

Technische Universität München
Physik-Department E17

**Struktur und Dynamik
natürlicher, mutierter und entfalteter Eisen-Schwefel-Proteine (HiPIPs)
untersucht mit fünf spektroskopischen Methoden**

Andreas W. E. Dilg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. L. van Hemmen

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak
2. Univ.-Prof. Dr. G. M. Kalvius
3. Univ.-Prof. Dr. W. Petry (schriftliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 26. Oktober 2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 12. Februar 2001 angenommen.

Meinen lieben Eltern.

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
1. Einführung	3
1.1 Bakterielle Photosynthese.....	3
1.2 Proteine.....	5
1.3 Eisen-Schwefel-Proteine	6
1.4 High-Potential Iron Proteins (HiPIPs).....	8
2. Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/3+}$-Zentrum in HiPIPs	12
2.1 Atomare Struktur des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters in HiPIPs	12
2.2 Magnetische Austauschwechselwirkung in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentren.....	14
2.3 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentren in oxidierten HiPIPs	16
2.3.1 Quantenmechanische Spinkopplungsmodelle	16
2.3.1.1 Reine Wellenfunktion (C_{2v} -Symmetrie).....	17
2.3.1.2 Gemischte Wellenfunktion (gestörte C_{3v} -Symmetrie).....	18
2.3.2 Das Vektormodell	19
2.3.3 Elektronische Isomere in oxidierten HiPIPs	21
2.4 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentren in reduzierten HiPIPs.....	22
3. Grundlagen der Messmethoden	23
3.1 Paramagnetische Elektronenrelaxation.....	23
3.1.1 Allgemeines	23
3.1.2 Spin-Gitter-Relaxationszeit	23
3.1.3 Spin-Spin-Relaxationszeit	26
3.2 Mößbauer-Spektroskopie.....	26
3.2.1 Der Mößbauer-Effekt.....	26
3.2.2 Der Lamb-Mößbauer-Faktor.....	27
3.2.3 Hyperfeinwechselwirkungen	30
3.2.4 Auswertung von Mößbauer-Spektren	34
3.2.4.1 Transmissionsintegral und dünne Absorbernäherung	34
3.2.4.2 Linienformkorrekturen	35
3.2.4.3 Temperaturabhängigkeit des mittleren Auslenkungsquadrates.....	36

3.2.4.4 Hyperfein-Hamiltonian.....	37
3.3 Continuous Wave Electron Paramagnetic Resonance (Cw-EPR)	39
3.3.1 Prinzip der Cw-EPR	40
3.3.2 Auswertung von EPR-Spektren	41
3.4 Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy (ENDOR)	43
3.5 Gepulste EPR.....	45
3.5.1 Allgemeines	45
3.5.2 Pulsfolgen zur Bestimmung von Relaxationszeiten	46
3.5.2.1 Spin-Echo-Sequenz.....	46
3.5.2.2 Inversion-Recovery-Sequenz.....	48
3.5.2.3 Saturation-Recovery-Sequenz	49
3.6 EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure)	50
4. Probenpräparation und Experimentiertechnik.....	52
4.1 Probenpräparation.....	52
4.1.1 Isolierung und Reinigung von HiPIP-Proben	52
4.1.2 Herstellung vollständig reduzierter HiPIP-Proben	60
4.1.3 Herstellung vollständig oxidiertes HiPIP-Proben	60
4.1.4 Herstellung von reduzierten teilweise entfalteteten HiPIP <i>C. vinosum</i> WT-Proben	61
4.1.5 Probenhalter	62
4.2 Mößbauer-Experimente	63
4.3 EPR- und ENDOR-Experimente	66
4.3.1 Cw-EPR-Messungen.....	66
4.3.2 ENDOR-Messungen	68
4.3.3 Gepulste EPR-Messungen	69
4.4 EXAFS-Messplatz.....	69
5. Experimente an nativen, mutierten und teilweise entfalteteten oxidierten und reduzierten HiPIPs mit fünf Spektroskopien	71
5.1 Cw-EPR an oxidierten HiPIPs.....	71
5.2 Gepulste EPR an oxidierten HiPIPs	74
5.3 ⁵⁷ Fe-ENDOR an oxidierten HiPIPs	78
5.4 Mößbauer-Spektroskopie an HiPIPs	83
5.4.1 Strukturuntersuchungen	83
5.4.1.1 Oxidiertes HiPIP I <i>E. halophila</i> bei 5 K.....	83

5.4.1.2 Oxidiertes HiPIP <i>C. vinosum</i> WT bei 5 K.....	87
5.4.1.3 Oxidiertes HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S bei 5 K.....	89
5.4.1.4 Oxidierte HiPIPs bei höheren Temperaturen.....	92
5.4.1.5 Reduzierte HiPIPs.....	95
5.4.1.6 Teilweise entfaltetes reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> WT.....	96
5.4.2 Temperaturabhängige Messreihen.....	98
5.4.2.1 Dynamikmessungen.....	98
5.4.2.2 Relaxationsuntersuchungen.....	101
5.5 Fe-EXAFS.....	104
6. Struktur und Dynamik von nativen, mutierten und teilweise entfalteteten oxidierten und reduzierten HiPIPs.....	108
6.1 Atomstruktur von nativem und C77S-mutiertem reduziertem HiPIP <i>C. vinosum</i>	108
6.2 Elektronische und magnetische Konfiguration nativer und C77S-mutierter HiPIPs ..	109
6.2.1 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}\text{Cys}_4$ -Cluster in nativen oxidierten HiPIPs.....	109
6.2.1.1 Interpretation der Tieftemperatur-Mößbauer-Parameter.....	109
6.2.1.2 Analyse des Spinzustandes $ \text{S}_{12} \text{S}_{34} \text{S}\rangle$ im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}\text{Cys}_4$ -Zentrum.....	111
6.2.2 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}\text{Cys}_4$ -Cluster in nativen reduzierten HiPIPs.....	114
6.2.3 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}\text{Cys}_3\text{Ser}$ -Cluster in C77S-mutiertem reduziertem HiPIP <i>C. vinosum</i>	116
6.2.4 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}\text{Cys}_3\text{Ser}$ -Cluster in C77S-mutiertem oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i>	117
6.3 Berechnung reeller Ladungszahlen aus Isomerieverschiebungen.....	120
6.3.1 HiPIP-Modell.....	120
6.3.2 Eisen-Schwefel-Protein-Modell.....	122
6.4 Elektronische Isomere von oxidierten HiPIPs.....	123
6.5 Paramagnetische Elektronenrelaxation in oxidierten HiPIPs.....	126
6.5.1 Relaxationsmechanismen bei tiefen Temperaturen.....	126
6.5.2 Relaxationsmechanismen bei hohen Temperaturen.....	127
6.5.3 Interpretation der Orbach-Relaxation: Übergänge zwischen Isomeren.....	128
6.6 Dynamik von HiPIPs.....	130
6.7 Charakterisierung teilweise entfalteter HiPIPs.....	134
Anhänge.....	138
Anhang A: Mößbauer-Parameter von sieben HiPIPs.....	138
Anhang B: Mößbauer-Spektren von sieben HiPIPs.....	142

Quellenverzeichnis 146

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen 156

Verzeichnis der Formelzeichen 159

Danksagung

Abstract

Structure and dynamics of the $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{n+}$ -centre in the High-Potential Iron-Proteins (HiPIPs) from *E. halophila* and *C. vinosum* is characterized by Mößbauer Spectroscopy, Cw-EPR, pulsed EPR, ^{57}Fe -ENDOR and Fe-EXAFS. The proteins are investigated in the oxidized ($n = 3$) and in the reduced ($n = 2$), in the native and in the C77S-mutated, in the folded and in the *molten globule* state, respectively.

The atomic distances within the cubane-like iron-sulphur cluster of reduced HiPIP *C. vinosum* are determined in the native and in the C77S-mutated state by Fe-EXAFS experiments. The intact prosthetic group shows up an almost unchanged structure compared to the wild type protein. While the fourfold ligation to the protein backbone is maintained, the binding distance between the iron ion and amino acid 77 decreases considerably due to the mutation.

Information about the electronic structure of the iron-sulphur centre is obtained from a combination of Mößbauer-, EPR- and ENDOR-studies. The paramagnetic Mößbauer spectrum of native oxidized HiPIPs consists of two iron pairs with antiparallel oriented spins S_{12} and S_{34} in the oxidation states $3+$ and $2.5+$, respectively. The paired spins couple nearly antiparallel to a net cluster spin $S = 1/2$, as indicated by the EPR signal around $g = 2$. A consistent interpretation of Mößbauer Spectroscopy, ENDOR and pulsed EPR requires the consideration of electronic relaxation and of a rotation of the EFG coordinate system with respect to the one of the \mathbf{g} -, \mathbf{A} -tensors. An analysis of measured \mathbf{A} -tensors yields for the ground state of the spin system $|S_{12} S_{34} S\rangle$ either a pure $|3 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ -wave function or a quantum mechanical mixture of $|4 \ 9/2 \ 1/2\rangle$ - and $|4 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ -components. Native reduced HiPIP is EPR-silent ($S = 0$) and consists of two completely antiparallel coupled iron pairs in an $\text{Fe}^{2.5+}$ -oxidation state. The symmetry within the $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -cluster is broken by a C77S-mutation, therefore serine- and cysteine-ligated iron is distinguishable in the Mößbauer spectrum. The diamagnetic behaviour of the reduced cluster is maintained under the exchange of amino acid 77, and the charge cloud of the metal centre is shifted towards the oxygen ion of the serine. A fit of the Mößbauer spectrum of the oxidized mutant requires to distinguish between two electronic isomers, one with a trivalent iron ion and the other one with a mixed-valent iron ion ligated to the serine. The Mößbauer experiment and complementary EPR- and NMR-results strongly favour an approximately equal population of the two isomers. However, it cannot be ruled out completely that all of the molecules occur in an Fe^{3+} -O-isomer. Electronic charge is accumulated around the serine-ligated iron on the cost of the other metal ions. This is indicated by the isomer shift and by two theoretical models which are in accordance with each other. These models allow to calculate realistic charge numbers of the iron ions in iron-sulphur proteins from experimentally obtained isomer shifts.

The occurrence of oxidized HiPIPs in different electronic isomers as obtained experimentally is discussed. The temperature dependence of the population of the isomeric states does not obey a Boltzmann-law as a consequence of entropic effects. A quantification of changes in the population due to a variation of the temperature and due to a C77S-mutation, respectively, are derived from spectroscopic studies.

The paramagnetic electron relaxation performed by the net cluster spin in oxidized HiPIPs is observed by pulsed EPR and Mößbauer Spectroscopy, and contributions from different

relaxation mechanisms are estimated. Spin-spin relaxation turns out to be the dominant mechanism at low temperatures. At higher temperatures, spin-lattice relaxation becomes dominant, whereby direct one-phonon processes in the limit of a phonon-bottleneck set in first, followed by Orbach-relaxation. A phenomenological analysis shows that Orbach-processes are equivalent with transitions of protein molecules between different electronic isomers and that this relaxation mechanism is driven on by phonon modes localized within the iron-sulphur cluster. In the frame of this interpretation the energy gap between both isomeric levels is estimable.

The temperature dependence of the iron ions' mean square displacement is evaluated by Mößbauer Spectroscopy for HiPIPs in six different states. In all cases, two temperature intervals typical for proteins are observed: below approximately 190 – 200 K a linear temperature dependence is found, and the low temperature dynamics of HiPIPs seems to be dominated by iron motion of the *entire* cluster. The dynamical properties of the [Fe₄S₄]-cluster of HiPIPs in the low-temperature regime are independent of the oxidation level, a C77S-mutation, a partially unfolding or the sequence. Mean square displacements from Mößbauer Spectroscopy are almost double as large as those measured by EXAFS under comparable experimental conditions due to the different sensitivity of the two methods. In the physiological temperature range oxidized HiPIPs show up more pronounced dynamics than reduced HiPIPs, as the latter protein state is the more stable one in HiPIPs.

Structure-dynamics of partially unfolded reduced HiPIP *C. vinosum* is characterized by Fe-EXAFS and Mößbauer Spectroscopy. In contrast to the secondary structure of the protein being mostly lost, the structure of the cluster and its bonds to the amino acids are still intact in the *molten globule*-HiPIP. The prosthetic group seems to function as a seed for the protein folding process and seems to stabilize the protein structure. The mean square displacement in the temperature regime dominated by harmonic vibrations does not differ between the wild type protein and the *molten globule*. In contrast to this, the protein specific dynamics of the metal centre in the partially unfolded HiPIP shows up a dramatically increased flexibility compared to the native protein which is interpreted as a preliminary stage of protein's denaturing.

Zusammenfassung

Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{n+}$ -Zentrum im High-Potential Iron-Protein (HiPIP) aus *E. halophila* und *C. vinosum* wurde mittels Mößbauer-Spektroskopie, Cw-EPR und gepulster EPR, ^{57}Fe -ENDOR und Fe-EXAFS hinsichtlich Struktur und Dynamik charakterisiert. Die Proteine wurden im oxidierten ($n = 3$) und reduzierten ($n = 2$), im nativen und im C77S-mutierten, im gefalteten und im *molten globule* Zustand untersucht.

Mittels Fe-EXAFS wurden die Atomabstände innerhalb des würfelförmigen Eisen-Schwefel-Zentrums von reduziertem HiPIP *C. vinosum* im nativen und C77S-mutierten Zustand bestimmt. Die intakte prosthetische Gruppe zeigt eine nahezu unveränderte Struktur. Während die vierfache Ligandierung an das Proteinerückgrat bestehen bleibt, verkürzt sich der Bindungsabstand zwischen dem Eisen und der Aminosäure 77 infolge der Mutation erheblich.

Die Elektronenstruktur im Eisen-Schwefel-Cluster ergibt sich aus einer Kombination von Mößbauer-, EPR- und ENDOR-Messungen. Das paramagnetische Mößbauer-Spektrum von nativen oxidierten HiPIPs setzt sich aus zwei Eisenpaaren mit zueinander antiparallel orientierten Spins S_{12} und S_{34} in den Oxidationszuständen $3+$ und $2.5+$ zusammen. Diese koppeln wiederum überwiegend antiparallel zu einem Netto-Cluster-Spin $S = 1/2$, wie durch das EPR-Signal nahe $g = 2$ angezeigt wird. Eine konsistente Interpretation von Mößbauer-Spektroskopie, ENDOR und gepulster EPR erfordert die Berücksichtigung von Elektronenrelaxation sowie eine Rotation des EFG Koordinatensystems zu dem der g - und A -Tensoren. Eine Analyse gemessener A -Tensoren lässt für den Spingrundzustand $|S_{12} S_{34} S\rangle$ entweder eine reine $|3 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ -Wellenfunktion oder eine Mischung aus einer $|4 \ 9/2 \ 1/2\rangle$ - und einer $|4 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ -Komponente zu. Natives reduziertes HiPIP ist EPR-silent ($S = 0$) und besteht aus zwei vollständig antiparallel gekoppelten Eisenpaaren im $\text{Fe}^{2.5+}$ -Oxidationszustand. Die Symmetrie im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster wird durch eine C77S-Mutation gebrochen, weshalb im Mößbauer-Spektrum serin- und cysteinligandiertes Eisen unterscheidbar ist. Der Diamagnetismus des reduzierten Clusters bleibt unter dem Aminosäureaustausch erhalten und die Ladungswolke des Metallzentrums wird in Richtung des Serinsauerstoffs verschoben. Die Anpassung des Mößbauer-Spektrums der oxidierten C77S-Mutante erfordert eine Unterscheidung zwischen zwei elektronischen Isomeren, bei denen einmal ein trivalentes und einmal ein gemischt-valentes Eisenion ans Serin ligandiert ist. Eine etwa gleich starke Besetzung beider Isomere wird vom Experiment sowie von komplementären EPR- und NMR-Ergebnissen stark favorisiert, eine ausschließliche Bevölkung des Fe^{3+} -O-Isomers kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Die von der Isomerieverschiebung angezeigte Akkumulation von Elektronenladung um das serinligandiertes Eisen auf Kosten der anderen Metallionen wird durch zwei untereinander kompatible Modelle quantifiziert. Diese gestatten für Eisen-Schwefel-Proteine die Berechnung realistischer Eisen-Ladungszahlen aus experimentellen Isomerieverschiebungen.

Das Auftreten oxidierter HiPIPs in elektronischen Isomeren und dessen Sichtbarwerden im Experiment wird diskutiert. Die Temperaturabhängigkeit der Besetzung dieser Zustände richtet sich nicht nach einem Boltzmann-Gesetz, was auf Entropieeffekte zurückgeführt wird. Besetzungsänderungen infolge Temperaturvariation und C77S-Mutation werden für das HiPIP *C. vinosum* aus spektroskopischen Messungen quantitativ abgeleitet.

Die paramagnetische Elektronenrelaxation des Netto-Cluster-Spins in oxidierten HiPIPs wird mittels gepulster EPR und Mößbauer-Spektroskopie nachgewiesen, quantifiziert und in verschiedene Relaxationsmechanismen aufgeschlüsselt. Übereinstimmend zeigt sich die Dominanz der Spin-Spin-Relaxation im Tieftemperaturbereich. Bei höheren Temperaturen ist Spin-Gitter-Relaxation vorherrschend, wobei zunächst direkte Ein-Phononen-Prozesse im Phonon-Bottleneck und später Orbach-Relaxation einsetzen. Eine phänomenologische Analyse ergibt, dass die Orbach-Relaxation mit Übergängen zwischen den elektronischen Isomeren äquivalent ist und dass diese durch lokalisierte Eisen-Schwefel-Eigenschwingungen angetrieben wird. Diese Interpretation ermöglicht die Bestimmung der Energielücke zwischen beiden isomeren Niveaus.

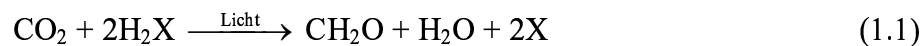
Für sechs HiPIP-Zustände wurde die Temperaturabhängigkeit des mittleren Auslenkungsquadrates der Eisenatome mit Mößbauer-Spektroskopie gemessen. In allen Fällen sind die für Proteine typischen beiden Temperaturintervalle sichtbar: unterhalb 190 - 200 K findet man eine lineare Temperaturabhängigkeit des Auslenkungsquadrates, die im Falle von HiPIPs von Bewegungen des Eisens *im* Clusterverbund geprägt sein dürfte. Die Tieftemperaturdynamik des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrums von HiPIPs ist unabhängig von Oxidationsniveau, Mutation, Faltungszustand oder Sequenz. Mittlere Auslenkungsquadrate aus Mößbauer-Spektroskopie sind nahezu doppelt so groß wie unter gleichen Bedingungen mit EXAFS gemessene, was mit der unterschiedlichen Sensitivität beider Methoden erklärbar ist. Im Bereich proteinspezifischer Dynamik zeigen oxidierte HiPIPs eine ausgeprägtere Dynamik als reduzierte, was auf die höhere Stabilität letzterer zurückgeführt werden kann.

Die Struktur-Dynamik von teilweise entfaltetem reduziertem HiPIP *C. vinosum* wird durch Fe-EXAFS und Mößbauer-Spektroskopie charakterisiert. Während die Sekundärstruktur des Proteins bereits weitgehend aufgelöst ist, sind der Aufbau des Clusters im *molten globule*-HiPIP sowie dessen Bindungen mit den Aminosäuren intakt. Der prosthetischen Gruppe scheint eine Keimbildungsfunktion bei der Proteinfaltung und eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur zuzukommen. Hinsichtlich der Auslenkungsquadrate aufgrund harmonischer Festkörperschwingungen unterscheiden sich Wildtyp und *molten globule* nicht. Im Bereich der proteinspezifischen Dynamik zeigt das Metallzentrum im ungefalteten HiPIP verglichen mit dem nativen Protein eine dramatisch erhöhte Flexibilität, die als Vorstufe zur Denaturierung aufzufassen ist.

1 Einführung

1.1 Bakterielle Photosynthese

Die Photosynthese ist ein Meilenstein der Evolution. Entwicklungsgeschichtlich war sie die Reaktion heterotropher Bakterien auf eine Verknappung ihrer pflanzlichen und tierischen Nahrung. Nicht Pflanzen waren die Architekten der Energiegewinnung aus dem Sonnenlicht, sondern grüne und purpurne Bakterien. Angepasst an die Bedingungen der damaligen Zeit läuft die Photosynthese der phototropen Bakterien noch heute anaerob ab. Während die grünen Schwefelbakterien in Sauerstoffatmosphäre nicht überleben können, tolerieren ihre purpurnen Verwandten wenigstens im Dunklen für kurze Zeit eine anaerobe Umgebung. Die allgemeine Reaktionsgleichung für die Photosynthese lautet



Dabei steht im Falle der aeroben, pflanzlichen Photosynthese X für Sauerstoff, für die anaerobe bakterielle Photosynthese symbolisiert X Schwefel. Die phototropen Bakterien waren also neben Sonnenlicht auf Kohlendioxid und Schwefelwasserstoff angewiesen. Ersteres war in der Atmosphäre enthalten, letzterer drang aus Spalten und Vulkanen. Heutzutage hat sich der Lebensbereich der purpurnen Schwefelbakterien hin zu den unteren, anaeroben Zonen von Süß- und Salzwässern verlagert. Dort bilden sich „Wasserblüten“, lachsfarbene bis dunkel-weinrote Beläge auf Faulschlamm, der als Quelle von Schwefelwasserstoff dient (siehe Abb. 1.1). Auch im Brackwasser, auf feuchten Böden, auf überfluteten Feldern und auf in Zersetzung befindlichen Pflanzen sind diese urzeitlichen Lebewesen beheimatet. Durch die Photosynthese entsteht Zellstoff CH_2O , aus dem die Bakterien ihren Körper aufbauen. Als Abfallprodukt fällt elementarer Schwefel an, den die meisten Purpurschwefelbakterien im Zellinneren anhäufen. Solche Schwefelklumpen sind in Abb. 1.2 für das Bakterium *Chromatium vinosum*¹ als schwarze Kugeln in den Globoli zu erkennen (Margulis und Sagan 1999). Nur die Art *Ectothiorhodospira*, deren salzliebende Spezies *Ectothiorhodospira halophila*² in dieser Arbeit ebenso eine Rolle spielen wird wie das zuvor erwähnte Bakterium, häuft den entstehenden Schwefel außerhalb der Zelle an. Purpurschwefelbakterien sind stäbchenförmig mit Dimensionen von etwa 10 μm x 1 μm x 1 μm .

Der Mechanismus der bakteriellen Photosynthese ist bis heute nicht restlos verstanden. Ein wesentlicher Unterschied zur pflanzlichen Photosynthese besteht darin, dass nur ein Reaktionszentrum auftritt. Abb. 1.3 zeigt die wesentlichen Prozesse nach Youvan und Marrs (1984) sowie Darnell et al. (1990), deren Erkenntnisse auf einer Kombination spektroskopischer, röntgenkristallographischer und molekulargenetischer Methoden beruhen (Youvan und Marrs 1987). Antennenpigmente im bakteriellen Reaktionszentrum absorbieren

¹ Chromatium $\hat{=}$ Färbemittel

² ecto $\hat{=}$ außerhalb, thio $\hat{=}$ Schwefel, rhodos $\hat{=}$ rot, spira $\hat{=}$ spiral(förmig), halophila $\hat{=}$ salzliebend

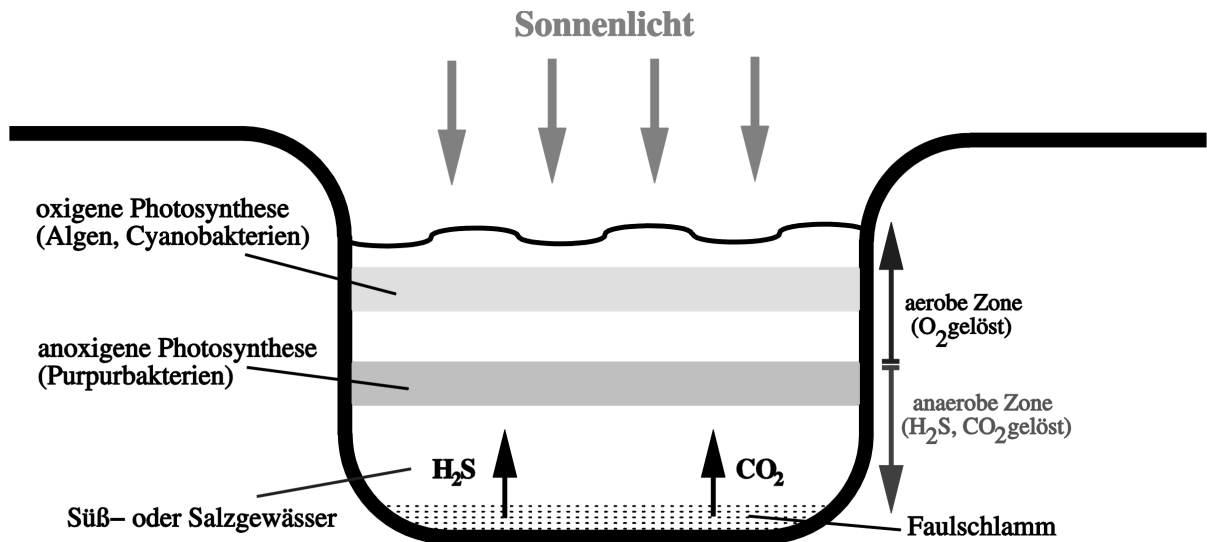


Abb. 1.1 Der Lebensraum phototroper Bakterien



Abb. 1.2 Die photosynthetisch aktiven purpurnen Schwefelbakterien *Chromatium vinosum*; die purpurnen Einschlüsse sind Thylakoidmembranen mit Photosynthesepigmenten; die schwarzen Kugeln sind in den Zellen angehäuften Einschlüssen des bei der Photosynthese anfallenden elementaren Schwefels (Quelle: Margulis und Sagan 1999)

ein Sonnenquant und setzen so ein Chlorophyllelektron frei. In Abb. 1.2 sind diese Photosynthesepigmente als purpurfarbene Zelleinschlüsse zu erkennen (Margulis und Sagan 1999). Das energiereiche Elektron begibt sich auf einen Akzeptor auf der exoplasmatischen Membranseite. Von hier aus wird es über eine Kette von Elektronentransferproteinen geleitet und gelangt dabei auch zu einem High-Potential Iron Protein (HiPIP). Die Proteinkette fungiert als biologisches Stromkabel, dessen Spannung über die Redoxpotentiale der Proteine eingestellt wird. Wie diese Justierung erfolgt, ist bis heute weitgehend unverstanden. Das Elektron gelangt zum Cytochrom bc_1 Oxidoreduktase-Komplex und erzeugt zwischen beiden

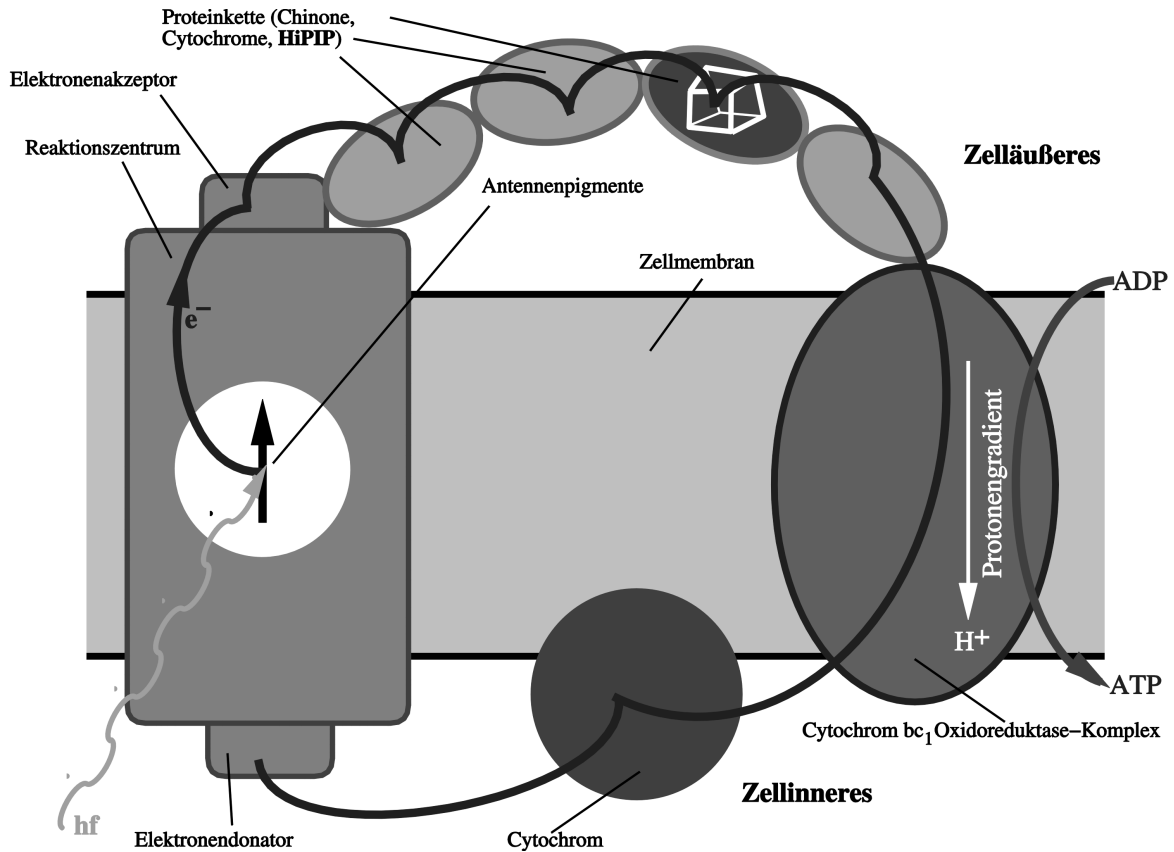


Abb. 1.3 Schema des zyklischen Elektronentransfers in einer phototropen Bakterienzelle; an einer nicht genau lokalisierten Stelle in der zellexternen Proteinkette befindet sich das hier untersuchte High-Potential Iron Protein (HiPIP), das am Elektronentransport partizipiert (angelehnt an: Youvan und Marss 1984)

Seiten der Membran einen Protonengradienten. Mit dieser Batterie wird die Synthese der universellen Energieeinheit ATP angetrieben. Über ein Cytochrom wird das Elektron zum photosynthetischen Reaktionszentrum zurückgeleitet. Damit ist der zyklische Elektronentransfer abgeschlossen, die Lichtenergie dauerhaft gespeichert und die Ladungsneutralität des Reaktionszentrums wiederhergestellt. Nun kann der nächste Durchlauf beginnen. Die Rolle von Eisen-Schwefel-Proteinen bei der bakteriellen Photosynthese ist Gegenstand aktueller Forschung (Hochkoeppler et al. 1995).

1.2 Proteine

Wenn die DNA den Bauplan des Lebens vorgibt, dann sind Proteine Ziegel, Mörtel und Werkzeuge (Doolittle 1986). Keine andere Gruppe von Molekülen erfüllt in Organismen eine derartige Vielfalt von Aufgaben wie zum Beispiel Speicherung und Transport lebenswichtiger Moleküle, enzymatische Katalyse biochemischer Reaktionen, Koordinierung der Muskelbewegung oder Übertragung von Nervenimpulsen (vgl. Stryer 1988). Eine andere fundamentale Funktion, die typischerweise durch Eisen-Schwefel-Proteine wie die hier untersuchten High-Potential Iron Proteins bewerkstelligt wird, ist der Elektronentransport. Proteinfehlfunktionen spielen eine Schlüsselrolle bei Krankheiten wie Creutzfeldt-Jakob oder AIDS.

Proteine sind makromolekulare Polypeptide. Das Alphabet der Proteine hat zwanzig Buchstaben, die Aminosäuren. Diese Bausteine stellen eine Palette von biophysikalischen Eigenschaften (groß-klein, polar-unpolar, hydrophob-hydrophil) zur Verfügung, deren Kombination es der Natur ermöglicht, alle physiologischen Aufgabenstellungen zu lösen und alle Proteine vom Einzeller bis zum Menschen aufzubauen. Benachbarte Aminosäuren sind jeweils über eine kovalente C-N-Bindung (Peptidbindung) miteinander verknüpft. Die Reihenfolge der Aminosäuren heißt Sequenz oder Primärstruktur des Proteins und ist genetisch festgelegt. Die Aminosäurekette ist nicht linear angeordnet, sondern faltet sich in eine energiearme Konformation. Faltungsphänomene sind ein aktuelles Forschungsgebiet (Creighton 1990, Christensen und Pain 1991, Wolynes und Eaton 1999). Es bilden sich Sekundärstrukturelemente des Proteins wie schraubenförmige Windungen („ α -Helix“) oder flächige Bereiche („ β -Faltblatt“), aber auch andere Anordnungen (vgl. Abb. 1.5). So leistungsfähig Proteine sind, so empfindlich sind sie auch. Zwar ist ihre Stabilität im ausgeklügelten Chemikalienmix des Organismus hoch, unter Laborbedingungen aber können etwas zu hohe Temperaturen, falsche pH-Werte oder die Anwesenheit bestimmter Chemikalien dafür sorgen, dass die Proteine denaturieren. Die gesamte dreidimensionale Proteinstruktur bezeichnet man als Tertiärstruktur. Aggregieren mehrere gleichartige Proteinmoleküle zu einem Komplex, so formt sich damit die Quartärstruktur. Diese relative geometrische Anordnung von Ketten ist am Beispiel des HiPIP *E. halophila* in Abb. 1.5 zu sehen, wobei zwischen dem hier untersuchten HiPIP I *E. halophila* (links in Abb. 1.5b) und dem HiPIP II *E. halophila* (rechts) unterschieden wird. Die Moleküle eines Proteinensembles besitzen keinen singulären, energieärmsten Zustand, sondern verschiedene Konformations-subzustände mit ähnlicher Energie (Frauenfelder et al 1979).

Die physiologisch relevanten Prozesse spielen sich bei vielen Proteinen in metallhaltigen Zentren ab. Da die nicht vollständig besetzten 3d-Schalen für Redoxreaktionen mit geringem Energieaufwand prädestiniert sind, kommen Übergangsmetalle häufig in den aktiven Zentren von Proteinen vor. Die Tatsache, dass die prosthetischen Gruppen vieler Proteine Eisenatome enthalten, gestattet die Anwendung der Mößbauer-Spektroskopie und damit einen Einblick in die Elektronenstruktur dieser Funktionszentren. Proteine mit eisenhaltigem Metallzentrum sind in vier Gruppen einteilbar. Hämproteine wie Myoglobin binden ein Eisenion im Zentrum ihres Protoporphyrin-Ringes. Eisenspeicher-Proteine wie beispielsweise Ferritin enthalten große Eisenklumpen. Eisen-Schwefel-Proteine besitzen einen aus Eisen und Schwefel aufgebauten Cluster in ihrem Zentrum. Alle anderen eisenhaltigen Proteine werden unter der Bezeichnung „Non-heme-non-iron-sulphur“ zusammengefasst, wozu etwa die Superoxiddismutasen zählen.

1.3 Eisen-Schwefel-Proteine

Eisen-Schwefel-Proteine kommen in praktisch allen Organismen vor und fungieren vorwiegend als Elektronentransporter (Cammack und Sykes 1992, Carter et al. 1972). Säugetiere enthalten etwa 1% ihres Eisengehalts in Form von Eisen-Schwefel-Proteinen. Diese Proteinklasse spielte eine wichtige Rolle in der Frühphase der Evolution (Kaim und Schwederski 1991). Abb. 1.4 zeigt die in Eisen-Schwefel-Proteinen auftretenden Typen von Metallzentren (Bertini et al. 1995), optisch hervorgehoben ist das in HiPIPs vorkommende und hier untersuchte $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum. Allen Eisen-Schwefel-Proteinen gemeinsam sind die folgenden Eigenschaften, die Hagen (1992) als „Lemmas“ bezeichnet:

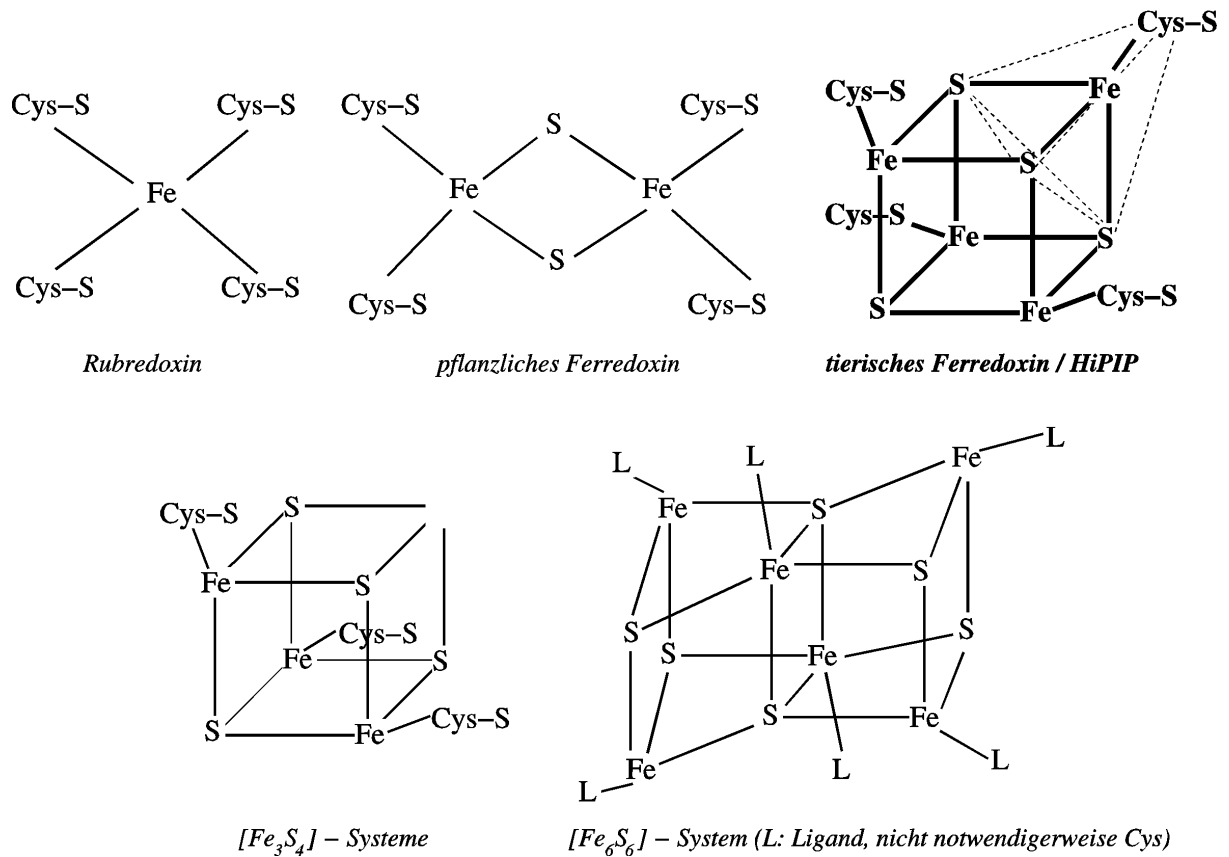


Abb. 1.4 Prosthetische Gruppen von Eisen-Schwefel-Proteinen

Lemma I: Die Wertigkeit von Eisen in Eisen-Schwefel-Proteinen liegt zwischen zwei und drei

Biologisches Eisen tritt entweder bivalent („ferrous“) oder trivalent („ferric“) auf, während in der anorganischen Chemie auch vier- oder fünffach geladenes Eisen vorkommt. Ein formaler Oxidationszustand von „2.5+“ kann durch magnetische Doppelaustauschwechselwirkung (Kap. 2.2) der Spins eines Fe²⁺/Fe³⁺-Paares entstehen („ferric-ferrous pair“, „mixed-valence pair“) (Blondin et al. 1990, Kahn 1993).

Lemma II: Eisenspins in Eisen-Schwefel-Proteinen sind stets im High-Spin Zustand

Die gestrichelten Linien in der Skizze des [Fe₄S₄]-Zentrums in Abb. 1.4 zeigt, dass die Eisenionen des Clusters von vier Schwefelionen umgeben sind und somit in erster Näherung tetraedrische Symmetrie vorliegt. Das tetraedrische Ligandenfeld hebt die Entartung der 3d-Zustände teilweise auf, indem es zwei Niveaus energetisch absenkt und drei anhebt. Der Energieunterschied zwischen beiden Niveaus heißt Kristallfeldaufspaltung und ist in tetraedrischer Symmetrie erheblich kleiner als etwa in oktaedrischer (Reinhold 1994). Durch die Kristallfeldaufspaltung entsteht die Tendenz, zunächst die beiden unteren Zustände mit jeweils zwei antiparallelen Elektronenspins doppelt zu besetzen. Dem entgegen wirken die Hund'schen Regeln, welche eine zunächst einfache Populierung der fünf 3d-Orbitale mit parallelen Spins forcieren. Die infolge der tetraedrischen Symmetrie geringe

Kristallfeldaufspaltung tritt hinter den Hundtschen Regeln zurück, so dass die Elektronenorbitale zunächst nur einfach und mit parallelen Spins besetzt werden. Daraus resultiert die High-Spin Konfiguration mit Eisenspins von $S = 2$ für Fe^{2+} beziehungsweise von $S = 5/2$ für Fe^{3+} .

Lemma III: Anorganischer Brückenligand für die Eisenionen ist immer S^{2-}

Idealerweise liegt der Cluster-Schwefel in diamagnetischer Edelgaskonfiguration vor. Dichtefunktional-Rechnungen für Eisen-Schwefel-Cluster belegen, dass nur unwesentlich viel Spindichte auf den anorganischen Schwefelionen lokalisiert ist (Mouesca et al. 1994). Eine Substitution $S \rightarrow \text{Se}$ führt bei HiPIP I *E. halophila* und HiPIP C. *vinosum* nur zu geringen Veränderungen der elektronisch-magnetischen Struktur (Bertini et al. 1993). Die biologische Relevanz des anorganischen Schwefels wird als sehr gering eingeschätzt (Hagen et al. 1992).

Lemma IV: Aminosäureliganden von Eisen-Schwefel-Clustern sind zumeist Cysteine

Diese Aussage gilt weniger streng als die ersten drei. So existiert beispielsweise ein Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus* mit einem $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -Cluster und je zwei Cystein- und Histidin-Liganden (Fee et al. 1984). Auch gibt es $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -haltige Proteine mit drei Cystein- und einem Asparagin-Liganden, etwa das Ferredoxin III aus *Desulfovibrio africanus* (George et al. 1989) oder das Ferredoxin aus *Pyrococcus furiosus* (Conover et al. 1990, Calzolari et al. 1995). Bekannt sind darüber hinaus Proteine mit vier Cystein-Liganden im nativen Zustand, die unter einem $\text{Cys} \rightarrow \text{Ser}$ -Austausch stabil bleiben. Beispiele hierfür sind die C42S-Mutante des Rubredoxin von *Clostridium pasteurianum* (Meyer et al. 1995) und die hier untersuchte C77S-Mutante des HiPIP C. *vinosum* mit einem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum (Babini et al. 1996, Bentrop et al. 1996). Dennoch handelt es sich bei Eisen-Schwefel-Proteinen mit Nicht-Cystein-Liganden um extreme Ausnahmefälle.

1.4 High-Potential Iron Proteins (HiPIPs)

Die Rolle der HiPIPs beim Elektronentransport während der bakteriellen Photosynthese ist nur ansatzweise verstanden. HiPIPs sind in der Proteinkette angesiedelt, über die der Transport des im bakteriellen Reaktionszentrum durch Lichtabsorption erzeugten freien Elektrons zum Cytochrom bc_1 Oxidoreduktase-Komplex erfolgt. Ein vorgelagertes, mit dem zu transportierenden Elektron beladenes Elektronentransportprotein gibt das Elektron an das unbeladene oxidierte HiPIP aufgrund der herrschenden Redoxverhältnisse ab. Dadurch wird das HiPIP reduziert. Vom HiPIP muss das Transportelektron dann an den nächsten Zwischenspeicher mit einer noch höheren Elektronenaffinität weitergeleitet werden. Der Einstellung des Redoxpotentials im Metallzentrum von HiPIPs kommt daher eine entscheidende physiologische Bedeutung zu.

HiPIPs sind kleine Proteine mit Molekülmassen von etwa 10 kDa und weniger als hundert Aminosäuren. Einige wichtige Eigenschaften sind für die hier untersuchten HiPIPs in Tab. 1.1 zusammengestellt.

	HiPIP I <i>E. halophila</i>	HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S
E ₀ [mV]	+120 ¹	+355 ¹	+330 ²
Q[e] bei pH8 ³	-11	-4	-4
M [Da]	7907 ⁴	8888 ⁵	8943 ⁶
Aminosäuren	72 ⁴	85 ⁵	86 ⁶

Tab. 1.1 Eigenschaften verschiedener HiPIPs nach folgenden Quellen: ¹Przysiecki et al. 1985, ²Babini et al. 1996, ³Meyer et al. 1983, ⁴Breiter et al. 1991, ⁵Bertini et al. 1995a, ⁶Bentrop et al. 1996

Räumliche Strukturen der beiden in dieser Arbeit untersuchten nativen HiPIPs sind in Abb. 1.5 zu sehen. Diese basieren auf Röntgenstrukturanalysen, die ebenso wie NMR-Strukturbestimmungen für das HiPIP I *E. halophila* (Breiter et al. 1991, Banci et al. 1994) und das HiPIP *C. vinosum* (Carter et al. 1974, Bertini et al. 1995a) verfügbar sind.

Alle HiPIPs enthalten einen verzerrt würfelförmigen [Fe₄S₄]-Kubanen, der an das Proteinrückgrat über vier Cystein-Reste ligandiert ist. In der stabilen C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* ist ein organischer Schwefelligand des Metallzentrums gegen einen Sauerstoff gentechnisch ausgetauscht (Babini et al. 1996). NMR-Strukturdaten zeigen trotz der Mutation eine intakte Proteinstruktur (Bentrop et al. 1996).

Natives reduziertes HiPIP *C. vinosum* hat die Eigenschaft, bei Zugabe einer definierten Menge Guanidiniumchlorid eine reversible teilweise entfaltete Konformation einzunehmen (Bertini et al. 1997). Dieser stabile Zwischenzustand mit einer gewissen Restordnung wird als *molten globule* bezeichnet (Creighton 1990). Abb. 1.6 zeigt Stereobilder von nativem und teilweise entfaltetem HiPIP *C. vinosum*, die mittels NMR-Untersuchungen gewonnen wurden (Bentrop et al. 1999). Während das Proteinrückgrat einen dramatischen Verlust an Ordnung aufweist, ist die Struktur und insbesondere die Fe-Cys-Bindung in der direkten Umgebung des Clusters weitgehend erhalten.

