösungsmittel erreicht. Die Verteilung der Spindichte, die die katalytische Aktivität beeinflusst, wurde untersucht. Ausserdem wurde die Dichtefunktionaltheorie (DFT) verwendet, um die EPR Parameter zu berechnen, die im Einklang mit den experimentellen Werten sind.

Für neue auf der Struktur der Magnussalze basierende quasi-eindimensionale Platin-Verbunde wurden die paramagnetischen Defekte in Halbleitern und Isolatoren bestimmt. Solche Defekte können die elektrischen und optischen Eigenschaften dieser Materialien entscheidend beeinflussen. Der Unterschied zwischen  $[\text{Pt}(\text{phen})_2][\text{Pt}(\text{dmit})_2]$  (phen, oder  $L^1 = \text{Phenantrolin}$ , und dmit oder  $L^2 = \text{Dimercaptoisotrithion}$ ) und  $[\text{Pt}(\text{mebipy})_2][\text{Pt}(\text{dmit})_2]$  (mebipy oder  $L^1 = 4,4\text{-dimethyl-}2,2'\text{-dipyridyl}$ , und mnt oder  $L^2 = \text{maleodinitrildithiolat}$ ) könnte durch verschiedene Mengen an paramagnetischen Verunreinigungen bewirkt werden. Die Kombination von EPR mit anderen spektroskopischen Methoden zeigt die Anwesenheit des Dimers ( $[\text{Pt}(L^1)_2][\text{Pt}(L^2)_2]$ ), bei dem der grösste Teil der Spindichte auf dem Liganden und nicht am zentralen Pt-Ion vorliegt. Ausserdem zeigt ein Vergleich der Leitfähigkeit und der Spin-Konzentrationen an unterschiedlichen Proben, dass die  $[\text{Pt}(L^1)_2][\text{Pt}(\text{dmit})_2]$  Materialien Halbleiter und die  $[\text{Pt}(L^1)_2][\text{Pt}(\text{mnt})_2]$  Verbindungen Isolatoren sind.