

Quantification of Modulation Depth and Ghost Distance Removal in Dipolar EPR on Multiple-Spin Systems

Doctoral Thesis

Author(s):

Hagens, Tona von

Publication date:

2014

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010252707>

Rights / license:

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

Diss. ETH No. 22168

Quantification of Modulation Depth and Ghost Distance Removal in Dipolar EPR on Multiple-Spin Systems

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
TONA VON HAGENS
MSc Interdisciplinary Sciences, ETH Zurich
born on 27.07.1985
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Gunnar Jeschke, examiner
Prof. Dr. Matthias Ernst, co-examiner

2014

Abstract

Distance measurements by pulse electron paramagnetic resonance (EPR) techniques, especially the double electron-electron resonance (DEER) experiment, are an established procedure that is extensively used with nitroxide spin pairs for structure determination studies and the observation of structural changes of bio-macromolecules. Recently, it was increasingly applied to multiple-spin systems. In the DEER experiment, more than two dipolar coupled spins manifest in an increased total modulation depth and in sum and difference dipolar frequency contributions that give rise to additional peaks appearing in the distance distribution, which do not correspond to the real interspin distances of the system and are hence referred to as ghost contributions. These ghost contributions may be so prominent that they might be mistaken for real distance peaks or that real distance peaks shift their position or disappear.

While the position of ghost distances is determined by the interspin distance geometry, their prominence and extent in the DEER form factor is determined by the inversion efficiency. A precise evaluation of the inversion efficiency in order to estimate the magnitude of ghost contributions is therefore a prerequisite for a precise and accurate analysis of multi-spin distance distributions.

Closely connected to the precise determination of inversion efficiency is the precise determination of total modulation depth. The total modulation depth increases with increasing spin multiplicity N . The form and dimension of the background decay crucially determines the numerical value of total modulation depth. Exact determination of the background decay is furthermore needed for the separation of inter- and intramolecular contributions. The exact form of the background decay depends on interpulse delay time and concentration and size of paramagnetic centers. For a given sample, spectrometer and probehead, the background decay is very well reproducible. Fitting the background dimensionality during data analysis is a simple way of fitting most effects that influence the background decay and gives reasonable and reproducible values of modulation depth.

The inversion efficiency can reliably be back-calculated from the total modulation depth Δ when the spin multiplicity N is known. The linear dependency between the experimental inversion efficiency λ_{exper} of the echo-detected nutation experiment and the inversion

efficiency λ of the DEER experiment enables an alternative access to inversion efficiency for a series of measurements at variable attenuation. Both approaches are consistent with each other, but I have observed a systematic trend of lower apparent inversion efficiencies with increasing N .

In principle, the linear dependency between total modulation depth and inversion efficiency can furthermore be exploited for a calibration-free spin counting approach when a series of DEER and echo-detected nutation experiments is conducted. The fit of Δ versus λ_{exper} was expected to provide the correct spin multiplicity. This approach is however very sensitive towards noise and experimental imperfections and has therefore only limited reliability. Spin counting with calibration by a completely labeled biradical, assuming that the total modulation depth of a biradical equals the inversion efficiency, is in most cases more reliable and thus the method of choice.

This thesis presents a simple approximate procedure to suppress ghost distances to a great extent by manipulating the experimentally obtained form factor during data analysis by a simple power scaling with a scaling exponent $\zeta_N = 1/(N - 1)$, with N being the number of coupled spins in the system. This approach requires neither further experimental effort nor exact knowledge about labelling and inversion efficiency. This should enable routine application to biological systems.

The approach is validated on simulated test cases for up to five spins and applied to synthetic model samples. The limit of inversion efficiency was determined up to which suppression of ghost contributions by power scaling is efficient. This limit decreases with increasing number N of coupled spins. The suppression of ghost distances with the presented approach works best for symmetric geometries and rigid molecules which, at the same time, are the cases where ghost contributions are most disturbing. The distance distributions obtained by power scaling are consistent with distributions that were obtained with previously obtained alternative approaches and agree, in some cases, strikingly well with the expectations for the true interspin distance distributions.

Zusammenfassung

Abstandsmessungen mit Hilfe der Puls-Elektronenparamagnetresonanzspektroskopie (EPR)-Technik, insbesondere dem Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz (DEER)-Experiment, sind eine etablierte Prozedur, die mit Nitroxid-Spinpaaren rege Verwendung findet für Strukturbestimmungsstudien und die Beobachtung struktureller Veränderungen von Bio-Makromolekülen. Die Methode wird zunehmend auf Multispin-Systeme angewandt. Beim DEER-Experiment führen mehr als zwei dipolar gekoppelte Spins zu einer erhöhten totalen Modulationstiefe und zu Summen und Differenzen der dipolaren Frequenzbeiträge, die wiederum zusätzliche Peaks in der Abstandsverteilung erzeugen, denen keine realen Interspinabstände entsprechen, und die deshalb als Geisterabstände bezeichnet werden. Diese Peaks bei Geisterabständen können so ausgeprägt sein, dass sie fälschlicherweise für reale Abstandspeaks gehalten werden oder dass sich die Position realer Abstandspeaks verschiebt oder dass reale Abstandspeaks verschwinden.