Grundlage für ein besseres Verständnis der Prozesse, die mit der physiologischen Funktion von HiPIPs als Elektronentransportproteine einhergehen, erfordern die detaillierte Kenntnis der elektronischen Feinstruktur des aktiven Zentrums. Trotz des sehr ähnlichen Aufbaus des [Fe₄S₄]-Zentrums in verschiedenen HiPIPs ist die Spanne der Redoxpotentiale von +90 mV bis +500 mV erheblich (Capozzi et al. 1998, Przysiecki et al. 1985, Tab. 1.1). Die Redoxpotentiale aller HiPIPs sind im Vergleich zu denen der strukturell sehr ähnlichen tierischen Ferredoxine (-430 mV bis -280 mV), welche ebenfalls ein [Fe₄S₄]-Zentrum besitzen, ungewöhnlich hoch. Daher rührt auch die Bezeichnung *High-Potential* Iron Protein. Die große Bandbreite der Redoxpotentiale von [Fe₄S₄]-Zentren zu verstehen war und ist Gegenstand vieler Veröffentlichungen und scheint bis heute nicht einmal im Grundsatz befriedigend geklärt (Meyer et al. 1983, Przysiecki et al. 1985, Langen et al. 1992, Mouesca et al. 1994, Heering et al. 1995, Soriano et al. 1996).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der elektronisch-magnetischen Struktur von [Fe₄S₄]^{2+/3+}-Zentren in Proteinen liefern. Die Korrelation zwischen Proteindynamik und physiologischer Funktion ist vielfach nachgewiesen - Standardbeispiel

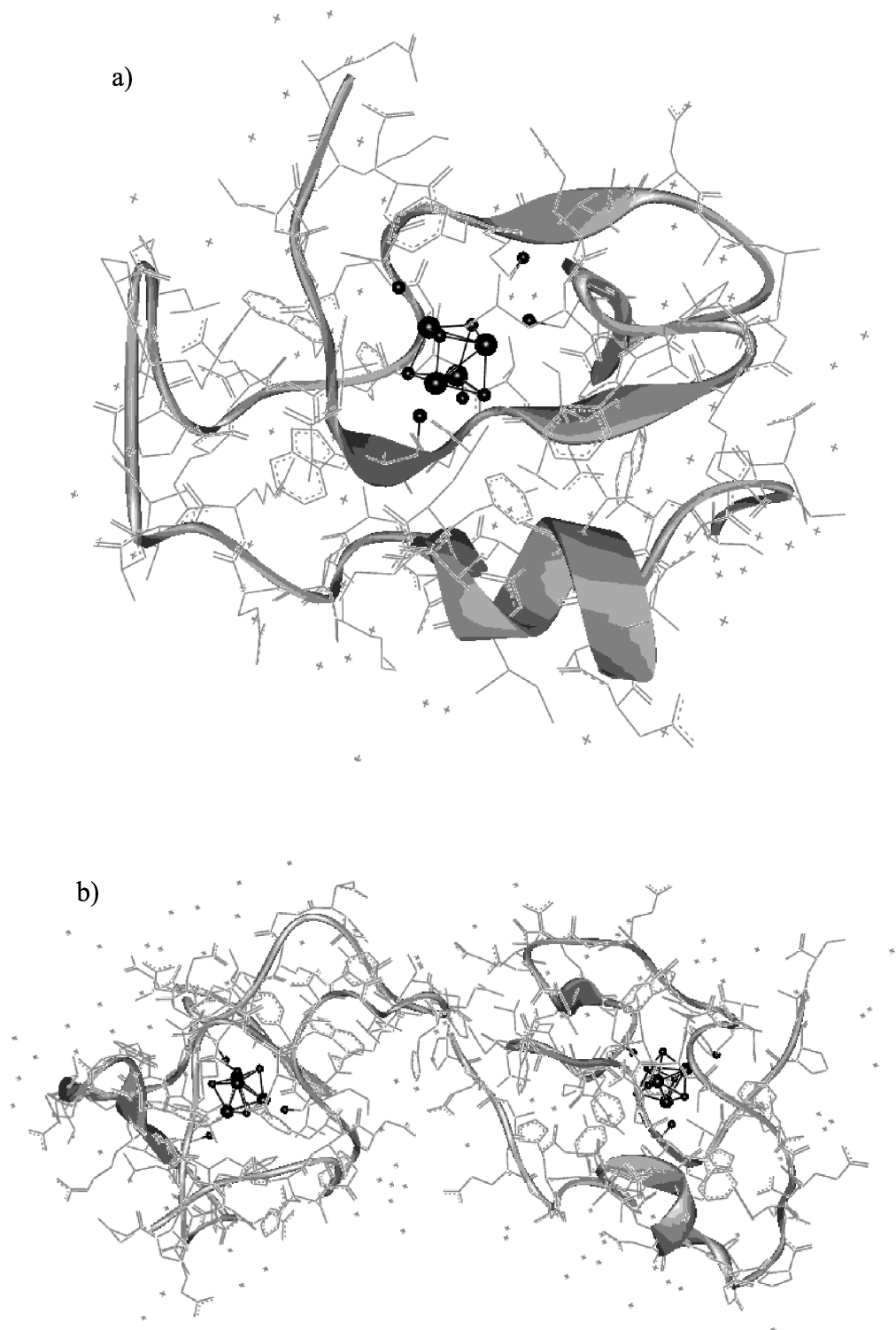


Abb. 1.5 Dreidimensionale Proteinstrukturen von a) HiPIP *C. vinosum* und b) HiPIP *E. halophila* mit seinen Untereinheiten I (links) und II (rechts); optisch hervorgehoben sind die $[\text{Fe}_4\text{S}_4]\text{Cys}_4$ -Würfel mit ihren Eisenatomen (große Kugeln) und organischen wie anorganischen Schwefelatomen (kleine Kugeln); Sekundärstrukturelemente sind schematisch skizziert

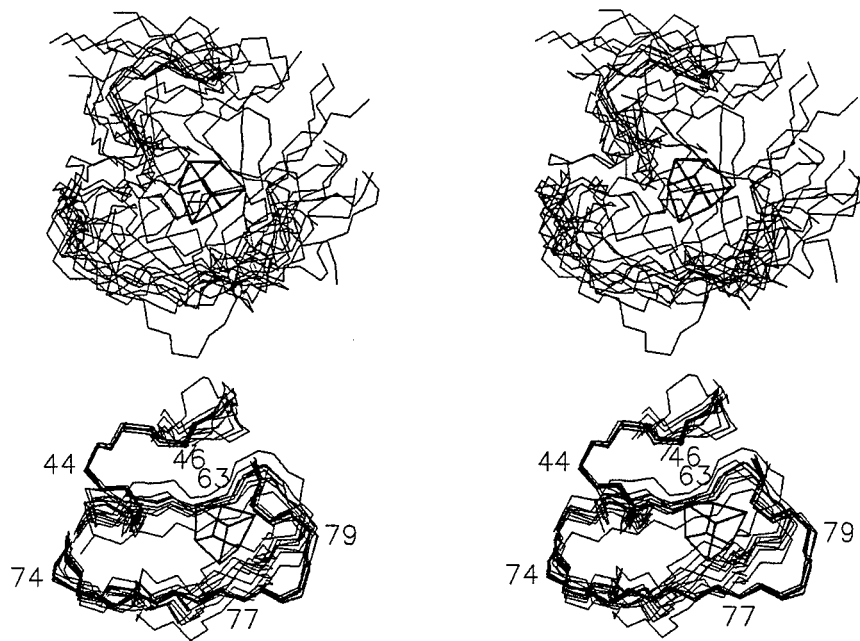


Abb. 1.6 Vergleich des Ordnungsgrades in nativem (unten) und teilweise entfaltetem (oben) reduziertem HiPIP *C. vinosum* anhand von Stereobildern der NMR-Strukturfamilien (Quelle: Bontrop et al. 1999)

ist die Atmungsbewegung des Hämoglobins bei der Sauerstoffanlagerung (Parak und Kalvius 1982). Bisher existiert jedoch keine Literatur, die sich mit den Bewegungseigenschaften von HiPIPs beschäftigt. In dieser Arbeit werden Messungen des mittleren Auslenkungsquadrates der Eisenionen vorgestellt. Die dynamischen Eigenschaften beeinflussen auch über die paramagnetische Elektronenrelaxation die Interpretation der spektroskopischen Daten von HiPIPs. Generell verfolgt diese Arbeit drei Ansätze: einerseits werden HiPIPs aus verschiedenen Organismen - *E. halophila* und *C. vinosum* - untersucht, um deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu erforschen. Andererseits wird das native HiPIP *C. vinosum* mit dessen C77S-Mutante verglichen. Durch diese Punktmutation kann der Einfluss der Liganden auf Struktur und Dynamik des Eisenzentrums studiert werden. Schließlich soll durch Vergleich der Struktur-Dynamik von nativem und teilweise entfaltetem reduziertem HiPIP *C. vinosum* ein Beitrag zum Verständnis der Proteinfaltung geleistet werden.

2 Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/3+}$ -Zentrum in HiPIPs

2.1 Atomare Struktur des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters in HiPIPs

Die Grobstruktur des Metallzentrums in HiPIPs ist aus Röntgenstrukturanalysen und NMR-Strukturbestimmungen bekannt, die sowohl für das HiPIP I *E. halophila* (Breiter et al. 1991, Banci et al. 1994), als auch für das HiPIP *C. vinosum* nativ (Carter et al. 1974, Bertini et al. 1995a) und als C77S-Mutante (Bentrop et al. 1996) durchgeführt wurden. Die Zentren verschiedener HiPIPs unterscheiden sich kaum, ähnliches gilt für den Wildtyp und die Mutante des HiPIP *C. vinosum*. Das Metallzentrum hat die Form eines verzerrten Würfels, der von vier Eisen- und vier Schwefelionen aufgespannt wird. Die Abweichungen von der idealen Würfelform sind der Gestalt, dass die Eisenionen in Richtung des Würfelschwerpunktes und die Schwefelionen nach außen verschoben sind. Jedes Eisenatom ist über einen negativ geladenen Cystein-Rest mit dem Rückgrat des Proteins verbunden. Abb. 2.1 zeigt die Struktur, wobei die Sequenznummern I, II, III, IV der Cystein-Liganden von HiPIP zu HiPIP variieren. Für das HiPIP I *E. halophila* gilt I = 31, II = 34, III = 48, IV = 64, für das HiPIP *C. vinosum* hingegen I = 43, II = 46, III = 63, IV = 77. Strukturdaten des vierfach schwefel-ligandierten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters sind in Tab. 2.1 angegeben.

Die wesentliche Veränderung der Proteinstruktur des HiPIP *C. vinosum* infolge der C77S-Mutation besteht darin, dass der organische Ligand des zu Aminosäure 77 benachbarten Eisenions nun ein Sauerstoffion anstelle eines Schwefelions ist. Als Bindungsabstand Fe-O_γ wird für die reduzierte Mutante $2.3 \pm 0.6 \text{ \AA}$ angegeben (Bentrop et al. 1996). Zwar ist diese Angabe mit einer hohen Unsicherheit behaftet, der Mittelwert des Abstandes liegt aber höher als der entsprechende Fe-S_γ-Abstand von $2.22 \pm 0.03 \text{ \AA}$ im Wildtyp (Jensen 1987).

In engem Zusammenhang mit der physiologischen Funktion als Elektronentransporter steht das Auftreten des HiPIP-Metallzentrums in verschiedenen Oxidationszuständen. Nach der *Three State Hypothesis* (Carter 1977) können $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Kubane drei verschiedene Ladungszustände einnehmen:

	HiPIP			$[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{n-}$		
	<i>I. E. halophila</i>	<i>C. vinosum</i>		n=1	n=2	n=3
	oxidiert	oxidiert	reduziert			
Fe-S _γ	2.17 ± 0.10	2.21 ± 0.03	2.22 ± 0.03	2.208	2.263	2.295
Fe-S _ε	2.22 ± 0.10	2.25 ± 0.06	2.32 ± 0.08	2.233/2.269	2.267/2.296	2.354/2.286
Fe-Fe	2.65 ± 0.10	2.73 ± 0.04	2.81 ± 0.05			
S _γ -S _γ	5.90 ± 0.20					
S _ε -S _ε	3.50 ± 0.10					
Ref.	Banci et al. 1994	Jensen 1987		Lippard und Berg 1995		

Tab. 2.1: Bindungsabstände (in Å) für verschiedene $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster; S_γ = Cysteinschwefel, S_ε = Clusterschwefel

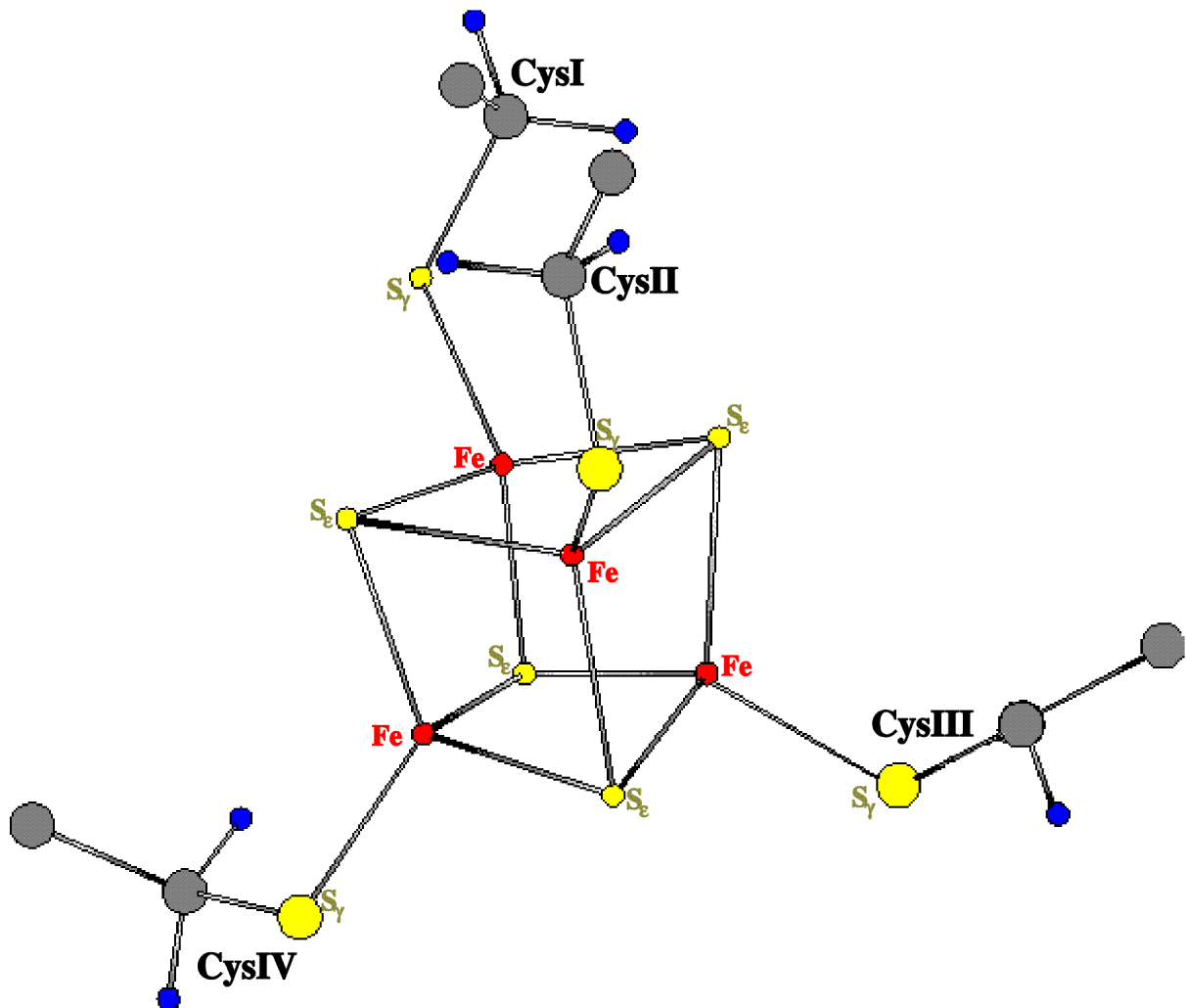


Abb. 2.1 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster aus HiPIPs mit den vier Cystein-Liganden

$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$	\leftrightarrow	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$	\leftrightarrow	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$
HiPIP oxidiert	\leftrightarrow	HiPIP reduziert	\leftrightarrow	(HiPIP superreduziert)
		tierisches Ferredoxin oxidiert	\leftrightarrow	tierisches Ferredoxin reduziert
$[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})]^-$	\leftrightarrow	$[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})]^{2-}$	\leftrightarrow	$[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})]^{3-}$

Nur zwei der drei Oxidationszustände kommen in HiPIPs natürlich vor. Den unphysiologischen dritten Zustand („super-reduced“) kann man bei HiPIPs nur durch Zugabe entsprechender Chemikalien künstlich herstellen (Dickson et al. 1974).

Röntgenstrukturdaten an $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Modellkomplexen haben gegenüber solchen, die an Proteinen gemessen sind, den Vorteil höherer Auflösung (Que et al. 1974). Deshalb können über Unterschiede zwischen dem Aufbau des Metallzentrums im oxidierten und im reduzierten Zustand an Modellkomplexen genaue Aussagen getroffen werden. Tab. 2.1 stellt Eisen-Eisen-Abstände im Fe_4S_4 -Zentrum für die drei nach der *Three State Hypothesis* möglichen Oxidationsniveaus zusammen. Der mittlere Eisen-Schwefel-Abstand wächst demnach systematisch um etwa 1.3% mit jedem hinzugefügten Elektron ($2.25 \text{ \AA} \rightarrow 2.28 \text{ \AA} \rightarrow$

2.31 Å), was sowohl für die Bindung des Eisens zum Clusterschwefel als auch zum Ligandenschwefel gilt (Lippard und Berg 1995). Wie Tab. 2.1 zeigt, sind auch bei HiPIPs die mittleren Bindungsabstände zwischen Eisen und Schwefel im reduzierten Protein geringfügig größer als im oxidierten.

2.2 Magnetische Austauschwechselwirkung in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentren

Die magnetische Kopplung der Eisenspins im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/3+}$ -Cluster von HiPIPs ist auf Austauschwechselwirkung zurückzuführen. Dieser quantenmechanische Effekt, der durch ein Zusammenspiel von Coulomb-Wechselwirkung und dem Pauli-Prinzip eine bestimmte Spinorientierung energetisch bevorzugt, ist um Größenordnungen stärker als die klassische magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Letztere ist viel zu schwach, um magnetische Ordnungszustände von Eisen-Schwefel-Zentren bei Zimmertemperatur erklären zu können. Im weiteren werden die wesentlichen Mechanismen magnetischer Austauschwechselwirkung im Metallzentrum von HiPIPs anschaulich erklärt. Eine ausführlichere Abhandlung ist der Spezialliteratur zu entnehmen (Jäger und Perthel 1996, Kahn 1993).

Der Mechanismus der Heisenberg-Austauschwechselwirkung wird am einfachen Fall zweier freier Elektronenspins \mathbf{S}_i und \mathbf{S}_j veranschaulicht (Abb. 2.2a). Sind diese räumlich so nahe beisammen, dass ihre Orbitale überlappen, so sind sie durch einen gemeinsamen quantenmechanischen Zustand beschreibbar. Das Pauli-Prinzip fordert dann jedoch, dass sich die beiden Fermionen in mindestens einer Quantenzahl unterscheiden, was eine zueinander antiparallele Orientierung der Spins bedingt. Sind beide Elektronen dagegen weit voneinander entfernt, so greift das Pauli-Prinzip nicht und einer parallelen Spinorientierung steht nichts im Weg. Welcher der beide Fälle sich einstellt, wird durch die Coulomb-Wechselwirkung festgelegt. Im ersten Fall ist der Abstand der beiden gleichnamigen Ladungen klein, was mit einer hohen elektrostatischen Abstoßung korrespondiert. Daher wird sich der zweite Zustand mit kleinerer Coulomb-Abstoßung und paralleler Spinorientierung einstellen. Diesen Fall findet man etwa im Wasserstoffmolekül (Kronmüller und Lambeck 1992). Der den Heisenberg-Austausch beschreibende phänomenologische Hamiltonian lautet

$$\mathbf{H} = J_{ij} \mathbf{S}_i \mathbf{S}_j \quad (2.1)$$

wobei das Austauschintegral J_{ij} nach dieser Vorzeichenkonvention für antiparallele Spinorientierung positiv ist. Heisenberg-Austauschwechselwirkung spielt in HiPIPs allerdings keine wesentliche Rolle, da infolge des recht großen Eisen-Eisen-Abstandes von 2.65 - 2.81 Å (Banci et al. 1994, Jensen 1987) eine ausreichend starke Überlappung der 3d-Schalen der beiden Metallionen nicht erfolgen kann. Möglich ist dies etwa in metallischem Eisen, wo Eisen-Eisen-Abstände von 2.48 Å einen solchen Überlapp ermöglichen.

Ein in Eisen-Schwefel-Proteinen vorherrschender magnetischer Kopplungsmechanismus ist die Superaustauschwechselwirkung (Kronmüller und Lambeck 1992). Dabei wird die Spinkopplung zwischen zwei paramagnetischen Ionen mit nicht direkt überlappenden Elektronenschalen durch ein aufgefülltes Orbital eines diamagnetischen Ions vermittelt. Im Beispiel von Abb. 2.2b, das der Situation im HiPIP-Cluster entspricht, werden zwei trivalente Eisenionen über die vollbesetzte p_z -Hantel eines zweifach negativen Schwefelions antiparallel

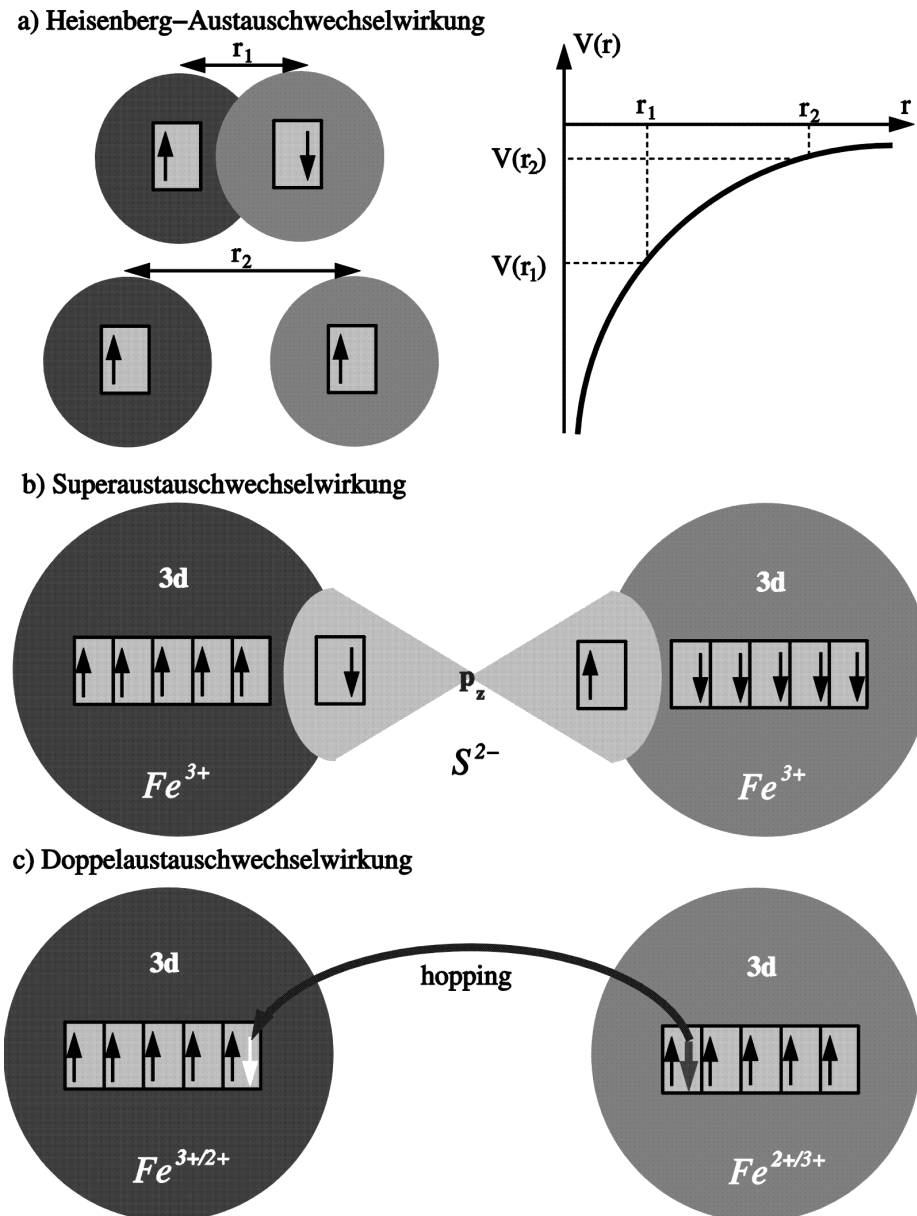


Abb. 2.2 Mechanismen magnetischer Austauschwechselwirkung in Eisen-Schwefel-Proteinen (Beschreibung im Text) a) Heisenberg-Austausch b) Superaustausch c) Doppelaustausch

gekoppelt. Das Elektron in der linken Hälfte der Hantel wird vom positiv geladenen Eisenion elektrisch angezogen und vorübergehend in dessen 3d-Schale eingebaut. Da hier bereits alle Zustände mit „Spin up“ besetzt sind, muss gemäß den hundschen Regeln der Spin der linken Hälfte des p-Orbitals nach unten gerichtet sein. Demzufolge bleibt dem Elektron in der rechten Hantelhälfte wegen des Pauli-Prinzips nur noch eine Orientierung nach oben. Es kann ebenso in die 3d-Schale des rechten Eisenions eingebaut werden, jedoch nur antiparallel zu den fünf Eisenelektronen orientiert, deren Spins folglich nach unten zeigen müssen. Coulomb-Wechselwirkung und Pauli-Prinzip bewirken hier also eine antiparallele Orientierung der Eisenspins. Superaustauschwechselwirkung wird üblicherweise als isotrop angenommen und ebenfalls durch den phänomenologischen Hamilton-Operator (2.1) beschrieben (Bencini und Gatteschi 1990). Zu betonen ist, dass der Superaustausch im Eisen-Schwefel-Zentrum vom Eisen-Schwefel-Abstand und dem Eisen-Schwefel-Eisen-Winkel abhängt (Bertini et al. 1995). Bilden die drei Ionen einen rechten Winkel, verschwindet mangels Überlapp des p-

Orbitals mit den 3d-Orbitalen des Eisens die Austauschwechselwirkung vollständig (Kronmüller und Lambeck 1992). Entscheidend für die Bedeutung von Superaustausch im Eisen-Schwefel-Zentrum von HiPIPs ist dessen *Abweichung* von idealer Würfelform. Der Eisen-Schwefel-Eisen-Winkel berechnet sich aus Strukturdaten für das HiPIP I *E. halophila* (Banci et al. 1994) zu $73^\circ \pm 6^\circ$ bzw. für das HiPIP *C. vinosum* (Jensen 1987) zu $75^\circ \pm 2^\circ$ und ist somit von 90° deutlich verschieden. Im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/3+}$ -Zentrum von HiPIPs findet zwischen paarweise je zwei Eisenionen Superaustausch statt.

Ein für Eisen-Schwefel-Zentren charakteristischer Austauschmechanismus ist die Doppelaustauschwechselwirkung, die stets eine parallele Spinorientierung innerhalb eines gemischt-valenten Spinpaares bewirkt (Blondin und Girerd 1990). Ihr Vorkommen ist auf Systeme beschränkt, in denen zwei paramagnetische Ionen desselben Elements in verschiedenen Oxidationsstufen auftreten. Dies ist in Abb. 2.2c schematisch für ein bivalentes und ein trivalentes Eisenion dargestellt. Das nach den hundschen Regeln zuletzt eingebaute und daher am schwächsten gebundene 3d-Elektron des Fe^{2+} -Ions ist das einzige mit „Spin down“. Es wird elektrostatisch vom Fe^{3+} -Ion stärker angezogen als von seinem schwächer geladenen Mutterion und springt deshalb in die 3d-Schale dieses Eisens. Dieser Prozess erfolgt ohne Änderung der Spinorientierung, da zur Drehung des magnetischen Momentes gegen das Magnetfeld Arbeit geleistet werden müsste. Um im Einklang mit dem Pauli-Prinzip in die genau halb gefüllte 3d-Schale des Eisenions eingebaut werden zu können, müssen nun aber alle fünf 3d-Elektronen des bisher trivalenten Eisenions ihren Spin nach oben gerichtet haben. Der Hopping-Prozess bewirkt also stets zueinander parallel orientierte Spins der beiden paramagnetischen Ionen. Doppelaustauschwechselwirkung wird über folgenden Hamilton-Operator beschrieben (Kahn 1993)

$$\mathbf{H} = -B_{ij} \mathbf{T}_{ij} \quad (2.2)$$

wobei B_{ij} ein Maß für die Stärke der zwischen den paramagnetischen Spezies i und j wirkenden Austauschwechselwirkung ist und wegen des grundsätzlich parallel ordnenden Charakters der Doppelaustauschwechselwirkung in dieser Vorzeichenkonvention immer positiv ist. Dabei ist der *Spin dependent delocalization operator* \mathbf{T}_{ij} selbsterklärend über folgende Operatorbeziehung definiert:

$$\mathbf{T}_{ij} |i S m_S \rangle = (S + 1/2) |j S m_S \rangle \quad (2.3)$$

2.3 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentren in oxidierten HiPIPs

2.3.1 Quantenmechanische Spinkopplungsmodelle

Im oxidierten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Redoxzustand enthalten HiPIPs unter Berücksichtigung der Lemmas I und III aus Kap. 1.3 formal drei Fe^{3+} -Ionen und ein Fe^{2+} -Ion. Zwar sind die grundlegenden Verhältnisse im Eisen-Schwefel-Zentrum oxidierteter HiPIPs aus Mössbauer- (Middleton et al. 1980, Bertini et al. 1993a), NMR- (Banci et al. 1991, 1993, 1994, Bertini et al. 1995, 1995a, 1995b) und EPR-Messungen (Dunham et al. 1991, Bertini et al. 1993a, Kappl et al. 1999) bekannt, dennoch liegt ein allgemein akzeptiertes Modell der genauen magnetischen Kopp-

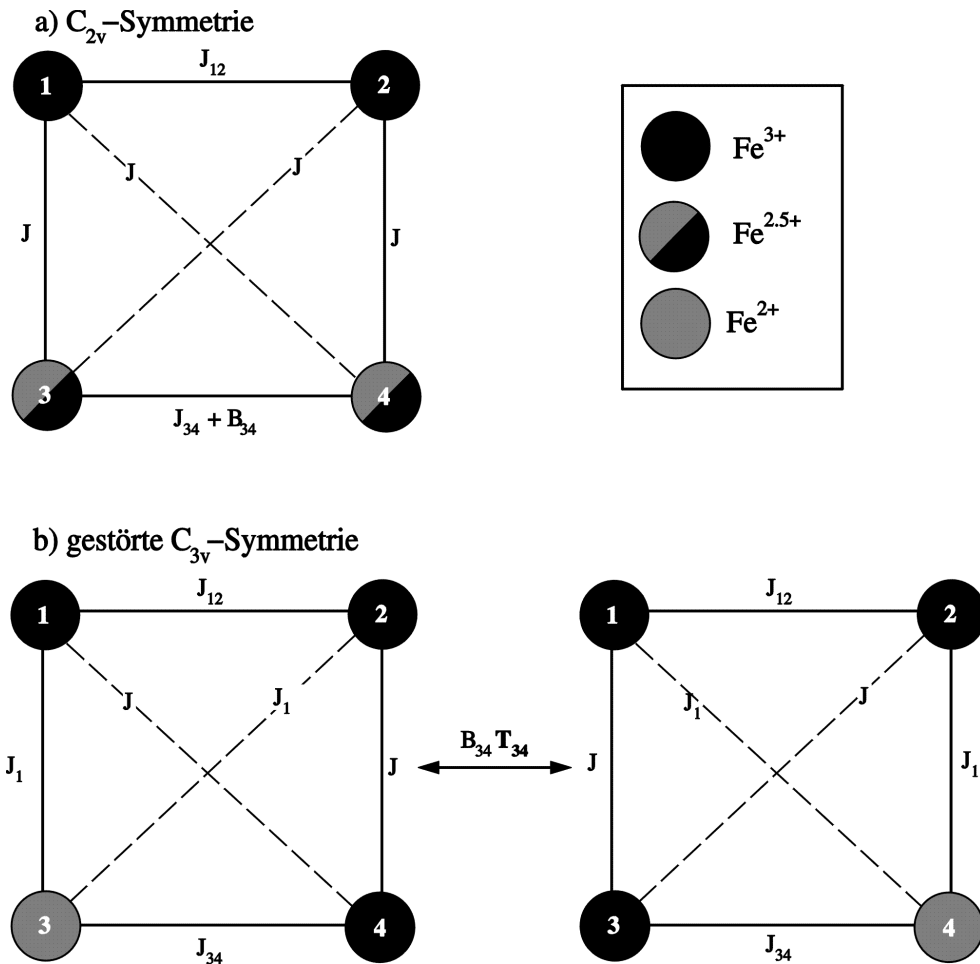


Abb. 2.3 Modelle für die magnetische Kopplung der Eisenspins in oxidierten HiPIPs a) C_{2v} -Symmetrie b) gestörte C_{3v} -Symmetrie

lungsmechanismen innerhalb des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Kubanen bis heute nicht vor. Einigkeit besteht darüber, dass der Cluster aus zwei stark gekoppelten Spinpaaren, einem reinen Fe^{3+} -Paar mit Spinquantenzahl S_{12} und einem gemischt-valenten $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paar, beschrieben durch S_{34} , besteht. Diese Spins koppeln antiparallel zum Netto-Cluster Spin S . Uneins ist man sich in der Literatur, ob der Cluster durch eine reine oder eine gemischte Wellenfunktion beschrieben werden muss und in welcher Größenordnung der Term B_{34} liegt. Die beiden vertretenen Modelle für den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster werden im Weiteren vorgestellt.

2.3.1.1 Reine Wellenfunktion (C_{2v} -Symmetrie)

Abb. 2.3a zeigt eine zweidimensionale Projektion der Eisenionen des Metallzentrums oxidiertes HiPIPs. Zwei Eisenionen sind dreiwertig, die anderen beiden infolge Doppelaustauschwechselwirkung in einem Oxidationszustand zwischen zwei und drei. In dreidimensionaler Anordnung besetzen die Eisenionen nichtbenachbarte Ecken des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Kubanen und spannen somit einen Tetraeder auf. Sieht man den Cluster vereinfacht als idealen Würfel an, so befände sich das Eisen-System in der gruppentheoretischen Symmetrie C_{2v} . Ein sinnvoller Ansatz zur Beschreibung der magnetischen Austauschwechselwirkung in diesem Spingebilde ist folgender Hamiltonian \mathbf{H} (Noodleman 1988, 1991):

$$\mathbf{H} = J \sum_{i \neq j} \mathbf{S}_i \mathbf{S}_j + (J_{12} - J) \mathbf{S}_1 \mathbf{S}_2 + (J_{34} - J) \mathbf{S}_3 \mathbf{S}_4 - B_{34} \mathbf{T}_{34} \quad (2.4)$$

in der Basis der Eigenzustände $|\psi\rangle$

$$|\psi\rangle = |S_{12} S_{34} S\rangle \quad (2.5)$$

Mit diesem Hamiltonian wird Superaustauschwechselwirkung zwischen je zwei Eisenionen mit konstanter Austauschkonstante J angenommen. Lediglich die Wechselwirkung der beiden ausgezeichneten Spinpaare 12 und 34 werden durch Austauschkonstanten J_{12} , J_{34} beschrieben. Doppelaustauschwechselwirkung innerhalb des gemischt-valenten Spinpaars S_{34} wird mit der Stärke B_{34} berücksichtigt. Das Eigenwertproblem ist in diesem Fall analytisch lösbar und liefert folgenden Ausdruck für die Energie des im reinen Zustand $|S_{12} S_{34} S\rangle$ befindlichen Spinsystems:

$$E = 1/2[JS(S + 1) + (J_{12} - J)S_{12}(S_{12} + 1) + (J_{34} - J)S_{34}(S_{34} + 1)] - B_{34}(S_{34} + 1/2) \quad (2.6)$$

Setzt man in (2.6) magnetische Austauschparameter ein, die mit Suszeptibilitätsmessungen an Modellkomplexen bestimmt wurden (Jordanov et al. 1990), so erhält man unter der Prämisse $J_{34} = J$ als Grundzustand des Spinsystems $|4 \ 9/2 \ 1/2\rangle$, der mit dem nächst höherliegenden Niveau $|3 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ bei einer Anregungsenergie von $k_B \cdot 16$ K nahezu entartet ist. Beträchtliche 226 K darüber befindet sich der zweite Anregungszustand $|2 \ 5/2 \ 1/2\rangle$. Das erste Niveau mit einem von $S = 1/2$ verschiedenem Netto-Cluster-Spin ist $|9/2 \ 3 \ 3/2\rangle$ mit einer Anregungsenergie von 577 K. Zu beachten ist, dass zwischen den Parametern B_{34} und J_{34} eine Korrelation besteht (vgl. (2.6)), so dass die experimentellen Befunde sowohl mit $J_{34} = J$ und einem großen Wert von B_{34} als auch mit $J_{34} > J$ und einem kleinen Wert von B_{34} kompatibel sind. Der gemischt-valente Charakter des durch S_{34} beschriebenen Eisenpaars fordert aber zwingend $B_{34} > 0$.

Aus dem Spinmodell lässt sich folgern, dass in HiPIPs Spinfrustration vorliegt: innerhalb des Spinpaars S_{12} etwa tritt ausschließlich eine antiparallel ordnende Wechselwirkung $J_{12} > 0$ auf, trotzdem erfolgt die Ausrichtung von S_1 und S_2 jedenfalls überwiegend parallel. Ursache dafür sind die vielfältigen Austauschwechselwirkungen im Cluster, deren Orientierungsvorgaben nicht alle gleichzeitig erfüllbar sind. S_1 etwa müsste sich wegen J , $J_{12} > 0$ antiparallel sowohl zu S_2 als auch zu S_3 und S_4 orientieren. Entsprechendes gilt für S_2 bezüglich S_1 , S_3 und S_4 . Damit spüren S_1 und S_2 gleichzeitig parallel als auch antiparallel ordnende Kräfte. Die Parallelorientierung innerhalb S_{12} und S_{34} ist somit nur Resultierende aller Einzelwechselwirkungen.

2.3.1.2 Gemischte Wellenfunktion (gestörte C_{3v} -Symmetrie)

Jüngere Arbeiten schlagen das in Abb. 2.3b dargestellte Konzept für die Beschreibung des Magnetsystems in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentren vor, das ebenfalls in Einklang mit allen bisherigen experimentellen Befunden steht (Belinskii et al. 1995, Belinskiy et al. 1996). Es interpretiert die Verhältnisse im Cluster als Ergebnis schneller Übergänge zwischen zwei

gleichpopulierten Eisen-Schwefel-Zentren mit C_{3v} -Symmetrie, die sich aufgrund kleiner Abweichungen von der idealen Würfelstruktur ausbilden. In den beiden Grenzstrukturen finden sich ein bivalentes und drei trivalente Eisenionen. Zwischen den energetisch gleichwertigen Konfigurationen führt die Doppelaustauschkraft B_{34} schnelle Übergänge herbei. Im Zeitmittel nimmt das Experiment einen Cluster wahr, wie er in Abb. 2.3a illustriert ist. Der Hamiltonian

$$\mathbf{H} = 1/2[J_1(\mathbf{S}^2 - 3/4) + (J - J_1)\mathbf{S}_{123}^2 + (J_{12} - J)\mathbf{S}_{12}^2 + (J_{34} - J)\mathbf{S}_{34}^2] - B_{34}\mathbf{T}_{34} \quad (2.7)$$

beschreibt das Modell mit Superaustauschkonstanten J für Fe^{3+} - Fe^{3+} -Kopplungen, J_1 für Fe^{2+} - Fe^{3+} -Kopplungen, sowie J_{12} und J_{34} für die ausgezeichneten magnetischen Wechselwirkungen innerhalb der Spinpaare 12 und 34. Doppelaustausch $-B_{34}\mathbf{T}_{34}$ treibt das sechste 3d-Elektron an, zwischen den Eisenplätzen 3 und 4 zu delokalisieren. Der Hamiltonian (2.7) ist in der Basis der Eigenzustände $|\mathbf{S}_{12} \mathbf{S}_{34} S\rangle$ nur numerisch lösbar und liefert als Grundzustand $|\psi_g\rangle$ des Magnetsystems unter Benutzung der mittels Suszeptibilitätsmessungen (Jordanov et al. 1990) bestimmten Austauschkonstanten als Grundzustand die gemischte Wellenfunktion

$$|\psi_g\rangle = 0.95 |4 \ 9/2 \ 1/2\rangle - 0.31 |4 \ 7/2 \ 1/2\rangle \quad (2.8)$$

Das Niedrigsymmetriemodell verquickt also den vom C_{2v} -Modells favorisierten reinen Grundzustand $|4 \ 9/2 \ 1/2\rangle$ mit einer kleinen $|4 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ -Beimischung. Korrespondierend damit werden Mittelwerte für die \mathbf{A} -Tensoren des Fe^{3+} -Paares und des gemischt-valenten Paares von $A_{12} = +20.8$ MHz sowie $A_{34} = -32.3$ MHz in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Systemen vorausgesagt, was die experimentelle Überprüfung des Modells ermöglicht. Die Verfechter dieses Modells weisen zutreffend darauf hin, dass auch ein kleiner - nicht jedoch ein verschwindender - Doppelaustauschparameter B_{34} die Magnetkopplung erklären kann und dass der Zahlenwert von B_{34} stark modellabhängig ist.

2.3.2 Das Vektormodell

Das sogenannte Vektormodell wurde ursprünglich für $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -Zentren entwickelt (Dunham et al. 1971) und später auf Tetramere (Middleton et al. 1978, 1980) und Trimere (Papefthymiou et al. 1987) erweitert. Es erlaubt die Bestimmung von Spinquantenzahlen eines gekoppelten Spinsystems aus gemessenen \mathbf{A} -Werten des Komplexes. Die grundlegende Idee besteht darin, die Hyperfeinparameter a_i eines ungekoppelten Eisenions i mit dessen \mathbf{A} -Wert im gekoppelten Zustand A_i zu verknüpfen. Die zugehörige Proportionalitätskonstante ist $\langle \mathbf{S}_{iz} \rangle / \langle \mathbf{S}_z \rangle$, also das Verhältnis der Erwartungswerte der z -Komponenten im ungekoppelten Eisenspin i und im gekoppelten Komplex.

$$A_i = \frac{\langle \mathbf{S}_{iz} \rangle}{\langle \mathbf{S}_z \rangle} a_i \equiv K_i a_i \quad (2.9)$$

Die Veränderung der Spinerwartungswerte beim Übergang vom ungekoppelten in den gekoppelten Zustand modifizieren auch die \mathbf{A} -Werte. Die Koeffizienten K_i lassen sich mit Spinprojektionstechniken (Noodleman 1988) ebenso berechnen wie allein aus der Annahme,

$K_1 = \frac{\langle \mathbf{S}_{1z} \rangle}{\langle \mathbf{S}_z \rangle} = \frac{\alpha\gamma}{\Delta_1}$ $K_2 = \frac{\langle \mathbf{S}_{2z} \rangle}{\langle \mathbf{S}_z \rangle} = \frac{\alpha\gamma}{\Delta_1}$ $K_3 = \frac{\langle \mathbf{S}_{3z} \rangle}{\langle \mathbf{S}_z \rangle} = \frac{\delta_1\varepsilon}{\Delta_2}$ $K_4 = \frac{\langle \mathbf{S}_{4z} \rangle}{\langle \mathbf{S}_z \rangle} = \frac{\delta_2\varepsilon}{\Delta_2}$	$\alpha = 1/2[\mathbf{S}_{12}(\mathbf{S}_{12}+1)+\mathbf{S}_1(\mathbf{S}_1+1)-\mathbf{S}_2(\mathbf{S}_2+1)]$ $\gamma = 1/2[\mathbf{S}(\mathbf{S}+1)+\mathbf{S}_{12}(\mathbf{S}_{12}+1)-\mathbf{S}_{34}(\mathbf{S}_{34}+1)]$ $\Delta_1 = \mathbf{S}_{12}(\mathbf{S}_{12}+1)\mathbf{S}(\mathbf{S}+1)$ $\varepsilon = 1/2[\mathbf{S}(\mathbf{S}+1)+\mathbf{S}_{34}(\mathbf{S}_{34}+1)-\mathbf{S}_{12}(\mathbf{S}_{12}+1)]$ $\delta_1 = 1/2[\mathbf{S}_{34}(\mathbf{S}_{34}+1)+\mathbf{S}_3(\mathbf{S}_3+1)-\mathbf{S}_4(\mathbf{S}_4+1)]$ $\delta_2 = 1/2[\mathbf{S}_{34}(\mathbf{S}_{34}+1)+\mathbf{S}_4(\mathbf{S}_4+1)-\mathbf{S}_3(\mathbf{S}_3+1)]$ $\Delta_2 = \mathbf{S}_{34}(\mathbf{S}_{34}+1)\mathbf{S}(\mathbf{S}+1)$
---	---

Tab. 2.2 Theorieparameter aus dem Vektormodell (Noodleman 1988)

dass die magnetische Energie beim Übergang vom ungekoppelten in den gekoppelten Zustand unverändert bleibt (Anhang B in Dilg 1997). Für ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -System mit den Fe^{3+} -Einzelspins $S_1 = S_2 = S_3 = 5/2$, dem Fe^{2+} -Einzelspin $S_4 = 2$, den gepaarten Spins S_{12} und S_{34} , sowie dem Netto-Cluster-Spin S ergeben sich die in Tab. 2.2 dargestellten Ausdrücke K_i .

Für das Fe^{3+} -Paar gilt

$$A_1 = A_2 \equiv A_{12} \quad (2.10)$$

und für das $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paar

$$A_{34} \equiv 1/2(A_3 + A_4) \quad (2.11)$$

Den Spingrundzustand $|S_{12} S_{34} S\rangle$ im Sinne des C_{2v} -Modells (Kap. 2.3.1.1) erhält man, indem man mit experimentellen Tensormittelwerten A_{12} , A_{34} unter Zuhilfenahme von (2.10), (2.11) dasjenige Tripel S_{12} , S_{34} , S sucht, für welches (2.9) mit geeignet gewählten Werten a_i bestmöglich erfüllt ist. Aus diesem Konzept folgt zweierlei:

- i) Das Vektormodell ist nur anwendbar auf Systeme mit wenigstens näherungsweise isotropen \mathbf{A} -Tensoren.
- ii) Es sind geeignete Referenzsysteme auszuwählen, die als Quelle für a_i -Werte dienen. Einerseits wird a_i für zwei- und dreiwertiges Eisen verschieden sein. Andererseits sollte das Eisen im Referenzsystemen eine ähnliche biochemische Umgebung wie im HiPIP aufweisen, weshalb man a_i anderen cysteinligandierten Eisen-Schwefel-Proteinen entnehmen sollte. Schließlich muss das Eisen in den Referenzsystemen ungekoppelt sein.

Das Vektormodell wurde in der Literatur auf das HiPIP II *E. halophila* angewendet, wobei die \mathbf{A} -Tensoren der beiden Eisenpaare mit Mößbauer-Spektroskopie (Bertini et al. 1993a) und mit ^{57}Fe -ENDOR (Kappl et al. 1999) bestimmt wurden. Auch wenn die Autoren eine Tendenz zu einem $|3 \ 7/2 \ 1/2\rangle$ -Grundzustand feststellten, konnte ein möglicher Grundzustand $|4 \ 9/2 \ 1/2\rangle$

nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Einkristall- ^{57}Fe -ENDOR-Messungen an $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Modellkomplexen favorisieren einen $|3\ 7/2\ 1/2\rangle$ -Grundzustand (Mouesca et al. 1993).

2.3.3 Elektronische Isomere in oxidierten HiPIPs

Der magnetische Grundzustand des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Clusters aus Abb. 2.3a ist sechsfach entartet. Denn für das gemischt-valente Eisenpaar existieren kombinatorisch sechs Möglichkeiten, sich auf zwei der vier Cystein-Bindungsstellen zu verteilen („zwei aus vier“). Diese Entartung wird jedoch durch geometrische Abweichungen von idealer Tetraedersymmetrie der Eisenionen sowie durch das Kristallfeld aufgehoben. Insbesondere in Proteinen wäre demzufolge zu erwarten, dass von den sechs möglichen Konfigurationen lediglich eine zu beobachten sein sollte (Kappl et al. 1999). Den oxidierten HiPIP-Cluster kann man als $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{4+}$ -System mit vier trivalenten Eisenionen ansehen, dem ein zusätzliches Elektron hinzugefügt wird. Dieses wird sich bevorzugt an dasjenige Eisenpaar anlagern, welches das höchste Redoxpotential besitzt. Nur falls mehrere Eisenpaare ähnlich günstig sind, wird sich ein charakteristisches Verhältnis mehrerer Isomere ausbilden.

Abb. 2.4 zeigt ein solches Gleichgewicht zweier Isomere, wie es mit NMR bei Raumtemperatur bestimmt wurde. Solche Messungen ermöglichen es, die ^1H -Resonanzen der β - CH_2 -Protonen den an den Cluster angelagerten Cysteinen zuzuordnen. Vorzeichen und Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen lassen zu, die Nummer des Cysteinliganden in der Proteinsequenz mit dem Oxidations- bzw. Magnetzustand des daran gebundenen Eisens zu korrelieren. Im Falle mehrerer Isomere verschieben deren Beimischungen Werte und Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebung charakteristisch (Bertini et al. 1995). Das NMR-Experiment ist nur im Falle des HiPIP II *E. halophila* mit der Existenz eines Isomers kompatibel (Banci et al. 1991). In allen anderen untersuchten HiPIPs ist ein Gleichgewicht von (mindestens) zwei elektronischen Isomeren vonnöten, um die experimentellen Daten zu erklären. Übergänge zwischen diesen Grenzstrukturen erfolgen schnell gegen die für NMR charakteristische Zeitskala von 10^{-4} s. Tab. 2.3 gibt für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine die Anteile des „Major Isomer“ und des „Minor Isomer“ an.

Auch EPR-Messungen bei Temperaturen von 20 - 30 K zeigen bei allen bislang untersuchten HiPIPs wiederum mit Ausnahme des HiPIP II *E. halophila* die Anwesenheit mehrerer Spezies (Überblick: Bertini et al. 1995). Die Ausnahmerolle des HiPIP II *E. halophila* lässt es plausi-

Biologisches System	α [%]	Literaturstelle
HiPIP II <i>E. halophila</i>	100	Bertini et al. 1995
HiPIP I <i>E. halophila</i>	80 \pm 5	Bertini et al. 1995b
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	60 \pm 5	Babini et al. 1996
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	35 \pm 5	Babini et al. 1996

Tab. 2.3 Anteil α des linken Isomers aus Abb. 2.4 bei Zimmertemperatur aus NMR-Messungen für verschiedene Proteine; der verbleibende Anteil $1-\alpha$ entfällt in allen Fällen auf das rechte Isomer in Abb. 2.4

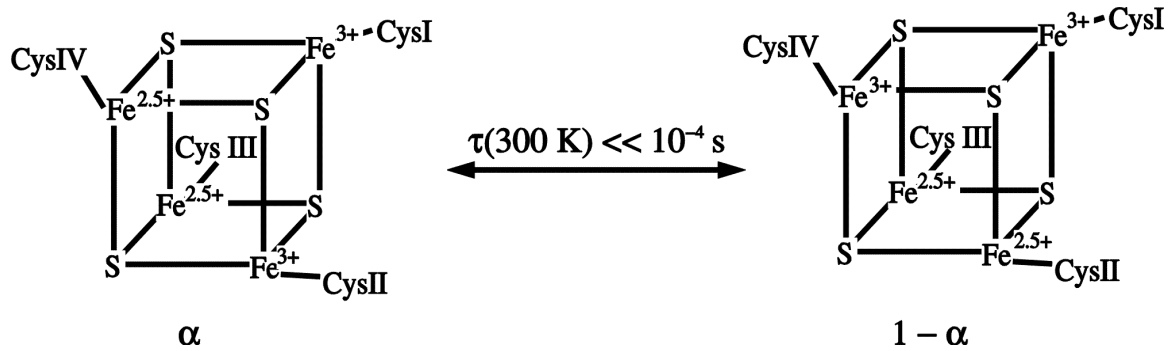


Abb. 2.4 Die elektronischen Isomere oxidierter HiPIPs aus NMR-Untersuchungen

bel erscheinen, EPR- und NMR-Isomere als identisches Phänomen anzusehen. Verschiedene elektronische NMR-Isomere wurden auch in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Zentren gefunden (Calzolari et al. 1997).

2.4 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentren in reduzierten HiPIPs

Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrum in reduziertem HiPIP weist ein Elektron mehr auf als oxidiertes und besteht somit formal aus je zwei bivalenten und zwei trivalenten Eisenionen. Es ist diamagnetisch ($S = 0$), was aus dem Fehlen eines EPR-Signals und an einem Mößbauer-Spektrum ohne magnetische Aufspaltung gefolgert werden kann (Middleton et al. 1980). Der verschwindende Gesamtspin deutet auf eine vollständig antiparallele Kopplung der Spins zweier mutmaßlich gemischt-valenter Eisenpaare hin, weswegen das Spinsystem durch einen Hamiltonian der Form (2.6) plus einen Doppelaustauschterm für das Paar 12 zu beschreiben sein dürfte.

Bedeutung erlangte jüngst das reduzierte HiPIP *C. vinosum* WT in der Faltungsforschung, die sich dem Verständnis der Vorgänge bei der Faltung der Aminosäurekette zu einem dreidimensionalen Gebilde widmet (Creighton 1996). In Anwesenheit des Entfaltungsgagenten Guanidiniumchlorid bildet sich ein stabiler teilweise entfalteter Zwischenzustand zwischen nativem und denaturiertem HiPIP aus ("molten globule"). Eine Charakterisierung des teilweise entfaltenen Proteins mittels NMR ergab (Abb. 1.6), dass die vierfache Cysteinligandierung des intakten Eisen-Schwefel-Clusters erhalten bleibt, die Sekundärstruktur des Proteins weitgehend aufgelöst wird und die Beweglichkeit des teilweise entfaltenen Moleküls im Vergleich zum intakten dramatisch erhöht ist (Bertini et al. 1997, Bontrop et al. 1999).

3 Grundlagen der Messmethoden

3.1 Paramagnetische Elektronenrelaxation

Da der Effekt der paramagnetischen Elektronenrelaxation bei den meisten der hier relevanten spektroskopischen Methoden maßgebliche Bedeutung hat, sollen die gemeinsamen Grundlagen an dieser Stelle erarbeitet werden. Ausführliche Abhandlungen finden sich bei Wickman und Wertheim (1968) oder bei Pilbrow (1990).

3.1.1 Allgemeines

Ein Spin-Ensemble befinde sich auf einer Spin-Temperatur und führe einen intrinsischen Energieausgleich mit einer der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 inversen Geschwindigkeit durch (Altschuler und Kosyrew 1964). Dieses Spin-System ist in das Phononenbad, das als ein auf einer bestimmten Gittertemperatur befindlicher Thermostat angesehen wird, eingebettet. Spin- und Gittersystem laufen mit der Zeitkonstante T_1 (Spin-Gitter-Relaxationszeit) in ein gemeinsames thermodynamisches Gleichgewicht ein. In der Blochschen Relaxationstheorie (Schatz und Weidinger 1992) wird eine longitudinale und eine transversale Relaxationszeit eingeführt. Erstere beschreibt die Zeitkonstante, mit der sich der Gleichgewichtszustand nach einer plötzlichen Amplitudenänderung des externen Magnetfeldes unter Beibehaltung von dessen Richtung wieder einstellt und ist mit der oben definierten Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 identisch. Die transversale Relaxationszeit ist ein Synonym für T_2 . Denn sie bestimmt die Zeit der Nachwirkung, wenn nur die Richtung, nicht aber der Betrag des externen Magnetfeldes geändert wird.

Tragen beiden Relaxationsmechanismen unabhängig voneinander bei, so kann eine effektive Relaxationszeit T_{eff} zur Beschreibung des resultierenden Einflusses eingeführt werden

$$T_{\text{eff}}^{-1} = T_1^{-1} + T_2^{-1} \quad (3.1)$$

Diese Formulierung ist äquivalent mit der Aussage, dass sich die Linienverbreiterungsbeiträge der beiden fundamentalen Relaxationsmechanismen unabhängig voneinander addieren. Die Relaxationsrate γ_i ist als Reziproke der zugehörigen Relaxationszeit T_i definiert:

$$\gamma_i = T_i^{-1} \quad (3.2)$$

3.1.2 Spin-Gitter-Relaxationszeit

Liegt reine Spin-Gitter-Relaxation vor, so führt dies zwar zu einer Linienverbreiterung T_1^{-1} , die Linienform gehorcht aber weiterhin streng einer Lorentzverteilung. Die Funktion zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxation setzt sich im Allgemeinen aus drei Komponenten zusammen,

$$T_1^{-1} = C_1 \coth(hf/2k_B T) + C_2 T^n + C_3 \Delta^3 [\exp(\Delta/k_B T) - 1]^{-1} \quad (3.3)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante und C_1, C_2, C_3 systemabhängige Parameter sind.

Der erste Term in (3.3) beschreibt den Einfluss direkter Prozesse, deren Physik Abb. 3.1a veranschaulicht. Ein im magnetischen Anregungszustand befindlicher Spin geht durch inelastische Wechselwirkung mit dem Phononenfeld unter Emission eines Gitterquants in den Grundzustand über. Im Grenzfall $hf \ll 2k_B T$ ergibt sich eine lineare Temperaturabhängigkeit des Beitrages direkter Ein-Phononen-Prozesse zur reziproken Spin-Gitter-Relaxationszeit. Bei tiefen Temperaturen, wo nur wenige Phononen thermisch angeregt sind, können Heliumbad und Phononensystem ins thermodynamische Ungleichgewicht geraten. Tritt ein solcher "Phonon Bottleneck" auf, so gilt abweichend vom ersten Term in (3.3) für die Temperaturabhängigkeit der direkten Relaxation (Abragam 1986, Scott und Jeffries 1962)

$$T_{1\text{direkt}}^{-1} = \frac{T^2}{C_{10} + C_{11}T} \quad (3.4)$$

wobei $C_{11} = 0$ werden kann. Ein solches Verhalten wurde experimentell für ein $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -Protein (Gayda et al. 1979) und für ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Protein (Bertrand et al. 1981) gefunden.

Abb. 3.1b stellt den als Raman-Prozess bezeichneten Spin-Gitter-Relaxationsmechanismus dar. Von einem angeregten magnetischen Niveau aus wird ein Phonon absorbiert und damit ein energetisch höher liegender virtueller Phononenzustand bevölkert. Von diesem aus kann dann unter Emission eines zweiten Phonons eine Rückführung des Spins in den Grundzustand $|g\rangle$ erfolgen. Mathematisch führt dies zu einer durch ein Potenzgesetz beschreibbaren Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationsrate. Der Exponent n in (3.3) kann dann folgende Werte annehmen:

- $n=5$ Multiplett mit kleiner Aufspaltung
- $n=7$ Nicht-Kramers-Dublett
- $n=9$ Kramers-Dublett

Auch fraktale Werte für n wurden experimentell gefunden und theoretisch diskutiert (Abragam 1986).

Der letzte Term in (3.3) berücksichtigt sogenannte Orbach-Prozesse. Der zugrundeliegende Mechanismus (Abb. 3.1c) entspricht bis auf ein entscheidendes Detail dem Raman-Prozess: Das hochenergetische Niveau ist nun kein virtueller Phononenzustand, sondern ein wohldefinierter Eigenzustand des Spinsystems. Letzterer muss energetisch wesentlich höher liegen als das mittlere Level, was in der Nomenklatur von Abb. 3.1c der Bedingung entspricht

$$\Delta \gg \delta \quad (3.5)$$

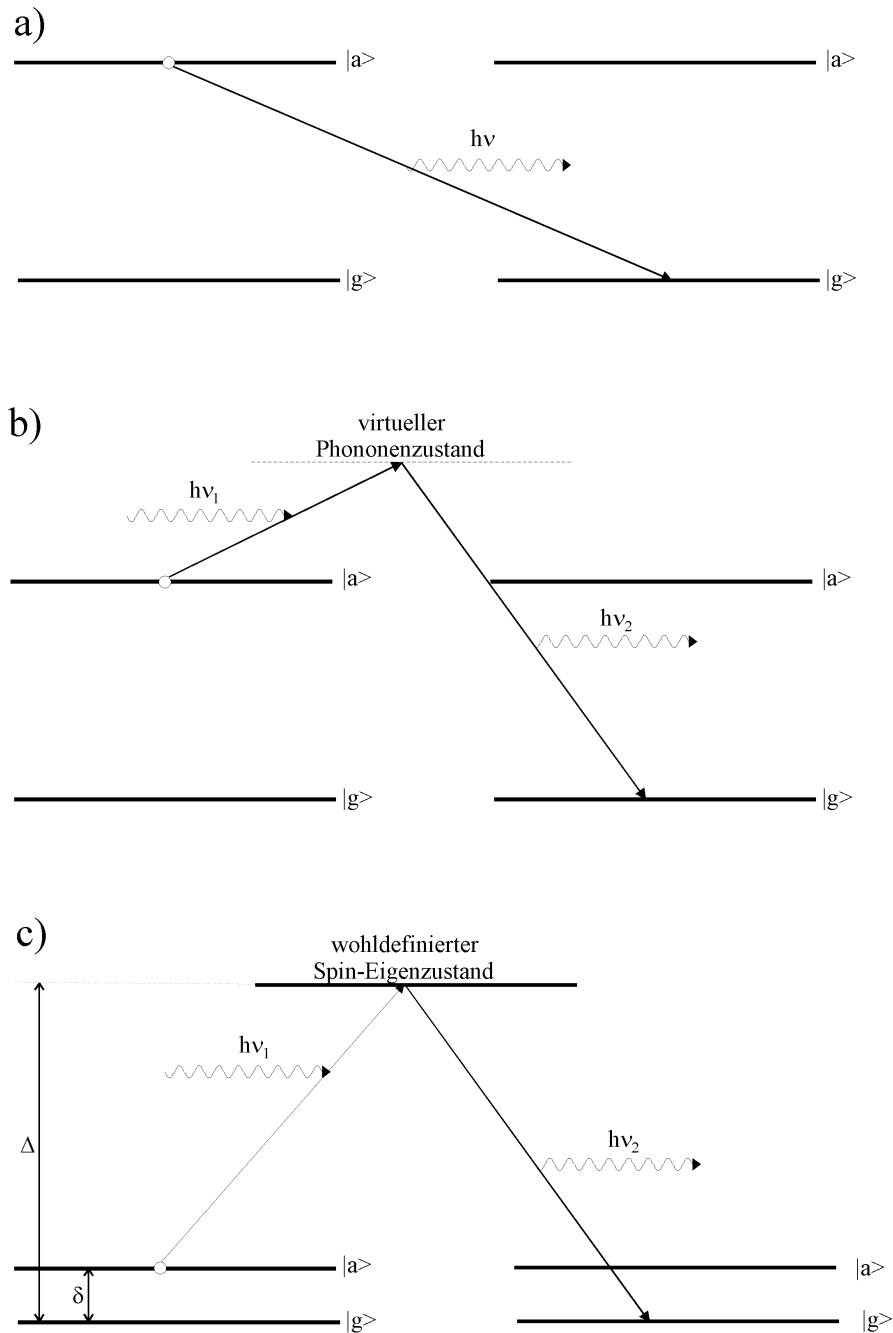


Abb. 3.1 Energieniveauschema eines Elektronenspins für die drei grundlegenden Spin-Gitter-Relaxationsmechanismen (Erläuterung im Text) a) direkter Prozess b) Raman-Prozess c) Orbach-Prozess

Gilt zudem $\Delta \gg k_B T$, so vereinfacht sich die Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationsrate infolge von Orbach-Prozessen zu einem Arrhenius-Faktor. Da der Temperaturverlauf für diesen Mechanismus von Δ abhängt, ermöglicht die Messung der Temperaturabhängigkeit die Bestimmung dieses Parameters.

3.1.3 Spin-Spin-Relaxationszeit

Die Spin-Spin-Relaxation resultiert aus einem Energieaustausch innerhalb des Spin-Ensembles und ist temperaturunabhängig. Sie beruht vorrangig auf magnetischer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen benachbarten magnetischen Momenten. Darüber hinaus sind auch Wechselwirkungen elektrischer Quadrupole und Dipole zu berücksichtigen. Sind permanente magnetische Dipole näher benachbart als etwa 5 Å, ist auch Austauschwechselwirkung in Betracht zu ziehen. Spin-Spin-Wechselwirkung hängt von der Konzentration der magnetischen Partikel ab. Bei ausreichender Verdünnung wird die Spin-Spin-Relaxation nur von molekulinternen Prozessen gesteuert. Proteine sind in der Regel quasi „natürlich verdünnt“, da in ihnen der Anteil paramagnetischer Zentren am Gesamtmolekül klein ist (Pilbrow 1990) und da die magnetischen Momente im Inneren des Proteins durch eine Wand von Aminosäuren von anderen Magnetzentren getrennt sind. Im Unterschied zur Spin-Gitter-Relaxation ist die Form einer infolge Spin-Spin-Relaxation verbreiterten Absorptionslinie näherungsweise durch eine Gauß-Funktion beschreibbar, weil diese Verteilung die Überlappung eines Konglomerats vieler schmaler Spin-Pakete repräsentiert, die aufgrund von Spin-Spin-Wechselwirkung gegenüber der Zentralfrequenz verschoben sind. Von diesem Effekt zu unterscheiden, aber experimentell schwer abzutrennen, ist die weiter oben beschriebene Inhomogenitätsverbreiterung. Wesentlich ist, dass von exotischen Phänomenen abgesehen (Blume 1967, Wickman und Wertheim 1968) Spin-Spin-Relaxation *temperaturunabhängig* ist. Abragam (1986) folgert dies aus der Tatsache, dass die für Spin-Spin-Relaxation relevanten Terme im Hamilton-Operator selbst temperaturunabhängig sind.

3.2 Mößbauer-Spektroskopie

Die Mößbauer-Spektroskopie ist mehr als vierzig Jahre nach der Entdeckung des zugrundeliegendem Effektes noch immer eine hochmoderne spektroskopische Methode, die in vielen Gebieten der Naturwissenschaften Anwendung findet (Parak und Trautwein 2000). Methodische Fortentwicklungen der Methode wie Mößbauer-Experimente mit Synchrotronstrahlung (Smirnov 1996) oder Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung (Parak und Achterhold 1995) eröffnen neue Möglichkeiten. Darüber hinaus existieren zahlreiche Nischenanwendungen, die von archäologischen Untersuchungen bis zum Bau hochgenauer kryogener Thermometer reichen. Vollständige Abhandlungen der Methode finden sich bei Wegener (1965), bei Gonser (1975, 1981) sowie bei Goldanskii und Herber (1968). Der Untersuchung biologischer Proben und speziell der Proteindynamik mittels Mößbauer-Spektroskopie widmen sich die Übersichtsartikel von Parak und Reinisch (1985) sowie von Schönemann und Winkler (2000).

3.2.1 Der Mößbauer-Effekt

Bei der Emission eines Photons der Frequenz ν und des Impulses $h\nu/c$ durch einen angeregten freien Atomkern der Masse m verlangt der Impulserhaltungssatz, dass das Atom den entsprechenden Rückstoßimpuls aufnimmt. Dies bewirkt eine relative Frequenzerniedrigung $\Delta\nu/\nu$ des abgestrahlten Quants, die sich aus dem Energieerhaltungssatz ergibt zu:

$$\frac{\Delta\nu}{\nu} = -\frac{h\nu}{2mc^2} \quad (3.6)$$

Dabei sind c die Vakuum-Lichtgeschwindigkeit und h das Plancksche Wirkungsquantum. Entsprechend ist die Resonanzenergie bei der Absorption eines Quants durch ein ruhendes Atom um $\Delta\nu$ erhöht. Emissions- und Absorptionslinie sind folglich um $2\Delta\nu$ gegeneinander verschoben, so dass man Resonanzabsorption nur beobachten könnte, wenn die Linienbreite nicht wesentlich kleiner wäre als die Frequenzverschiebung. Ein Vergleich typischer Linienbreiten von γ -Strahlung (z. B. die natürliche Linienbreite des ^{57}Fe -Mößbauer-Kernübergangs $\Gamma = 4.7 \text{ neV}$) mit charakteristischen Frequenzverschiebungen (z. B. 14.4 keV - ^{57}Fe -Kernübergang: $h\Delta\nu = 1.9 \text{ meV}$) zeigt, dass Resonanzabsorption von γ -Strahlung an freien Atomkernen unmöglich ist. Baut man hingegen den strahlenden und den absorbierenden Kern in einen Festkörper ein, so geht in (3.6) in guter Näherung $m \rightarrow \infty$ und folglich $\Delta\nu \rightarrow 0$. Im Festkörper ist unverschobene Absorption von γ -Quanten also möglich, sofern nicht ein inelastischer Phononenstreuprozess eine Energieverschiebung bewirkt und auf diese Weise die Resonanzfähigkeit zerstört. Die rückstoßfreie Resonanzabsorption beziehungsweise -fluoreszenz von γ -Strahlung, die wegen der geringen Zahl angeregter Phononen bei Temperaturenniedrigung mit erhöhter Wahrscheinlichkeit stattfindet, heißt Mößbauer-Effekt.

Die hervorragende Energieauflösung der Mößbauer-Spektroskopie ist prinzipiell nur durch die Heisenberg-Unschärfe beschränkt und liegt für den Fall von ^{57}Fe bei $\Gamma/E_\gamma = 3.3 \cdot 10^{-13}$. Damit werden winzige energetische Verschiebungen und Aufspaltungen messbar. Mößbauer-Resonanzen sind Lorentzkurven mit der natürlichen Linienbreite Γ , deren Fouriertransformierte im Zeitraum eine abklingende Welle darstellt. In der Realität sorgen linienformverändernde Verbreiterungsmechanismen (Kap. 3.2.4.2) dafür, dass die Linienbreite der Mößbauer-Resonanzen regelmäßig größer ist als die quantenmechanische Untergrenze und dass die Linienform nicht mehr streng einer Lorentzfunktion gehorcht.

In einem Mößbauer-Spektrometer emittiert eine Quelle γ -Strahlung, die bei passender Energie von der zu untersuchenden Probe absorbiert wird. Das Abtasten der Energielandschaft wird experimentell realisiert, indem die Quelle relativ zum Absorber bewegt wird und über die Doppler-Verschiebung ein der Geschwindigkeit proportionales Energieprofil aufgeprägt bekommt. Die vom Detektor in Abhängigkeit von der Doppler-Geschwindigkeit aufgenommene Transmissionsfunktion bezeichnet man als Mößbauer-Spektrum.¹

3.2.2 Der Lamb-Mößbauer-Faktor

Nur ein Teil der Mößbauer-Kerne kann den Resonanzprozess ohne Änderung des Schwingungszustandes des Festkörpers bewerkstelligen. Die temperaturabhängige Wahrscheinlichkeit für unverschobene Resonanzabsorption und -emission heißt Lamb-Möß-

¹ Bei der Konversionselektronen-Mößbauer-Spektroskopie (CEMS) werden dagegen in Reflexion Konversionselektronen in Abhängigkeit von der Antriebsgeschwindigkeit detektiert, womit Rückschlüsse auf Oberflächeneigenschaften des Absorbers gezogen werden können (Schatz und Weidinger 1992).

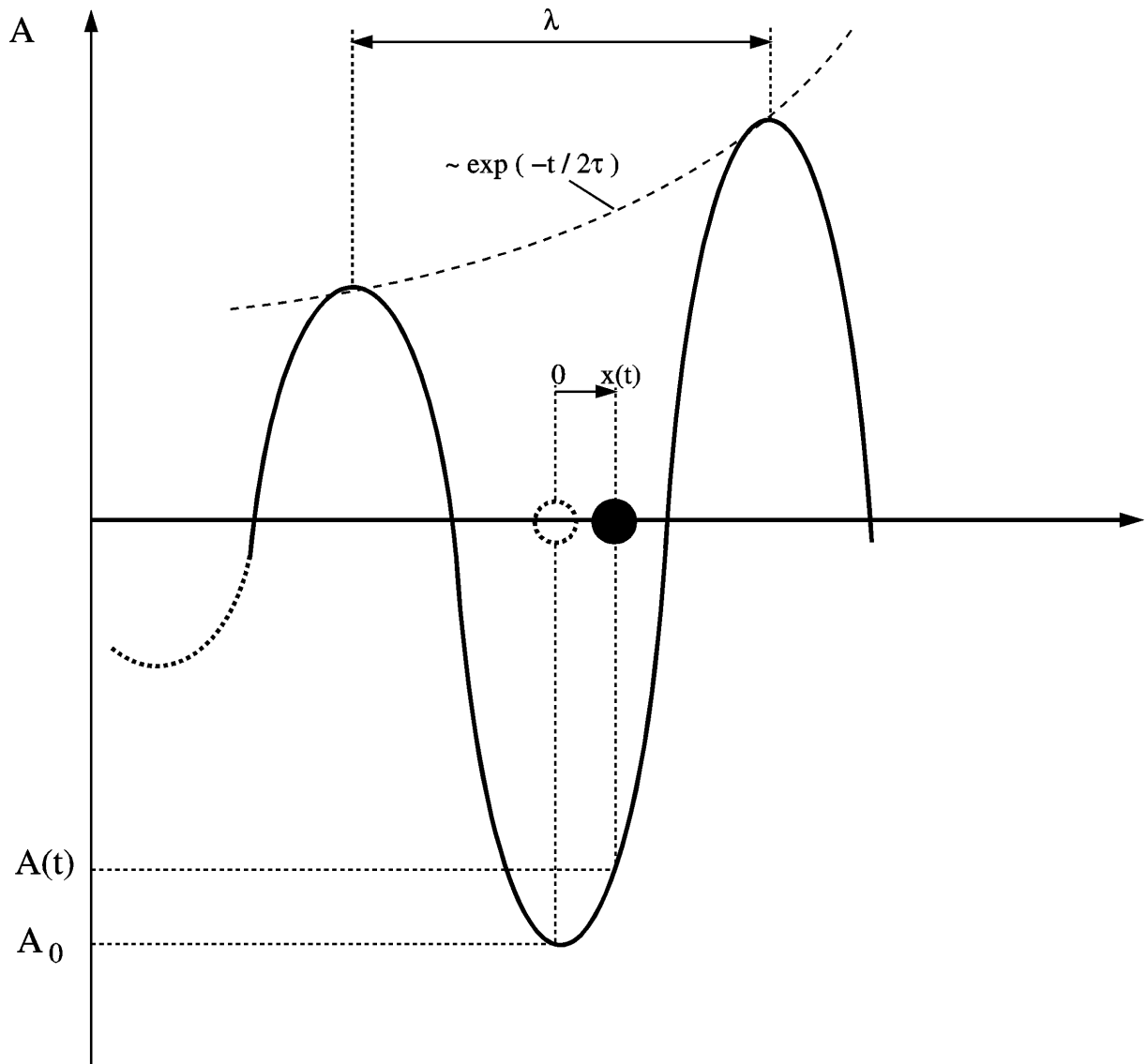


Abb. 3.2 Eine Anzahl Quanten, die durch einen gedämpften Wellenzug mit Wellenlänge λ dargestellt sind, ziehen über den mit $x(t)$ bewegten Mößbauer-Kern hinweg. Dies führt zu einer Veränderung der Phasenbeziehung und verringert die Wahrscheinlichkeit für Resonanzabsorption

Mößbauer-Faktor f . Für eine $^{57}\text{CoRh}$ -Quelle bei 300 K ist $f \approx 0.7$, für das „Wasserstoffatom des Biophysikers“, Myoglobin, gilt bei Zimmertemperatur $f \approx 0.03$.

Abb. 3.2 zeigt in einer halbklassischen Betrachtungsweise eine quantitative Ableitung des Lamb-Mößbauer-Faktors. Thermische Bewegungen des Kerns (Auslenkung $x(t)$ zur Zeit t) bewirken eine Phasenänderung δ zwischen Kern und dem darüber hinwegstreichenden Strahlungsfeld (Wellenlänge λ):

$$\frac{\delta}{2\pi} = \frac{x}{\lambda} \quad (3.7)$$

Das Strahlungsfeld $A(t)$ wird dadurch gegenüber der Maximalamplitude A_0 geschwächt.

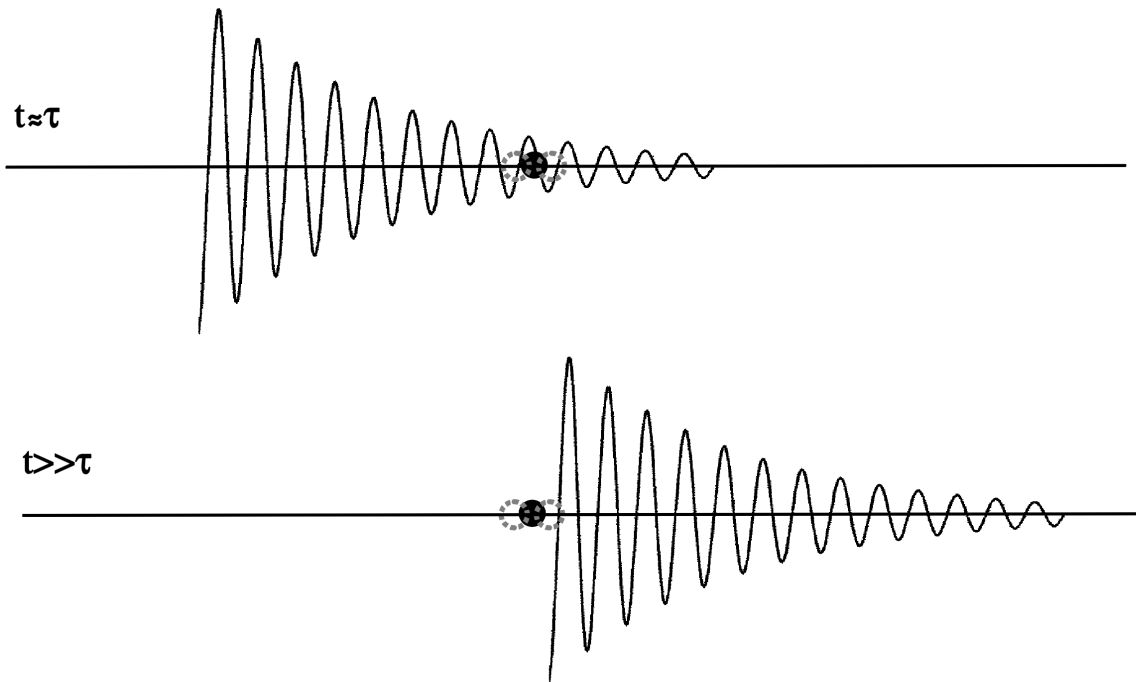


Abb. 3.3 Eine Anzahl Quanten, die durch einen gedämpften Wellenzug mit Wellenlänge λ dargestellt sind, ziehen über einen Mößbauer-Kern hinweg. Eine Wechselwirkung ist nur solange möglich, wie die Welle am Kernort noch eine ausreichend hohe Restamplitude besitzt, nicht also für Zeiten $t \gg \tau$.

$$\frac{A(t)}{A_0} = e^{i\delta} = 1 + i\delta - \frac{1}{2}\delta^2 + \dots = 1 + ikx - \frac{1}{2}k^2x^2 + \dots \quad (3.8)$$

Dabei wurde die Exponentialfunktion in eine Taylorreihe entwickelt und es wurde die Beziehung $k = 2\pi/\lambda$ zwischen Wellenzahl k und Wellenlänge λ benutzt. Für harmonische Schwingungen verschwinden im Zeitmittel alle in x ungeraden Potenzen, so dass sich für $\langle A(t) \rangle$ ergibt:

$$\langle A(t) \rangle = A_0 \left(1 - \frac{1}{2}k^2 \langle x^2 \rangle + \dots \right) = A_0 e^{-\frac{1}{2}k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (3.9)$$

Die messbare Größe Intensität I ist dem Betragsquadrat der Feldamplitude proportional und wird durch das beschriebene Phänomen abgeschwächt:

$$I \propto |\langle A(t) \rangle|^2 = A_0^2 e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (3.10)$$

Damit ergibt sich der Lamb-Mößbauer-Faktor zu

$$f = e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (3.11)$$

Die Betrachtung anhand Abb. 3.3 macht deutlich, dass in die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ nur Bewegungen eingehen, deren Zeitkonstanten nicht wesentlich größer sind als die Lebensdauer des angeregten Kernzustandes τ . Das als abklingendes elektromagnetisches Feld darstellbare Ensemble von γ -Quanten zieht über den Mößbauer-Kern hinweg und kann mit dem Kern nur wechselwirken, solange die Feldamplitude am Eisenort deutlich von Null verschieden ist. Bereits nach der Zeit τ ist die Wellenintensität bereits auf $1/e$ abgeklungen. Zu wesentlich späteren Zeiten ist keine Resonanzabsorption mehr möglich. Damit ist der Mößbauer-Effekt nur auf Bewegungen mit charakteristischen Zeiten schneller als τ sensitiv, alle anderen Schwingungen erscheinen „eingefroren“. Folglich ist das für ^{57}Fe -Mößbauer-Spektroskopie typische Zeitfenster durch $\infty < t < \tau = 141 \text{ ns}$ gegeben. Harmonische Gitterschwingungen mit typischen Frequenzen von 10^{12} - 10^{13} Hz liegen also innerhalb des zugänglichen Bereichs.

3.2.3 Hyperfeinwechselwirkungen

Eine Multipolentwicklung des elektromagnetischen Potentials zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Kern und umgebender Elektronenhülle liefert energetische Verschiebungen bzw. Aufspaltungen in der Größenordnung μeV - neV (Schatz und Weidinger 1992). Die entsprechenden Hyperfeinparameter können mittels Mößbauer-Spektroskopie gemessen werden. Der physikalische Ursprung der Taylorpolynome bis zur dritten Ordnung und ihre Auswirkungen auf das Mößbauer-Spektrum werden im weiteren erläutert. Tab. 3.1 stellt die wichtigsten Eigenschaften der Wechselwirkungen zusammen.

Die Coulomb-Wechselwirkung zwischen der Kernladung und den s-Elektronen mit Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichten $|\Psi(0)|^2$ am Kernort führt im Mößbauer-Spektrum zu einer Verschiebung des Resonanzschwerpunktes gegen den Ursprung der Geschwindigkeitskala (Isomerieverschiebung δ)

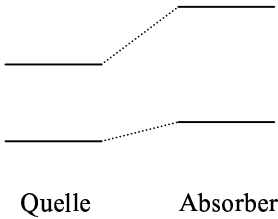
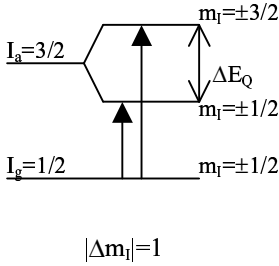
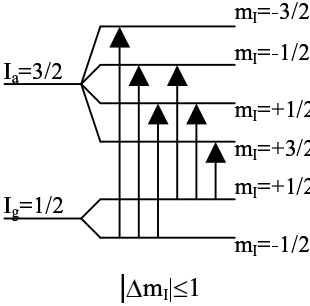
$$\delta = \frac{Ze^2c}{6\epsilon_0\hbar\omega_0} (|\Psi_A(0)|^2 - |\Psi_S(0)|^2) \cdot (\langle R_a^2 \rangle - \langle R_g^2 \rangle) \quad (3.12)$$

Z ist die Ladungszahl des Mößbauer-Kerns, e die Elementarladung, c die Vakuumlichtgeschwindigkeit, ϵ_0 die allgemeine Dielektrizitätskonstante und $\hbar\omega_0$ die Energie der Mößbauer-Strahlung. Die Isomerieverschiebung ist nur dann ungleich Null, wenn die Elektronendichten am Kernort in Quelle („S“ für „source“) und Absorber („A“) verschieden sind und wenn sich die mittleren quadratischen Kernradien $\langle R^2 \rangle$ im Anregungszustand („a“) und im Grundzustand („g“) unterscheiden. Der zugehörige Hamiltonian lautet

$$\mathbf{H} = \delta \mathbf{E} \quad (3.13)$$

mit der Einheitsmatrix \mathbf{E} . Da δ stets auch Quelleneigenschaften widerspiegelt, werden Isomerieverschiebungen stets auf eine metallische Eisenquelle bei Zimmertemperatur bezogen angegeben (Muir et al. 1966).

δ ist ein sensitiver Indikator für den Oxidationszustand des Mößbauer-Ions. Abb. 3.4a erklärt, warum zweiwertiges Eisen regelmäßig eine größere Isomerieverschiebung aufweist als drei-

	Isomerieverschiebung δ	Quadrupol- aufspaltung ΔE_Q	Magnetische Hyper- feinwechselwirkung
Taylorpolynom	1. Ordnung (elektrisch)	3. Ordnung (elektrisch)	2. Ordnung (magnetisch)
Energieniveaus	 <p>Quelle Absorber</p>	 <p>$\Delta m_l =1$</p>	 <p>$\Delta m_l \leq 1$</p>
Mößbauer-Spektrum	Resonanzschwerpunkt verschoben gegen $\nu=0$	Aufspaltung in zwei intensitätsgleiche Linien	Aufspaltung in sechs Linien unterschiedlicher Intensitäten
Information	Oxidationszustand Koordinationszahl Liganden Spinzustand	Ligandenfeld Koordinationszahl MO-Energieniveaus	lokales Magnetfeld Spinzustand Relaxationseigenschaften

Tab. 3.1 Hyperfeinwechselwirkungen und ihre Auswirkungen auf das Mößbauer-Spektrum

wertiges. Da Fe^{2+} mit seiner $3d^6$ -Konfiguration ein Valenzelektron mehr besitzt als Fe^{3+} , schirmt es die Kernladung stärker ab. Die s-Elektronen spüren im bivalenten Eisen deshalb eine kleinere effektive Kernladungszahl als im trivalenten Eisen und sind infolge der geringeren Coulomb-Anziehung stärker delokalisiert. Für Fe^{2+} ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der s-Orbitale im Kerninneren somit kleiner als für Fe^{3+} , was gemäß (3.12) zu einer größeren Isomerieverschiebung führt. Man beachte dabei, dass für ^{57}Fe der Term $\langle R_a^2 \rangle - \langle R_g^2 \rangle$ negatives Vorzeichen besitzt. Aufgrund ähnlicher Effekte ist δ auch ein genaues Maß für die Atomart in der ersten Ligandensphäre, was Abb. 3.4b für das Beispiel eines Schwefel- und eines Sauerstoffliganden verdeutlicht. Wegen der sehr verschiedenen Pauling-Elektro negativitäten von Eisen ($\chi_{\text{Fe}} = 1.83$) und von Sauerstoff ($\chi_{\text{O}} = 3.44$) hat die Fe-O-Bindung stark ionischen Charakter, während die Fe-S-Bindung einen hohen Kovalenzgrad aufweist ($\chi_{\text{S}} = 2.58$). Die an der kovalenten Bindung beteiligten Elektronen gehen für die Abschirmung der Kernladung verloren. Damit stellt Fe-O das Analogon zu Fe^{2+} dar und besitzt eine größere Isomerieverschiebung als Fe-S, welches Fe^{3+} entspricht. Daneben gibt δ auch Aufschlüsse über den Spinzustand des Eisens („high-spin“, „low-spin“) sowie über die Koordinationszahl. In Abb. 3.5 sind typische Wertebereiche für die ^{57}Fe -Isomerieverschiebung abhängig von Oxidationszahl, Spinzustand und Art der nächsten Nachbarn angegeben.

Die elektrische Multipolentwicklung dritter Ordnung beschreibt die Wechselwirkung des Kernquadrupolmomentes Q mit einem elektrischen Feldgradienten V . Beiträge liefern die inhomogene 3d-Ladungsverteilung der umgebenden Elektronenhülle und das elektrische Feld der Liganden (Kristallfeld). Ein Kernquadrupolmoment ist anschaulich als zigarren- ($Q > 0$)

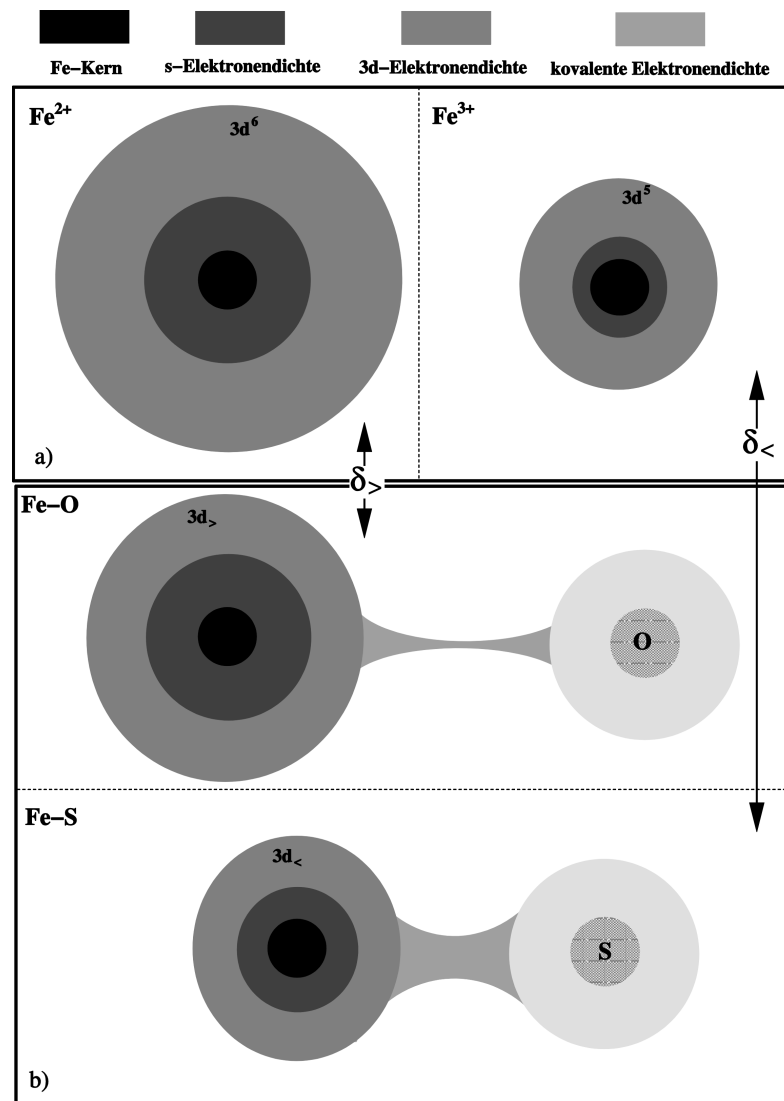


Abb. 3.4 Graphische Veranschaulichung der Abhängigkeit der Isomerieverschiebung vom Oxidationszustand des Mößbauer-Ions und vom Kovalenzgrad dessen Bindung mit den Liganden (Erklärung im Text)

oder linsenförmige ($Q < 0$) Verzerrung des Kerns aufzufassen und tritt nur bei Kernspins $I \geq 1$ auf. Der Hamilton-Operator zur Beschreibung der elektrischen Quadrupolwechselwirkung hat die Form

$$\mathbf{H} = \frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)} [3I_z^2 - I(I+1) + \eta(I_x^2 - I_y^2)] \quad (3.14)$$

Der Asymmetrieparameter η ist ein Maß für die Anisotropie des Kristalleffektes und ist definiert als

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (3.15)$$

Der Energieterm (3.14) hebt die Entartung nur dem Betrage von m_I nach auf. Für den Fall von ^{57}Fe bleibt der Grundzustand mit $I_g = 1/2$ entartet, während der Anregungszustand mit $I_a = 3/2$

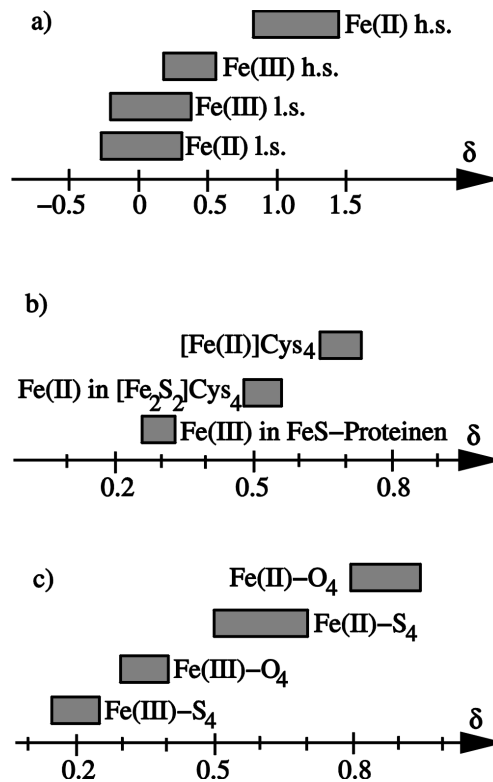


Abb. 3.5 Abhängigkeit der ⁵⁷Fe-Isomerieverschiebung von a) Oxidationszahl und Spinzustand (Gonser 1975), b) Oxidationszustand in Eisen-Schwefel-Proteinen (Bertini et al. 1995), c) Oxidationszustand und Atomart der nächsten Nachbarn (Debrunner et al. 1977)

eine Aufspaltung in zwei Subniveaus erfährt (siehe Tab. 3.1). Im Mößbauer-Spektrum führt das zu zwei Linien im energetischen Abstand

$$\Delta E_Q = \frac{eQV_{zz}}{2} \sqrt{1 - \frac{\eta^2}{3}} \quad (3.16)$$

ΔE_Q heißt Quadrupolaufspaltung.

Zwar liefert die magnetische Multipolentwicklung erster Ordnung wegen der Nichtexistenz magnetischer Monopole keinen Beitrag, wohl aber der Entwicklungsterm zweiter Ordnung. Dieser beschreibt die Zeeman-Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment eines Kernes mit $I \neq 0$ und dem von ungepaarten Elektronenspins erzeugten lokalen Magnetfeld. Allerdings ist das vom magnetischen Moment des 3d-Elektronenspins direkt erzeugte Magnetfeld wegen der großen räumlichen Ausdehnung der Orbitale am Ort des Kernes sehr klein. Dagegen dominant ist das Fermikontaktfeld (Schatz und Weidinger 1992): die 3d-Elektronen bewirken eine teilweise Polarisierung der s-Elektronen, die auch im Kerninneren eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit besitzen. Diese Polarisierung ruft ein hohes Magnetfeld am Kernort – das Fermikontaktfeld – hervor. Grundsätzlich erzeugen auch elektronische Bahndrehimpulse magnetische Felder, jedoch mitteln sich ihre Beiträge aufgrund des Einflusses des Kristallfeldes in Festkörpern im Zeitmittel häufig weg („Orbital quenching“). Quantenmechanisch beschrieben wird die Zeeman-Wechselwirkung von Kernspin und Hüllfeld durch den magnetischen Hyperfein-Hamiltonian

$$\mathbf{H} = \mathbf{S A I} \quad (3.17)$$

\mathbf{A} heißt magnetischer Hyperfeintensor und liefert Informationen über Vorzeichen und Amplitude des lokalen Magnetfeldes, über Spinzustände und magnetische Kopplungsmechanismen. Der Zeeman-Effekt bewirkt eine vollständige Aufhebung der Entartung bezüglich m_I , so dass jeder Zustand in $(2I + 1)$ Niveaus aufspaltet (Tab. 3.1). Unter Beachtung der Auswahlregeln für magnetische Dipolstrahlung ($|\Delta m_I| \leq 1$) führt dies für den Fall von ^{57}Fe im Mößbauer-Experiment zur Ausbildung eines Sechslinienspektrums.

Um die magnetische Aufspaltung beobachten zu können, muss das Magnetfeld am Kernort über Zeiträume konstant sein, die groß gegen die Kern-Larmor-Frequenz sind. Feldschwankungen kommen durch paramagnetische Elektronenrelaxation zustande. Diese sind klein bei tiefen Temperaturen, verdünnten magnetischen Systemen und halbzahligen Elektronenspins.

3.2.4 Auswertung von Mößbauer-Spektren

3.2.4.1 Transmissionsintegral und dünne Absorbernäherung

Die Transmission $T(\nu)$ einer Einzellinie im Mößbauer-Spektrum, also die Zählrate $Z(\nu)$ bei der Antriebs-Geschwindigkeit ν , normiert auf die Zählrate weitab der Resonanz $Z(\infty)$, hat die Form

$$T(\nu) \equiv \frac{Z(\nu)}{Z(\infty)} = 1 - R f_s \left[1 - \int_{-\infty}^{\infty} Q(\nu, E_s, E) \cdot \exp(-\sigma_A(E_A, E) \cdot n_{Fe}) dE \right] \quad (3.18)$$

mit:

$$Q(\nu, E_s, E) = \frac{\Gamma/2\pi}{[E - E_s(1 + \nu/c)]^2 + (\Gamma/2)^2} \quad (3.19)$$

$$\sigma_A(E_A, E) = \sigma_0 f_A \frac{(\Gamma/2)^2}{(E - E_A)^2 + (\Gamma/2)^2} \quad (3.20)$$

$$\sigma_0 = 2\pi k^{-2} \frac{2I_a + 1}{2I_g + 1} \frac{1}{1 + \alpha} \quad (3.21)$$

Die Verallgemeinerung auf Mehrlinienspektren erfolgt durch Summenbildung und Gewichtungsfaktoren. Zur Transmission trägt nur die untergrundbereinigte (Korrekturfaktor R) und von der Quelle rückstoßfrei emittierte Strahlung (Anteil f_s) bei. Das um die Dopplergeschwindigkeit ν verschobene Emissionsspektrum Q der Quelle mit Energieschwerpunkt bei $E = E_s$ wird im Absorber gemäß einem Lambert-Beer-Gesetz (Absorptionskoeffizient σ_A , Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe}) geschwächt, wobei über den gesamten Energiebereich zu integrieren ist. Sowohl Quellenspektrum als auch Absorptionswirkungsquerschnitt gehorchen idealerweise einer Lorentzverteilung. Die natürliche Linienbreite der Strahlung wird mit Γ bezeichnet. Bei der Energie E_A erreicht die Absorption ihren maximalen Wert, welcher durch

den Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers f_A und durch die Amplitude des Wirkungsquerschnittes σ_0 bestimmt wird. Letzterer hängt von der Wellenzahl k und vom Konversionskoeffizienten α des Mößbauer-Übergangs ab.