Während die Position von Geisterabständen von der Interspinabstandsgeometrie bestimmt wird, ist ihr Hervortreten und ihre Grösse im DEER-Formfaktor abhängig von der Inversionseffizienz. Eine präzise Evaluation der Inversionseffizienz, um das Ausmass der Geisterbeiträge zu bestimmen, ist deshalb eine Voraussetzung für eine präzise und akkurate Analyse von Multispin-Abstandsverteilungen.

Eng verbunden mit der präzisen Bestimmung der Inversionseffizienz ist die präzise Bestimmung der totalen Modulationstiefe. Die totale Modulationstiefe Δ steigt mit steigender Spinmultiplizität N . Die Form und Dimension des Hintergrundzerfalls bestimmt entscheidend den numerischen Wert der totalen Modulationstiefe. Eine exakte Bestimmung des Hintergrundzerfalls wird darüber hinaus für die Separation von inter- und intramolekularen Beiträgen gebraucht. Die exakte Form des Hintergrundzerfalls hängt vom Pulsabstand und der Konzentration und Grösse der paramagnetischen Zentren ab. Sind Probe, Spektrometer und Probenkopf gegeben, so ist der Hintergrundzerfall sehr gut reproduzierbar. Das Anpassen der Hintergrunddimensionalität während der Datenanalyse ist ein einfacher Weg, um die meisten Effekte, die den Hintergrundzerfall beeinflussen, zu berücksichtigen und liefert realistische und reproduzierbare Werte der Modulationstiefe.

Ausgehend von der totalen Modulationstiefe kann die Inversionseffizienz zuverlässig zurück-

gerechnet werden, wenn die Spinmultiplizität N bekannt ist. Die lineare Abhängigkeit zwischen experimenteller Inversionseffizienz λ_{exper} des echo-detektierten Nutationsexperimentes und der Inversionseffizienz λ des DEER-Experimentes ermöglicht einen alternativen Zugang zur Inversionseffizienz für eine Messreihe bei variabler Abschwächung. Beide Herangehensweisen sind miteinander konsistent, doch habe ich einen systematischen Trend niedrigerer scheinbarer Inversionseffizienzen mit steigendem N beobachtet.

Darüber hinaus kann die lineare Abhängigkeit zwischen totaler Modulationstiefe und Inversionseffizienz prinzipiell für einen kalibrationsfreien Spinzählungszugang ausgenutzt werden, wenn eine Messreihe von DEER- und echo-detektierten Nutationsexperimenten durchgeführt wird. Eine Analyse der Abhängigkeit zwischen Δ und λ_{exper} sollte eine Bestimmung der korrekten Spinmultiplizität erlauben. Diese Herangehensweise ist allerdings sehr empfindlich gegenüber Rauschen und experimentellen Unvollkommenheiten und hat folglich nur eine limitierte Verlässlichkeit. Spinzählung mit Kalibration eines vollkommen markierten Biradikals unter der Annahme, dass die totale Modulationstiefe eines Biradikals gleich der Inversionseffizienz ist, ist in den meisten Fällen verlässlicher und darum die Methode der Wahl.

Diese Doktorarbeit stellt eine einfache Näherungsmethode vor, um Geisterabstände in hohem Masse zu unterdrücken, indem der experimentell erhaltene Formfaktor während der Datenanalyse durch ein einfaches Hochskalieren mit einem Skalierungsexponenten $\zeta_N = 1/(N - 1)$ manipuliert wird, wobei N die Anzahl gekoppelter Spins des Systems ist. Diese Herangehensweise erfordert weder zusätzliche experimentelle Anstrengungen, noch exaktes Wissen über Markierungs- und Inversionseffizienz. Dies sollte Routineanwendungen für biologische Systeme ermöglichen.

Die Herangehensweise ist an simulierten Testfällen mit bis zu fünf Spins validiert und auf synthetische Modelproben angewendet worden. Bestimmt wurde die Höchstgrenze der Inversionseffizienz, bis zu der eine Unterdrückung von Geisterbeiträgen mit Hochskalieren effizient ist. Diese Höchstgrenze nimmt mit steigender Anzahl N gekoppelter Spins ab. Die Unterdrückung von Geisterabständen mit der vorgestellten Herangehensweise funktioniert am besten für symmetrische Geometrien und starre Moleküle, die zugleich die Fälle sind, bei denen Geisterbeiträge am störendsten sind. Die mit Hochskalieren erhaltenen Abstandsverteilungen sind konsistent mit Verteilungen, die mit vorherigen alternativen Herangehensweisen erhalten worden sind und stimmen in manchen Fällen auffallend gut mit den Erwartungen für die wahren Interspinabstandsverteilungen überein.