Der Ausdruck (3.18) ist für Absorber mit geringem Eisengehalt geschlossen berechenbar. Diese „dünne Absorbernäherung“ ist zulässig, falls für die effektive Dicke t_A folgende Bedingung erfüllt ist

$$t_A = \sigma_0 f_A n_{Fe} \ll 1 \quad (3.22)$$

Dann vereinfacht sich (3.18) zu

$$T(\nu) \approx 1 - R \cdot f_s \cdot t_A \frac{\Gamma}{2} \frac{\Gamma}{[E_s(1 + \nu/c) - E_A]^2 + \Gamma^2} \quad (3.23)$$

und das Mößbauer-Spektren ist lorentzförmig. Ist (3.22) nicht erfüllt, so ist die Linienform der Mößbauer-Resonanzen aus dem Transmissionsintegral (3.18) numerisch zu berechnen.

3.2.4.2 Linienformkorrekturen

Experimentelle Mößbauer-Linien sind häufig nicht lorentzförmig und die Halbwertsbreiten sind regelmäßig größer als die natürliche Linienbreite Γ . Hierfür sind folgende Effekte verantwortlich, die sowohl in Quelle als auch im Absorber auftreten:

Bereits die exakte Berechnung des Transmissionsintegrals an Stelle der dünnen Absorbernäherung führt zu einer Abweichung von der Lorentzform und zu einer Erhöhung der Linienbreite. Schneidet man gedanklich die „dicke“ Probe in viele „dünne“ Scheiben, so sieht die erste Scheibe noch ein lorentzverteiltes Spektrum. Beim Durchgang der Strahlung durch diese Scheibe wird das intensive Zentrum stärker geschwächt als die intensitätsarmen Flanken. Dadurch verliert die Strahlung ihre exaktes Lorentzprofil. Dieser Effekt verstärkt sich von Scheibe zu Scheibe und führt im Resultat zu einer nicht-lorentzförmigen Transmission und zu einer um Γ_{dick} erhöhten Halbwertsbreite. Man bezeichnet dies als Dickeneffekt.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass in realen Proben nicht alle Mößbauer-Kerne identisch sind. Dies gilt im Besonderen für ein Proteinensemble, dessen Moleküle in verschiedenen Konformationssubzuständen auftreten (Frauenfelder et al. 1979, Parak et al. 1982). Hinsichtlich der für das Mößbauer-Spektrum relevanten physikalischen Parameter (lokales Magnetfeld, Kristallfeld, etc.) sind die verschiedenen Proteinmoleküle durch eine Verteilungsfunktion zu beschreiben. Hierfür wählt man üblicherweise eine Gauß-Kurve, da sie normierbar ist und als rasch abfallende Funktion eine schmale Verteilung der Hyperfeinparameter um einen Mittelwert repräsentiert. Die Linienform der Mößbauer-Resonanzen erhält man mathematisch aus einer Faltung der Lorentz-Verteilung mit der Gauß-Funktion, man spricht von einem Voigt-Profil. Im Resultat führt die Inhomogenität der Proteinmoleküle zu einer Erhöhung der Halbwertsbreite, die Inhomogenitätsverbreiterung Γ_{inh} genannt wird.

Ein weiteres Spezifikum von Proteinen ist deren dynamisches Verhalten. Oberhalb einer Grenztemperatur in der Größenordnung von 180 K setzen quasidiffusive Bewegungsmoden ein, die als Übergänge zwischen verschiedenen Konformationssubzuständen interpretiert werden (Parak und Formanek 1971, Parak et al. 1982). Im Mößbauer-Spektrum äußert sich dies in einer Linienverbreiterung Γ_{diff} sowie im Hinzutreten einer zusätzlichen sehr breiten Linie.

Formal können diese Mechanismen durch eine modifizierte Transmission beschrieben werden:

$$T(v) = 1 - Rf_s \left[1 - \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Q}(v, E_s, E) \cdot \exp(-\tilde{\sigma}_A(E_A, E) \cdot n_{\text{Fe}}) dE \right] \quad (3.24)$$

$$\tilde{Q}(v, E_s, E) = Q(v, E_s, E) \otimes w_s(E_s, \xi_s) \quad (3.25)$$

$$\tilde{\sigma}_A(E_A, E) = \sigma_A(E_A, E) \otimes w_A(E_A, \xi_A) \quad (3.26)$$

Quellenfunktion und Absorptionskoeffizient werden nun dargestellt als Faltungen (" \otimes ") der Ausdrücke (3.19) bzw. (3.20) mit Gauß-Verteilungen der Halbwertsbreiten ξ_s bzw. ξ_A . Näherungsweise kann statt dessen oft ein lorentzförmiges Profil mit der effektiven Linienbreite Γ_a angenommen werden:

$$\Gamma_a = \Gamma + \Gamma_{\text{dick}} + \Gamma_{\text{inh}} + \Gamma_{\text{diff}} \quad (3.27)$$

3.2.4.3 Temperaturabhängigkeit des mittleren Auslenkungsquadrates

Das mittlere Auslenkungsquadrat der ^{57}Fe -Kerne ist über den Lamb-Mößbauer-Faktor dem Experiment zugänglich. Hierzu nimmt man Mößbauer-Spektren der zu untersuchenden Probe im relevanten Temperaturintervall auf. Die Absorptionsfläche A unter dem Mößbauer-Spek-

Parameter	Status	Hintergrund
R	fest	bestimmbar aus Anpassung des Pulshöhenspektrums der Quelle; bei dicken Proben Selbstabsorptionskorrektur (Zach 1996)
f_s	fest	durch Standardmessverfahren bestimmbar (Chang 1992)
ξ_s	fest	bestimmbar durch Optimierung der Anpassung unter Berücksichtigung von Angaben des Quellenherstellers, konstant für alle Messungen an derselben Quelle ($\xi_s \approx 0.12 \text{ mm s}^{-1}$)
t_A	frei	Fitparameter mit sinnvollem Startwert in der Größenordnung von eins
ξ_A	frei	Fitparameter mit sinnvollem Startwert in der Größenordnung von Γ

Tab. 3.2 Bei der Anpassung von Mößbauer-Spektren mit dem Transmissionsintegral auftretende Parameter

trum ist mit der Transmission (3.18) über folgendes Integral verknüpft

$$A = \int_{-\infty}^{\infty} [1 - T(v, t_A, \dots)] dv \quad (3.28)$$

In der Praxis wird über einen endlichen Geschwindigkeitsbereich $[-v_{\max}; v_{\max}]$ des Experiments summiert. Aus (3.28) lässt sich numerisch der Wert t_A für jeden Temperaturpunkt bestimmen (vgl. Tab. 3.2).

Setzt man (3.11) in (3.22) ein, so erhält man nach beiderseitiger Logarithmierung einen Ausdruck für das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ des Eisenkerns

$$\langle x^2 \rangle = \frac{1}{k^2} \ln \sigma_0 n_{\text{Fe}} - \frac{1}{k^2} \ln t_A \quad (3.29)$$

Der erste Summand in (3.29) ist meist ohne Zerstörung der Mößbauer-Probe nicht exakt bestimmbar. Daher ermittelt man diese Konstante aus der Bedingung $\langle x^2 \rangle(T = 0) \equiv 0$, die bei Vernachlässigung der quantenmechanischen Nullpunktsunruhe gültig ist. Zudem verwendet man die Abhängigkeit $\langle x^2 \rangle(T) \propto T$ (vgl. beispielsweise Schatz und Weidinger 1992), die im Bereich nicht zu hoher Temperaturen ($T \leq 180$ K) für Proteine erfüllt ist. Man legt daher eine Ausgleichsgerade durch den experimentell bestimmten Verlauf von $-1/k^2 \ln t_A(T)$ und verschiebt diese Geraden vertikal, bis sie durch den Ursprung des $\langle x^2 \rangle(T)$ -Koordinatensystems verläuft. Den Achsenabschnitt subtrahiert man vom $-1/k^2 \ln t_A(T)$ -Verlauf und erhält die absolute Temperaturabhängigkeit $\langle x^2 \rangle(T)$.

3.2.4.4 Hyperfein-Hamiltonian

Man unterscheidet zwei Ansätze für die Anpassung eines Mößbauer-Spektrums. Einerseits können rein phänomenologisch aus einem Messspektrum die Mößbauer-Parameter bestimmt werden, etwa Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung aus einem Quadrupoldublett. Bei komplexeren Spektren, bei denen magnetische Aufspaltungen, paramagnetische Elektronenrelaxation, Tensoren mit gegeneinander verdrehten Hauptachsensystemen, etc. zu berücksichtigen sind, formuliert man zunächst einen das System beschreibenden Hamilton-Operator. Für diesen löst man die Schrödinger-Gleichung und kann dann die Lage der Mößbauer-Resonanzen aus den Eigenwerten und die Intensität der Linien aus den Übergangsmatrixelementen ihrer Eigenfunktionen berechnen. Dann passt man das experimentelle Spektrum dem gewählten Modell durch Variation der darin enthaltenen Parameter an. Ein geeigneter Hamiltonian \mathbf{H} hat die Form:

$$\mathbf{H} = \beta_e \mathbf{B}_{\text{ex}} \mathbf{g} \mathbf{S} + \mathbf{I} \mathbf{A} \mathbf{S} + \delta \mathbf{E} + \frac{eQV_{z'z'}}{4I(2I-1)} [\mathbf{I}_z'^2 - I(I+1) + \eta(\mathbf{I}_x'^2 - \mathbf{I}_y'^2)] + i \mathbf{R} \quad (3.30)$$

Der erste Ausdruck, der das Bohrsche Magneton β_e und den elektronischen \mathbf{g} -Tensor enthält, beschreibt die Zeeman-Wechselwirkung zwischen dem Elektronenspin \mathbf{S} und dem externen Magnetfeld \mathbf{B}_{ex} . Die nächsten drei Terme stehen für die magnetische Hyperfeinwechselwirkung, die Isomerieverschiebung und die elektrische Quadrupolwechselwirkung. Die \mathbf{g} - und \mathbf{A} -Tensoren sind untereinander und bezüglich der Molekülachsen kollinear und

daher im selben Koordinatensystem (x,y,z) diagonal. Der Tensor \mathbf{V} , der in die elektrische Quadrupolwechselwirkung eingeht, ist im Allgemeinen gegenüber \mathbf{g} und \mathbf{A} um die Euler-Winkel α, β, γ gedreht und wird durch das Hauptachsensystem (x',y',z') charakterisiert. Der letzte Term berücksichtigt Elektronenrelaxation und enthält neben der imaginären Einheit i den Relaxations-Superoperator \mathbf{R} :

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} -\gamma & \gamma \\ \gamma & -\gamma \end{pmatrix} \quad (3.31)$$

Die Relaxationsrate γ ist das Reziproke der effektiven paramagnetischen Elektronenrelaxationszeit. Die Anpassung von Mößbauer-Spektren im Rahmen von (3.30) basiert auf den Arbeiten von Afanas'ev und Mitarbeitern (Afanas'ev et al. 1972, Afanas'ev und Gorobchenko 1974, Afanas'ev et al. 1988). Die grundlegende Idee besteht darin, während des Mößbauer-Experiments ein schwaches externes Magnetfeld von einigen mT anzulegen. Dies bewirkt eine Aufspaltung der vom kristallelektrischen Feld erzeugten Kramers-Dubletts, die wesentlich größer ist als die Energien der Hyperfeinwechselwirkungen. Damit entkoppelt man das Elektron-Kern-System, so dass die Hyperfeinstruktur im Mößbauer-Spektrum von rein nuklearen Übergängen zwischen Zuständen mit gleichbleibender elektronischer Spin-Projektion herrühren. Mathematisch verringert dies die Dimension der Hamilton-Matrix. Faktisch wird durch das externe Feld die magnetische Hyperfeinstruktur stabilisiert, da durch den Feldvektor eine Vorzugsachse definiert wird („weak field stabilization“). Unter diesen experimentellen Bedingungen weist das Mößbauer-Spektrum eine konturenreichere Hyperfeinstruktur auf, ohne das schwache Feld erhält man hingegen oft strukturlose Spektren mit geringem Informationsgehalt (siehe beispielsweise Abb. 5.10). Der Zeeman-Term in (3.30) ist dominant gegen die Hyperfeinwechselwirkungen, so dass eine störungstheoretische Behandlung gerechtfertigt ist. Eigenwerte E_i und Eigenzustände $|\Psi_i\rangle$ der Zeeman-Wechselwirkung ergeben sich zu:

$$E_{1,2} = \pm 1/2 G \beta_e B_{ex} \quad (3.32)$$

$$|\Psi_1\rangle = [2G(G + G_z)]^{-1/2} [(G + G_z) |1/2\rangle + G_+ |-1/2\rangle] \quad (3.33)$$

$$|\Psi_2\rangle = [2G(G+G_z)]^{-1/2} [G_- |1/2\rangle - (G+G_z) |-1/2\rangle] \quad (3.34)$$

mit:

$$G_z = g_z \cos\theta, G_x = g_x \sin\theta \cos\phi, G_y = g_y \sin\theta \sin\phi, G_{\pm} = G_x \pm iG_y, G = (G_x^2 + G_y^2 + G_z^2)^{1/2} \quad (3.35)$$

Die Winkel ϕ, θ definieren die Orientierung von \mathbf{B}_{ex} bezüglich des molekularen Koordinatensystems (x,y,z) . Den effektiven Hamiltonian der Hyperfeinwechselwirkung für die beiden Zeeman-Niveaus erhält man durch Mittelung des Hyperfeintensors \mathbf{IAS} über die Wellenfunktionen der Unterzustände:

$$\mathbf{H}_{\text{hf}}^{1,2} = \pm 1/2 G^{-1} (G_x A_x \mathbf{I}_x + G_y A_y \mathbf{I}_y + G_z A_z \mathbf{I}_z) \quad (3.36)$$

Unter Einführung des effektiven Hyperfeinfeldes \mathbf{B}_{eff} kann (3.36) umgeschrieben werden in

$$\mathbf{H}_{\text{hf}} = \beta_n g_n \mathbf{B}_{\text{eff}} \mathbf{I} \quad (3.37)$$

Dabei sind β_n das Kernmagneton und g_n der durch die Kernspinquantenzahl I dividierte nukleare g -Faktor (z. B. ^{57}Fe -Grundzustand: $g_n = 0.180448$). Ein allgemeiner Ausdruck für das Mößbauer-Absorptionsspektrum lautet dann

$$I(\omega) = \text{Im} \langle (\eta^* \mathbf{J}(\mathbf{k})) \mathbf{G}(\omega + i\Gamma/2)^{-1} (\eta \mathbf{J}^+(\mathbf{k})) \rangle \quad (3.38)$$

$\mathbf{J}^+(\mathbf{k})$ ist die Fouriertransformierte ("+") des nuklearen Stromdichteoperators, η die Polarisation und Γ eine Gesamtlinienbreite wie Γ_a in (3.27). \mathbf{G} ist eine Green-Funktion

$$\mathbf{G}(\omega + i\Gamma/2) = \omega \mathbf{E} + \delta \mathbf{E} - \mathbf{L} + i\mathbf{R} + i\mathbf{E}\Gamma/2 \quad (3.39)$$

Hier tritt der Liouville-Superoperator \mathbf{L} auf, dessen Wirkung auf einen beliebigen Operator \mathbf{A} anhand folgender Beziehung verständlich wird:

$$\mathbf{L} \mathbf{A} = \hbar^{-1} (\mathbf{H}_a \mathbf{A} - \mathbf{A} \mathbf{H}_g) \quad (3.40)$$

Dabei sind \mathbf{H}_a und \mathbf{H}_g die Hamiltonians im Anregungs- bzw. im Grundzustand. Der Liouville-Superoperator beinhaltet also die Hamilton-Operatoren zur Beschreibung der statischen Hyperfeinwechselwirkungen. In der Basis der transformierten Elektronenfunktionen (3.33), (3.34) besitzt er eine Blockstruktur,

$$\mathbf{L} = \begin{pmatrix} \mathbf{L}_{\text{hf}} + \mathbf{L}_Q & \\ & -\mathbf{L}_{\text{hf}} + \mathbf{L}_Q \end{pmatrix} \quad (3.41)$$

in welcher der Superoperator $\pm \mathbf{L}_{\text{hf}}$ die magnetische Hyperfeinwechselwirkung für die positive/negative Projektion des effektiven Hyperfeinfeldes und \mathbf{L}_Q die elektrische Quadrupolwechselwirkung beschreibt.

Das Mößbauer-Spektrum ist also durch die Tensoren \mathbf{g} und \mathbf{A} sowie durch die Skalare δ , ΔE_Q , η und γ festgelegt.

3.3 Continuous Wave Electron Paramagnetic Resonance (Cw-EPR)

Ausführliche Darstellungen der EPR-Spektroskopie sind bei Abragam und Bleaney (1986) sowie bei Pilbrow (1990) zu finden. Eine straffe Einführung bieten Schneider und Plato (1971). Der Übersichtsartikel von Hagen (1992) befasst sich mit der Anwendung der EPR-Spektroskopie auf Eisen-Schwefel-Proteine.

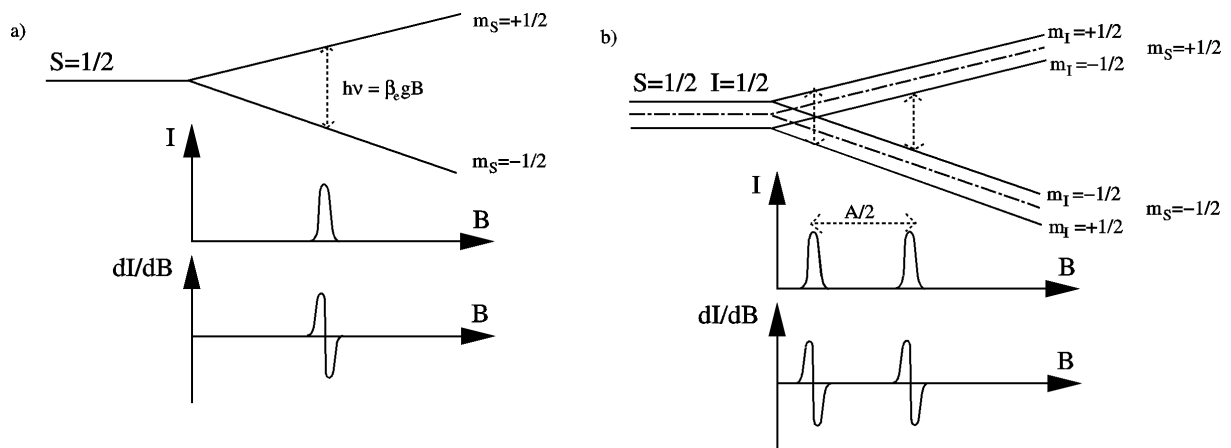


Abb. 3.6 Energieniveauschema und EPR-Signal eines isotropen Atoms mit a) Elektronenspin $S = 1/2$ und Kernspin $I = 0$ bzw. b) $S = I = 1/2$

3.3.1 Prinzip der Cw-EPR

Legt man an einen ungepaarten Elektronenspin S ein externes Magnetfeld \mathbf{B} an, so hebt der elektronische Zeeman-Effekt die Entartung bezüglich m_s vollständig auf. Für einen Elektronenspin ist die quantenmechanische Richtungsquantelung zu beachten, die nur $2S + 1$ diskrete Orientierungen des Spins relativ zum Feld zulässt. Die zugehörigen Energieniveaus werden entsprechend der Boltzmann-Statistik populiert, so dass im thermischen Gleichgewicht eine kleine Ungleichbesetzung der Zeeman-Niveaus herrscht². Strahlt man nun Mikrowellen geeigneter Frequenz ν ein, so können, wenn die Resonanzbedingung

$$g \beta_e B = h \nu \quad (3.42)$$

erfüllt ist, unter Beachtung der Auswahlregel $|\Delta m_s| = 1$ für magnetische Dipolstrahlung durch Absorption der Zentimeterwellen Übergänge zwischen den Spinzuständen herbeigeführt werden. In (3.42) ist g der als isotrop angenommene elektronische g -Faktor, der in Festkörpern im Allgemeinen Tensorcharakter besitzt. Für ein freies Elektron gilt $g = 2.002319$, so dass Abweichungen experimentell ermittelter g -Faktoren von diesem Wert ein Maß für den Festkörpereinfluss - insbesondere des Kristallfeldes - auf den Elektronenspin sind. Verharrten die umgeklappten Elektronenspins dauerhaft im Anregungszustand, so würde dies nach kurzer Zeit zu einer Gleichbesetzung der Zeeman-Niveaus führen und das EPR-Signal würde verstummen. Die paramagnetische Elektronenrelaxation sorgt jedoch dafür, dass die vom Spinsystem absorbierte Energie ins Gittersystem zurückströmt und die Ungleichbesetzung der verschiedenen Zeeman-Zustände wiederherstellt. Durch kontinuierliche Einstrahlung eines Mikrowellenfeldes passender Frequenz und ausreichend geringer Leistung zur Vermeidung von Sättigungseffekten kann somit ein kontinuierliches

² Für X-Band-EPR bei Raumtemperatur beträgt der Besetzungsunterschied zwischen Grund- und Anregungszustand eines freien Elektrons etwa 1%

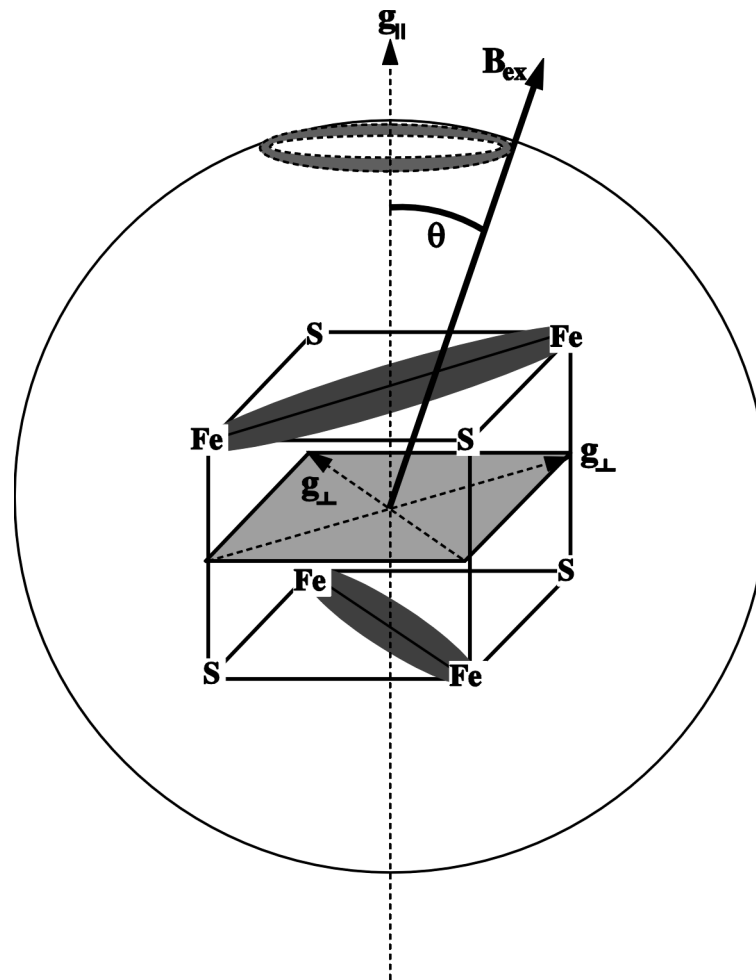


Abb. 3.7 Abhängigkeit der Stärke des EPR-Signals eines oxidierten HiPIP-Moleküls von dessen Orientierung zum externen Magnetfeld (Erklärung im Text)

EPR-Signal aufrechterhalten werden (*Continuous Wave EPR*). Aus technischen Gründen und aufgrund des konturenreicheren Signals wird in der EPR-Spektroskopie die erste Ableitung der Absorptionskurve über der Magnetfeldstärke gemessen. Der Sachverhalt ist für einen Spin $S = 1/2$ in Abb. 3.6a dargestellt.

3.3.2 Auswertung von EPR-Spektren

Die bisherige Darstellung beschreibt einen Elektronenspin, auf den ausschließlich der elektronische Zeeman-Effekt einwirkt. Durch Wechselwirkungen im Festkörper und mit dem eigenen Atomkern treten jedoch weitere Hyperfeinwechselwirkungen hinzu. Dies macht eine Analyse auf der Grundlage des folgenden Hamiltonians erforderlich:

$$\mathbf{H} = \beta_e \mathbf{B}_{\text{ex}} \mathbf{g} \mathbf{S} + \mathbf{S} \mathbf{D} \mathbf{S} + \mathbf{I} \mathbf{A} \mathbf{S} + \mathbf{I} \mathbf{Q} \mathbf{I} + \beta_n g_n \mathbf{B}_{\text{ex}} \mathbf{I} \quad (3.43)$$

Der erste Term berücksichtigt elektronische Zeeman-Wechselwirkung für den allgemeinen Fall eines anisotropen \mathbf{g} -Tensors. Es folgt der phänomenologische Kristallfeldhamiltonian mit der Kristallfeldmatrix \mathbf{D} , welcher den Einfluss des von den Liganden erzeugten inhomogenen elektrischen Feldes auf den Elektronenspin widerspiegelt. Dieser führt auch in Abwesenheit

magnetischer Felder zu einer teilweisen Aufhebung der Entartung bezüglich m_s . Ein halbzahliger Spin S etwa spaltet in $2S$ Kramers-Dubletts auf (Nullfeldaufspaltung). Bei oxidierten HiPIPs mit $S = 1/2$ hat dieser Term keine Bedeutung. Der dritte Summand trägt der magnetischen Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektronenspin und Kernspin Rechnung. Der Ausdruck $\mathbf{I} \mathbf{Q} \mathbf{I}$ berücksichtigt die Wechselwirkung eines Kernquadrupolmomentes \mathbf{Q} mit dem elektrischen Feld des Elektronenspins und führt in der Mößbauer-Spektroskopie zur Quadrupolaufspaltung. Da bei der EPR-Spektroskopie keine angeregten Nukleonen auftreten, verschwindet im hier maßgeblichen Fall von im Grundzustand befindlichen ^{57}Fe -Kernen der Quadrupoltensor \mathbf{Q} . Der letzte Summand in (3.43) steht für den nuklearen Zeeman-Effekt, der die Aufspaltung des Kernzustandes bezüglich m_I infolge der Wechselwirkung des kernmagnetischen Momentes mit dem äußeren Magnetfeld bewirkt. Die Schrödinger-Gleichung ist für den Hamilton-Operator (3.43) störungstheoretisch zu lösen, wobei weiter links stehende Terme als dominant gegenüber weiter rechts stehenden angenommen werden. Diese Annahme ist für die Auswertung der EPR-Spektren von oxidierten HiPIPs, für welche die Terme eins, drei und fünf aus (3.43) mit einzubeziehen sind, in sehr guter Näherung erfüllt. Als Beispiel für den Einfluss der Hyperfeinwechselwirkungen auf das EPR-Spektrum zeigt Abb. 3.6b ein System mit $S = I = 1/2$, für das neben dem elektronischen Zeeman-Effekt auch noch magnetische Hyperfeinwechselwirkung berücksichtigt ist.

EPR-Untersuchungen an statistisch orientierten Molekülen wie gefrorenen Proteinlösungen werden als *Powder EPR* bezeichnet. Bewegen sich die paramagnetischen Spezies langsam genug, so mitteln sich anisotrope Hyperfeinwechselwirkungen nicht heraus. Jede Orientierung der größenordnungsmäßig 10^{17} Proteinmoleküle bezüglich der Richtung des äußeren Feldes ist gleichwahrscheinlich und die Projektion des \mathbf{g} -Faktors auf die Magnetfeldachse ist in verschiedenen orientierten Molekülen unterschiedlich. Abb. 3.7 zeigt die Verhältnisse für ein oxidiertes HiPIP-Molekül, dessen ausgezeichnete Achse unter einem Winkel θ zum externen Magnetfeldvektor steht. Dieses Proteinmolekül sieht den effektiven \mathbf{g} -Faktor g_{eff}

$$g_{\text{eff}} = (g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta)^{1/2} \quad (3.44)$$

Daher kann man experimentelle Pulvermuster nur simulieren, wenn man eine an (3.44) orientierte Winkelmittelung durchführt. Der Beitrag eines paramagnetischen Zentrums zum EPR-Spektrum ist davon abhängig, wie es bezüglich \mathbf{B}_{ex} orientiert ist. Aus Abb. 3.7 ist ersichtlich, dass das Winkelement $d\theta$ ein um so größeres Flächenelement liefert, je größer θ ist. Der spektrale Beitrag der Moleküle innerhalb des Winkelementes $[\theta; \theta + d\theta]$ ist dieser Fläche proportional. Daher erscheint g_{\perp} im EPR-Spektrum überproportional stark. Dieser Effekt ist eingehender von Gaffney und Silverstone (1993) beschrieben worden.

Bezüglich der Linienform gelten die Aussagen, die in Kap. 3.2.4.2 für die Mößbauer-Spektroskopie getroffen wurden. Wie jede Absorptionskurve ist auch die EPR-Resonanz im Idealfall eine Lorentz-Funktion. Form und Breite der Linie werden durch Elektronenrelaxation beeinflusst. EPR-Linienbreite $\Delta\omega$ und effektive Relaxationszeit T_{eff} sind folgendermaßen verknüpft (Pilbrow 1990):

$$\Delta\omega = T_{\text{eff}}^{-1} \quad (3.45)$$

Spektraler Parameter	Information
Intensität	Spin-Konzentration, Beiträge diverser Spezies, Sättigungsverhalten
Linienform und -breite	Relaxationszeiten, Grad der Inhomogenität
g -Faktoren	Symmetrie (axial, kubisch, rhombisch), Spinquantenzahl
Kristallfeldparameter	Ligandenkoordination, Symmetrie
Hyperfeinparameter	chemische Information, Wechselwirkung Kern-Hülle

Tab. 3.3 Informationsgehalt von EPR-Spektren

Proteine, die aufgrund ihres Auftretens in verschiedenen Konformationssubzuständen äußerst heterogene Gebilde sind, zeigen von der Lorentz-Form abweichende Linienformen. Die Inhomogenitätsverbreiterung, beschreibbar durch eine Gauß-Verteilung von Lorentz-Linien, führt im Ergebnis zu einem Voigt-Profil. Tritt die Relaxationsverbreiterung voll hinter Inhomogenitätseffekten zurück, werden EPR-Spektren von Proteinen mit Gauß-Funktionen anzupassen sein. Die EPR-Linienbreiten von Proteinen sind etwa hundert Mal größer als solche von anorganischen Substanzen.

Tab. 3.3 fasst zusammen, welche Informationen aus den EPR-Parametern gewonnen werden können.

3.4 Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy (ENDOR)

Diese Doppelresonanzmethode kombiniert eine Elektronenresonanz mit einer Kernresonanz und geht zurück auf Feher (1956). Eine gründliche Einführung in die ENDOR-Spektroskopie bieten Abragam und Bleaney (1986) und Pilbrow (1990).

Die ausgeprägte Inhomogenität von Proteinen führt im EPR-Spektrum zu hohen Linienbreiten, so dass die eng beieinander liegenden hyperfeinaufgespalteten Unterlinien meistens nicht voneinander getrennt und die Hauptachsenkomponenten der **A**-Tensoren mittels EPR nicht bestimmt werden können. Dies ermöglicht die ENDOR-Spektroskopie, eine Kombination aus einem EPR- und einem NMR-Experiment. Der Reiz der Methode besteht darin, dass ENDOR orientierungsselektierte Informationen über statistisch orientierungsverteilte Pulverproben liefert. Somit sind Richtungsinformationen messbar, ohne dass Proteinkristalle benötigt werden. Bei hinreichend anisotropen **g**-Tensoren werden die durch Absorption von Radiowellen herbeigeführten Kern-Resonanzen auf der Magnetfeldachse aufgefächert. Jedem Magnetfeldwert ist ein **g**-Wert und damit eine Richtung in Bezug auf diesen Tensor zugeordnet. Da **g**-Tensor und **A**-Tensor kollinear sind, ermöglicht die Einstrahlung des Magnetfeldes entlang der Achse j des **g**-Tensors die unmittelbare Bestimmung von A_j , wobei $j = x, y, z$.

Das Prinzip der ENDOR-Methode wird für den in der vorliegenden Arbeit relevanten Spezialfall $S = I = 1/2$ erläutert. Das Energieniveauschema eines solchen Systems, beschrieben durch einen Hamiltonian der Form

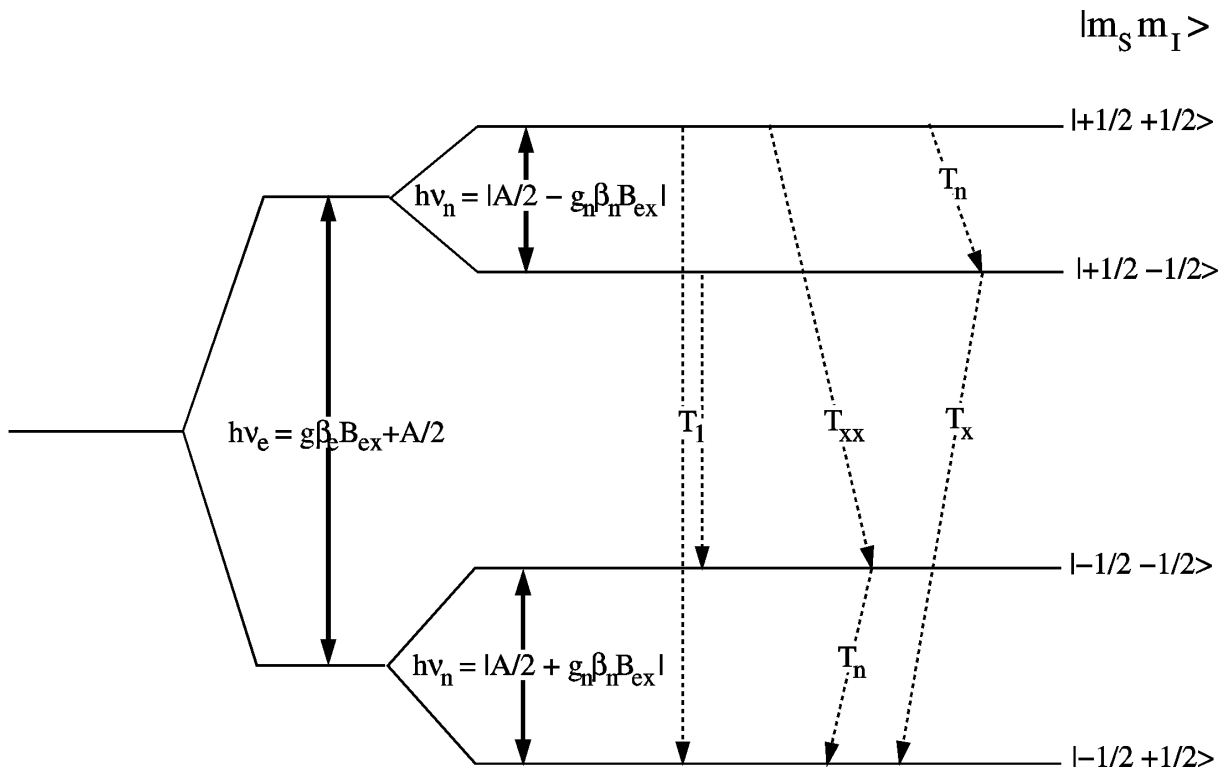


Abb. 3.8 Energieniveauschema für ein gekoppeltes Elektron-Kern-System mit $I = S = 1/2$ und isotropem A -Tensor und verschiedene Relaxationskanäle (Erläuterung im Text)

$$\mathbf{H} = \beta_e \mathbf{B}_{ex} \mathbf{g} \mathbf{S} + \mathbf{I} \mathbf{A} \mathbf{S} + \beta_n g_n \mathbf{B}_{ex} \mathbf{I} \quad (3.46)$$

ist in Abb. 3.8 unter der Prämisse isotroper g - und A -Tensoren und eines magnetischen Feldes dargestellt, das der Anforderung $g\beta_e B_{ex} \gg A \gg g_n \beta_n B_{ex}$ genügt. Die Abbildung zeigt alle Relaxationskanäle: die EPR-Übergänge werden durch die elektronische Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 entvölkert, die auf die NMR-Niveaus verteilten Kerne relaxieren über die nukleare Relaxationszeit T_n . Übergänge zwischen EPR- und NMR-Zuständen werden durch die Cross-Relaxationszeiten T_x und T_{xx} beschrieben, wobei letztere nur bei anisotropen A -Tensoren eine Rolle spielt. Bei einem ENDOR-Experiment legt man ein konstantes externes Magnetfeld an und selektiert über (3.42) den zu untersuchenden g -Wert. Die Mikrowellenleistung wird nun so hoch gefahren, dass die Relaxationskanäle mit T_1 keine Chance mehr haben, eine unterschiedliche Besetzung von Grund- und Anregungszuständen im Elektronensystem aufrechtzuerhalten. Diese Sättigung führt zu einem Verschwinden des EPR-Signals. Strahlt man nun zusätzlich Radiowellen der Frequenz ν_n

$$h \nu_n = |A/2 \pm g_n \beta_n B_{ex}| \quad (3.47)$$

ein, stimuliert man dadurch die NMR-Übergänge $|+1/2 +1/2\rangle \rightarrow |+1/2 -1/2\rangle$ und $|-1/2 -1/2\rangle \rightarrow |-1/2 +1/2\rangle$, die aufgrund der sonst sehr uneffektiven T_n -Relaxation des Kernspins nicht auftreten. Durch Schließen dieses Schalters wird eine Relaxationslawine über die effektiven Kanäle T_x und eventuell T_{xx} ausgelöst, wodurch der Grundzustand des Elektron-Kern-Systems bevölkert wird. Das paramagnetische Ensemble wird damit aus der Sättigung

herausgefahren und man misst wieder ein EPR-Signal. Das Elektronensystem fungiert somit als Sensor für eine Resonanz im Kernsystem. Da bei Wiederauftreten des EPR-Signals (3.47) erfüllt ist, können durch Variation der Radiofrequenz ν_n die Resonanzen des Kernsystems abgetastet werden. Da (3.47) vom nuklearen g -Faktor abhängt, kann man Gruppen von Resonanzen im ENDOR-Spektrum dem zugehörigen Nuklid (z. B. Pärchen von Peaks bei ^{57}Fe , ^1H) zuordnen. Die Argumentation zeigt, dass ENDOR nur möglich ist, wenn folgende Relation zwischen den auftretenden Relaxationszeiten erfüllt ist

$$T_n \gg T_1 \quad \text{und: } T_x, T_{xx} > T_1 \quad (3.48)$$

Dies ist oft nur bei Temperaturen im Bereich flüssigen Heliums und in manchen Systemen nie der Fall. Die Genauigkeit der mit ENDOR bestimmten A -Tensoren beträgt abhängig von der Linienbreite der Resonanz etwa 1 - 10 %.

3.5 Gepulste EPR

3.5.1 Allgemeines

Eine genaue Bestimmung von elektronischen Relaxationszeiten gestattet die gepulste EPR-Spektroskopie (Pilbrow 1990, Alger 1968, straff in Mentler 1999). Bei dieser Methode wird durch kurze Mikrowellenpulse ein EPR-Signal zunächst gezielt gestört und dann die Erholung des Signals detektiert.

Während einzelne Spins streng quantenmechanisch zu behandeln sind, kann die Magnetisierung eines Spin-Ensembles als makroskopische Größe halbklassisch behandelt werden. Dies ist für das Verständnis der Methode der gepulsten EPR wesentlich, da es die folgende anschauliche Betrachtung rechtfertigt. Der linke Teil von Abb. 3.9 veranschaulicht die Präzession der Magnetisierung \mathbf{M} um einen externen Magnetfeldvektor \mathbf{B}_{ex} mit der Larmor-Frequenz ω_L

$$\omega_L = \gamma B_{\text{ex}} \quad (3.49)$$

Dabei ist γ das gyromagnetische Verhältnis. Die nach oben orientierten Spins einer paramagnetischen Spezies mit $S = 1/2$ befinden sich im Zeeman-Grundzustand, die nach unten orientierten Spins im Zeeman-Anregungszustand. Die Ungleichbesetzung der Zeeman-Niveaus ruft eine ensembledgemittelte Magnetisierungskomponente in z -Richtung hervor. Der Erwartungswert der Magnetisierung in der xy -Ebene verschwindet dagegen, da die Spins auf dem Kegelmantel unphasiert präzedieren. Lässt man nun für ein kurzes Zeitintervall δt einen Puls in Form eines senkrecht zu \mathbf{B}_{ex} orientierten Magnetfeldes \mathbf{B}_{\perp} auf das System einwirken, so spürt die Magnetisierung ein Drehmoment, welches \mathbf{M} um den Winkel α

$$\alpha = \gamma \delta t B_{\perp} \quad (3.50)$$

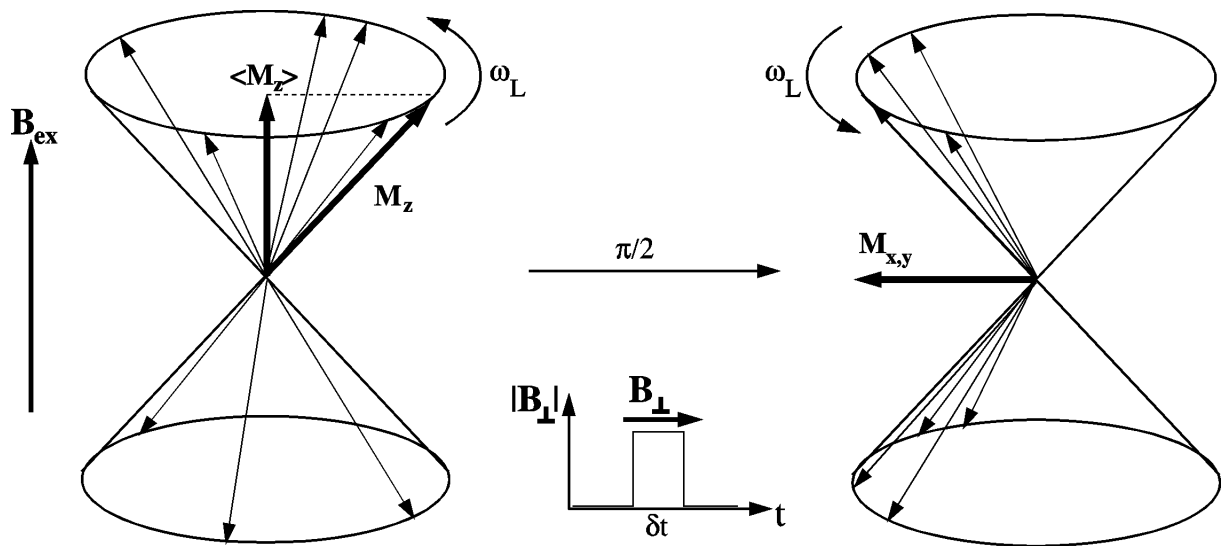


Abb. 3.9 Schematische Darstellung von einzelnen Spins (dünne Pfeile) und der Magnetisierung (dicke Pfeile) im statischen externen Magnetfeld \mathbf{B}_{ex} (links) und nach Umlappen der Spins durch einen $\pi/2$ -Puls \mathbf{B}_{\perp} (rechts); während im ersten Fall die Spins ohne definierte Phasenbeziehung zueinander auf einem Kegelmantel mit der Larmor-Frequenz präzedieren und eine resultierende Magnetisierungskomponente in z-Richtung erzeugen, verschwindet im zweiten Fall $\langle M_z \rangle$ und es bildet sich aufgrund der Kohärenz der Einzelspins ein $\langle M_{x,y} \rangle \neq 0$ aus

dreht. Der rechte Teil in Abb. 3.9 zeigt den Sachverhalt für den wichtigen Spezialfall $\alpha = 90^\circ$ („ $\pi/2$ -Puls“). Durch einen solchen Puls wird $\langle M_z \rangle$ ausgelöscht, so dass gleich viele Spins auf dem oberen Kegel larmorpräzedieren wie auf dem unteren. Dagegen ist $\langle M_{xy} \rangle$ nun ungleich Null, weil durch den Umlappprozess eine Phasenfokussierung der Spins auf den beiden Kegelmänteln erfolgt ist. Die Präzession erfolgt nun kohärent. Im Falle eines π -Pulses wird \mathbf{M}_z von $+z$ -Richtung in $-z$ -Richtung umgedreht, infolgedessen der Zeeman-Grundzustand schwächer populierte ist als der angeregte. Dies entspricht einer negativen Temperatur, ähnlich der Inversion beim Laserpumpen.

3.5.2 Pulsfolgen zur Bestimmung von Relaxationszeiten

3.5.2.1 Spin-Echo-Sequenz

Mittels der Spin-Echo-Pulsfolge

$$\pi/2 \rightarrow \tau_0 + t \rightarrow \pi \rightarrow \tau_0 + t \rightarrow \text{Echo} \quad (3.51)$$

ist es möglich, die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 zu messen. Abb. 3.10a stellt dies graphisch dar. Zunächst klappt man durch einen $\pi/2$ -Puls die Magnetisierung aus der z-Richtung in die xy-Ebene. Danach gestattet man dem Magnetisierungsvektor einen Zeitraum $\tau_0 + t$ lang in Richtung seines Ausgangszustandes zurück zu relaxieren („free induction decay“). Hierbei steht τ_0 für eine aus messtechnischen Gründen erforderliche konstante Mindestwartezeit. Dagegen ist t derjenige Anteil der Wartezeit, der jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsfolgen erhöht wird. Die Erholung der Magnetisierung erfolgt transversal zum Magnetfeld \mathbf{B}_{ex} , so dass der interne Mechanismus die Spin-Spin-Relaxation ist. Gleichzeitig laufen die phasierten Spins wegen des über den Probenquerschnitt hinweg niemals exakt homogenen ex-

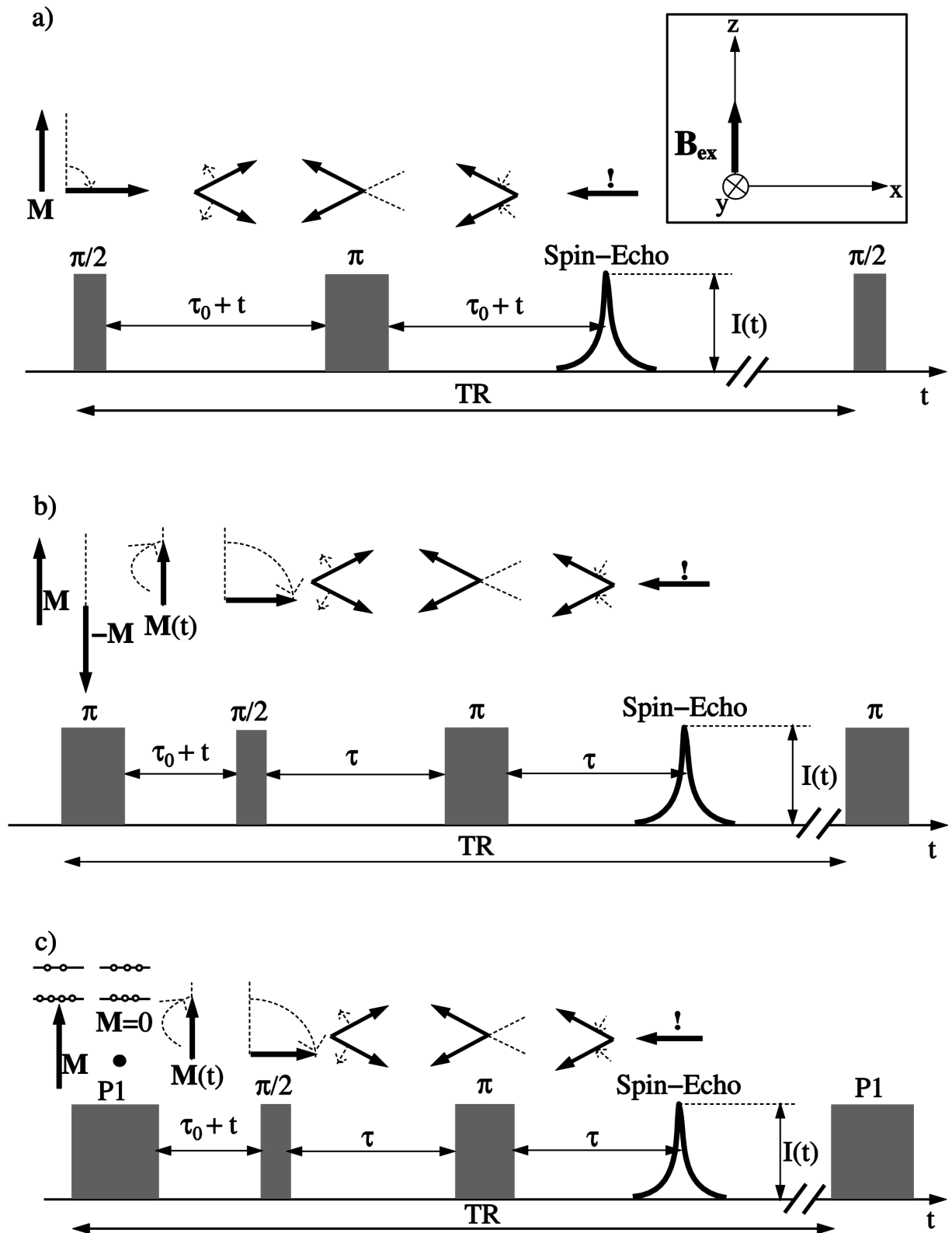


Abb. 3.10 Zeitliche Folge dreier Pulssequenzen und die Reaktion der Magnetisierung (genaue Erläuterung im Text) a) Spin-Echo-Sequenz b) Inversion Recovery-Sequenz c) Saturation-Recovery-Sequenz

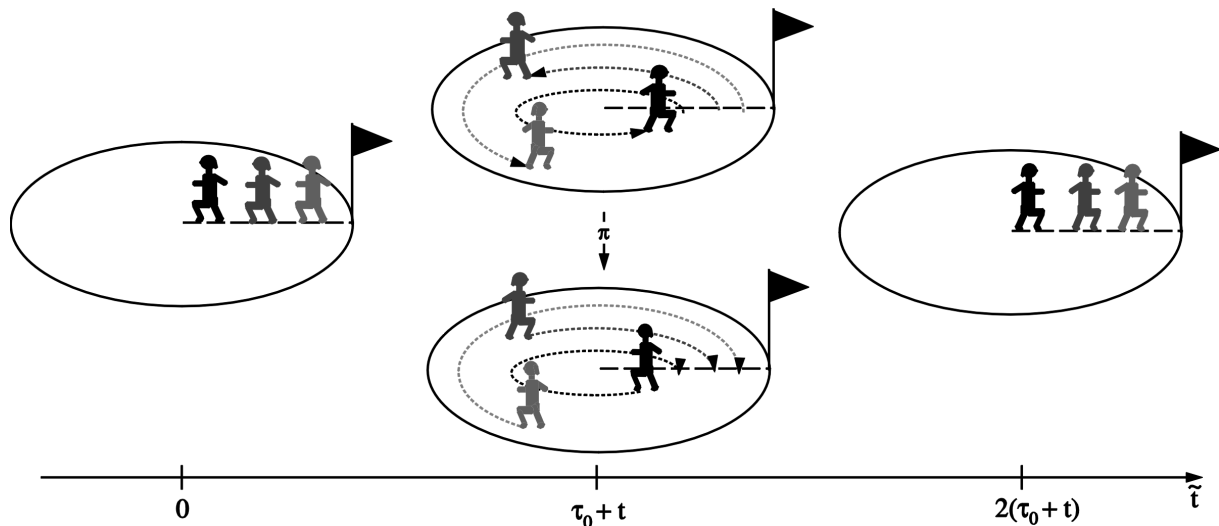


Abb. 3.11 Mechanisches Analogon nach Abragam für das Entstehen eines Echos in einem Spinsystem; Läufer (Einzelspins) starten bei $t = 0$ auf einer kreisförmigen Bahn und geraten aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten außer Phase; bei $t = \tau_0 + t$ kehrt sich die Laufrichtung um (π -Puls) und treffen einander bei $t = 2(\tau_0 + t)$ am Start wieder (Echo)

ternen Feldes und der daher leicht unterschiedlichen Larmor-Frequenzen auseinander. In einem auf Abragam zurückgehenden anschaulichen Analogon (Abb. 3.11) geraten die Läufer (Einzelspins), die von einem gemeinsamen Punkt aus gestartet waren (Spin-Kohärenz), aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten (Larmor-Frequenzen) außer Phase. Legt man nach der Wartezeit $\tau_0 + t$ einen π -Puls an, klappt die Magnetisierung um 180° um. Jeder Einzelspin spürt nun ein Magnetfeld umgekehrten Vorzeichens. Im mechanischen Analogon bewirkt dies, dass die Läufer umkehren und zum Startpunkt zurücklaufen. Dafür benötigen sie dieselbe Zeit $\tau_0 + t$ wie für den Hinweg. Nach dem Zeitintervall $\tau_0 + t$ treffen sich die Läufer daher wieder am Ausgangsort und die Spins sind zu diesem Zeitpunkt wieder in Phase. Man erhält wieder ein EPR-Signal, das sogenannte Spin-Echo. Durch den π -Puls werden jedoch ausschließlich die "trivialen" Einflüsse etwaiger Inhomogenitäten des externen Magnetfeldes exakt kompensiert. Die Dephasierung aufgrund Spin-Spin-Relaxation ist dagegen irreversibel. Daher wird die Intensität $I(t)$ des Spin-Echos von der Stärke der Spin-Spin-Relaxation und von der Wartezeit $\tau_0 + t$ abhängen. Verlängert man nach jeder Pulsfolge – die im Abstand TR wiederholt werden – die Wartezeit t , so wird man ein immer schwächeres Echo erhalten, dessen Intensität der Relation

$$I(t) \propto \exp(-t/T_2) \quad (3.52)$$

genügt. Damit lässt sich aus der Erholung der Magnetisierung die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 ermitteln.

3.5.2.2 Inversion-Recovery-Sequenz

Abb. 3.10b zeigt die Inversion-Recovery Pulsfolge

$$\pi \rightarrow \tau_0 + t \rightarrow \pi/2 \rightarrow \tau \rightarrow \pi \rightarrow \tau \rightarrow \text{Echo} \quad (3.53)$$

mit der die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bestimmt werden kann. Mit einem π -Puls wird zunächst der Magnetisierungsvektor in negative z-Richtung geklappt, im Idealfall entsteht keine Quermagnetisierung. Während der von Zyklus zu Zyklus ansteigenden Wartezeit $\tau_0 + t$ (wiederum ist τ_0 der konstante und t der variable Anteil) ist den einzelnen Spins Gelegenheit zur longitudinalen Relaxation (Spin-Gitter-Relaxation) gegeben. Je länger $\tau_0 + t$ ist, desto stärker hat sich die Magnetisierung erholt. Der Rest der Pulsfolge stellt ein Spin-Echo-Experiment dar, das der Analyse der teilweise relaxierten Spins dient. Ein $\pi/2$ -Puls klappt $\mathbf{M}(t)$ in die xy-Ebene, in der für den Zeitraum τ die Spins dephasieren. Ein erneuter π -Puls führt zur Refokussierung dieser Spins, so dass nach einer weiteren Wartezeit τ ein Echo gemessen werden kann. Durch Variation von t kann aus dem zeitlichen Verlauf der Echointensität $I(t)$ die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 gemäß

$$I(t) \propto \text{const.} \cdot \exp(-t/T_1) \quad (3.54)$$

erhalten werden.

Eine Ungenauigkeit der Messung resultiert aus der Tatsache, dass der erste π -Puls ein Umlappen um *exakt* 180° hervorrufen muss. Weicht der Drehwinkel von dem gewünschten Winkel ab, bleibt eine Magnetisierungskomponente in der xy-Ebene erhalten und das Messspektrum enthält auch Beiträge der Spin-Spin-Relaxation. Ein weiteres Problem besteht darin, dass das Messsignal von parasitären Echos zwischen erstem und zweitem sowie zwischen erstem und drittem Puls verfälscht werden kann. Diese treten zunächst zeitlich vor dem erwünschten Detektorsignal - dem Echo zwischen zweitem und drittem Puls - auf und überholen dieses aufgrund ihrer doppelt so hohen Geschwindigkeit. Bei den hier beschriebenen Messungen wurde dieses Problem dadurch gelöst, dass die Aufzeichnung des Messsignals erst deutlich nach vollendetem Überholprozess begonnen wurde. Dies lässt sich durch eine geeignete Wahl der in (3.53) auftretenden Zeitparameter bewerkstelligen.

3.5.2.3 Saturation-Recovery-Sequenz

Diese Pulsfolge ermöglicht ebenfalls die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit und entspricht folgendem Protokoll (Abb. 3.10c):

$$P1 \rightarrow \tau_0 + t \rightarrow \pi/2 \rightarrow \tau \rightarrow \pi \rightarrow \tau \rightarrow \text{Echo} \quad (3.55)$$

Bei der Inversion-Recovery-Methode wird zu Beginn die Magnetisierung durch einen lang andauernden Puls P1 in den Koordinatenursprung gedrückt. Nach diesem Sättigungspuls herrscht Gleichbesetzung der Zeeman-Niveaus, so dass die Magnetisierung in keiner Richtung eine resultierende Komponente besitzt. Während der Wartezeit $\tau_0 + t$ baut sich die Magnetisierung in z-Richtung infolge Spin-Gitter-Relaxation wieder auf. Der Rest der Pulsfolge ist identisch wie bei Inversion-Recovery: eine Spin-Echo Pulsfolge ruft ein Echo mit von t abhängiger Stärke hervor. Verlängert man nach jedem Durchlauf t , so genügt die

Zeitabhängigkeit der Echoamplitude dem Ausdruck (3.55). Dadurch kann T_1 bestimmt werden. Zu beachten und auf identische Weise zu lösen ist das in Kap. 3.5.2.2 beschriebene Problem mit parasitären Echos. Ein Vorteil verglichen mit der Inversion-Recovery-Methode besteht darin, dass die genaue Dauer des ersten Pulses nicht entscheidend ist. Nachteilig ist die deutlich erhöhte Messzeit.

3.6 EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure)

Als EXAFS-Spezialliteratur seien die Werke von Teo und Joy (1981) sowie Koningsberger und Prins (1988) empfohlen. Mess- und Auswertetechnik dokumentiert Scherk (1998). Bei der EXAFS-Methode misst man die Feinstruktur des Absorptionskoeffizienten nahe der Anregungsschwelle einer Atomart, die über die Energie von dessen charakteristischer Röntgenstrahlung ausgewählt wird. Der für EXAFS erforderliche intensive monochromatische Photonenstrahl wird von einer Synchrotronquelle bereitgestellt.

Überschreitet die Energie der Quanten die Ionisierungsgrenze eines K-Elektrons, so wird ein Elektron mit kleiner kinetischer Energie ins Kontinuum angehoben. Diese primäre Elektronenwelle ist in einem von den Nachbaratomen gebildeten Potentialkäfig eingeschlossen. Wird die Teilchenwelle an einem der angrenzenden Atome reflektiert, so läuft die Photoelektronenwelle zurück. Die Interferenz zwischen der primären und der an den Nachbaratomen gestreuten Elektronenwelle findet in der Energieabhängigkeit des Absorptionsspektrums in Form von langwelligen Oszillationen seinen Niederschlag (EXAFS-Spektrum). Die EXAFS-Funktion χ ist über die Absorptionskoeffizienten μ_0 eines freien Atoms und μ eines Festkörperatoms bei der Energie E durch

$$\chi(E) = (\mu(E) - \mu_0(E)) / \mu_0(E) \quad (3.56)$$

definiert. Ihre Abhängigkeit von der Wellenzahl k wird beschrieben durch die Beziehung (Scherk 1998, Fink und Geiger 1992)

$$\chi(k) = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^N \frac{|f_i(k)| \exp(-2k^2 \langle x_{XAS}^2 \rangle)}{r_i^2} \sin[2kr_i + \alpha_i(k)] \quad (3.57)$$

Dabei wird die Rückstreuamplitude mit f_i bezeichnet. Die Ondulationen mit der Phasenverschiebung $\alpha_i(k)$ spiegeln die chemische Umgebung des Absorberatoms wider. Denn der oszillatorische Verlauf erfolgt mit einer Frequenz, deren Fouriertransformierte den Abstand r_i der nächsten Nachbaratome liefert. Die Amplitude der Schwingung ist proportional zur Zahl der nächsten Nachbarn N. Damit erlaubt die EXAFS-Methode die Bestimmung von Koordinationszahl und Atomabständen bis etwa 4 Å. Auch gehen die korrelierte Dynamik von absorbierendem und rückstreuendem Atom und der Inhomogenitätsgrad eines Ensembles über den Debye-Waller-Faktor $\exp(-2k^2 \langle x_{XAS}^2 \rangle)$, dessen Bestandteil $2 \langle x_{XAS}^2 \rangle$ als A-Faktor bezeichnet wird, in die Messung ein. $\langle x_{XAS}^2 \rangle$ aus EXAFS stellt dabei ein relatives mittleres Auslenkungsquadrat zwischen dem röntgenaktiven Atom und dem streuenden Nachbaratom dar und nicht etwa eine absolute Auslenkung aus der Ruhelage. Es setzt sich aus statischen und dynamischen Komponenten zusammen (Scherk et al. 2000, Scherk 1998): zunächst spiegelt $\langle x_{XAS}^2 \rangle$ die Unterschiede der Atomabstände zwischen in einer EXAFS-Schale

zusammengefassten Ionen wider. Zweitens sind statische Verquetschungen, also strukturelle Unterschiede zwischen verschiedenen Molekülen des untersuchten Ensembles im Debye-Waller-Faktor aus EXAFS enthalten. Schließlich liefern auch relative Bewegungen der Bindungspartner zueinander einen Beitrag zu $\langle x^2_{XAS} \rangle$, der damit die korrelierte Dynamik zwischen streuendem und rückstreuendem Atom erfasst. Die hier beschriebenen EXAFS-Experimente wurden gemäß (3.57) über einen Marquart-Fit angepasst, den das Computerprogramm EXCURV92 (Binsted et al. 1992) bewerkstelligte.

4 Probenpräparation und Experimentiertechnik

4.1 Probenpräparation

4.1.1 Isolierung und Reinigung von HiPIP-Proben

Die Herstellung einer ^{57}Fe -angereicherten und damit auch für Mößbauer- und Eisen-ENDOR-Messungen geeigneten Probe von HiPIP *C. vinosum* WT, wie sie im Rahmen dieser Arbeit bei Prof. Capozzi in Cesena durchgeführt wurde, wird im Weiteren beschrieben. Die Verfahren zur Erzeugung der anderen hier untersuchten HiPIPs I *E. halophila* (Banci et al. 1994, Meyer 1985, Przysiecki et al. 1985) und *C. vinosum* C77S (Babini et al. 1996) sind dem an dieser Stelle dokumentierten Protokoll sehr ähnlich. Die entsprechenden Proben wurden innerhalb einer Kooperation an den Lehrstühlen von Prof. Bertini in Florenz und Prof. Capozzi in Cesena hergestellt. Sind die entsprechenden Plasmide, die in den genannten Gruppen entwickelt wurden (Banci et al. 1994, Babini et al. 1996), bereits verfügbar, so dauert die Gewinnung einer Charge sechs Tage.

Einschleusen des C. vinosum-Genes in kompetente E.coli-Zellen

Die HiPIPs wurden nicht in dem Organismus produziert, der die Proteine *in vivo* erzeugt, sondern in *Escherichia coli*-Bakterien, in welche man das entsprechende *C. vinosum*-Gen eingeschleust hat. Grund dafür ist, dass *E. coli*s robuster sind, schneller wachsen und der Reinigungsprozess aufgrund des gentechnisch angefügten H₆-Tags einfacher ist. Um die *C. vinosum* DNA in die *E. coli*s einzubringen (Sambrook et al. 1989, Ausubel et al. 1992), lässt man eine Kolonie kommerziell erhältlicher *E. coli*-Bakterien über Nacht auf einem Standard-LB-Medium (5 ml) bei 37 °C wachsen. Nach hundertfacher Verdünnung mit LB-Medium wachsen die Bakterien bei 37 °C weiter, bis eine optische Dichte OD_{660nm} = 0.5 erreicht ist. Nun wird die Bakterienkultur abzentrifugiert (7000 g für 5 min), der Überstand abgeschüttet und das Pellet weiter verwendet. Es wird in 60 ml „CM 1 Puffer“ (10 mM NaOAc pH5.6, 50 mM MnCl₂, 5 mM NaCl) gelöst und 20 min auf Eis gelagert. Nach abermaliger Abzentrifugation wird das Pellet nun aufgelöst in 6 ml „CM 2 Puffer“ (10 mM NaOAc pH5.6, 5 % Glycerin, 70 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂). Die entscheidende Komponente ist dabei das Kalziumchlorid, das den Zellen etwa eine Stunde lang die Fähigkeit verleiht, das Plasmid mit dem *C. vinosum*-Gen in die *E. coli*s eindringen zu lassen. Zellen, die mit diesem Verfahrens "kompetent" gemacht wurden, nennt man "Competent *E. coli* Cells TOPP1".

Das *C. vinosum*-Gen, in dem die HiPIP-Sequenz codiert ist, wird folgendermaßen in *E. coli* eingeschleust (Abb. 4.1a): Das ringförmige Plasmid wird mit Restriktionsenzymen aufgeschnitten und das die HiPIP-Sequenz enthaltene Gen des Bakteriums *C. vinosum* inklusive dem Code für den H₆-Tag dort eingebaut. Letzteres fügt am Sequenzende sechs weitere Histidine an (Babini et al. 1996, Eltis et al. 1994). 5 µl dieses Plasmids pEBCV10 werden mit 100 µl der kompetenten Zellen in einem Eisbad vermischt und 30 min gelagert. Tiefe Temperaturen sind hierbei ganz wichtig, da die kompetenten Zellen besonders empfindlich sind. Anschließend unterzieht man das Gemisch einem „Hitzeschock“, indem man es für 2 min auf 42 °C erhitzt (Abb. 4.1b). In diesem Zeitraum gestatten die Zellen ein Eindringen des Plasmids. Der geklonte Organismus ist nun zur Erzeugung des *C. vinosum*-

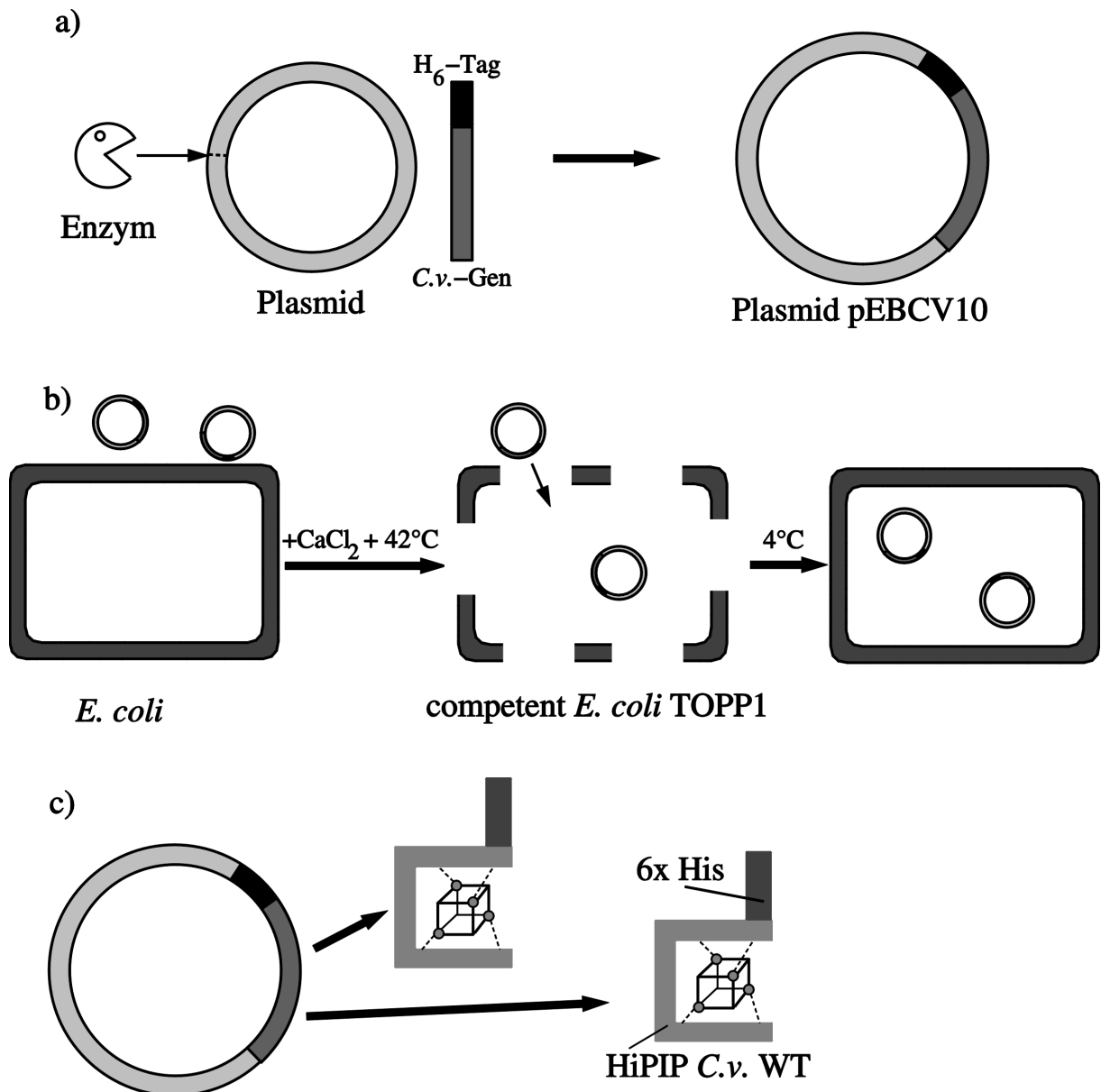


Abb. 4.1 Gentechnologisches Verfahren zur Expressierung von HiPIPs in *E. coli*-Zellen: a) ein Enzym trennt ein Plasmid auf, in welches das Gen zur Herstellung des Proteins (hier mit einem synthetischen Gen zur Erzeugung eines Poly-Histidin-Schwanzes) eingebaut wird; b) in die durch Kalziumchlorid und einen Hitzeschock „kompetent“ gemachten *E. coli*s kann das Plasmid mit dem HiPIP-Gen in die Bakterienzelle eindringen; c) im *E. coli*-Wirt kann das HiPIP-Gen das gewünschte Protein erzeugen

HiPIPs in der Lage (Abb. 4.1c). Nach dem Hitzeschock stellt man den Eppendorf-Behälter sofort in das Eisbad zurück.

Ansetzen der Bakterienkultur

Eine Petrischale wird steril mit LB-Medium, Ampicillin (ein Antibiotikum, in dessen Milieu ausschließlich die mit dem Plasmid klonierten *E. coli*-Zellen wachsen können) und Agar-Medium (sorgt für eine feste Konsistenz) belegt. Mit einer sterilen Impfeuse werden 50 µl der klonierten *E. coli*-Zellen auf die Petrischale aufgebracht und gut auf der Oberfläche verstrichen. Diese lässt man 16 h lang bei 37 °C wachsen. Zur Kontrolle der Sterilität bringt man auf einer mit demselben Gemisch bestrichenen Petrischale 50 µl „kompetenter“ *E. coli*

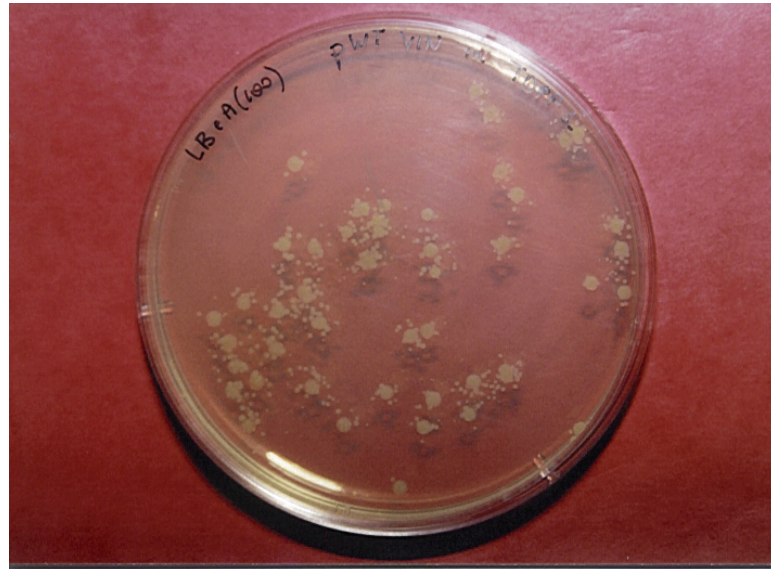


Abb. 4.2 Ampicillin-belegte mit modifizierten antibiotikaresistenten *E. coli*s angeimpfte Petrischale nach einem Tag Wachstum; diverse Bakterienkolonien sind zu erkennen.

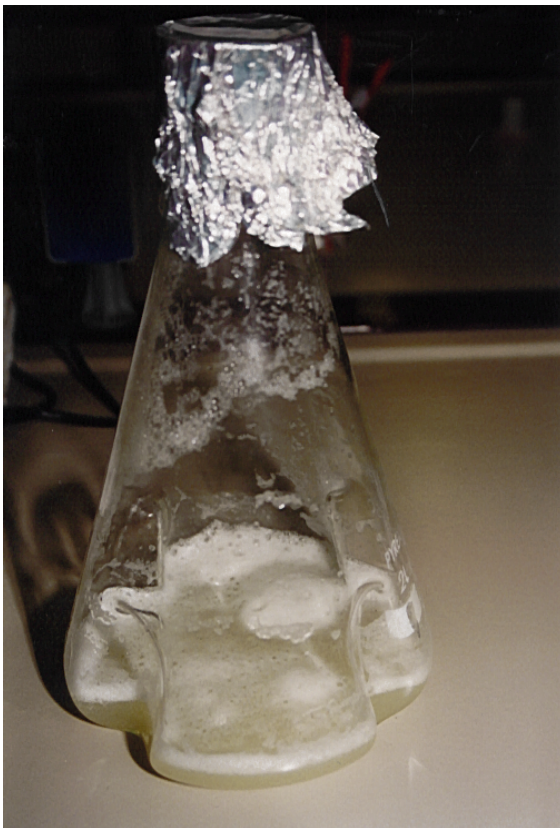


Abb. 4.3 Über Nacht sind in der im Brutkasten befindlichen Nährlösung Bakterienkulturen gewachsen, welche die Lösung färben und Schaum auf der Oberfläche erzeugen.

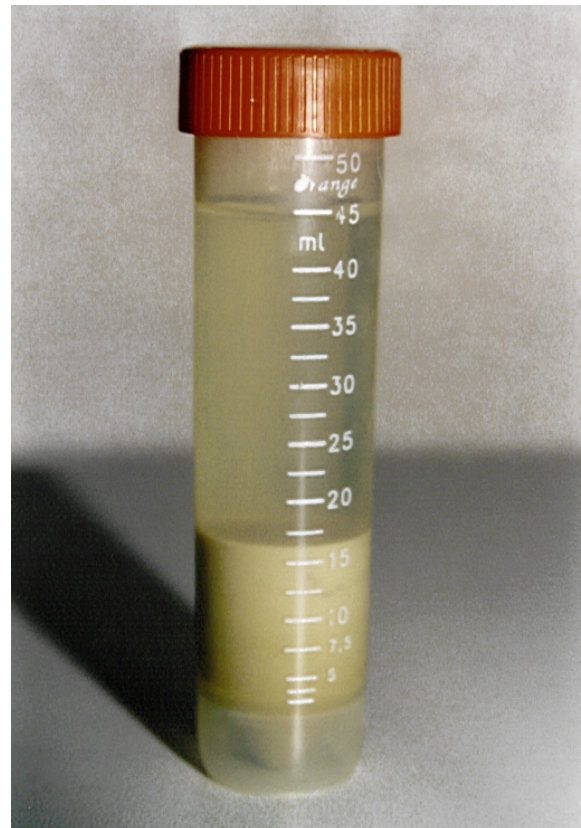


Abb. 4.4 Abzentrifugierte Bakterienkultur mit Nährlösung (Überstand) und purer Zellpaste (Niederschlag).



Abb. 4.5 Nach Aufbrechen der Zellen in der French-Press und Ultrazentrifugation trennt sich die Suspension auf in einen proteinhaltigen Überstand und einen Klumpen aus Zellmembran und DNS, der sich am Boden absetzt.



Abb. 4.6 Proteinreinigung auf der HiTrap-Säule: die auf Eis gelagerte Proteinlösung wird über einen Motor in die mit Nickelchlorid aufgeladene Säule geleitet, an der die HiPIPs (als dunkles Band erkennbar) festgehalten werden; mittels Imidazol wird die Proteinfraktion später abgelöst und von anderen Komponenten der Lösung getrennt aufgefangen.

ohne eingeschleustem Plasmid auf und stellt sie neben die andere Petrischale. Wurde steril gearbeitet, so darf hier nichts wachsen, da das Antibiotikum das Gedeihen der plasmidlosen *E. coli*s verhindert¹. Im Idealfall ist nach 16 h eine Bakterienkultur nur auf der ersten Petrischale sichtbar (Abb. 4.2).

Die Vermehrung der Bakterien erfolgt in einer „Minimal Medium“-Nährlösung, deren Zusammensetzung für *E.coli*-Bakterien optimiert und für die Herstellung mößbauerfähiger HiPIP-Proben geeignet ist, da die definierte Zugabe von 90 %-isotopenreinem ⁵⁷Fe möglich ist. Alle Geräte und Lösungen werden autoklaviert, außer der Glukoselösung, die statt dessen filtriert wird, da sie beim Autoklavieren karamellisieren würde. Gefäßdeckel werden beim Öffnen über dem Bunsenbrenner sterilisiert. Für 500 ml "Minimal-Medium"-Nährlösung werden 390 ml Wasser in ein Becherglas mit Einbuchtungen eingefüllt, dessen Form eine gute Durchmischung der Kultur während des Wachstumsprozesses ermöglicht. Es werden 50 µl 1 M CaCl₂ und 10 ml 20 % (Massenanteil) Glukoselösung hinzugefügt. Hierzu schüttet man 100 ml „M9 Salz“, das auf 1 l Gesamtvolumen 64 g Na₂HPO₄ 7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2.5 g NaCl und 5.0 g NH₄Cl enthält. Nun gibt man in die Mischung 1 ml 1 M MgSO₄, bevor 50 µl 10 mM „Tiamina“ (Vitamin B1) hinzugefügt werden. Zwei „Goodies“ werden beigegeben: „Goodies A“ enthält 214 mg MgO, 40 mg CaCO₃, 13.4 mg MnSO₄ H₂O, 30 mg ZnSO₄ 7H₂O, 5 mg CuSO₄ 5H₂O, 5 mg CaCl₂ 6H₂O, 1 mg H₃BO₃, 1 ml 37 % HCl und 20 ml ultrasteriles Wasser. Hiervon sind 625 µl dem Gemisch hinzuzufügen. „Goodies B“ besteht aus 12.5 mg in 0.5 ml Wasser gelöstem 90 %-⁵⁷Fe-isotopenreinem Mohrschem Salz (⁵⁷Fe(NH₄)₂(SO₄)₂). Dieses annähernd isotopenreine Mohrsche Salz ist die einzige eisenhaltige Chemikalie im „Minimal Medium“. Erzeugen die klonierten *E. coli*s HiPIP, so müssen sie das hierfür erforderliche Eisen dem Mohrschen Salz entnehmen. Alle Proteine sind daher mit ⁵⁷Fe ebenso zu 90 % angereichert wie die zugrundeliegende Eisenquelle. Letzter Bestandteil des „Minimal Medium“ sind 500 µl Lösung mit 0.1 µg/ml des Antibiotikums Amphicillin. Aus der Petrischale mit den gewachsenen Bakterien (Abb. 4.2) entnimmt man eine Kolonie, gibt diese mit 5 ml der „Minimal Medium“-Nährlösung in ein Reagenzglas und lässt die Bakterien wiederum 16 h bei 37 °C wachsen (Abb. 4.3). Die Lösung wird 15 Minuten bei 3150 rpm abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit den Bakterien in 0.5 ml Wasser wieder aufgelöst. Die Lösung wird für den letzten Wachstumsschritt in 500 ml „Minimal Medium“ eingerührt und 20 h unter ständigem Schütteln bei 37 °C gehalten. Ist die optische Dichte auf 0.7 gefallen, so ist eine ausreichende Zahl von Bakterien gewachsen. Dann kann mit der Gewinnung der Zellpaste begonnen werden. Für die Herstellung von ca. 75 mg HiPIP benötigt man achtzehn der beschriebenen Bakterienkulturen von je 500 ml Nährlösung.

Herstellung von Zellpaste aus den gewachsenen Bakterienkulturen

Die Nährlösung mit den gewachsenen Bakterien wird in einem PVC-Becher 20 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgeschüttet worden ist, werden der Zellpaste in

¹ Die Amphicillin-Resistenz der klonierten *E. coli*-Zellen ist ein Grund, warum mit den gentechnologisch veränderten Organismen sorgsam umgegangen werden soll. Ihre Freisetzung oder Inkorporation könnte die Antibiotika-Resistenz auf andere Bakterien übertragen. Alle kontaminierten Gefäße sind daher sorgsam zu autoklavieren, biologisch aktives Material ist mit Hexachlorat abzutöten.

jedem Becher 5 ml 1 mM EDTA (Acid Ethylendiaminotetraacetyl) beigegeben, durch welches restliche freie Eisenatome gebunden werden und die Zellpaste wieder verflüssigt wird. Das Material wird in einen Falcon-Behälter eingefüllt. Die Reste der Zellpaste im PVC-Becher werden mit weiteren 5 ml 0.1 mM EDTA gelöst und ebenso ins Falcon eingefüllt, bevor letzteres 1 h lang bei 4 °C und 3200 rpm zentrifugiert wird. Der Überstand wird mit einer an einer Pumpe angeschlossenen Pipette abgesaugt (Abb. 4.4). Der Zentrifugier- und Absaugprozess wird wiederholt und die Zellpaste in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den achtzehn Bakterienkulturen wurden 50 g pure Zellpaste gewonnen.

Aufbrechen der Zellen in der French Press

Die Zellpaste wird mit 100 ml Pufferlösung (20 mM Tris 100 mM KCl 1 mM MgSO₄ 1 mM CaCl₂ pH8.0) verdünnt. Dem Gemisch fügt man "eine Spatelspitze" (einige mg) DNase zu - ein Enzym, das nach dem Aufbrechen der Zellwände DNA-Stränge zersetzt. Zellklumpen in der Lösung werden verflüssigt, indem man diese in einem größeren Reagenzglas mit Hilfe eines Stempels zerreibt. Die Suspension wird in die French Press eingefüllt und unter Hochdruck durch ein winziges Loch expandiert. Durch den Druckunterschied reißen die Bakterienwände auf und die Zellflüssigkeit wird freigegeben. Die zuvor gelblich-graue Bakterienmasse färbt sich dunkel, weil die grün-schwarzen HiPIPs aus dem Zellinneren entwichen sind. Die Flüssigkeit wird nun in der Ultrazentrifuge 1 h lang bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wird abgeschöpft und das Pellet mit den Zellmembranen entfernt (Abb. 4.5).

Proteinreinigung mit der HiTrap-Säule

Eine kommerziell erhältliche HiTrap-Säule mit 5 ml Fassungsvermögen (Firma Pharmacia Biotech) wird zum ersten Schritt der Proteinreinigung verwendet. Mit einer Pumpgeschwindigkeit von etwa 0.2 - 0.3 ml/min wird die Säule zunächst mit etwa 25 ml Wasser vorgereinigt und anschließend mit 5 ml 0.1 M NiCl aufgeladen. Um überschüssiges NiCl auszuwaschen, spült man die Säule danach mit 150 ml 20 mM Tris 300 mM KCl pH6.0. Leitet man nun die Proteinlösung durch die Säule, so wird das mit sechs Histidinen modifizierte HiPIP mit hoher Affinität ans Nickel ligandiert und wird als Bande von der HiTrap-Säule aufgehalten (Abb. 4.6). Alle anderen Bestandteile der Lösung laufen durch die Säule. Zur weiteren Reinigung spült man die Säule mit weiteren 25 ml des zuvor verwendeten Puffers. Um die HiPIP-Fraktion von den Bindungsplätzen lösen, leitet man durch die Säule etwa 20 ml 20 mM Tris 300 mM Imidazol. Letzteres hat eine noch höhere Affinität zum Nickel als das Poly-Histidin am HiPIP, so dass das Protein von den Nickel-Bindungsstellen verdrängt wird und die Säule abwärts gleitet. Die stark dunkelgrün gefärbte HiPIP-Bande ist optisch leicht erkennbar und wird nun in einem Gefäß aufgefangen.

Dialyse und Aufkonzentration

Das Protein wird in einen angefeuchteten Dialyseschlauch mit einem Cutoff bei 3500 Da eingefüllt und der Schlauch an beiden Enden mit zwei Klemmen verschlossen. Der gefüllte Schlauch wird in 500 ml 40 mM Tris pH6.0 gelegt und unter ständigem Rühren (Rührfisch) im Eisbad 30 Minuten dialysiert. Diese Prozedur wird viermal mit jeweils frischem Puffer wiederholt. Danach ist das Imidazol aus der Lösung entfernt. Mit einem 10ml-Amicon (Mem-

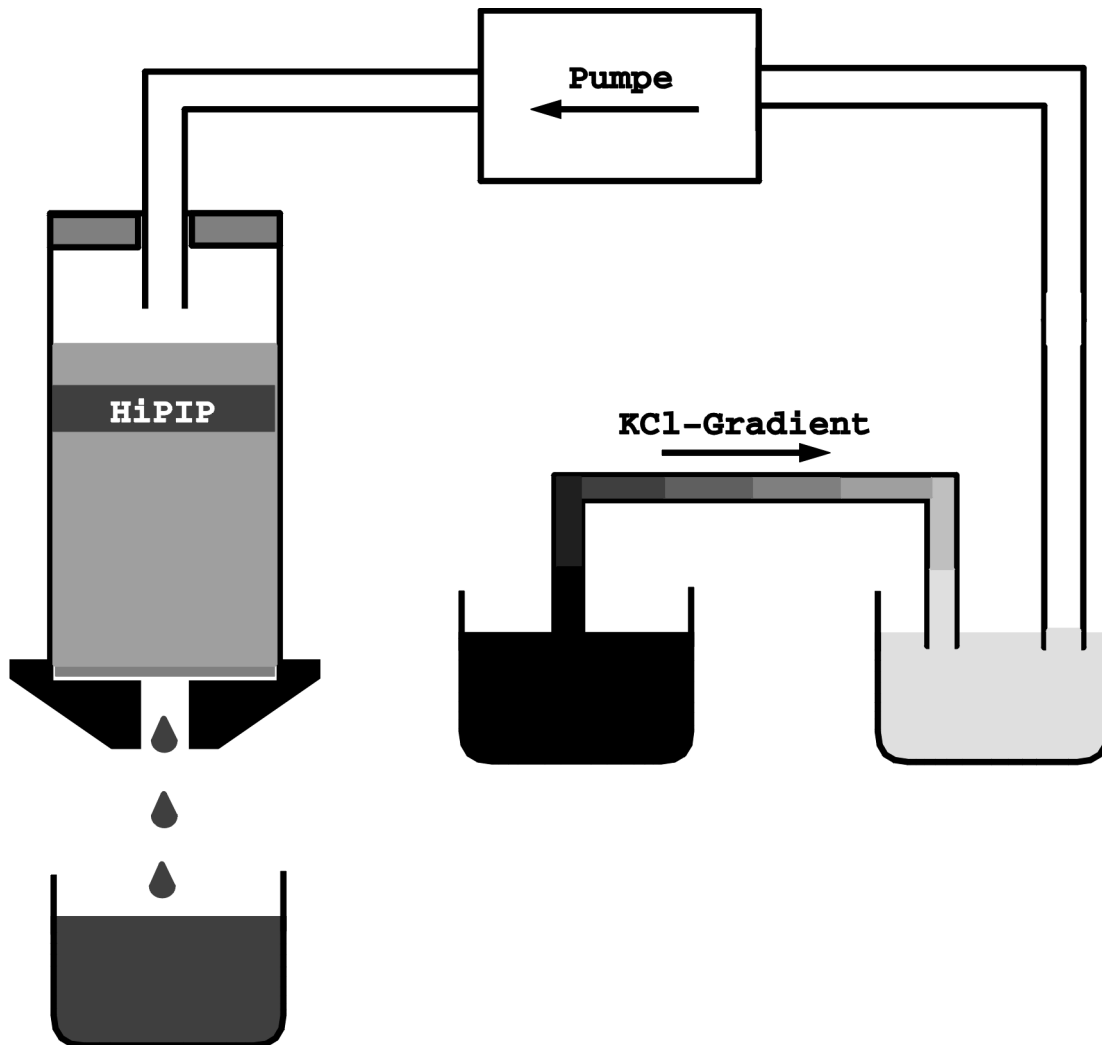


Abb. 4.7 Proteinreinigung auf der DEAE-Säule für Anionenaustauschchromatographie: die HiPIPs werden an der Zellolosesäule festgehalten.

bran mit Abschneidemasse 5000 Da) wird bei einem Überdruck von 4 bar Stickstoff die Lösung im Eisbad auf etwa 4 ml aufkonzentriert.

Abtrennung des Poly-Histidin

60 µg des Enzyms Restriktionsprotease Faktor Xa (Firma Boehringer Mannheim) werden in 60 µl des Puffers gelöst, in dem sich auch das Protein befindet. Dies wird in die Proteinlösung eingemischt. Das Enzym trennt die sechs Histidine vom modifizierten HiPIP ab. Die Restriktionsprotease arbeitet über Nacht in der Lösung, die bei 6 °C durch einen Rührfisch ständig in Bewegung gehalten wird. Danach wird die Proteinlösung erneut dialysiert, um das Enzym auszuspülen.

Anionen-Austausch-Chromatographie

Abb. 4.7 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten DEAE-Säule. 15 g pulverförmiges Diethylaminoäthyl (DE52, Firma Whatman) wird sehr langsam in 80 ml 400 mM Tris pH8.0 eingerührt und mit Salzsäure auf pH8.0 gebracht. Man wartet, bis sich das Gemisch abgesetzt hat und gießt den Überstand ab, bevor mit 20 ml 40 mM Tris pH8.0 aufgefüllt wird. Die ge-

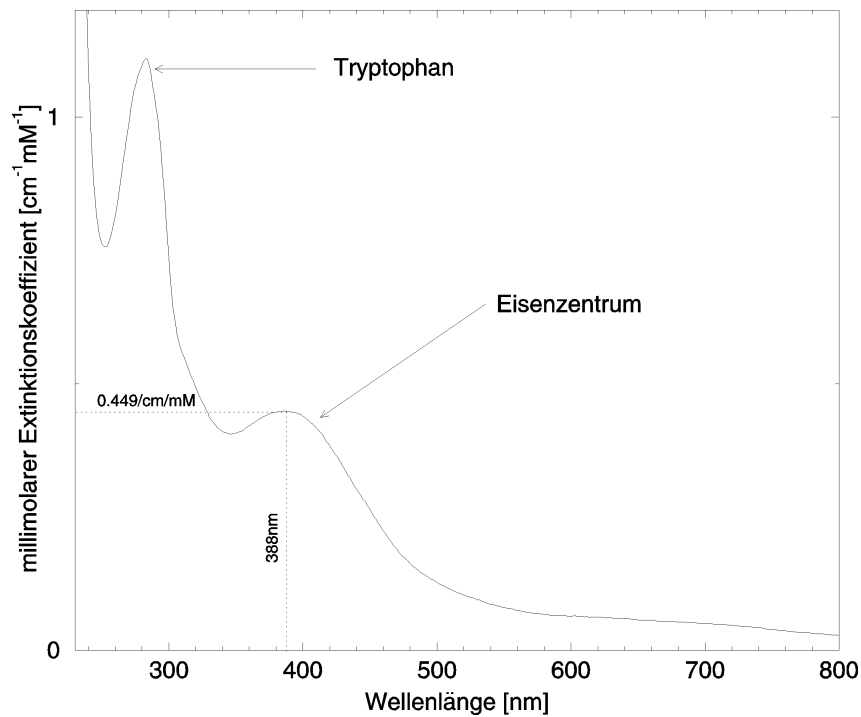


Abb. 4.8 Optisches Spektrum von reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT zur Konzentrationsbestimmung des isolierten Proteins

quollene Zellulose wird mit einer Pasteurpipette (dünn Ende komplett abgebrochen und über dem Bunsenbrenner entgratet) in eine Säule eingefüllt, die unten durch einen Bausch Glaswolle begrenzt wird. Nun wird die Säule mit 100 ml 40 mM Tris pH8.0 gespült. Füllt man die Proteinlösung ein, so bleibt diese aus elektrostatischen Gründen als dunkelgrünes Band hängen. Mit einem Gradientenbad KCl wird nun ein Puffer mit sukzessive steigender Kaliumchlorid-Konzentration durch die Säule gepumpt. Bei einer bestimmten Konzentration beginnt das Protein, die Säule hinabzugleiten. Es wird ein Puffer mit eben dieser KCl-Konzentration – die aus dem Volumen des bis zum Abgleiten des Proteins durchgepumpten Puffers berechenbar ist – hergestellt, im vorliegenden Fall etwa 100 mM KCl. Das Protein löst sich dann von der Säule und wird in einem Gefäß gesammelt. Damit ist ein weiterer Schritt der HiPIP-Reinigung vollzogen, da die Lösung nun von Bestandteilen mit anderen elektrischen Ladungszuständen gereinigt ist. Das Protein wird im 10 ml-Amicon wiederum auf etwa 4ml eingengt und gegen 50 mM Phosphat pH7.5 dialysiert.

Test auf erfolgreiche Abtrennung des Poly-Histidin

Die HiTrap-Säule wird, wie zuvor beschrieben, mit NiCl aufgeladen und die Proteinlösung durchgepumpt. Derjenige Teil des HiPIPs, dessen Histidin-Enden durch das Enzym Faktor Xa abgetrennt wurde, gleitet die Säule hinab und wird unten aufgefangen. Der HiPIP-Anteil, dessen Poly-Histidin durch das Enzym nicht abgetrennt wurde, wird an das Nickel gebunden. Er wird getrennt durch Imidazol von der Säule gelöst, bevor er abermals mit dem Enzym behandelt werden kann. Man engt die Lösung mit dem erfolgreich vom H₆-Tag befreiten HiPIP abermals im 10 ml-Amicon auf etwa 4 ml ein und dialysiert das Konzentrat gegen den entgültigen Puffer (20 mM Phosphat pH6.8).

Vollendung der HiPIP-Probe und Mengenbestimmung

Im 10 ml-Amicon konzentriert man das Protein, im beschriebenen Fall bis auf 850 μ l, nimmt dann ein optisches Spektrum von 1 ml verdünntem Protein (5 μ l der Lösung auf 1 ml Puffer) im Photometer auf (Abb. 4.8) und führt mit Hilfe einer Referenzmessung an 1 ml Puffer eine Untergrundkorrektur durch. Aus der Absorption bei 388 nm, $A_{388} = 0.449$, kann die Endkonzentration des Proteins bestimmt werden. Die beschriebene Präparation lieferte 73 mg reduziertes HiPIP *C. vinosum* in 850 μ l 20 mM Phosphatpuffer bei pH6.8, was einer Endkonzentration von 8.95 mM des Proteins entspricht.

4.1.2 Herstellung vollständig reduzierter HiPIP-Proben

Die Totalreduktion einer HiPIP-Probe erfolgt mittels Natriumdithionit, $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (Dickson and Cammack 1974). Dieses gibt man in fünffachem Überschuss zu einer möglichst hoch konzentrierten HiPIP-Probe (idealerweise etwa 10 mM) und stellt diese für 10 min in den Kühlschrank. Das Natriumdithionit entfernt man, indem man die Lösung in ein Centricon mit Abschneidemasse 5000 Da gibt, mit Puffer auffüllt und das Gemisch in einer Zentrifuge mit 5700 rpm auf das gewünschte Endvolumen einengt. Probleme durch Rückoxidation des Proteins traten dabei nicht auf, da HiPIPs im reduzierten Zustand stabil sind.

4.1.3 Herstellung vollständig oxidiertes HiPIP-Proben

Schwieriger ist es, volloxydierte HiPIP-Proben herzustellen, weil HiPIPs wegen ihrer ungewöhnlich hohen Redoxpotentiale (siehe Tab. 1.1) selbst starke Oxidationsmittel sind und deshalb die Tendenz haben, in den reduzierten Zustand zurückzulaufen. Da diese unerwünschten chemischen Prozesse umso effektiver ablaufen, je höher die Temperatur ist, sind eine zügige Präparation und ein Arbeiten bei 4 °C erforderlich. Aus der Literatur (Przysiecki et al. 1985, Ciszewska et al. 1989, Bertini et al. 1995a) ist nur ein geeignetes Oxidationsmittel für HiPIPs bekannt: Eisenhexacyanoferrat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), auch rotes Blutlaugensalz genannt. Dieses ist aufgrund seines Redoxpotentials von +450 mV, einer günstigen Reaktionskinetik und seiner Verträglichkeit mit Proteinen geeignet, HiPIPs zu oxidieren. Leider enthält diese Chemikalie aber mit der natürlichen Isotopenwahrscheinlichkeit von 2.17% ^{57}Fe und erzeugt daher im Mößbauer-Spektrum ein intensives Störsignal. Von der C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* ist bekannt, dass das Protein in hoher Konzentration von $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ seinen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster verliert und denaturiert. Außerdem reduziert jedes dieser freiwerdenden Eisen-Schwefel-Zentren weitere vier HiPIP-Moleküle und konterkariert damit den Oxidationsprozess (persönliche Mitteilung von Prof. Francesco Capozzi). Eisenhexacyanoferrat hat für die Präparation von EPR-Proben die weitere ungünstige Eigenschaft, dass es eine sehr breite EPR-Resonanz bei g-Werten aufweist, wo auch HiPIPs ein solches Signal zeigen. Außerdem ruft $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ein wellenförmiges Störsignal bei ENDOR-Messungen an HiPIPs im Bereich $g = 2$ hervor.

Folgende Methode ermöglichte es, vollständig oxidierte HiPIP-Proben zu gewinnen und gleichzeitig den Problemen mit dem $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ Herr zu werden. Man fügt der möglichst hoch

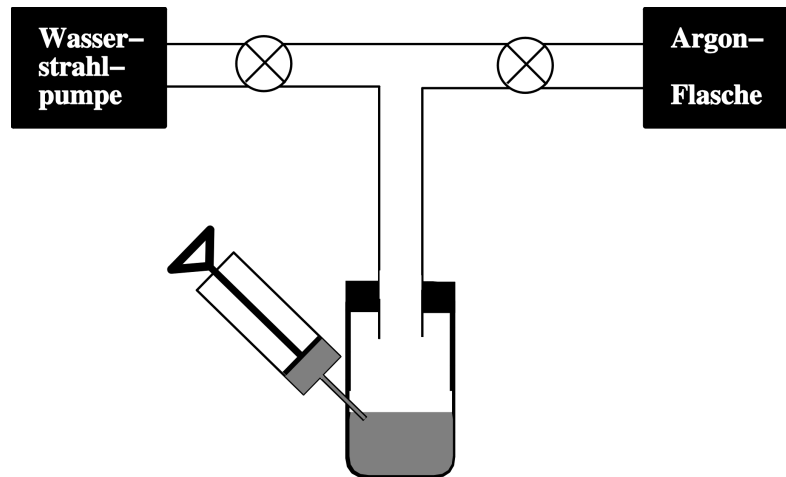


Abb. 4.9 Experimentelle Anordnung zur strikt anaeroben Durchmischung von reduziertem HiPIP *C. vinosum* mit einer Guanidiniumchlorid-Lösung zur Herstellung einer teilweise entfalteten Proteinprobe

konzentrierten HiPIP-Probe (10 mM) in zehnfachem Überschuss eine 0.5 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Lösung zu. Die gut durchmischten Komponenten werden für zehn Minuten kalt und dunkel aufbewahrt. Danach füllt man das Gemisch in ein Centricon mit CutOff 5000 Da ein und füllt mit dem entsprechenden Puffer auf 2 ml auf. Die Lösung engt man bei 4 °C in einer bei 5700 rpm arbeitenden Zentrifuge auf 100 μl ein, was mehrere Stunden dauert. Mit den angegebenen Zahlenwerten ergibt sich in der verbleibenden Probe ein Verhältnis von mößbauerfähigem Eisen aus dem Protein zu dem aus dem Oxidationsmittel von fast tausend. Die während des ganzen Prozesses anwesende geringe Restkonzentration $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ gewährleistet, dass rückreduzierende HiPIP-Moleküle wieder oxidiert werden. Außerdem ist mit dieser Methode eine hohe Proteinkonzentration erreichbar. Alternativ kann man mit einem 3 ml-Amicon (CutOff: 5000 Da) in etwa zwei Stunden die mit Puffer erweiterte Proteinlösung bis auf 200 μl aufkonzentrieren. Dem Vorteil einer kürzeren Präparationsdauer steht der Nachteil gegenüber, dass mit dieser Methode nicht ganz so hohe Endkonzentrationen erreicht werden.

4.1.4 Herstellung von reduzierten teilweise entfalteten HiPIP *C. vinosum* WT-Proben

Die unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführte Zugabe von Guanidiniumchlorid (GdmCl , CH_6ClN_3) zu reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT bewirkt eine reversible teilweise Entfaltung des Proteins (Bertini et al. 1997, Bentrop et al. 1999). Über die GdmCl -Konzentration kann gesteuert werden, welcher Anteil des Proteins sich im teilweise entfalteten Zustand und welcher sich im nativen Zustand befindet. Die Relation zwischen "Intermediate"-Anteil und GdmCl -Konzentration ist mittels NMR aus dem Intensitätsverhältnis der überlagerten NMR-Muster beider Komponenten bestimmbar. Die im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen gemessene Abhängigkeit (Tab. 4.1) weicht leicht von der in der Literatur beschriebenen ab (Bertini et al. 1997). Zu beachten ist, dass das Protein sekundenschnell irreversibel denaturiert - erkennbar am sofortigen Ausbleichen der Probe - wenn man oxidiertes HiPIP *C. vinosum* WT auch nur mit geringsten GdmCl -Konzentrationen in Berührung bringt oder bei der Behandlung der reduzierten Probe nicht anaerob arbeitet (Bertini et al. 1997).

c_{GdmCl} [M]	Anteil ungefalteten HiPIPs [%]
0	0
2.15	10
3.20	50
3.44	75
4.05	100
>> 4	Denaturierung

Tab. 4.1 Abhängigkeit des Anteils ungefalteten HiPIPs von der GdmCl-Konzentration

Zur Herstellung einer Probe von teilweise entfaltetem reduziertem HiPIP *C. vinosum* präpariert man zunächst eine bis nahe der Löslichkeitsgrenze aufkonzentrierte 8.6 M GdmCl-Lösung in 20 mM Phosphatpuffer bei pH6.8. Zweite Mischungskomponente ist 8.95 M reduziertes HiPIP *C. vinosum* WT im selben Puffer. Es wurden folgende Proben hergestellt:

150 μl Protein pur	$c_{\text{GdmCl}} = 0 \text{ M}$	0 % entfaltet
210 μl Protein + 36 μl Puffer + 141 μl GdmCl	$c_{\text{GdmCl}} = 3.20 \text{ M}$	50 % entfaltet
210 μl Protein + 177 μl GdmCl	$c_{\text{GdmCl}} = 4.05 \text{ M}$	100 % entfaltet

Damit das Protein intakt bleibt, ist eine Mischung zweier *beiderseits entgaster* Komponenten unter *strikt anaeroben* Bedingungen erforderlich (Abb. 4.9). Zunächst wird die in eine Spritze eingefüllte GdmCl-Lösung von gelöstem Sauerstoff befreit, indem man die Spritze an eine Wasserstrahlpumpe hängt. Dann wird durch Umlegen der Ventile Argon in die Spritze geleitet und durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklus Sauerstoff aus der Lösung entfernt. Die Proteinlösung in einem Kunststoffröhrchen wird separat auf gleiche Weise entgast. Dann bringt man anaerob die GdmCl-Lösung mit der Spritze in das Proteinröhrchen ein, so dass beide Komponenten sich durchmischen. Die Mischung kann dann mit der Spritze aufgenommen und unter ständiger Argonatmosphäre in den Probenhalter gefüllt werden. Dieser wird verschlossen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.1.5 Probenhalter

Für die Mößbauer-Experimente wurden hohlzylinderförmige Probenhalter aus PVC verwendet, die mit indiumgedichteten Hostaphan-Fenstern der Dicke 50 μm abgeschlossen wurden. Die Proben wurden durch schlagartiges Eintauchen in ein Bad aus flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die EPR- und ENDOR-Experimente wurde die Proteinlösung mithilfe einer über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipette in ein Probenröhrchen aus "spinarmem" Quarzglas eingefüllt. Aufgrund des geringen Innendurchmessers des Röhrchens von wenigen Millimetern führt ein schnelles Eintauchen in flüssigen Stickstoff wegen der raschen Expansion der Lösung beim Gefriervorgang zur Zerstörung des Probenhalters und zum Verlust der Proteinprobe. Deshalb ist das Röhrchen unter leichtem Drehen im kalten Dampf über der Oberfläche von flüssigem Stickstoff zunächst langsam zu verfestigen und erst dann in das Kühlmittel zu tauchen. Dennoch sollte der Füllstand des EPR-Röhrchens 2 cm nicht wesentlich überschreiten, um Glasbruch beim Gefrieren zu verhindern. Für alle EPR- und

ENDOR-Messungen ist zu beachten, dass bereits geringe Mengen $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ oder Tris-Puffer ein intensives Störsignal im Bereich um $g = 2$ erzeugen.

Für die EXAFS-Experimente wurden 1 mm dicke PVC-Plättchen mit herausgefrästen Fenstern verwendet, auf die mit Zweikomponentenkleber (Uhu plus schnellfest) eine Mylar-Folie aufgeklebt wurde. 75 μl einer hochkonzentrierten Proteinprobe wurde über eine 100 μl -Spritze durch eingebohrte Löcher luftblasenfrei eingefüllt. Anschließend wurden die Öffnungen mit Zweikomponentenkleber abgedichtet und die Probe in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Proteinprobe mit dem teilweise entfalteten reduzierten HiPIP *C. vinosum* wurde unter Argonatmosphäre in der Glove-Box präpariert.

4.2 Mößbauer-Experimente

Der Weg der γ -Strahlung in Abb. 4.10 zeigt die drei Elemente eines Mößbauer-Spektrometers: die auf einem Antrieb montierte radioaktive Quelle, den Absorber im Inneren eines Kryostaten und den Detektor mit angeschlossener Elektronik zur Signalverarbeitung.

Als Mößbauer-Strahlung wird hier der 14.4 keV γ -Übergang von ^{57}Fe verwendet, dessen Eigenschaften in Tab. 4.2 und dessen Zerfallsschema in Abb. 4.11 dargestellt sind. Die Strahlung kommt aus einer auf Zimmertemperatur befindlichen $^{57}\text{CoRh}$ -Quelle mit maximal $3.7 \cdot 10^9$ Bq Aktivität. So gemessene Isomerieverschiebungen sind auf die Referenz einer metallischen Eisenquelle bei Raumtemperatur durch Addition der Geschwindigkeit 0.114 mm s^{-1} umzurechnen (Muir et al. 1965), was bei allen in dieser Arbeit angegebenen Isomerieverschiebungen bereits berücksichtigt ist. Die Quelle ist auf einem nach dem Lautsprecherprinzip arbeitenden Antrieb befestigt, der mit Geschwindigkeitsamplituden von größenordnungsmäßig 10 mm s^{-1} (entspricht einer Dopplerenergie von $0.47 \text{ } \mu\text{eV}$) sinusförmig oszilliert. Die Geschwindigkeitsamplitude wird über die am Oszilloskop abgelesene Signalamplitude grob eingestellt und durch eine Eichmessung an einer Natrium-Nitroprussid-

Eigenschaft:	Größe:
Kernreaktion zur Produktion des Mutterisotops	$^{58}_{28}\text{Ni}(p;2p)^{57}_{27}\text{Co}$
Energie und Multipolmoment der Strahlung	$E_\gamma = 14.4125 \text{ keV (M1)}$
Wellenlänge der γ -Strahlung	$\lambda = 0.861 \text{ \AA}$
Konversionskoeffizient	$\alpha = 8.21$
Mittlere Lebensdauer	$\tau = 141 \text{ ns}$
Natürliche Linienbreite	$\Gamma = 4.7 \cdot 10^{-9} \text{ eV}$
Relative Energieauflösung	$\Gamma / E_\gamma = 3.3 \cdot 10^{-13}$
Natürlicher Isotopenanteil von ^{57}Fe	$n_{^{57}\text{Fe}} / n_{\text{Fe}} = 2.17 \%$
Kernspin und Parität des oberen/unteren Niveaus	$\frac{3}{2}^- / \frac{1}{2}^-$
Nuklearer g-Faktor des oberen/unteren Niveaus	$g_n = -0.1553 / +0.0906$
Kernquadrupolmoment des oberen/unteren Niveaus	$Q = -0.21 \text{ b} / 0 \text{ b}$
Relative Kernradiusdifferenz zwischen oberem/unterem Niveau	$\Delta R / R = -1.8 \%$

Tab. 4.2 Eigenschaften des Mößbauer-Übergangs von ^{57}Fe

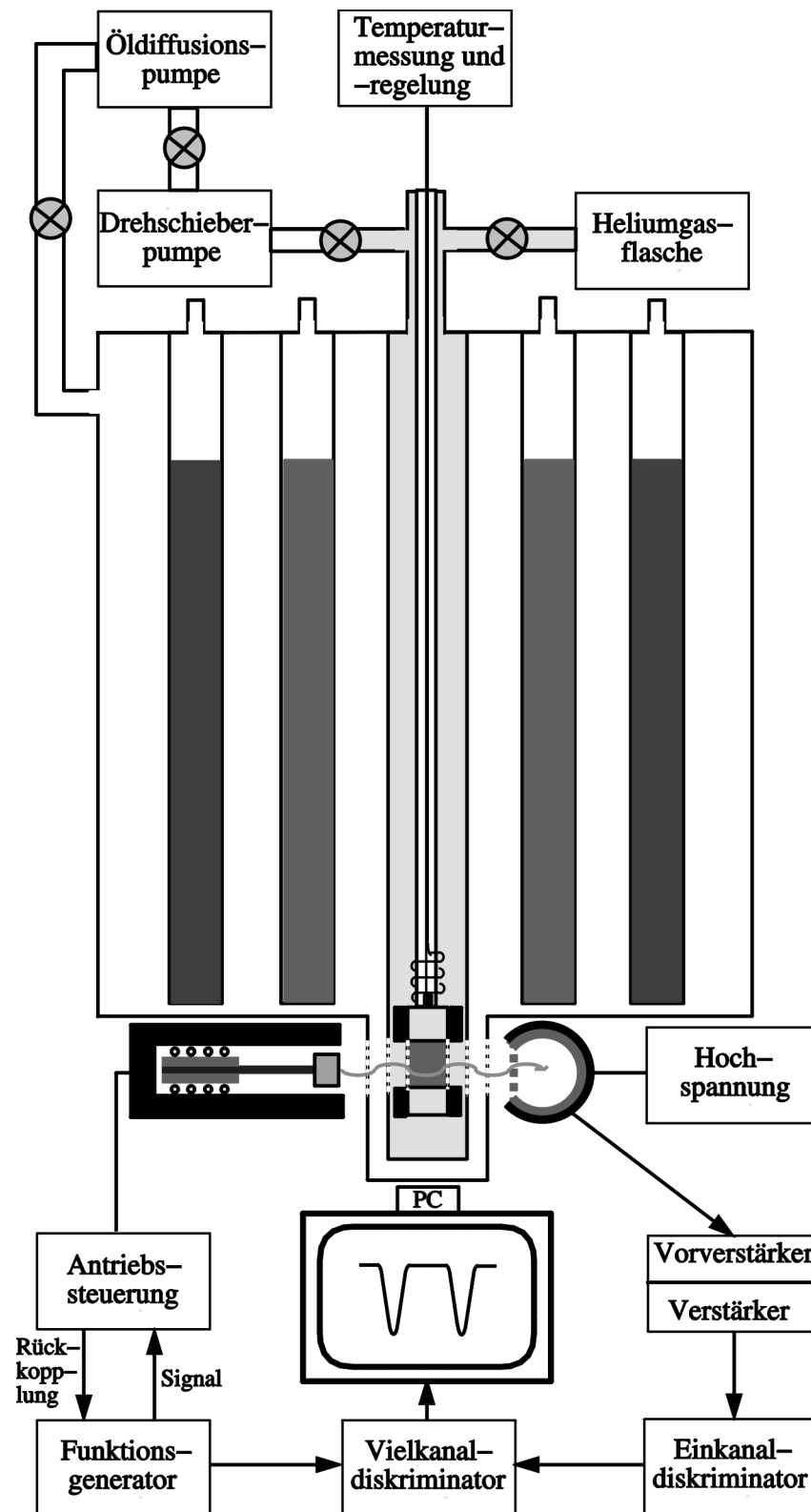


Abb. 4.10 Prinzipdarstellung eines Mößbauer-Spektrometers mit einem Badkryostaten (Erläuterung im Text)

Probe (SNP, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) aus dessen Quadrupolaufspaltung von 1.7034 mm s^{-1} (Stevens und Stevens 1977) exakt bestimmt. Ein Rückkopplungssystem zwischen Antriebssteuerung und Funktionsgenerator sorgt für ein fehlerfreies Geschwindigkeitsprofil.

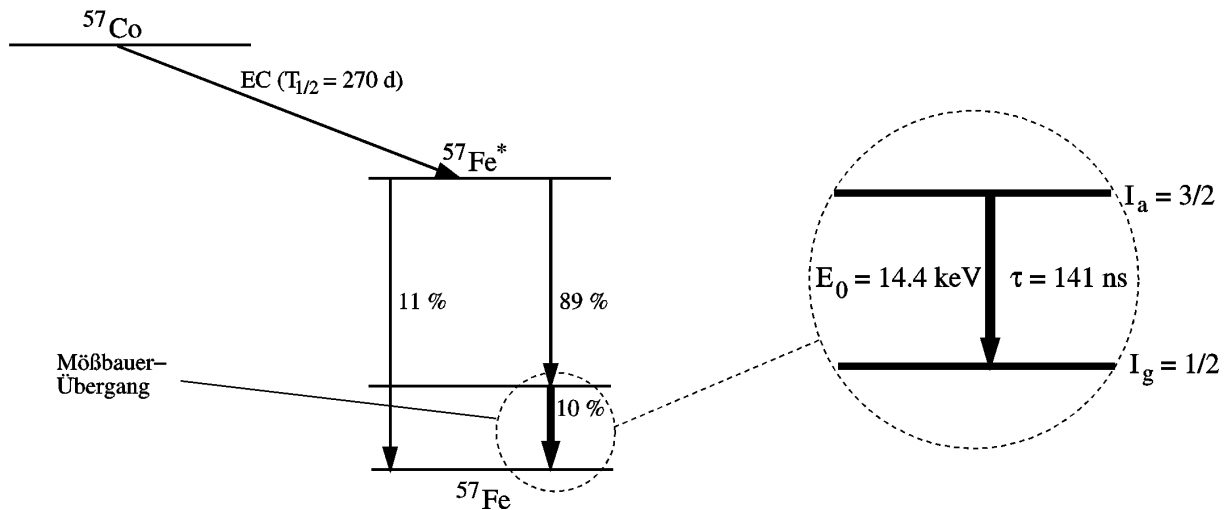


Abb. 4.11 Zerfallsschema für den mößbauerfähigen 14.4 keV-Übergang von ^{57}Fe .

Der durch einen Kollimator und ein Bleiblendensystem fokussierte γ -Strahl gelangt nach Durchqueren mehrerer etwa 100 μm dicker aluminiumbedampfter Hostaphan-Fenster zum Absorber, der am Ende einer Probenstange montiert im Inneren eines Kryostaten auf die gewünschte Temperatur gebracht ist. Bei den hier vorgestellten Messungen wurde ein Temperaturbereich von 2 K - 260 K abgedeckt. Durchflusskryostaten befördern über eine Saugpumpe laufend gasförmiges Kühlmittel aus einer Vorratskanne durch den Kryostaten. Mit Hilfe des Joule-Thomson-Effektes kann durch adiabatische Expansion des Kühlmittels beim Durchgang durch eine Düse zusätzliche Kälteleistung erzeugt werden und Temperaturen unterhalb des Siedepunktes des Kühlmittels erreicht werden (z. B. 2 K mit flüssigem Helium). Alternativ werden Badkryostaten wie der in Abb. 4.10 skizzierte verwendet, die anfangs mit dem Kühlmittel aufgefüllt werden und dieses dann sukzessive verbrauchen. Zwischen den Kühlmittel tanks befindet sich ein Vakuumraum, der durch ein zweistufiges Pumpensystem evakuiert wird: Eine Drehschieberpumpe wird zum Abpumpen beliebiger Kryostatenräume auf einige 10^{-3} mbar und im Dauerbetrieb als Auspuff für die Öldiffusionspumpe verwendet. Letztere bringt den Vakuumraum auf den Enddruck von etwa 10^{-6} mbar. Das Vakuum unterbindet Kälteverluste aufgrund von Gas-Wärmeleitung. Als Strahlungsschild gegen Wärmestrahlung dient die um die Kryostatentöpfe gewickelte Superisolation und der äußere mit flüssigem Stickstoff gefüllte Kühlmittel tank. Der innere Kühlmittel tank wird je nach Messtemperatur mit flüssigem Stickstoff oder Helium gefüllt. Er steht mit der metallischen Außenwand des Probenraums in thermischem Kontakt. Diese wiederum koppelt Kühlleistung über den mit Heliumgas gefüllten Probenraum in den Absorber ein. Die Temperaturmessung erfolgt durch eine geeichte Diode oder einen Pt100-Platinwiderstand. Die gewünschte Messtemperatur wird über den Heliumdruck im Probenraum und mittels eines um die Probe gewickelten Heizdrahtes eingeregelt. An den Absorber wurde bei fast allen hier beschriebenen Messungen ein schwaches externes Magnetfeld von 20 mT senkrecht zum γ -Strahl angelegt, das von zwei Permanentmagneten erzeugt wurde.

Die durch die Probe transmittierte Strahlung wird von einem mit Xenon gefüllten Proportionalzählrohr bei einer anliegenden Hochspannung von 2 kV detektiert. Das Signal wird von einer Elektronik, deren Blockschaltbild in Abb. 4.10 skizziert ist, weiterverarbeitet. Zunächst erfolgt eine Signalverstärkung im Vor- und Hauptverstärker. Ein

Einkanaldiskriminator prüft, ob die Energie des eintreffenden Quants innerhalb eines vor Beginn der Messung eingestellten Energiefensters um die Mößbauer-Resonanz herum liegt und blendet andere Strahlung aus. Im Vielkanalanalysator wird ein vom Einkanaldiskriminator akzeptiertes Quant in demjenigen Kanal gezählt, welcher der Antriebsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der Emission des Photons aus der Quelle entspricht. Die üblicherweise 1024 Kanäle werden über einen PC ausgelesen und zur weiteren Auswertung auf eine Workstation transferiert.

Vor Aufnahme eines jedem Mößbauer-Spektrums wird das Pulshöhenspektrum der Quelle kontrolliert. Dieses zeigt neben der 14.4 keV-Strahlung von ^{57}Fe noch diskrete Röntgenlinien (Fe- K_α bei 6.4 keV, Rh- K_α bei 20.2 keV, Rh- K_β bei 21.6 keV) und einen für Xenon-Zählrohre typischen Escape-Peak bei 10.3 keV. Die diskreten Linien sitzen auf einem breiten Compton-Gebirge. Nicht mößbauerfähige Strahlung wird zunächst weitgehend durch Einstellung des Energiefensters am Einkanaldiskriminator ausgeblendet. Jedoch befinden sich im Inneren dieses Fenster auch Flanken benachbarter Resonanzen sowie der Untergrund infolge Compton-Streuung. Damit ist eine Verfälschung der Fläche unter dem Mößbauer-Spektrum verbunden. Dies lässt sich korrigieren, indem man nach Anpassung des Pulshöhenspektrums den Anteil R der Quanten im Fenster berechnet, der tatsächlich mößbauerfähig ist.

4.3 EPR- und ENDOR-Experimente

4.3.1 Cw-EPR-Messungen

Für die Experimente wurde ein Bruker elexsys 580 Spektrometer mit einem Kryostaten der Firma Oxford sowie separaten Resonatoren für Cw-EPR, gepulste EPR und ENDOR verwendet. Das System wird über das Computerprogramm Xepr gesteuert. Einzelheiten zum technischen Aufbau dieser Maschine finden sich an anderer Stelle (Mentler 1999).

Den Aufbau eines EPR-Spektrometers stellt Abb. 4.12 dar. Eine Gunn-Diode erzeugt monochromatische Mikrowellenstrahlung, bei X-Band EPR im Bereich von 9.5 GHz. Die Mikrowellenleistung kann eingestellt werden und wird an einem Referenzarm gemessen. Die Strahlung wird über das „Magic-T“ in den Hohlleiter eingekoppelt, von wo aus die Mikrowellen in den Resonator gelangen. In diesem metallischen Hohlraum befindet sich die Probe, die in ein Röhrchen aus spinarmem Quarzglas eingefüllt ist. Zur Kühlung wird ein heliumbetriebener Durchflusskryostat verwendet, mit dem Temperaturen bis 2 K erreicht werden können. Die gewünschte Temperatur wird über den Heliumdurchsatz auf etwa 1 K unterhalb der Solltemperatur eingestellt und mit einem Heizdraht auf die Endtemperatur geregelt. Durch Justierung einer Stellschraube (Iris), der exakten Mikrowellenfrequenz und der Detektordiode wird die Mikrowellenbrücke abgeglichen. Dadurch erreicht man eine sogenannte „kritische Kopplung“, bei der die gesamte Mikrowellenleistung in den Resonator eingespeist wird und im Idealfall keine Leistung mehr an der Grenze zwischen Hohlleiter und Resonator reflektiert wird. Im Resonator bilden sich stehende Mikrowellen aus, deren elektrische und magnetische Feldvektoren aufeinander senkrecht stehen. Ein wassergekühltes stromdurchflossenes Spulenpaar bewirkt ein homogenes durchfahrbares Magnetfeld B_0 von etwa 340 mT im Fall von X-Band-EPR bei $g = 2$. Senkrecht dazu erzeugen zwei Modulationsspulen ein kleines oszillierendes Magnetfeld B_1 . Sollte die Resonanzbedingung

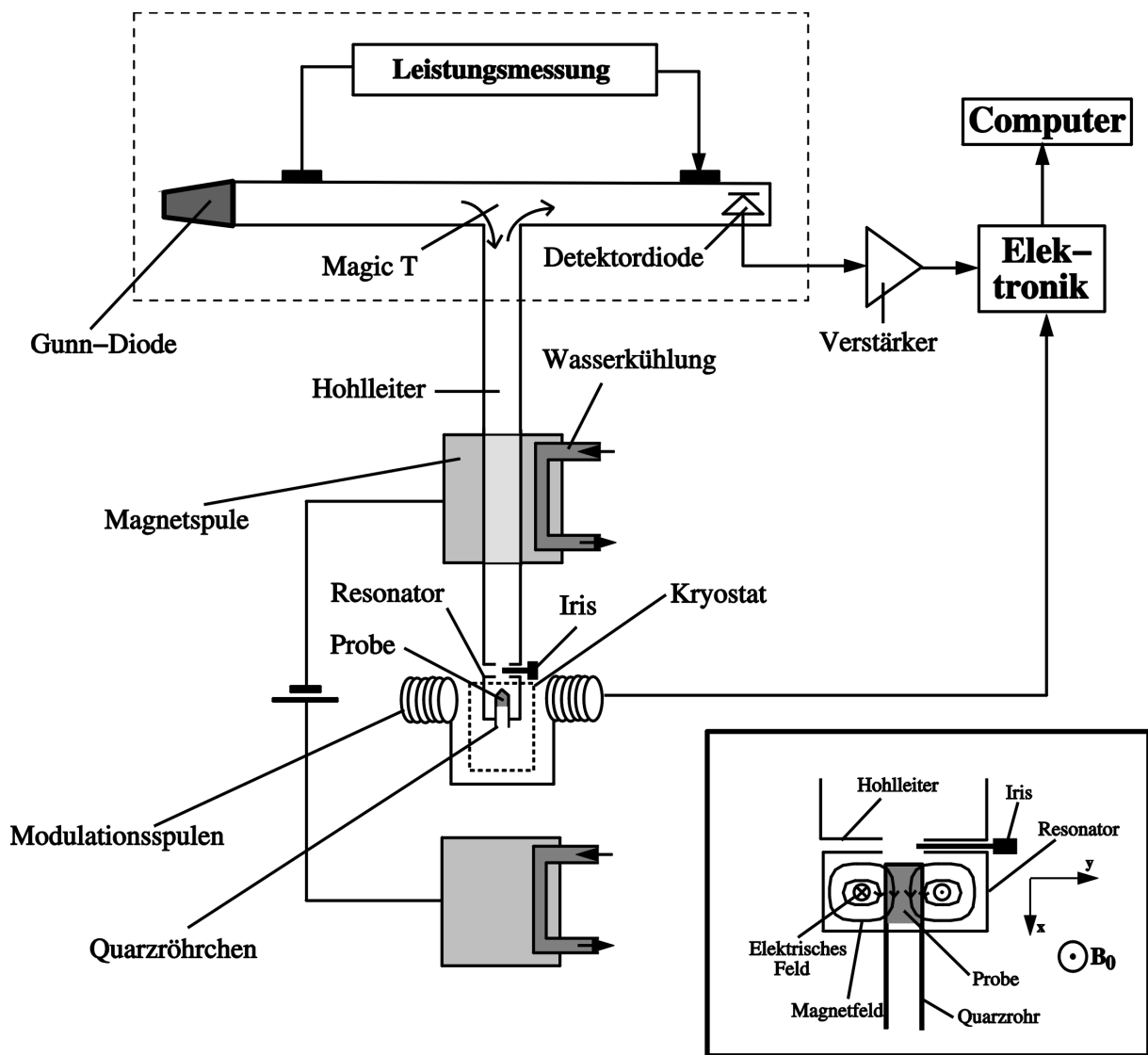


Abb. 4.12 Skizze eines EPR-Spektrometers und Verlauf magnetischer und elektrischer Feldlinien im Resonator (Einschub).

(3.42) erfüllt sein, so absorbiert die Probe Mikrowellen. Dadurch wird die Mikrowellenbrücke verstimmt, so dass Hohlleiter und Resonator nicht mehr kritisch gekoppelt sind. Ein Teil der Mikrowellenleistung wird reflektiert und die Detektordiode empfängt ein zur Absorptionsleistung proportionales Signal. Aufgrund des dem starken externen Feld B_0 überlagerten Modulationsfeldes $B_{10}\cos\omega t$ ist das Messsignal die erste Ableitung des Absorptionssignals. Dies ist vorteilhaft, da das differenzierte Signal konturenreicher ist als die Absorptionsintensität selbst.

Für die in Tab. 4.3a erläuterten Parameter sind geeignete Werte einzustellen. Insbesondere ist die Leistung ausreichend klein zu wählen, um die Probe nicht in die Sättigung zu treiben. Dies kann kontrolliert werden, indem man ein Probespektrum aufnimmt und untergrundkorrigiert integriert. Das so erhaltene Absorptionsspektrum zeigt eine Sättigung dadurch an, dass das Intensitätssignal nach der Resonanz nicht wieder genau auf den Nullwert zurückgeht, sondern darunter oder darüber bleibt. Ergänzend kann man das EPR-Spektrum bei zwei Leistungen im Verhältnis von eins zu zehn aufnehmen. Nur wenn beide Kurven bis

a) Parameter	Bedeutung	100µl 10 mM HiPIP
Sweep Width	Durchfahrbarer Magnetfeldbereich	[300 mT; 350 mT]
Frequency	zum Abgleich von Resonator und Hohlleiter feinjustierbare Mikrowellenfrequenz	9.45 GHz
Iris	Drehschraube zur kritischen Kopplung von Hohlleiter und Resonator	
Power	Mikrowellenleistung, die so schwach sein muss, dass Absorber nicht in Sättigung ist	1 mW bei 30 K
Modulation Frequency	Frequenz der Modulationsspulen	100 kHz
Modulation Amplitude	Magnetfeldamplitude der Modulationsspulen (auflösungsbestimmend, daher klein gegen die Linienbreite zu wählen)	0.05 mT
Receiver Gain	Verstärkungsfaktor für analoges Signal	60 dB
Conversion Time	Verharrzeit pro Magnetfeldkanal (darf nicht zu kurz gewählt werden)	40.96 ms
b) Parameter	Bedeutung	100µl 10 mM HiPIP
Field Position	Magnetfeldwert, der untersuchten g-Faktor festlegt	
Power	Mikrowellenleistung, die so stark sein muss, dass der Absorber in Sättigung ist	10 - 20 mW bei 5 K
Sweep Width	durchfahrbarer Radiofrequenzbereich	[5 MHz; 23 MHz]
Modulation Frequency	Frequenz der Modulationsspulen	12.5 kHz
Modulation Depth	Amplitude der Radiofrequenzmodulation (auflösungsbestimmend)	150 kHz
Conversion Time	Verharrzeit pro Radiofrequenzkanal (darf nicht zu kurz gewählt werden)	40.96 ms

Tab. 4.3 Messparameter (erste Spalte), deren Bedeutung (zweite Spalte) und typische Werte für Messungen an 100 µl 10 mM HiPIP-Proben (dritte Spalte) für a) EPR- und b) ENDOR-Messungen; Nomenklatur gemäß Bruker-Software Xepr zum EPR-Spektrometer ESP 580

auf einen konstanten Faktor über den gesamten spektralen Bereich identisch sind, war die Probe bei beiden Leistungen außer Sättigung. Geeignete Mikrowellenleistungen sind extrem proben- und temperaturabhängig. Für die Messung wird das Magnetfeld so oft durchgefahren, bis die gewünschte Statistik erreicht wird. Das Spektrum wird dann mit geeigneter Software, etwa WinEPR und SimFonia der Firma Bruker (Thiele et al. 1992, Weber et al. 1995), weiterverarbeitet. Manchmal ist dem Messspektrum ein Untergrund überlagert, der von breiten parasitären Resonanzen (z. B. durch Sauerstoff im Resonator) hervorgerufen wird. Dann ist vor der Simulation des Spektrums eine Untergrundkorrektur durchzuführen.

4.3.2 ENDOR-Messungen

Als ENDOR-Spektrometer wurde ein modifiziertes Bruker elexsys 580 Spektrometer verwendet. Neben der umfangreicheren Elektronik besteht der Hauptunterschied zum Cw-EPR-Spektrometer darin, dass für ENDOR-Experimente um die Probe herum zusätzlich eine vergoldete Metallwendel angebracht wird, die mit einem Radiogenerator verbunden ist. Diese

Anordnung versorgt den Absorber mit Radiostrahlung, die im Bereich [0.3 MHz; 37 MHz] durchgestimmt werden kann. Ein ENDOR-Experiment läuft bis auf einige Änderungen ähnlich ab wie ein EPR-Experiment. Nachdem die Probe eingebaut und auf die richtige Temperatur gebracht wurde sowie die Mikrowellenbrücke abgeglichen wurde, sind die in Tab. 4.3b genannten ENDOR-spezifischen Messparameter einzustellen. Im Unterschied zu Cw-EPR werden nun Mikrowellenfrequenz und Magnetfeld konstant gehalten und auf eine gewünschte Stelle der zugrundeliegenden EPR-Resonanz eingestellt. Durchgeföhren wird statt dessen nun die Frequenz der Radiowellen. Außerdem wird die Probe durch Wahl einer hohen Mikrowellenleistung gezielt in Sättigung gebracht. Ist bei einer passenden Radiofrequenz (3.47) erfüllt und Resonanzabsorption durch das Kernspinsystem möglich, so erfolgt ein Kernspinflip, der das gekoppelte Elektronen-Kern-System aus dem Sättigungszustand herausführt und das EPR-Signal wieder aufleben lässt. Letzteres stellt das Messsignal dar. Im ENDOR-Spektrum wird die Amplitude des EPR-Signals in Abhängigkeit von der Radiofrequenz aufgetragen.

4.3.3 Gepulste EPR-Messungen

Hauptunterschiede zur Cw-Maschine ist die wesentlich aufwendigere Elektronik zur Steuerung, Erzeugung und Detektierung der Mikrowellenpulse und Spinechos, der spezielle Quadraturdetektor und der mit einem Dielektrikum ausgegossene Resonator. Außerdem werden die Mikrowellen hier nicht dauerhaft, sondern nur in kurzen Pulsen auf die Probe eingestrahlt. Technische Details sind bei Mentler (1999) beschrieben.

Neben der geeigneten Wahl der EPR-Parameter aus Tab. 4.3a kommt es für das Gelingen eines gepulsten EPR-Experimentes maßgeblich darauf an, die Pulsdauern und Pulsabstände geeignet auszuwählen (vgl. (3.51), (3.53), (3.55)). Dies ist für jedes Experiment individuell durchzuführen. Hauptproblem ist das Ausschalten von parasitären Echos, die bei Sequenzen mit mindestens drei Pulsen auftreten.

4.4 EXAFS-Messplatz

Die hier beschriebenen EXAFS-Untersuchungen wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg am Messplatz D2 des Speicherrings DORIS im Hasylab des EMBL durchgeführt. Die Synchrotronstrahlung wurde von einem Elektronenstrom von 150 - 80 mA und einer Elektronenenergie von 4.4 GeV erzeugt. Eine Messung über die K_{α} -Eisenkante zwischen 7029 eV und 8110 eV dauerte 45 - 70 min. Für die HiPIP-Proben mit Proteinkonzentrationen von 1 - 6 mM und entsprechend vierfach höherer Eisenkonzentration mussten 11 - 26 Scans durchfahren werden. Durch einen "Closed-Cycle" Heliumkryostaten wurden die Proben auf 40 K gebracht. Abb. 4.13 zeigt schematisch den Aufbau des Experiments. Der Synchrotronstrahl wird durch eine motorgesteuerte Anordnung von Siliziumkristallen über deren Bragg-Reflexe monochromatisiert und auf die Proteinprobe geschossen. Im rechten Winkel zum Primärstrahl misst ein stickstoffgekühlter 13-Elemente-Detektor die Fluoreszenzstrahlung. In Strahlrichtung nehmen zwei Szintillationsdetektoren die Bragg-Reflexe eines dazwischenliegenden Siliziumkristalls auf (7051, 7063, 7238, 8089 eV; 7063, 7076, 7293, 8059 eV), anhand derer die Energie des Primärstrahls kalibriert werden kann. Nach einer Untergrundkorrektur auf Basis einer kubischen Funktion mit drei Knoten kann die Feinstruktur der K_{α} -Absorptionskante des Eisens ausgewertet werden.

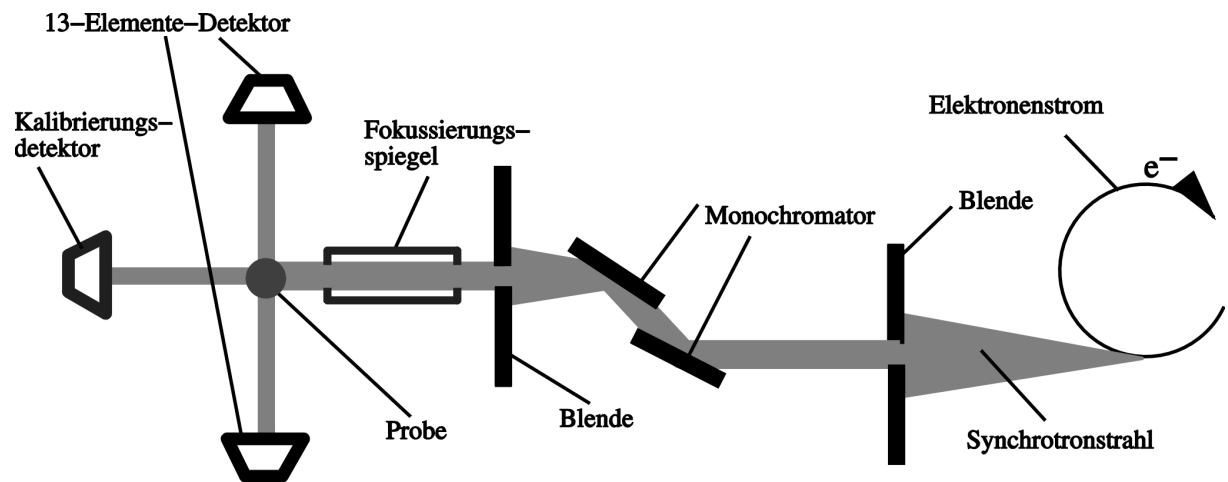


Abb. 4.13 Schematischer Aufbau eines EXAFS-Experiments nach dem Vorbild des Messplatzes D2 am EMBL des DESY in Hamburg.

5 Experimente an nativen, mutierten und teilweise entfaltenen oxidierten und reduzierten HiPIPs mit fünf Spektroskopien

5.1 Cw-EPR an oxidierten HiPIPs

Im Weiteren werden Cw-EPR-Experimente am HiPIP I *E. halophila*, dem HiPIP *C. vinosum* WT und dessen C77S-Mutante beschrieben (Dilg et al. 1999, Dilg et al. 2000a).

Bei allen drei HiPIPs konnte in der reduzierten Version kein EPR-Signal gemessen werden. Auch alle anderen zuvor untersuchten reduzierten HiPIPs waren EPR-silent. Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrum ist also diamagnetisch.

Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster in oxidierten HiPIPs zeigt dagegen eine EPR-Resonanz knapp oberhalb von $g = 2$. Das Signal ist nur unterhalb 50 K detektierbar, da es bei höheren Temperaturen wegen des zunehmenden Einflusses paramagnetischer Elektronenrelaxation immer kleiner wird und schließlich im Untergrund verschwindet. Unterhalb etwa 20 K ist das Signal zwar sehr stark, man erhält aber keine auswertbaren Spektren: selbst bei kleinsten Mikrowellenleistungen scheinen Teile des EPR-Signals in Sättigung zu gehen, so dass das integrierte EPR-Spektrum keine nach der Resonanz auf Null zurückgehende Absorptionskurve liefert. Die Linien sind außerordentlich breit und das EPR-Spektren wirkt deformiert. Diese Probleme können umgangen werden, indem man bei $T = 30$ K misst.

Abb. 5.1 zeigt das EPR-Signal des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentrums von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* bei $T = 30$ K im g -Bereich von 1.99 bis 2.18. Die Analyse des EPR-Spektrums wurde mit Hilfe der Bruker-Software WinEPR und SimFonia vorgenommen (Thiele et al. 1992, Weber et al. 1995). Während sich eine Anpassung mit nur einer Spezies als unmöglich erwies, lieferte eine Simulation mit zwei spektralen Komponenten eine gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Theoriekurve. Die relativen Beiträge der beiden Spezies wurden durch Doppelintegration ihrer Einzelspektren ermittelt. Die Anwesenheit zweier magnetischer Komponenten wird durch Aufnahme desselben Spektrums unter extremen Sättigungsbedingungen unabhängig bestätigt. Aufgrund eines unterschiedlichen Sättigungsverhaltens beider spektraler Komponenten ist die Minoritätsspezies im EPR-Spektrum nun besser aufgelöst, weshalb im Bereich $g = 2.08$ bei solch hohen Leistungen deutlich eine zusätzliche Schulter zu erkennen ist. Die g -Werte und die Flächenanteile beider Spezies von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* sind Tab. 5.1 zu entnehmen.

HIPIP	<i>I. E. halophila</i>		<i>C. vinosum</i> WT		<i>C. vinosum</i> C77S	
"Isomer A"	90%	2.03/2.03/2.14	80%	2.03/2.04/2.12	40%	2.03/2.04/2.10
"Isomer B"	10%	2.03/2.06/2.10	15%	2.05/2.05/2.09	5%	2.04/2.04/2.09
"Isomer C"	-	-	5%	2.01/2.08/2.15	55%	2.02/2.05/2.14

Tab. 5.1 Beiträge und g -Werte der EPR-Komponenten in verschiedenen HiPIPs

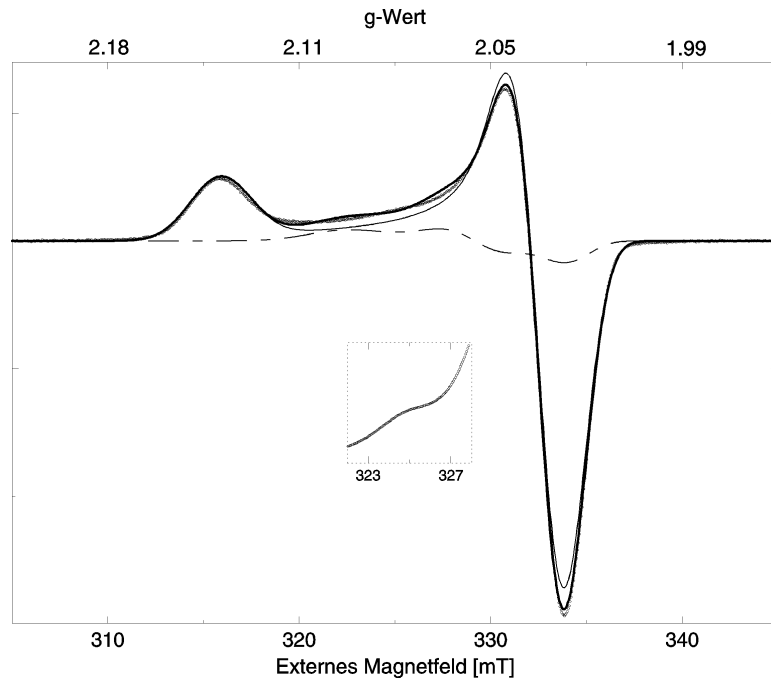


Abb. 5.1 EPR-Spektrum von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* (Kreise) und Simulation (fette durchgezogene Linie) mit Isomer "A" (durchgezogene Linie) und Isomer "B" (strichpunktierte Linie); g-Werte und spektrale Beiträge sind Tab. 5.1 zu entnehmen; experimentelle Bedingungen: Temperatur 30 K, Mikrowellenfrequenz 9.47 GHz, Mikrowellenleistung 0.2 mW, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 3 G, Konversionszeit 40.96 ms, Time Constant 1.28 ms; der vergrößerte Ausschnitt des Spektrums in der Region um $g = 2.08$ wurde bei einer Leistung von 100 mW aufgezeichnet (unter diesen Bedingungen wird die Schulter um $g = 2.08$ besser sichtbar, da die EPR-Spezies unterschiedliches Sättigungsverhalten zeigen).

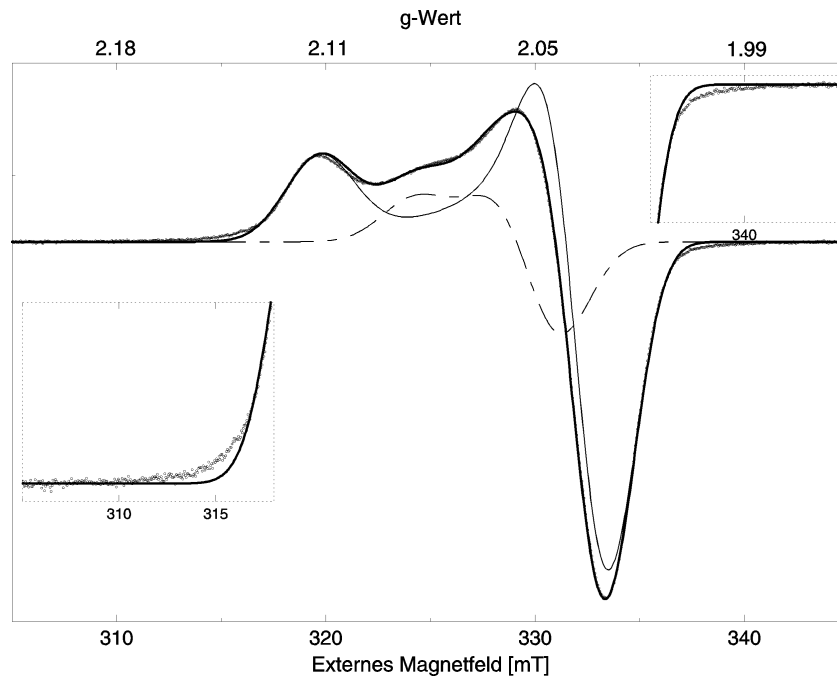


Abb. 5.2 EPR-Spektrum von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT (Kreise) und Simulation (fette durchgezogene Linie) mit Isomer "A" (durchgezogene Linie) und Isomer "B" (strichpunktierte Linie); experimentelle Bedingungen siehe Abb. 5.3; vergrößert dargestellt sind die spektralen Flanken.

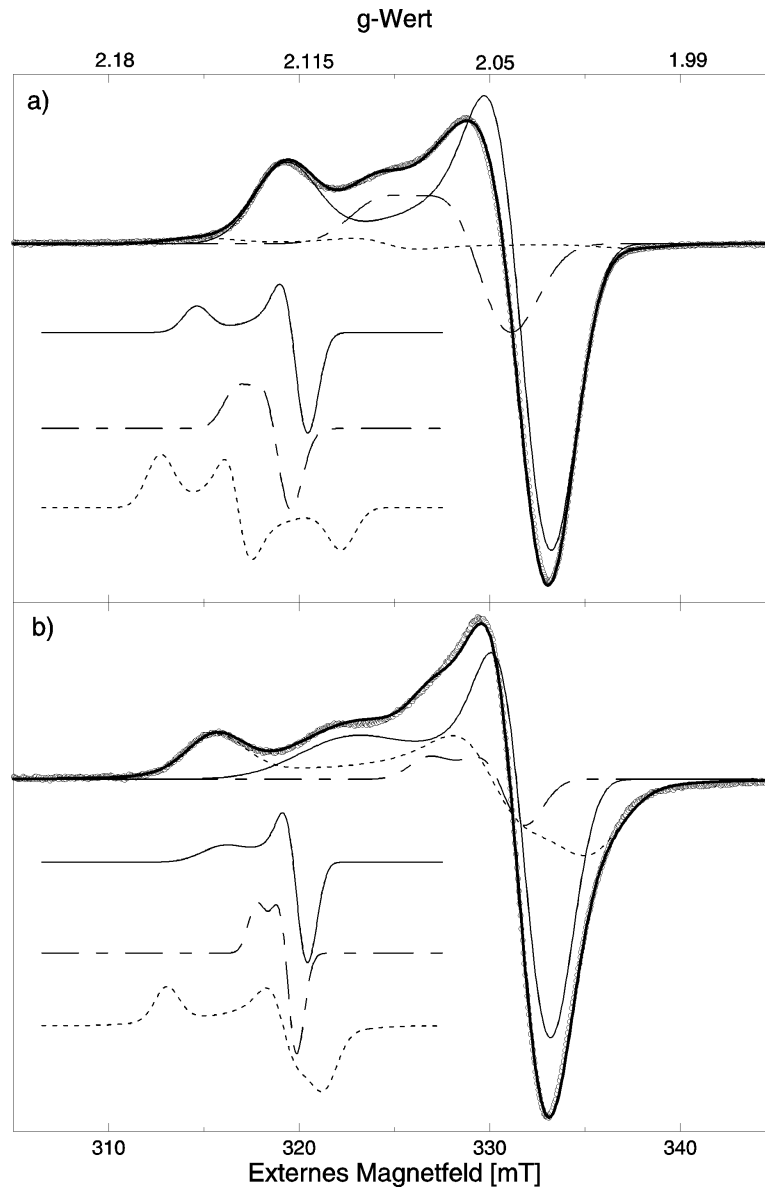


Abb. 5.3 EPR-Spektren (Kreise) von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* a) WT b) C77S-Mutante (Kreise) und Simulation (fette durchgezogene Linie) mit Isomer "A" (durchgezogene Linie), Isomer "B" (strichpunktierte Linie), Isomer "C" (gepunktete Linie); g-Werte und spektrale Beiträge sind Tab. 5.1 zu entnehmen; experimentelle Bedingungen: Temperatur 30 K, Mikrowellenfrequenz 9.47 GHz, Mikrowellenleistung a) 2 mW b) 6 mW, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 0.1 G, Konversionszeit 40.96 ms, Time Constant 1.28 ms

In Abb. 5.2 ist das EPR-Spektrum von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT bei $T = 30$ K zu sehen. Man erkennt abermals eine Resonanz um $g = 2$, deren spektraler Verlauf sich von dem zuvor diskutierten HiPIP I *E. halophila* jedoch deutlich unterscheidet. Für das HiPIP *C. vinosum* WT ist noch offensichtlicher, dass eine Simulation des Spektrums mit nur einer Komponente ausscheidet. In Abb. 5.2 ist eine Simulation mit zwei Spezies zu sehen. Zwar reproduziert diese Anpassung wesentliche Charakteristika des Spektrums, die spektralen Flanken können aber nicht mit letzter Genauigkeit wiedergegeben werden (vgl. vergrößerte Darstellungen in Abb. 5.2). Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre die Anwesenheit eines kleinen Beitrages von unspezifisch denaturiertem Protein, von dem in der Literatur berichtet wird (Agarwal et al. 1996). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die Messung mit einer komplett neu hergestellten Probe wiederholt. Das Spektrum samt Flankenverlauf konnte extrem genau reproduziert werden, so dass die These eines Denaturierungsuntergrundes

fragwürdig ist. Die Diskrepanz kann aber durch Einführung einer dritten Spezies mit geringem Beitrag beseitigt werden (Abb. 5.3a).

Abb. 5.3b zeigt das 30 K-EPR-Spektrum der oxidierten C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum*, das große Unterschiede zum nativem Protein zeigt. Es weist zu viele Charakteristika auf, um mit zwei Spezies angepasst werden zu können. Zum Zweck einer einheitlichen Interpretierbarkeit wurde zunächst versucht, das Spektrum mit den drei Spezies des nativen Proteins, jedoch mit anderen Flächenbeiträgen, zu simulieren. Ein solcher Versuch scheiterte, da nicht nur die Höhe, sondern auch die Lage der Resonanzen durch den C77S-Austausch modifiziert wird. Deshalb wurde in einem weiteren Schritt auch eine moderate Variation der g -Werte zugelassen, die als Konsequenz der Mutation plausibel erscheint. Abb. 5.3b zeigt das Resultat einer solchen Simulation. Die Subspezies von nativem und C77S-mutiertem HiPIP *C. vinosum* sind optisch und von den g -Werten her recht ähnlich, während die Flächenanteile der spektralen Komponenten sich zwischen Wildtyp und Mutante stark unterscheiden (Tab. 5.1). Die EPR-Spezies aller drei HiPIPs werden entsprechend der Werte und der Symmetrie der g -Komponenten in Tab. 5.1 als "Isomere A, B, C" bezeichnet.

5.2 Gepulste EPR an oxidierten HiPIPs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gepulste EPR-Experimente mit Spin-Echo-, Inversion Recovery- und Saturation-Recovery-Sequenzen an oxidierten HiPIPs durchgeführt (Dilg et al. 1999, Dilg et al. 2000a).

Anhand Abb. 5.4 wird die experimentelle Durchführung exemplarisch für das HiPIP *C. vinosum* WT geschildert. Abb. 5.4a zeigt das Signalschema eines Spin-Echo-Experimentes. Man erkennt zunächst einen $\pi/2$ - und dann einen zeitlich verschobenen π -Puls. Nach einem weiteren identischen Zeitintervall ist ein Pulsecho zu erkennen. Erhöht man sukzessive die Wartezeit zwischen den Pulsen, so erhält man die in Abb. 5.4b dargestellte Zeitabhängigkeit der Echoamplitude.

In Abb. 5.4c ist der Signalverlauf für ein Inversion-Recovery-Experiment dargestellt. Zunächst wird die Magnetisierung durch einen π -Puls umgeklappt. Nun gewährt man dem System eine Ruhezeit, während derer sich die Magnetisierung erholt. Den Fortschritt dieser Relaxation detektiert man mithilfe einer Spin-Echo-Analysesequenz. Messsignal ist das Echo zwischen zweitem und drittem Puls. Abb. 5.4c zeigt nach dem Echosignal noch weitere kleinere Wellenberge, die von parasitären Echos zwischen erstem und zweitem sowie zwischen erstem und drittem Puls herrühren. Diese können eliminiert werden, da sie früher entstehen als das Messsignal und dieses dann mit doppelter Geschwindigkeit überholen. Beginnt man die also Aufnahme der Zeitabhängigkeit der Echoamplitude erst nach Beendigung des "Überholvorgangs", so stören die parasitären Echos die Messung nicht. Damit kommt der Wahl der die Sequenzen bestimmenden Zeitparameter entscheidende Bedeutung zu. Die sich mit zunehmender Wartezeit immer weiter erholende Magnetisierung ist in Abb. 5.4d zu sehen.

Schließlich zeigt Abb. 5.4e das Pulsschema für ein Saturation-Recovery-Experiment. Der lange Sättigungspuls ist darin nicht sichtbar. Nach teilweisem Rücklauf der Magnetisierung ins Gleichgewicht detektiert man diesen wiederum mit Hilfe einer $\pi/2$ - π -Sequenz. Die Aus-

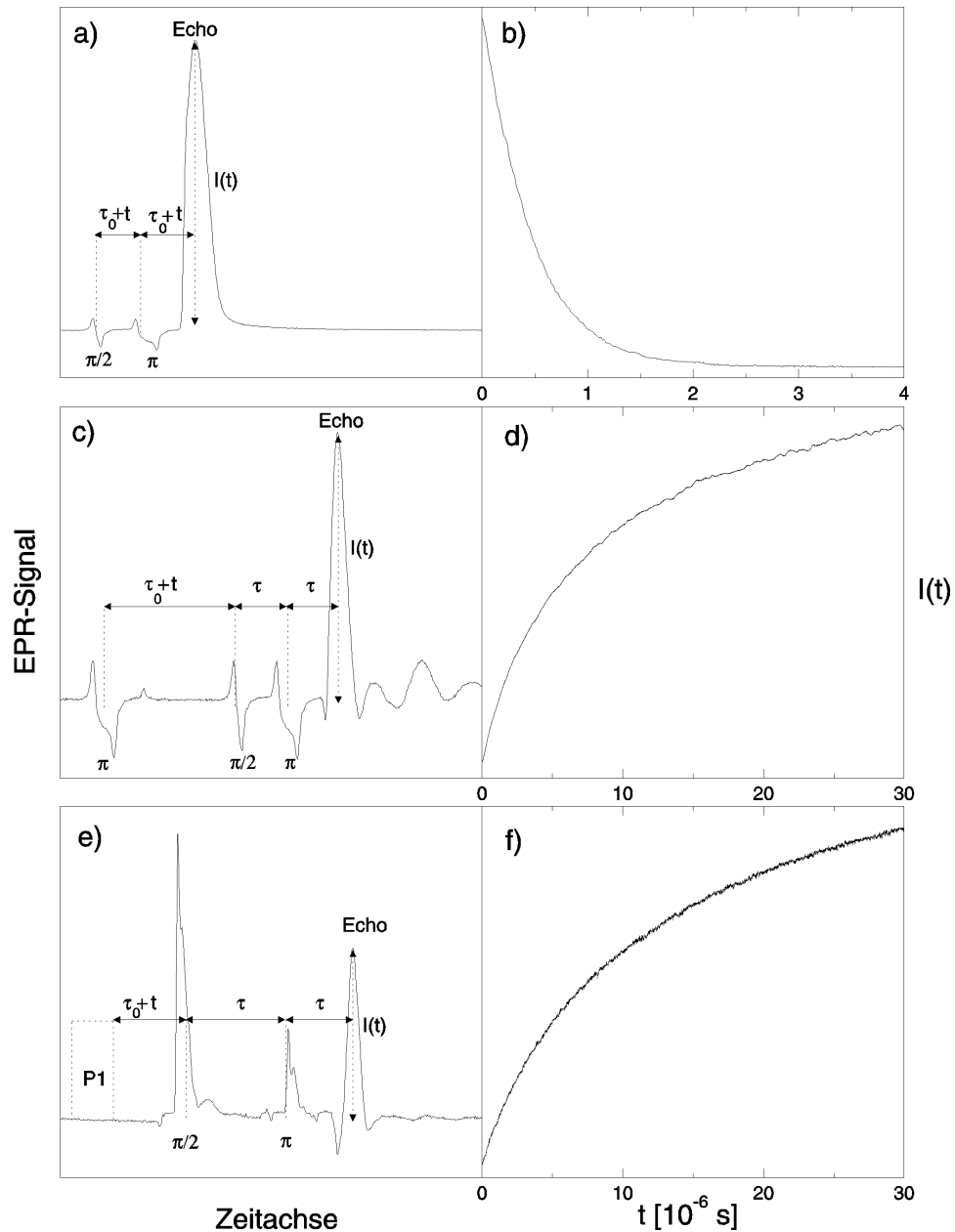


Abb. 5.4 Signalfolgen (a, c, e) und Erholung der Magnetisierung (b, d, f) bei gepulsten EPR-Experimenten an oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT; a), b) Spin-Echo-Experiment (Pulsfolge siehe (3.51)); c), d) Inversion-Recovery-Experiment (Pulsfolge siehe (3.53)); e), f) Saturation-Recovery-Experiment (Pulsfolge siehe (3.55));

schaltung parasitärer Echos erfolgt abermals durch verzögerte Aufnahme der Zeitabhängigkeit der Magnetisierung (Abb. 5.4f).

Alle gepulsten EPR-Spektren wurden bei demjenigen g -Faktor aufgenommen, bei dem das Cw-EPR-Spektrum sein Intensitätsmaximum erreicht. Damit wird streng genommen eine durchschnittliche Relaxationszeit gemittelt über die verschiedenen g -Richtungen und Isomere bestimmt. Dass die Annahme isotroper Relaxation in guter Näherung erfüllt ist, kann exemplarisch anhand der in Abb. 5.5b dargestellten Messungen nachvollzogen werden. Die Erholung der Magnetisierung bei diesen Spin-Echo-Experimenten im g -Bereich von 2.02 bis 2.14 kann mit T_2 -Werten des schmalen Intervalls zwischen $0.44 \mu\text{s}$ und $0.49 \mu\text{s}$ angepasst werden. Der in Tab. 5.2 angegebene, beim stärksten Signal nahe $g = 2.04$ gemessene Wert der

Spin-Spin-Relaxationszeit von 0.46 μs , ist demnach für den gesamten spektralen Querschnitt aussagekräftig. Für oxidierte HiPIPs ist aus Intensitätsgründen nur die Aufnahme des Spektrums bei sehr tiefen Temperaturen möglich. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Messergebnisse mit weiter unten beschriebenen Mößbauer-Experimenten sicherzustellen, wurden alle gepulsten Versuche bei $T = 5 \text{ K}$ durchgeführt.

Abb. 5.5a beweist, dass die detektierten Signale tatsächlich von der *Proteinresonanz* stammen. So ist in Abb. 5.5a am Beispiel der Spin-Echo Signalfolge des HiPIP *C. vinosum* WT die Abhängigkeit der Echointensität vom g -Faktor zu sehen. Während die externen $\pi/2$ - und π -Pulse bei allen g -Werten mit gleicher Amplitude auftreten, taucht das Echosignal nur im Bereich des EPR-Spektrums des HiPIPs auf. Abb. 5.5b stellt den Abfall der Echointensität abhängig von der Wartezeit zwischen beiden Pulsen und dem g -Wert dar. Die Projektion dieser dreidimensionalen Darstellung auf einen festen Zeitpunkt ist äquivalent mit dem integrierten EPR-Spektrum des Proteins.

Abb. 5.6 zeigt für die drei HiPIPs und die drei Pulssequenzen die wartezeitabhängigen Echointensitäten sowie Anpassungen mit monoexponentiellen Zerfällen entsprechend (3.52), (3.54). Die Güte der Anpassungen mit dieser Theoriefunktion beweist, dass die Ensemblemitglieder in jeder Probe jeweils einheitlich relaxieren und durch *eine* Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 und *eine* Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 charakterisiert sind. Die Zahlenwerte sind in Tab. 5.2 zusammengestellt, hier findet sich außerdem die aus T_2 und einem gemittelten Wert von T_1 gemäß (3.1), (3.2) berechnete effektive Relaxationszeit T_{eff} , dem Reziprokom der effektiven Relaxationsrate γ .

a) Oxidiertes HiPIP	<i>I. E. halophila</i>	<i>C. vinosum</i> WT	<i>C. vinosum</i> C77S			
T_2 [μs] (Spin-Echo)	0.68	0.46	0.44			
T_1 [μs] (Inversion-Recovery)	23	9.1	16			
T_1 [μs] (Saturation-Recovery)	20	11.9	22			
T_{eff} [μs]	0.66	0.44	0.43			
γ [MHz]	1.5	2.3	2.3			
b) Spin-Echo	$\pi/2$ [ns]	τ_0 [ns]	t [ns]	π [ns]		
HiPIP <i>I. E. halophila</i>	96	564	4 <i>m</i>	192		
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	96	304	4 <i>m</i>	192		
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	96	192	4 <i>m</i>	192		
c) Inversion Recovery	π [ns]	τ_0 [ns]	t [ns]	$\pi/2$ [ns]	τ [ns]	
HiPIP <i>I. E. halophila</i>	192	5800	16 <i>m</i>	96	608	
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	192	808	8 <i>m</i>	96	208	
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	192	608	8 <i>m</i>	96	208	
d) Saturation Recovery	P1 [μs]	τ_0 [ns]	t [ns]	$\pi/2$ [ns]	τ [ns]	π [ns]
HiPIP <i>I. E. halophila</i>	2	1012	16 <i>m</i>	96	304	192
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	2	112	8 <i>m</i>	96	304	192
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	2	512	8 <i>m</i>	96	304	192

Tab. 5.2 a) Mittels gepulster EPR gemessene elektronische Relaxationszeiten bei $T = 5 \text{ K}$; b) - d) Zeitparameter für die in Abb. 5.6 dargestellten Experimente entsprechend der Nomenklatur von (3.51) - (3.55); $m = 0, 1, 2, \dots$

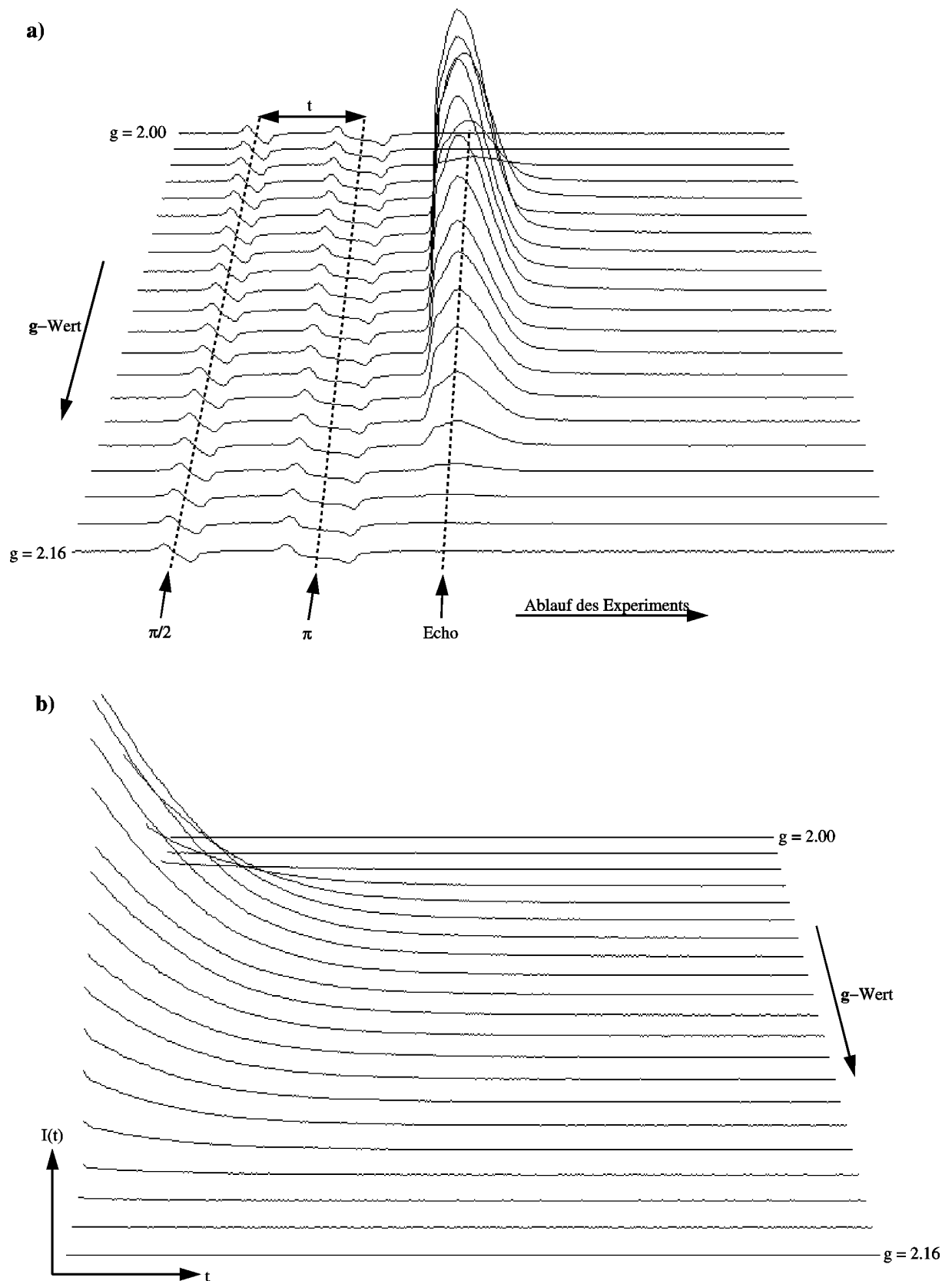


Abb. 5.5 dreidimensionale Darstellung a) der Signalfolge und b) der Relaxation der Magnetisierung für ein Spin-Echo-Experiment in Abhängigkeit vom g -Faktor und vom Ablauf des Experimentes; die Echoamplitude ist um so größer, je stärker das EPR-Signal des Proteins am jeweiligen g -Wert ist.

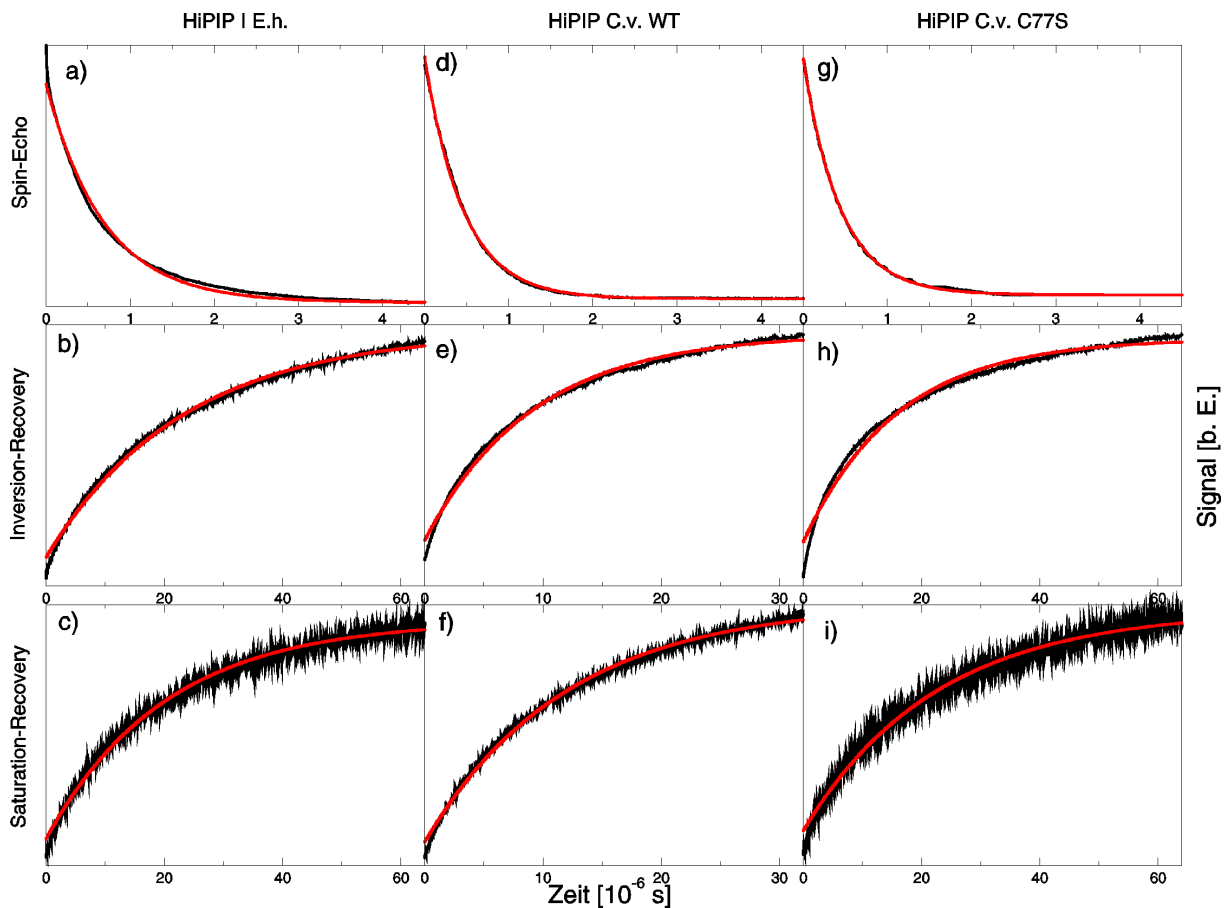


Abb. 5.6 schwarze Linien: gepulste EPR-Experimente an oxidierten HiPIPs I *E. halophila* (a - c), *C. vinosum* WT (d - f) und C77S (g - i) bei $T = 5$ K mit Spin-Echo- (a, d, g), Inversion-Recovery- (b, e, h) und Saturation-Recovery-Sequenzen (c, f, i) entsprechend der in Tab. 5.2 zusammengestellten Zeitparametern; graue Linien: monoexponentielle Anpassungen gemäß (3.52) bzw. (3.54) entsprechend den Relaxationszeiten von Tab. 5.2.

Experimentelle Unbestimmtheiten resultieren aus der leichten Variation der Relaxationszeiten über den Querschnitt des EPR-Spektrums sowie aus Resteinflüssen parasitärer Echos bei den Dreipulssequenzen. Bei der Inversion-Recovery-Methode kommt noch der Fehler hinzu, der sich aus der nicht völlig exakten Umklappung der Spins um genau 180° ergibt.

5.3 ^{57}Fe -ENDOR an oxidierten HiPIPs

Wie in Kap. 3.4 ausgeführt, ist die Anwendbarkeit der ENDOR-Methode an einige Bedingungen geknüpft. Erforderlich ist einerseits, dass das EPR-aktive Elektronensystem Kerne mit nichtverschwindendem Spin I enthält. Für das $[\text{}^{57}\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -(Cys) $_4$ -Zentrum sind demzufolge nur von ^{57}Fe - mit $I = 1/2$ und von den Protonen der Cysteine mit $I = 1/2$ ENDOR-Resonanzen zu erwarten. Andererseits ist ein ENDOR-Signal nur beobachtbar, wenn für die Relaxationszeiten des Systems die Bedingung (3.48) erfüllt ist. Schon früh wurde gezeigt, dass oxidierte HiPIPs ^{57}Fe -Signale aufweisen (Anderson et al. 1975). Die ersten quantitativ exakten Bestimmungen von A-Komponenten mithilfe ^{57}Fe -ENDOR gelangen jedoch erst unlängst für das HiPIP II *E. halophila* (Kappl et al. 1999) sowie für die hier vorgestellten HiPIPs I *E. halophila* (Dilg et al. 1999) und die HiPIPs *C. vinosum* WT und C77S (Dilg et al. 2000a). Die drei zuletzt genannten Messungen werden im weiteren beschrieben.

Abb. 5.7b zeigt ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* bei $T = 5$ K für verschiedene charakteristische g -Werte, die am zugehörigen EPR-Spektrum (Abb. 5.7a) markiert sind. Die Analyse wird am Beispiel des ersten ENDOR-Spektrums von Abb. 5.7b vorgenommen ($g = 2.024$). Man erkennt einen breiten Bereich von Resonanzen, die ^{57}Fe und ^1H unter Zuhilfenahme von (3.47) zugeordnet werden können. Typische A -Werte von vierfach koordinierten paramagnetischen Eisen-Ionen liegen im Bereich von 10 MHz bis 28 MHz (Debrunner et al. 1977) und sind damit sicher größer als deren Kern-Larmor-Frequenz $g_n\beta_n B_{\text{ex}} = 0.456$ MHz bei $B_{\text{ex}} = 0.33$ T. Daher erscheint (3.47) zufolge ein ^{57}Fe -Kern im ENDOR-Spektrum als eine um die zweifache Kern-Larmor-Frequenz aufgespaltene Doppelresonanz. Unter dieser Prämisse und durch Vergleich mit komplementären Mößbauer-Daten (siehe unten) können zwei Peak-Paare im ENDOR-Spektrum identifiziert werden, die vom ^{57}Fe aus dem HiPIP-Cluster stammen. Diese sind in Abb. 5.7b mit Pfeilen markiert. Der Frequenzschwerpunkt jedes Pärchens fällt gemäß (3.47) mit der Hälfte derjenigen A -Tensor-Komponente zusammen, die in Richtung der ausgewählten g -Achse zeigt. Im HiPIP findet man also eine Eisen-Resonanz bei $|A| \approx 20$ MHz und eine andere um $|A| \approx 30$ MHz. Aufgrund des hohen nuklearen g -Faktors von Protonen ($g_n = 2.7928$) liegen deren ENDOR-Resonanzpaare für $B_{\text{ex}} = 0.33$ T um die Kern-Larmor-Frequenz zentriert bei 14.05 MHz $\pm A_H/2$. Typische Werte des A -Tensors von Protonen A_H liegen in der Größenordnung von wenigen MHz (Kappl et al. 1999). Die acht $\beta\text{-CH}_2\text{-}^1\text{H}$ -Kerne der Cystein-Liganden bilden in den Spektren von Abb. 5.7b die Bande zwischen unterem und oberem Eisensignal. Lediglich für das Spektrum mit dem höchsten g -Wert, $g = 2.146$, ist nur das Eisensignal mit dem betragsmäßig kleineren A -Wert zu erkennen, während das andere unter dem Protonengebirge verborgen ist. Für die zu diesem g -Wert gehörende A -Komponente kann daher nur eine obere Grenze angegeben werden. Die Halbwertsbreiten der Einzelpeaks von etwa 0.7 MHz stellen ein Maß für die Unbestimmtheit der ermittelten Hyperfeintensorkomponenten dar.

Die A -Werte der jeweils zu einem Paar gekoppelten Eisenionen sind im Rahmen der experimentellen Genauigkeit äquivalent, so dass Abweichungen innerhalb eines Paares von höchstens 0.7 MHz nicht ausgeschlossen werden können. Bei ^{57}Fe -ENDOR-Messungen an einkristallinen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Modellkomplexen wurden paarinterne Abweichungen dieser Größenordnung gemessen (Rius und Lamotte 1989). Angesichts der für Proteine typischen hohen Linienbreiten, die auf der Verteilung der Moleküle auf verschiedenen Konformationszustände beruhen (Parak und Frauenfelder 1993), ist die Trennung der Unterkomponenten eines Eisenpaares mit ENDOR nicht möglich (Kappl et al. 1999).

Abb. 5.8 und Abb. 5.9 zeigen die ENDOR-Spektren von ^{57}Fe -angereichertem oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT und von dessen C77S-Mutante. Die Interpretation dieser Spektren erfolgt analog wie bei dem ausführlich erläuterten Fall des HiPIP I *E. halophila*. Einziger Unterschied ist, dass beim nativen HiPIP *C. vinosum* bereits ab $g = 2.119$ und bei der Mutante gar bereits ab $g = 2.037$ die obere Eisen-Resonanz von der Protonen-Bande überdeckt ist und das Experiment daher nur eine obere Abschätzung des A -Wertes erlaubt. Tab. 5.3 fasst für alle drei Proteine die den g -Werten zugehörigen A -Komponenten beziehungsweise deren Obergrenzen zusammen.

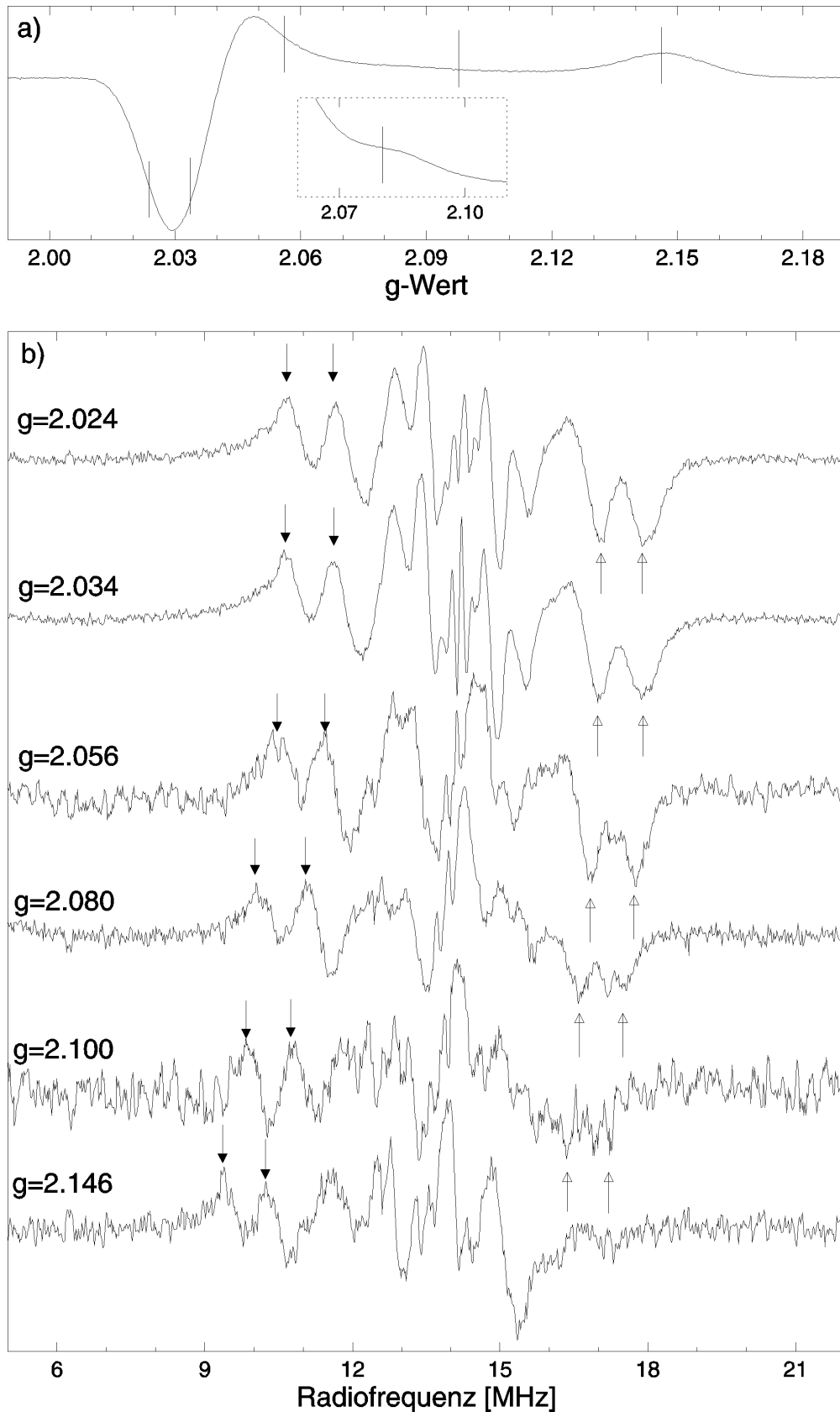


Abb. 5.7 b) ^{57}Fe -ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* aufgenommen bei den markierten g-Werten des zugehörigen EPR-Spektrums a); ausgefüllte Pfeile kennzeichnen Resonanzen des ferric-ferric-Paares, offene Pfeile solche des ferric-ferrous-Paares; experimentelle Bedingungen: Temperatur 5 K, Mikrowellenfrequenz 9.46 GHz, Mikrowellenleistung 20 mW, Modulationstiefe 150 kHz, Modulationsfrequenz 10 kHz, Konversionszeit 10.24 ms, Time Constant 2.56 ms

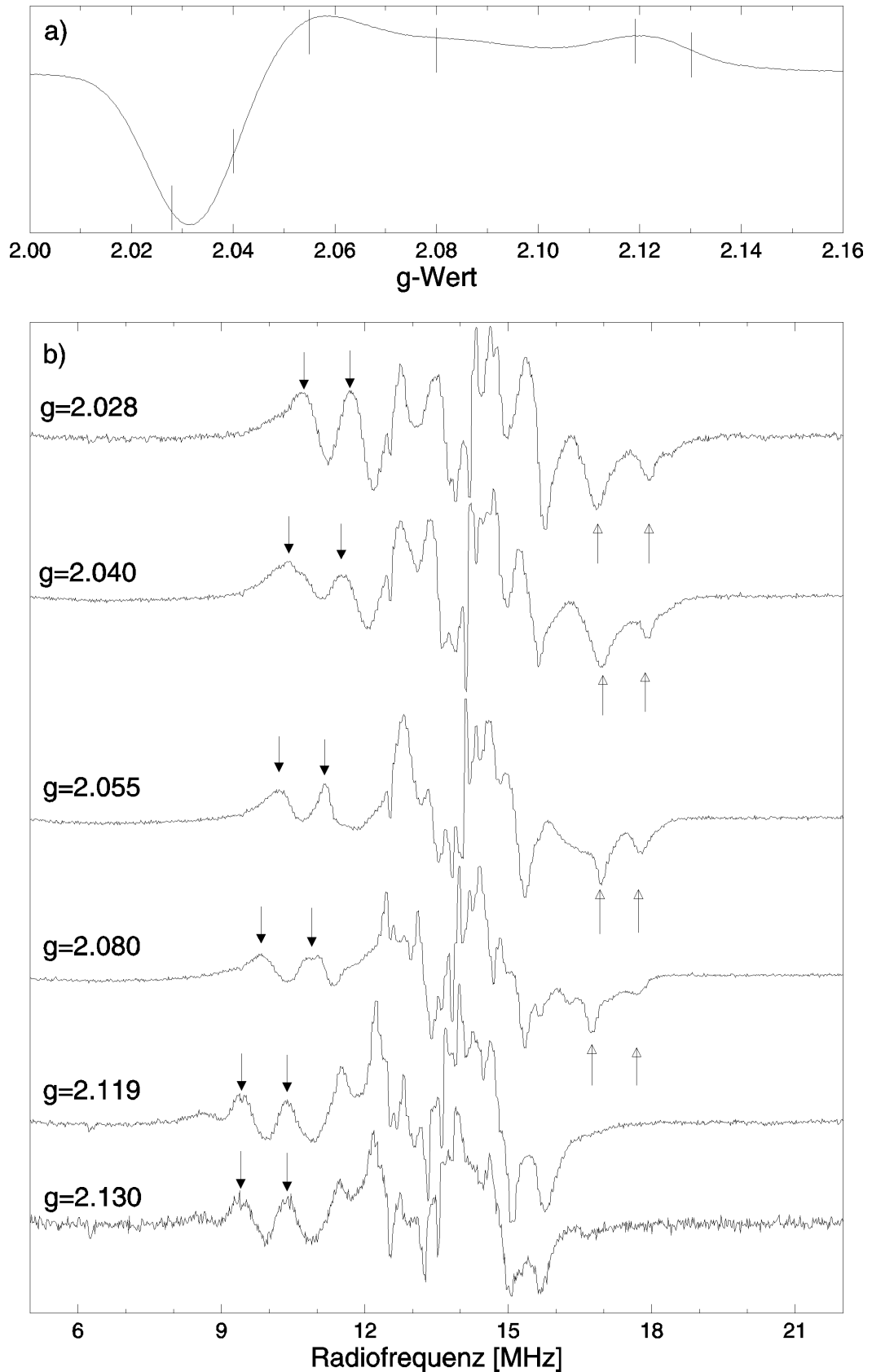


Abb. 5.8 b) ^{57}Fe -ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT aufgenommen bei den markierten g-Werten des zugehörigen EPR-Spektrums a); ausgefüllte Pfeile kennzeichnen Resonanzen des ferric-ferric-Paares, offene Pfeile solche des ferric-ferrous-Paares; experimentelle Bedingungen: Temperatur 5 K, Mikrowellenfrequenz 9.47 GHz, Mikrowellenleistung 10 mW, Modulationstiefe 100 kHz, Modulationsfrequenz 12.5 kHz, Konversionszeit 40.96 ms, Time Constant 2.56 ms

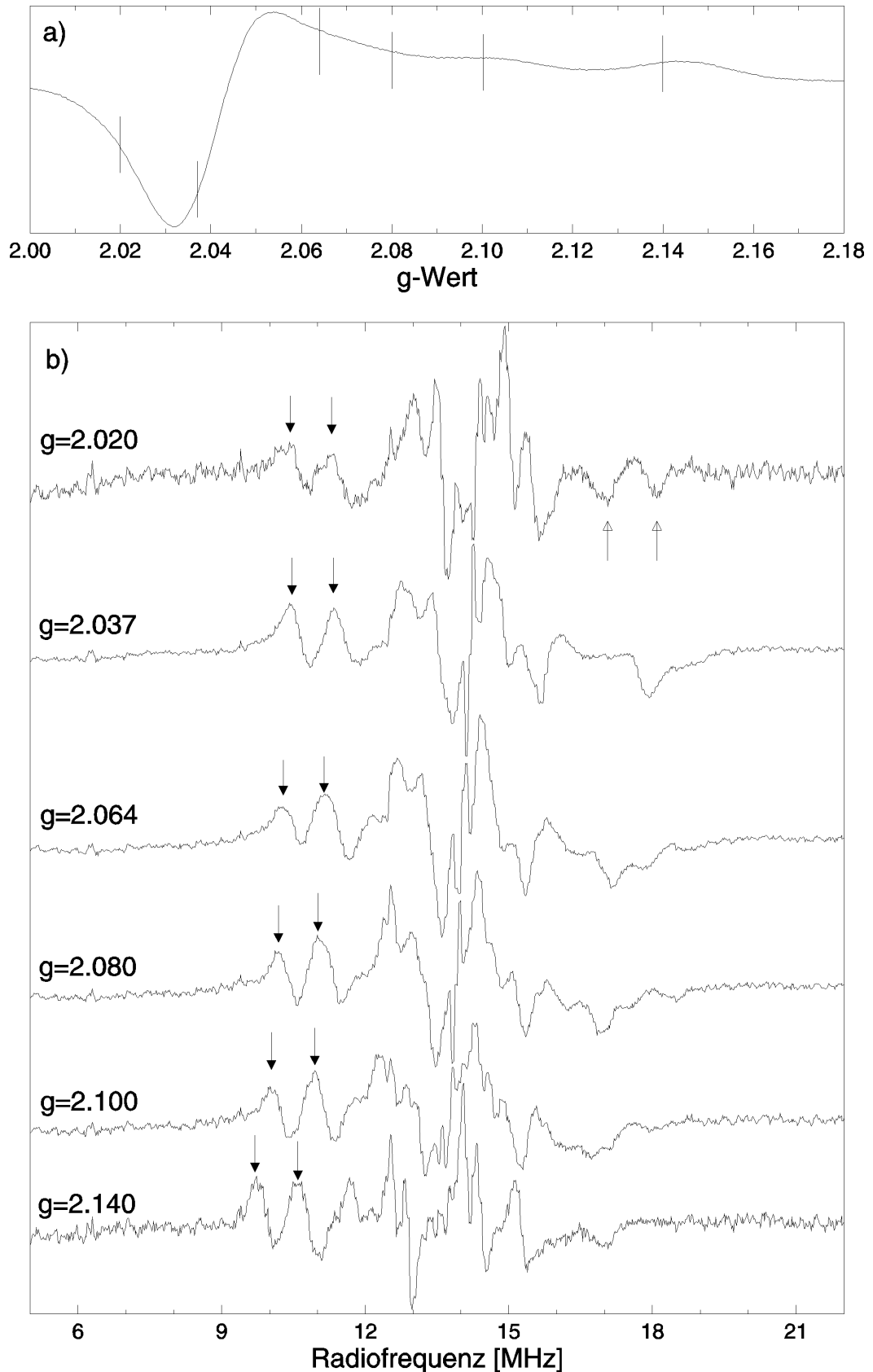


Abb. 5.9 b) ^{57}Fe -ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* C77S aufgenommen bei den markierten g-Werten des zugehörigen EPR-Spektrums a); ausgefüllte Pfeile kennzeichnen Resonanzen des ferric-ferric-Paares, offene Pfeile solche des ferric-ferrous-Paares; experimentelle Bedingungen: Temperatur 5 K, Mikrowellenfrequenz 9.47 GHz, Mikrowellenleistung 10 mW, Modulationstiefe 150 kHz, Modulationsfrequenz 12.5 kHz, Konversionszeit 40.96 ms, Time Constant 2.56 ms

a) ^{57}Fe -ENDOR an oxidiertem HiPIP I <i>E. halophila</i>		
g-Wert	$ A_{<} $ -Wert [MHz]	$ A_{>} $ -Wert [MHz]
2.024	22.3	34.9
2.034	22.2	34.8
2.056	21.9	34.5
2.080	21.0	33.9
2.100	20.5	33.5
2.146	19.7	< 31.1
b) ^{57}Fe -ENDOR an oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT		
g-Wert	$ A_{>} $ -Wert [MHz]	$ A_{>} $ -Wert [MHz]
2.028	22.4	34.9
2.040	21.6	34.8
2.055	21.2	34.7
2.080	20.6	34.4
2.119	19.9	< 30.6
2.130	20.0	< 30.4
c) ^{57}Fe -ENDOR an oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S		
g-Wert	$ A_{>} $ -Wert [MHz]	$ A_{>} $ -Wert [MHz]
2.020	21.4	35.0
2.037	21.7	-
2.048	21.6	-
2.064	21.2	-
2.080	21.1	-
2.100	20.5	-
2.120	20.3	-
2.140	20.1	-

Tab. 5.3 $|A|$ -Werte oxidiertener HiPIPs bestimmt mit ENDOR bei T = 5 K

5.4 Mößbauer-Spektroskopie an HiPIPs

5.4.1 Strukturuntersuchungen

5.4.1.1 Oxidiertes HiPIP I *E. halophila* bei 5 K

Abb. 5.10 zeigt das bei einer Temperatur von T = 5 K bei einem senkrecht zum γ -Strahl angelegten schwachen externen Magnetfeld von etwa 20 mT aufgenommene Mößbauer-Spektrum des oxidierten HiPIPs I *E. halophila* (Dilg et al. 1999). Man erkennt eine konturenreiche paramagnetische Aufspaltung. In Abb. 5.10c ist klein das Mößbauer-Spektrum genau der gleichen Probe, jedoch in Abwesenheit des stabilisierenden Feldes eingezeichnet. Mangels "weak field stabilization" fehlt es dem Spektrum an Struktur und es ist nur schwer auswertbar.

In der Literatur sind Mößbauer-Untersuchungen an oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT (Dickson et al. 1974, Middleton et al. 1980) sowie an oxidiertem HiPIP II *E. halophila* (Bertini et al. 1993) beschrieben. In diesen Arbeiten ist ein grundlegendes Modell für die An-

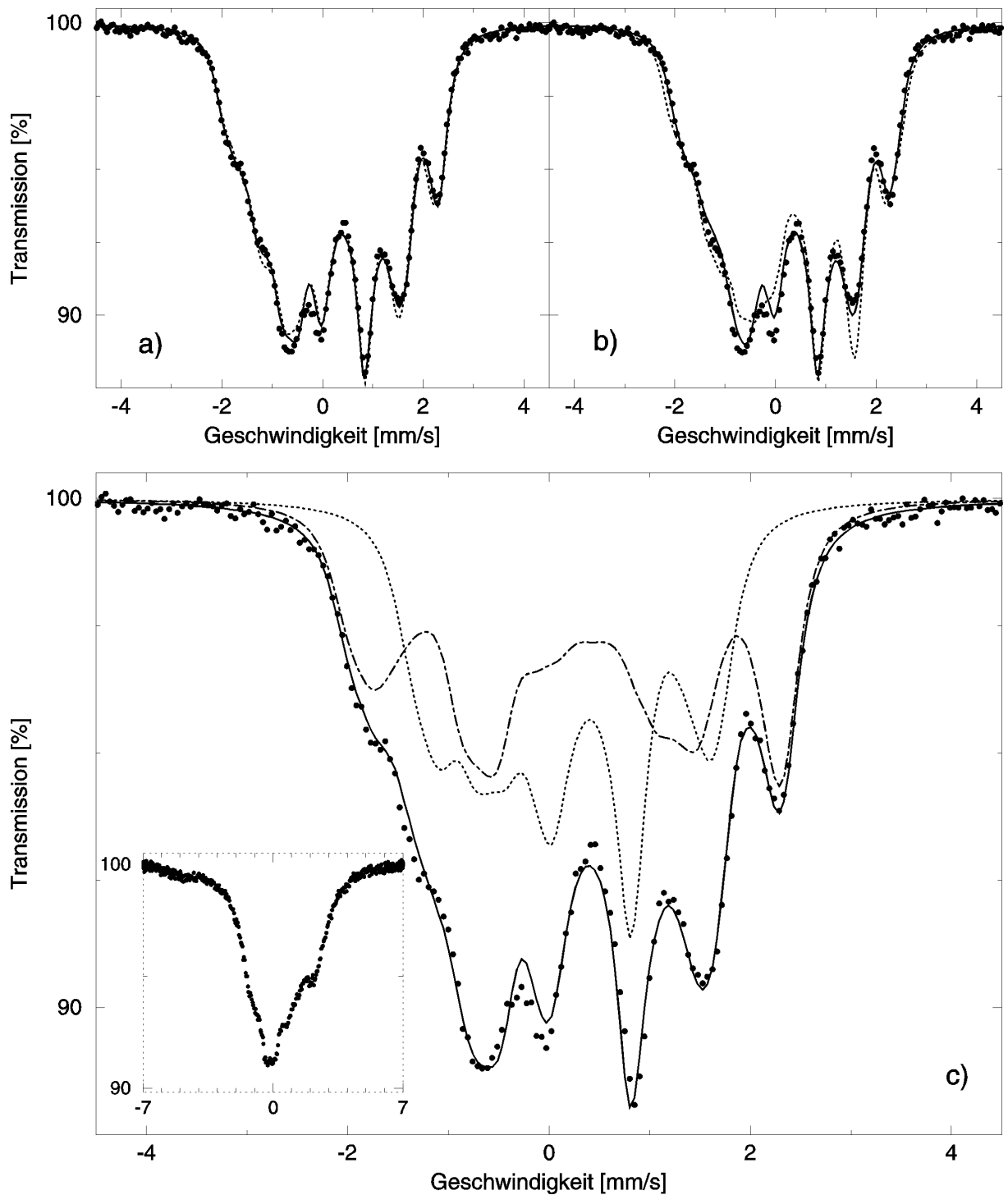


Abb. 5.10 Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* (Kreise) in einem schwachen transversalen externen Magnetfeld von 20 mT bei $T = 5$ K und Least-Squares-Fits mit den in Tab. 5.4 beschriebenen Modellen und Mößbauer-Parametern; a) gepunktete Linie: Tab. 5.4a, durchgezogene Linie: Tab. 5.4c; b) gepunktete Linie: Tab. 5.4b, durchgezogene Linie Tab. 5.4d; c) durchgezogene Linie: Tab. 5.4e mit Einzelbeiträgen von Spezies 12 (gepunktete Linie) und Spezies 34 (strichpunktierte Linie); links unten ist das Mößbauer-Spektrum derselben Probe *ohne* schwaches externes Feld zu sehen.

passung der Spektren entwickelt worden, das auf Hamiltonian (3.30) basiert, jedoch den die Elektronenrelaxation beschreibenden Term unberücksichtigt lässt. Damit wurde zunächst versucht, auch das Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* anzupassen. Wie in allen hier diskutierten Modellen wurden die g -Werte auf den mit EPR gemessenen Parame-

a) $\chi^2 = 2.91$	Eisenpaar (12)	Eisenpaar (34)
	<i>Freie Parameter:</i>	
δ [mm s ⁻¹]	0.31	0.43
ΔE_Q [mm s ⁻¹]	-0.89	-1.10
η	0.0	-1.0
A_x [MHz]	+18.6	-32.7
A_y [MHz]	+18.4	-28.4
A_z [MHz]	+21.5	-27.9
b) $\chi^2 = 8.94$	Eisenpaar (12)	Eisenpaar (34)
	<i>Freie Parameter:</i>	
δ [mm s ⁻¹]	0.28	0.45
ΔE_Q [mm s ⁻¹]	-0.80	-1.08
η	0.2	-0.7
A_z [MHz]		-21.6 [#]
	<i>Feste Parameter:</i>	
A_x [MHz]	+22.3	-34.8
A_y [MHz]	+22.3	-34.8
A_z [MHz]	+19.7	
c) $\chi^2 = 2.53$	Eisenpaar (12)	Eisenpaar (34)
	<i>Freie Parameter:</i>	
δ [mm s ⁻¹]	0.30	0.41
ΔE_Q [mm s ⁻¹]	-0.86	-0.82
η	0.0	-0.7
γ [MHz]		1.3
A_z [MHz]		-27.1 [*]
	<i>Feste Parameter:</i>	
A_x [MHz]	+22.3	-34.8
A_y [MHz]	+22.3	-34.8
A_z [MHz]	+19.7	
d) $\chi^2 = 2.00$	Eisenpaar (12)	Eisenpaar (34)
	<i>Freie Parameter:</i>	
δ [mm s ⁻¹]	0.29	0.42
ΔE_Q [mm s ⁻¹]	-0.88	-0.93
η	0.2	-0.8
γ [MHz]		1.1
A_x [MHz]	+20.0	-33.8
A_y [MHz]	+20.4	-33.2
A_z [MHz]	+22.5	-27.0
e) $\chi^2 = 1.97$	Eisenpaar (12)	Eisenpaar (34)
	<i>Freie Parameter:</i>	
δ [mm s ⁻¹]	0.29	0.42
ΔE_Q [mm s ⁻¹]	-0.88	-0.93
η	0.2	-0.8
γ [MHz]		1.1
A_x [MHz]	+21.9	-33.8
A_y [MHz]	+21.5	-33.2
A_z [MHz]	+18.1	-27.0
α	11°	0°
β	-43°	89°
γ	-91°	0°

Tab. 5.4 Hyperfeinparameter von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* ($T = 5$ K, $B = 20$ mT transversal) aus Least-Squares-Fits für verschiedene Modelle; in allen Fällen wurden die g -Werte auf $g_x = g_y = 2.03$, $g_z = 2.14$ fixiert und gleiche Flächen für beide spektralen Komponenten angenommen; χ^2 ist die Summe der Abweichungsquadrate zwischen experimentellem und theoretischem Spektrum; Umrechnungsfaktor für A -Komponenten und Relaxationsraten: $1 \text{ mm s}^{-1} = 11.625 \text{ MHz}$ (Trautwein et al. 1991); alle Tensoren haben die selben Hauptachsen außer dem (wenn nichts anderes gesagt wird) um die Euler-Winkel $\alpha = \gamma = 0^\circ$, $\beta = 90^\circ$ rotierten V -Tensor; a) A -Komponenten sind freie Fit-Parameter (ENDOR-Werte als Startparameter), keine Relaxation; b) A -Komponenten (vorzeichenrichtig) auf ENDOR-Werte fixiert, keine Relaxation, [#]inkompatibel mit ENDOR; c) A -Komponenten (vorzeichenrichtig) auf ENDOR-Werte fixiert, Relaxation berücksichtigt, ^{*}kompatibel mit ENDOR; d) A -Komponenten sind freie Fit-Parameter (ENDOR-Werte als Startparameter), Relaxation berücksichtigt; e) alle Parameter frei, auch Euler-Winkel

tern für die Hauptspezies ("Isomer A" in Tab. 5.1) festgehalten. Für das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentrum wurde in Einklang mit dem EPR-Signal nahe $g = 2$ ein Netto-Cluster-Spin von $S = 1/2$ angenommen. Zwischen A -, g - und V -Tensor wurde zunächst Kollinearität¹ vorausgesetzt. Da das Spektrum mit nur einer magnetischen Spezies nicht erklärt werden kann, wurde wie in der Literatur üblich eine Anpassung mit zwei spektralen Komponenten gleicher Flächenbeiträge versucht. Gerechtfertigt werden kann die Annahme zweier Eisenpaare im Eisen-Schwefel-Cluster mit den beiden Eisen-Resonanzen in den ^{57}Fe -ENDOR-Spektren sowie mit entsprechenden NMR-Beobachtungen (Bertini et al. 1995). Die gestrichelte Linie in Abb. 5.10a zeigt die im Rahmen dieses Modells erhaltene beste Anpassung, die mit den in Tab. 5.4a aufgeführten Mößbauer-Parametern korrespondiert.

Als Startparameter wurden die mit ENDOR ermittelten Beträge der A -Komponenten verwendet. Eine Anpassung der Mößbauer-Spektren erfordert es, dem betragsmäßig größeren A -Tensor ausschließlich negative Komponenten und dem betragsmäßig kleineren A -Tensor durchweg positive Komponenten zuzuordnen. Die Mößbauer-Spektroskopie beseitigt damit die Unbestimmtheit im Vorzeichen der mit ENDOR gemessenen A -Beträge. Zwar ist die Übereinstimmung zwischen experimenteller und theoretischer Kurve gut, jedoch liegen die angepassten A -Komponenten betragsmäßig systematisch niedriger (im Durchschnitt 13%) als die mittels ENDOR bestimmten Parameter. Die höchste Einzelabweichung liegt sogar bei 18%. Solch starke Diskrepanzen können durch die Fehler der ENDOR-Messung in der Größenordnung von 0.7 MHz bzw. 3 % nicht erklärt werden. Auch stimmt die Symmetrie der A -Werte aus der Anpassung des Mößbauer-Spektrums nicht mit den ENDOR- und EPR-Ergebnissen überein. Dort wurden für beide Eisenpaare betragsmäßig jeweils zwei große und ein kleiner Wert gefunden. Die Anpassung liefert dagegen für beide magnetischen Spezies zwei kleine und einen großen A -Wert. Das Literaturmodell steht im Widerspruch zu den ENDOR-Ergebnissen und kann in dieser Form somit nicht aufrechterhalten werden.

Die Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Anpassung ein falsches lokales Minimum gefunden hat. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden in einem nächsten Schritt alle A -Komponenten auf den vorzeichenkorrigierten ENDOR-Werten fixiert und nur die restlichen Mößbauer-Parameter freigegeben. Nur die dritte Komponente des betragsmäßig

¹ Kollinearität bedeutet, dass alle drei Tensoren im selben Hauptachsensystem diagonal sind, d.h. ihre Hauptachsen zueinander parallel sind.

größeren **A**-Tensors, für die mit ENDOR nur eine Obergrenze ermittelt werden konnte, wurde angepasst. Das resultierende Theoriespektrum ist in Abb. 5.10b als gepunktete Linie dargestellt und die Mößbauer-Parameter sind in Tab. 5.4b zusammengefasst. Der Gütefaktor χ^2 hat sich auf mehr als das dreifache verschlechtert und wesentliche Bereiche des Spektrums werden falsch wiedergegeben. Zudem steht der erhaltene Wert der einzigen freigegebenen **A**-Komponente mit den Ergebnissen aus ENDOR im Widerspruch, da beide Eisenresonanzpaare dann im letzten Spektrum von Abb. 5.7 links von den Protonenresonanzen angesiedelt sein müssten. Auch andere Theorieparameter sind mit dem weiter unten dargestellten, alle Experimente erklärenden Modell, unverträglich. Das Mößbauer-Spektrum kann durch diese Maßnahme nicht mit den ENDOR-Ergebnissen in Einklang gebracht werden.

Deshalb wurde versucht, durch Berücksichtigung des Einflusses paramagnetischer Elektronenrelaxation eine Übereinstimmung zwischen Mößbauer- und ENDOR-Spektroskopie herzustellen. Dieser Effekt wurde bei der Interpretation von Mößbauer-Spektren an HiPIPs bei Flüssig-Helium-Temperaturen bisher außer Acht gelassen, obwohl er gemäß der weiter oben dargestellten gepulsten EPR-Ergebnisse bei $T = 5$ K zweifelsfrei vorhanden ist. Der Effekt wurde durch Hinzunahme des letzten Terms von (3.30) in die Theorieroutine integriert. Dadurch tritt lediglich *ein* neuer Parameter hinzu, so dass ein sinnvolles Observablen-Parameter-Verhältnis aufrechterhalten bleibt. Wie bei der letzten Anpassung wurden die fünf mit ENDOR determinierten **A**-Komponenten auf diesen Werten festgehalten. Die erhaltene Anpassung zeigt die durchgezogene Linie in Abb. 5.10b, die zugehörigen Mößbauer-Parameter Tab. 5.4c. Obwohl das Modell vier freie Parameter *weniger* einführt als das zuerst diskutierte, erhält man eine bessere Übereinstimmung mit dem Experiment. Der Endwert der einzigen freigegebenen **A**-Komponente steht mit der ENDOR-Obergrenze in Einklang. Aus der freien Anpassung erhält man eine effektive Relaxationsrate γ , die hervorragend mit der mittels gepulster EPR gemessenen übereinstimmt (vgl. Tab. 5.2). Mit der Einführung elektronischer Relaxation verschwindet auch die Diskrepanz zwischen Mößbauer- und ^{57}Fe -ENDOR-Experimenten.

Die Stabilität des Parametersatzes wurde überprüft, indem nun auch alle **A**-Werte freigegeben wurden (durchgezogene Linie in Abb. 5.10a, Tab. 5.4d). Zwar verringert sich dadurch χ^2 nochmals um etwa 20% und nehmen die angepassten Parameter sinnvolle Werte ein, jedoch stimmt die Symmetrie der Komponenten des positiven Hyperfeintensors abermals nicht mit ENDOR überein. Erlaubt man nun noch eine Rotation der kollinearen **g**- und **A**-Tensoren gegen den elektrischen Feldgradienten **V** (EFG) um die Euler-Winkel α , β , γ , so verschwindet auch dieser Widerspruch. Man erhält das in Abb. 5.10c dargestellte Theoriespektrum mit dem kleinsten χ^2 und dem Satz geschlossen interpretierbarer Mößbauer-Parameter von Tab. 5.4e, die zu keiner anderen Messung im Widerspruch stehen. Auch wenn die letzte Verfeinerung der Anpassung der Verallgemeinerung auf den Niedrigsymmetriefall nichtkollinearer Tensoren zu verdanken ist, so ist doch der entscheidende Schritt die Berücksichtigung paramagnetischer Elektronenrelaxation.

5.4.1.2 Oxidiertes HiPIP *C. vinosum* WT bei 5 K

Das native oxidierte HiPIP *C. vinosum* eignet sich dazu, die Richtigkeit des Relaxations-Modells zu testen. Das Mößbauer-Spektrum des Proteins bei $T = 5$ K in einem schwachen transversalen externen Magnetfeld (20 mT), das dem des HiPIPs *I. E. halophila* ähnelt, ist in

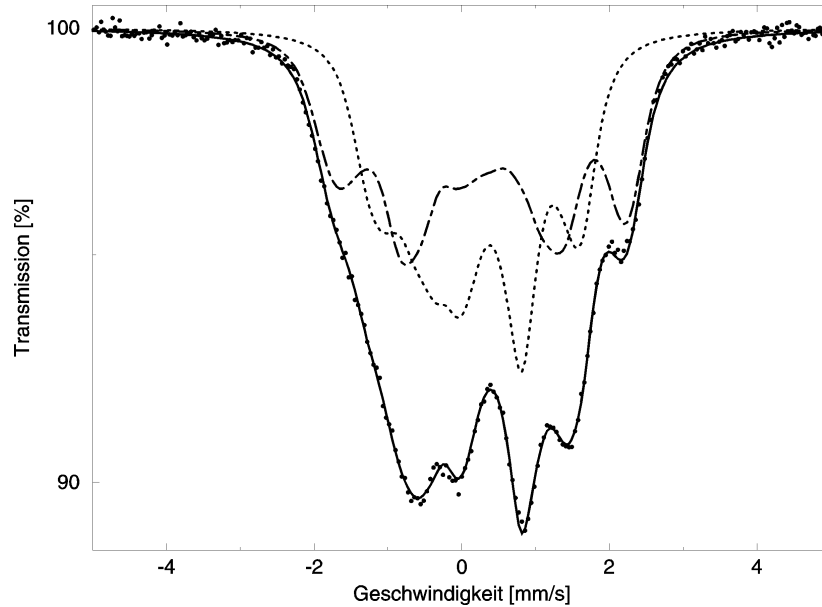


Abb. 5.11 Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP *C.vinosum* WT (Kreise) in einem schwachen transversalen externen Magnetfeld von 20 mT bei $T = 5$ K und Least-Squares-Fit mit den Parametern von Tab. 5.5 (durchgezogene Linie) sowie den Einzelbeiträgen von Spezies 12 (gepunktete Linie) und Spezies 34 (strichpunktierte Linie)

Abb. 5.11 zu sehen. Für dieses Spektrum ließe sich die oben ausgebreitete Diskussion der fünf Modelle wiederholen. Ohne Relaxation ergeben sich auch hier verglichen mit den ENDOR-Resultaten betragsmäßig zu kleine **A**-Werte. Wieder wird die Symmetrie der **A**-Tensoren, wie man sie aus der Kombination von EPR und ENDOR erhält, durch eine entsprechende Anpassung nicht korrekt wiedergegeben. Mößbauer-Literaturdaten stehen ebenso im Widerspruch zu den ENDOR-Ergebnissen (Middleton et al. 1980). Auch hier ist, um eine

$\chi^2 = 0.78$	Eisenpaar (12)	Eisenpaar (34)
	<i>Freie Parameter:</i>	
δ [mm s ⁻¹]	0.32	0.40
ΔE_Q [mm s ⁻¹]	-0.80	-0.84
η	-0.4	-0.7
γ [MHz]	1.5	
A_x [MHz]	+21.6	-34.0
A_y [MHz]	+21.1	-32.4
A_z [MHz]	+19.6	-26.4*
α	21°	-50°
β	113°	87°
γ	7°	-16°

Tab. 5.5 Hyperfeinparameter von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT ($T = 5$ K, $B = 20$ mT transversal) aus Least-Squares-Fits mit festen **g**-Werten von $g_x = 2.03$, $g_y = 2.04$, $g_z = 2.12$ und gleichen Flächen für beide Eisenpaare im Mößbauer-Spektrum; χ^2 ist die Summe der Abweichungsquadrate zwischen experimentellem und theoretischem Spektrum; Umrechnungsfaktor für **A**-Komponenten und Relaxationsraten: $1 \text{ mm s}^{-1} = 11.625 \text{ MHz}$ (Trautwein et al. 1991); alle Tensoren haben die selben Hauptachsen außer dem um die freien Euler-Winkel α , β , γ rotierten **V**-Tensor; **A**-Komponenten sind freie Fit-Parameter (ENDOR-Werte als Startparameter), Relaxation berücksichtigt; * kompatibel mit ENDOR

Übereinstimmung aller Messmethoden im Detail zu erreichen, die Berücksichtigung von elektronischer Relaxation und von Euler-Rotation zwischen \mathbf{g} , \mathbf{A} einerseits und \mathbf{V} andererseits erforderlich. Die endgültige Anpassung liefert das Spektrum von Abb. 5.11 und die Parameter von Tab. 5.5. Damit wurde für ein zweites natives oxidiertes HiPIP die Relevanz von Elektronenrelaxation nachgewiesen.

5.4.1.3 Oxidiertes HiPIP *C. vinosum* C77S bei 5 K

Abb. 5.12 zeigt das bei $T = 5$ K in einem schwachen transversalen Magnetfeld gemessene Mößbauer-Spektrum der C77S-Mutante (Dilg et al. 2000a). Bevor die experimentellen Daten analysiert werden, sollen mögliche Interpretationsansätze auf Basis früherer NMR- (Babini et al. 1996, Bentrop et al. 1996) und EPR-Ergebnisse (Kap. 5.1) aufgezeigt werden. NMR-Untersuchungen sagen aus, dass im oxidierten HiPIP *C. vinosum* C77S zwei Isomere vorliegen, wie in Abb. 2.4 dargestellt (für die Mutante muss in dieser Abbildung CysIV durch SerIV ersetzt werden). Das Gleichgewicht wurde bei Zimmertemperatur zu 65%:35% bestimmt. Dies bedeutet, dass das an Serin 77 ligandierte Eisenion bevorzugt trivalent ist, aber auch zu gut einem Drittel gemischt-valent auftritt. Dieses quantitative Verhältnis der Isomere beruht auf Raumtemperaturmessungen, wohingegen die Mößbauer-Experimente bei tiefen Temperaturen ablaufen. Deshalb könnte die Besetzung der beiden elektronischen Grenzstrukturen unter den Bedingungen des Mößbauer-Experiments ($T = 5$ K) anders ausfallen. Das bei $T = 30$ K gemessene EPR-Spektrum der Mutante besteht im wesentlichen aus zwei Komponenten mit etwa gleich starken Beiträgen - den beiden NMR-Isomeren?

Diese Vorüberlegungen sind erforderlich, weil im Unterschied zu den nativen HiPIPs in der C77S-Mutante durch das an den Cluster ligandierte Sauerstoffatom des Serins die Symmetrie im Eisenzentrum gebrochen ist. In nativen HiPIPs sollten beide NMR-Isomere in etwa das gleiche Mößbauer-Spektrum liefern, da die Unterschiede zwischen den Isomeren einer bloßen Permutation beider Eisenpaare auf zwei der vier Eisenplätze entspricht. Im Falle der Mutante sollte die Mößbauer-Spektroskopie aber zwischen sauerstoff- und schwefelligandiertem Eisen unterscheiden können (Bill et al. 1989, Yoo et al. 2000). Deshalb ist für die Interpretation des Mößbauer-Spektrums von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* C77S die Frage entscheidend, in welchem Verhältnis Isomere mit Fe^{3+} -Ser und $\text{Fe}^{2.5+}$ -Ser vorliegen. Dies ist bei der Modellbildung als Vorstufe der Auswertung der Mößbauer-Experimente zu berücksichtigen. Die Anpassung des Mößbauer-Spektrums der C77S-Mutante muss mit mehr als zwei Typen Eisen erfolgen. Denn zusätzlich zur Unterscheidung von Eisen in verschiedenen Oxidationszuständen muss jetzt auch noch zwischen cystein- und serinligandiertem Eisen unterschieden werden. Drei Grenzfälle wurden untersucht: in Modell A ist das an Serin 77 angrenzende Eisenion zu 100% trivalent, in Modell B zu 50% und in Modell C zu 0%. In den Fällen A und C sind drei für die Mößbauer-Spektroskopie unterscheidbare Eisentypen zu berücksichtigen (Modell A: 25% Fe^{3+} -O, 25% Fe^{3+} -S, 50% $\text{Fe}^{2.5+}$ -S, Modell C: 25% $\text{Fe}^{2.5+}$ -O, 25% $\text{Fe}^{2.5+}$ -S, 50% Fe^{3+} -S), wohingegen bei Modell B vier Eisentypen erforderlich sind (12.5% Fe^{3+} -O, 12.5% $\text{Fe}^{2.5+}$ -O, 37.5% Fe^{3+} -S, 37.5% $\text{Fe}^{2.5+}$ -S). Für alle Mößbauer-Anpassungen wurden die \mathbf{g} -Werte auf den Mittelwerten der beiden dominanten EPR-Spezies "Isomer A" und "Isomer C" fixiert, d. h.: $g_x = 1/2 (2.03 + 2.02)$, $g_y = 1/2 (2.04 + 2.05)$, $g_z = 1/2 (2.10 + 2.14)$. Der Relaxationsterm in Hamiltonian (3.30) wurde in allen Fällen berücksichtigt.

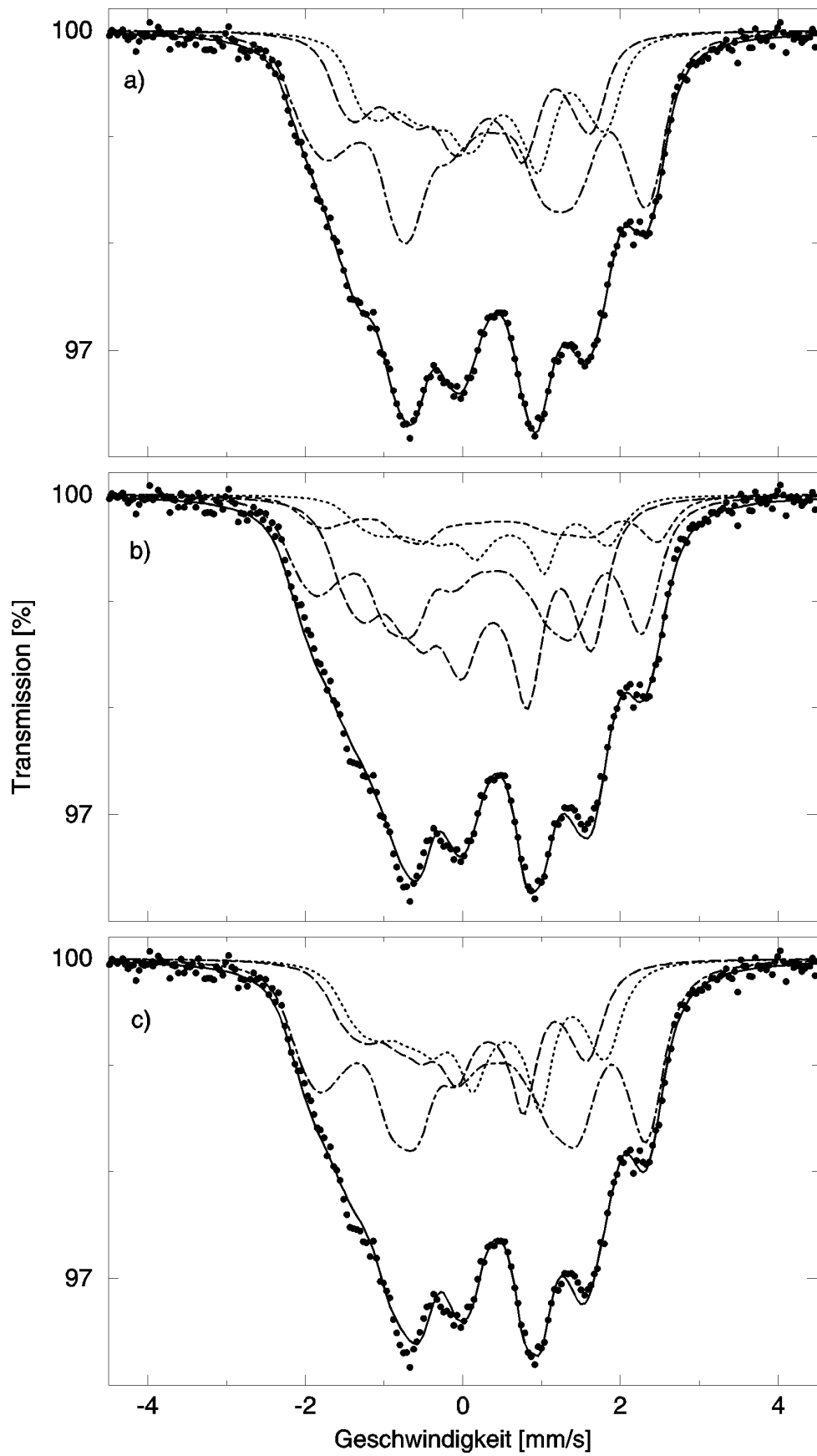


Abb. 5.12 Mößbauer Spektrum von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* C77S bei $T = 5$ K und $B_{\text{ex}} = 20$ mT, transversal, (Kreise) und Anpassungen (durchgezogene Linien) mit Modellen a) A, b) B, c) A' (siehe Text, Tab. 5.6a, b, c) sowie Einzelbeiträge von $\text{Fe}^{3+}\text{-S}$ (langgestrichelte Linien), $\text{Fe}^{3+}\text{-O}$ (gepunktete Linien), $\text{Fe}^{2.5+}\text{-S}$ (strichpunktierte Linien), $\text{Fe}^{2.5+}\text{-O}$ (gestrichelte Linien)

Bei der Anpassung im Rahmen von Modell A wurden alle Mößbauer-Parameter der drei Eisenspezies freigegeben. Startwerte für die **A**-Tensoren wurden den ^{57}Fe -ENDOR-Ergebnissen entnommen. Bei den **A**-Komponenten, für die nur Obergrenzen aus ENDOR bekannt waren, wurden diese als Startparameter gewählt. Beliebige Orientierungen zwischen **A** und **g** in Bezug auf **V** wurden zugelassen. Abb. 5.12a zeigt die beste Anpassung, die dem Parametersatz von Tab. 5.6a entspricht.

Die numerische Beschreibung von Modell B ist mit einer großen Zahl von Parametern verbunden. Um ein vertretbares Parameter-Observablen-Verhältnis aufrechtzuerhalten, sind

a) Modell A $\chi^2 = 0.83$	ferric-ferric-Paar (12)		ferric-ferrous-Paar (34)	
	$1/4 \text{ Fe}^{3+}\text{-O}$	$1/4 \text{ Fe}^{3+}\text{-S}$	$1/2 \text{ Fe}^{2.5+}\text{-S}$	
<i>Freie Parameter:</i>				
δ [mm s^{-1}]	0.42	0.21	0.41	
ΔE_Q [mm s^{-1}]	-0.96	-1.03	-0.92	
η	-0.4	-0.4	-0.9	
γ [MHz]	1			
A_x [MHz]	+21.0 (+21.4)		-36.0 (-35.0)	
A_y [MHz]	+22.4 (+21.7)		-33.9*	
A_z [MHz]	+20.0 (+20.3)		-25.5*	
α	34°	10°	3°	
β	128°	90°	110°	
γ	-133°	16°	29°	
b) Modell B $\chi^2 = 1.09$	ferric-ferric-Paar		ferric-ferrous-Paar	
	$1/8 \text{ Fe}^{3+}\text{-O}$	$3/8 \text{ Fe}^{3+}\text{-S}$	$1/8 \text{ Fe}^{2.5+}\text{-O}$	$3/8 \text{ Fe}^{2.5+}\text{-S}$
<i>Freie Parameter:</i>				
δ [mm s^{-1}]	0.47	0.26	0.52	0.35
ΔE_Q [mm s^{-1}]	-0.99	-0.99	-0.90	-0.98
η	0.0	-0.4	-0.6	-0.9
γ [MHz]	1			
A_z [MHz]	-28.0*			
c) Modell A' $\chi^2 = 1.10$	ferric-ferric-Paar (12)		ferric-ferrous-Paar (34)	
	$1/4 \text{ Fe}^{3+}\text{-O}$	$1/4 \text{ Fe}^{3+}\text{-S}$	$1/2 \text{ Fe}^{2.5+}\text{-S}$	
<i>Freie Parameter:</i>				
δ [mm s^{-1}]	0.41	0.22	0.40	
ΔE_Q [mm s^{-1}]	-0.95	-1.05	-0.90	
η	-0.1	-0.1	-0.7	
γ [MHz]	1			
A_z [MHz]	-28.0*			

Tab. 5.6 Hyperfein-Parameter für oxidiertes HiPIP *C. vinosum* C77S ($T = 5 \text{ K}$, $B_{\text{ex}} = 20 \text{ mT}$, transversal); **g**-Werte fixiert auf $g_x = 2.025$, $g_y = 2.045$, $g_z = 2.12$; *kompatibel mit vorzeichenkorrigierten Obergrenzen aus ENDOR; gleiche Flächen der beiden Spinpaare im Mößbauer-Spektrum angenommen; χ^2 : Summe der Abweichungsquadrate zwischen Experiment und Anpassung; a) Modell A: alle Proteinmoleküle haben Serin an trivalentes Eisen ligandiert; EFG gegen **A**, **g** um Euler-Winkel α , β , γ verdreht; **A**-Werte angepasst; b) Modell B: je 50% der Proteinmoleküle haben Serin an trivalentes bzw. gemischt-valentes Eisen ligandiert; Tensoren kollinear und **A**-Werte auf ENDOR-Ergebnissen fixiert; c) Modell A': wie Modell A, jedoch Tensororientierung und **A**-Werte wie in b)

vereinfachende Annahmen zu treffen. Die durchgeführte Näherung nimmt die beiden elektronischen Isomere mit gleich starker Bevölkerung bei 5 K an, was auf der EPR-Beobachtung zweier bei $T = 30$ K etwa gleich starker spektraler Komponenten beruht ("Isomere A, C" aus Tab. 5.1). Demzufolge setzt sich die Mößbauer-Absorptionsfläche zu $3/8$ aus Beiträgen von $\text{Fe}^{3+}\text{-S}$, $1/8 \text{Fe}^{3+}\text{-O}$, $3/8 \text{Fe}^{2.5+}\text{-S}$ und $1/8 \text{Fe}^{2.5+}\text{-O}$ zusammen. Fixiert man die A-Komponenten auf den ENDOR-Werten und nimmt man eine Kollinearität aller drei Tensoren an, verbleiben nur mehr vierzehn freie Parameter. Man erhält die Anpassung von Abb. 5.12b und die Mößbauer-Parameter von Tab. 5.6b.

Modell C erlaubte keine Anpassung mit sinnvollen Parametern.

Es ist also nur im Rahmen der Modelle A und B möglich, das Tieftemperatur-Mößbauer-Spektrum der oxidierten Mutante zu erklären. Eine Abwägung zwischen beiden Modellen setzt vergleichbare Rahmenbedingungen voraus, was die Zahl der variablen Parameter anbetrifft. Zu diesem Zweck wurde eine Anpassung mit einem Modell A' versucht, das sich von Modell A einzig darin unterscheidet, dass es einige die Zahl der freien Parameter reduzierende Annahmen trifft. Modell A' lässt wie Modell B Rotationen zwischen den Tensoren unberücksichtigt und hält die A-Komponenten auf den mit ENDOR bestimmten Werten fest. Damit verbleiben elf freie Parameter (Abb. 5.12c, Tab. 5.6c). Obwohl in Modell A' drei Größen weniger angepasst werden als in Modell B, sind die Gütefaktoren χ^2 praktisch identisch.

5.4.1.4 Oxidierte HiPIPs bei höheren Temperaturen

Die zur Erklärung der Tieftemperatur-Mößbauer-Experimente erfolgreichen Modelle können nur aufrecht erhalten werden, wenn damit auch die bei höheren Temperaturen gemessenen Spektren in Einklang stehen. Abb. 5.13a zeigt das bei 80 K aufgenommene Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP I *E. halophila*. Das Spektrum ähnelt einem Quadrupoldublett. Die magnetische Hyperfeinaufspaltung ist nur noch rudimentär erkennbar, da Elektronenrelaxation nun schnell gegenüber der Kern-Larmor-Präzession erfolgt. Dies führt im Zeitmittel zu einem sehr kleinen Rest-Magnetfeld am Ort der Eisenkerne. Eine phänomenologische Anpassung des Flüssig-Stickstoff-Spektrums mit einem Quadrupoldublett, wie es in früheren Mößbauer-Arbeiten an oxidierten HiPIPs versucht wurde (Dickson et al. 1974), ist als graue Linie in Abb. 5.13a zu erkennen. An den Flanken des Spektrums sind Diskrepanzen erkennbar. Dieses Problem wurde in der Literatur dadurch umgangen, dass eine Anpassung mit vier Quadrupoldubletts - einem pro Eisenion - versucht wurde (Middleton et al. 1980). Damit kann das Experiment zwar formal reproduziert werden, konzeptionell zufriedenstellend ist eine solche Anpassung aber keineswegs. Denn das gängige Modell zur Interpretation des 5 K-Spektrums - die Annahme zweier Eisenpaare mit paarweise ununterscheidbaren Eisenionen - ist mit der Interpretation des 80 K-Spektrums unter Zuhilfenahme vier verschiedener Eisentypen inkompatibel. Vielmehr ist das 80 K-Spektrum mit dem gleichen Modell anzupassen, mit dem auch das Niedrig-Temperatur-Spektrum erklärt wurde: zwei Eisenpaare mit magnetischer Hyperfeinwechselwirkung und nun schneller Elektronenrelaxation. Die durchgezogene Linie in Abb. 5.13a zeigt das Resultat, welches die Richtigkeit des 5 K-Modells verifiziert. Für diese Anpassung wurden alle Terme des Hamiltonian (3.30) berücksichtigt und g- und A-Komponenten auf den Werten von Tab. 5.4e festgehalten. Nur die geringfügig temperaturabhängigen Parameter Isomerieverschiebung und

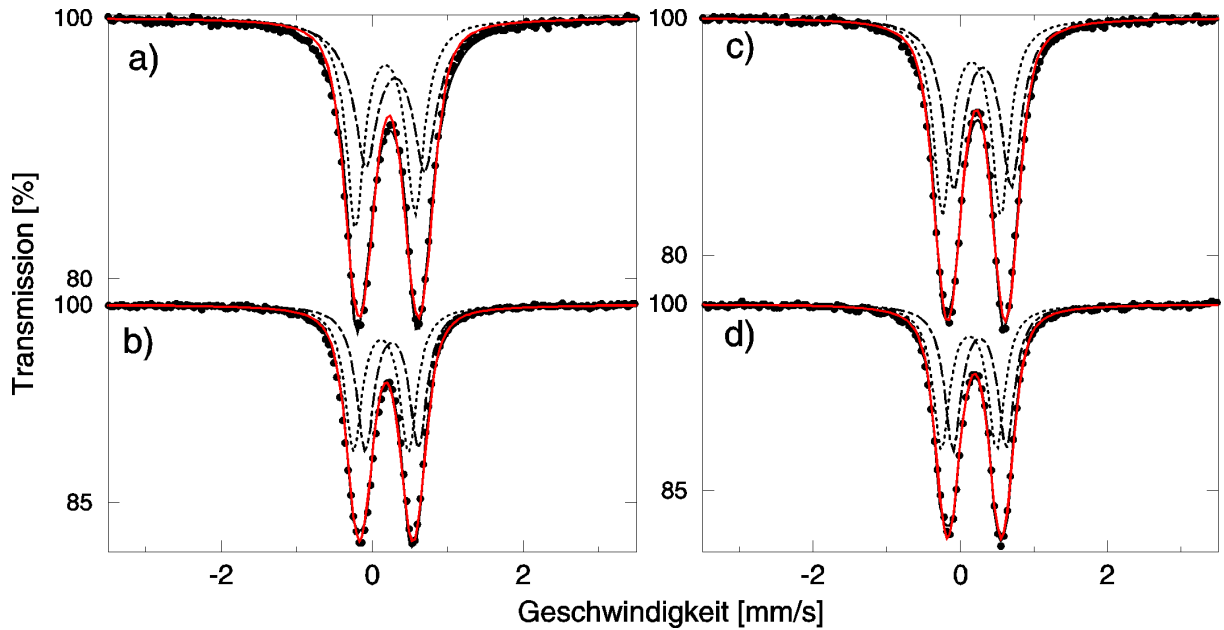


Abb. 5.13 Mößbauer-Spektren von oxidierten HiPIPs I *E. halophila/C. vinosum* WT in einem schwachen transversalen externen Magnetfeld von 20 mT (Kreise) bei a/c) $T = 80$ K und b/d) $T = 160$ K: Least-Squares-Fits mit einem Quadrupoldublett ohne Relaxation (durchgezogene graue Linie) bzw. mit dem Modell von Tab. 5.4e/Tab. 5.5 (durchgezogene schwarze Linie, Subspezies als gepunktete und strichpunktete Linie); resultierende Mößbauer-Parameter sind in Tab. 5.7 zusammengestellt

a) HiPIP I <i>E. h.</i>		(12)		(34)		(1234)			
T [K]	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	γ [MHz]				
5	0.29	-0.88	0.42	-0.93	1.1				
80	0.28	-0.79	0.41	-0.78	$7.7 \cdot 10^1$				
160	0.23	-0.72	0.37	-0.70	$1.9 \cdot 10^3$				
b) HiPIP <i>C. v.</i> WT		(12)		(34)		(1234)			
T [K]	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	γ [MHz]				
5	0.32	-0.80	0.40	-0.84	1.5				
80	0.27	-0.79	0.40	-0.78	$1.7 \cdot 10^2$				
160	0.23	-0.75	0.37	-0.73	$1.2 \cdot 10^4$				
c) HiPIP <i>C. v.</i> C77S Modell A									
T [K]	Fe ³⁺ -O		Fe ³⁺ -S		Fe ^{2.5+} -S		γ [MHz]		
	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q			
80	0.38	-0.83	0.22	-0.89	0.36	-0.85	$2.8 \cdot 10^2$		
160	0.36	-0.79	0.20	-0.83	0.35	-0.76	$5.0 \cdot 10^2$		
d) HiPIP <i>C. v.</i> C77S Modell B									
T [K]	Fe ³⁺ -O		Fe ³⁺ -S		Fe ^{2.5+} -O		Fe ^{2.5+} -S		γ [MHz]
	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q	
80	0.46	-0.90	0.26	-0.88	0.51	-0.90	0.34	-0.85	$2.8 \cdot 10^2$
160	0.40	-0.77	0.22	-0.81	0.51	-0.83	0.33	-0.82	$5.8 \cdot 10^2$

Tab. 5.7 Mößbauer-Parameter oxidierteter HiPIPs bei verschiedenen Temperaturen; alle nicht angegebenen Parameter wurden auf den Endwerten des zugehörigen Least-Squares-Fits bei $T = 5$ K festgehalten; zugehörige Messspektren und Theoriekurven sind in Abb. 5.13, 5.14 zu sehen; c), d) δ , ΔE_Q in mm s⁻¹;

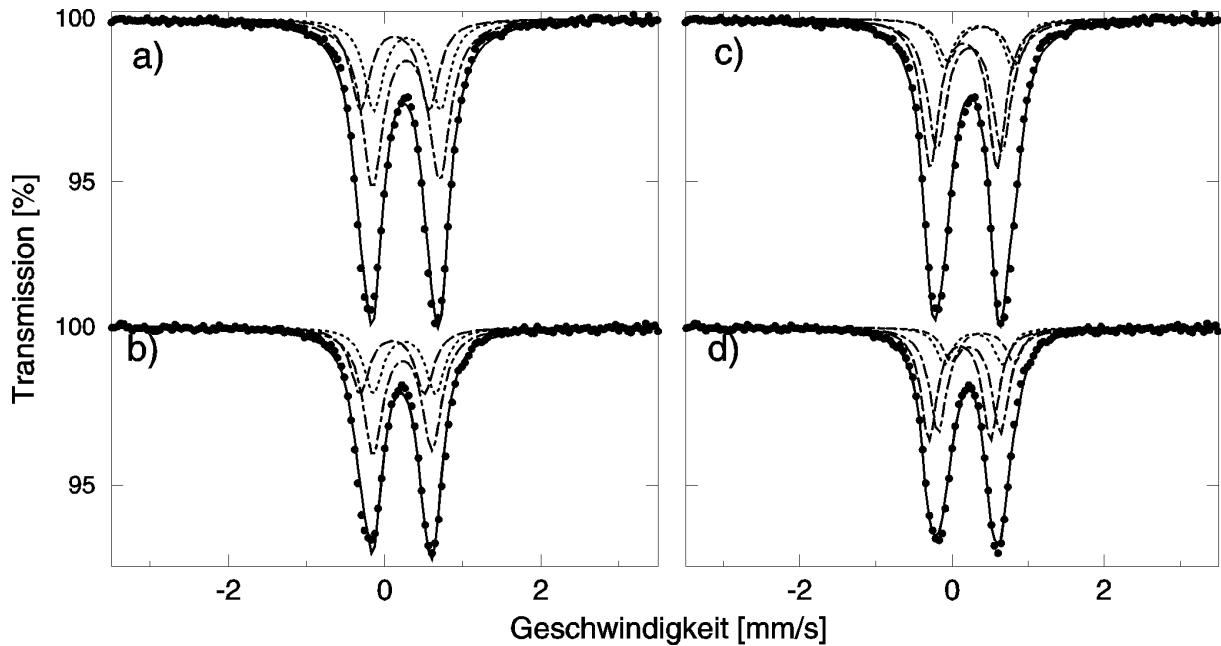


Abb. 5.14 Mößbauer-Spektren von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* C77S in einem schwachen transversalen externen Magnetfeld von 20 mT (Kreise) bei a)/c) $T = 80$ K und b)/d) $T = 160$ K sowie Least-Squares-Fits (durchgezogene Linien) mit a)/b) Modell A b)/d) Modell B (Parameter: Tab. 5.7c, d); Einzelbeiträge von Fe^{3+} -S (langgestrichelte Linien), Fe^{3+} -O (gepunktete Linien), $\text{Fe}^{2.5+}$ -S (strichpunktete Linien), $\text{Fe}^{2.5+}$ -O (gestrichelte Linien)

Quadrupolaufspaltung sowie die stark temperaturabhängige Relaxationsrate wurden freigegeben. Tab. 5.7a fasst die Mößbauer-Parameter zusammen: Von einer geringfügigen Abnahme von Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung abgesehen, sind die visuell gänzlich unterschiedlichen 5 K- und 80 K-Spektren mit identischen Parametern beschreibbar. Einzig und allein die Relaxationsrate ist bei flüssigem Stickstoff mehr als eine Größenordnung höher als bei flüssigem Helium. Hoch- und Tieftemperatur-Spektren oxidierteter HiPIPs sind im Rahmen des Relaxationsmodells also einheitlich verständlich. Abb. 5.13b stellt experimentelle und theoretische Mößbauer-Spektren von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* bei 160 K dar. Auch diese Anpassung bestätigt das entwickelte Modell und zeigt, dass sich die Temperaturdrift von δ , ΔE_Q und γ monoton fortsetzt (Tab. 5.7a).

Die Anpassungen der Mößbauer-Spektren von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT bei 80 K und 160 K erfolgten ganz analog (Abb. 5.13c, d, Tab. 5.7b). Auch hier können die Hochtemperaturdaten im wesentlichen mit den Theorieparametern der Tieftemperaturmessung und einem entsprechend größeren Wert γ angepasst werden.

Ein weiteres Entscheidungskriterium zwischen Modell A und Modell B im Falle der oxidierten C77S-Mutante ist die Güte der Anpassung der Mößbauer-Spektren bei 80 K und 160 K (Abb. 5.14, Tab. 5.7c, d). Mit beiden Modellen ist es möglich, die Experimente mit sinnvollen Parametern zu simulieren. Die Flanken und die leichte Asymmetrie der Spektren können mit Modell B etwas besser reproduziert werden als mit Modell A.

Über die Beseitigung der Diskrepanz zwischen Mößbauer- und ENDOR-Resultaten hinaus ist das Konzept der Elektronenrelaxation also zudem in der Lage, die Temperaturabhängigkeit der Mößbauer-Spektren oxidierteter HiPIPs verständlich zu machen.

5.4.1.5 Reduzierte HiPIPs

Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrum ist diamagnetisch ($S = 0$), wie durch das fehlende EPR-Signal angezeigt wird. Während damit alle an einen Elektronenspin ankoppelnden Messmethoden zur Untersuchung dieser Metallzentren ausscheiden, können sie mittels Mößbauer-Spektroskopie charakterisiert werden. In Abb. 5.15a ist das Mößbauer-Spektrum von reduziertem HiPIP I *E. halophila* bei einer Temperatur von 5 K dargestellt. Das Fehlen einer magnetischen Hyperfeinstruktur und spektraler Asymmetrien bestätigt den Diamagnetismus des reduzierten Metallzentrums. Obwohl das Protein vier Eisenionen enthält, lässt sich das Spektrum durch ein einziges Quadrupoldublett mit Voigt-Profil anpassen (Tab. 5.8). Die Linienform spiegelt die Inhomogenität der Mößbauer-Sonden wider, die ein Maß für die Unterschiedlichkeit der vier Eisenionen innerhalb des Clusters und der Mannigfaltigkeit einander entsprechender Eisenionen in verschiedenen Proteinmolekülen ist. Erhöht man die Temperatur auf 80 K bzw. 160 K, so ändert sich die spektrale Struktur nicht und die Mößbauer-Parameter nur unwesentlich (Abb. 5.15b, c, Tab. 5.8). Mößbauer-Experimente an reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT zeigen dieselben Charakteristika. Bei allen Temperaturen war eine Anpassung mit nur einer spektralen Komponente möglich, magnetische Effekte konnten nicht beobachtet werden. Abb. 5.16 zeigt die experimentellen Ergebnisse und Tab. 5.8 die zugehörigen Mößbauer-Parameter.

Dagegen weisen die Mößbauer-Spektren der reduzierten C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* im Vergleich zu den beiden nativen Proteinen erhebliche Veränderungen auf (Abb. 5.17). Im Bereich um $\nu = 0$ erkennt man deutlich eine Schulter im Mößbauer-Spektrum. Die Feinstruktur des Knickes in der Nähe des Geschwindigkeitsursprungs wurde separat ausgemessen und ist ebenfalls in Abb. 5.17 dargestellt. Eine Anpassung mit nur einem Quadrupoldublett ist offensichtlich ausgeschlossen. Als nächst einfacheres Modell wurde eine Anpassung mit zwei Komponenten versucht. Um das Modell in Einklang mit den biologisch-physikalischen Rahmenbedingungen zu bringen, wurden die beiden spektralen Anteile im Verhältnis 3:1 gewichtet. Die kleinere Komponente steht dabei für das einzige infolge der Mutation sauerstoffligandierete Eisenion, während die größere die drei unverändert vierfach schwefelkoordinierten Eisenionen im Cluster repräsentiert. Die Anpassungen in Abb. 5.17 zeigen, dass dieses Modell die Spektren bei allen Temperaturen sehr gut erklärt. Wie die nativen reduzierten HiPIPs zeigt auch die reduzierte Mutante keinerlei Paramagnetismus.

T [K]	reduziertes HiPIP I <i>E. halophila</i>			reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> WT		
	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	Anteil [%]	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	Anteil [%]
5	0.45	1.12	100	0.44	1.13	100
80	0.43	0.92	100	0.42	1.08	100
160	0.40	0.81	100	0.39	0.99	100
T [K]	reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S					
	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	Anteil [%]	δ [mm s ⁻¹]	ΔE_Q [mm s ⁻¹]	Anteil [%]
5	0.40	1.17	75	0.63	1.07	25
80	0.40	1.12	75	0.64	1.00	25
160	0.37	0.98	75	0.59	0.87	25

Tab. 5.8 Mößbauer-Parameter reduzierter HiPIPs

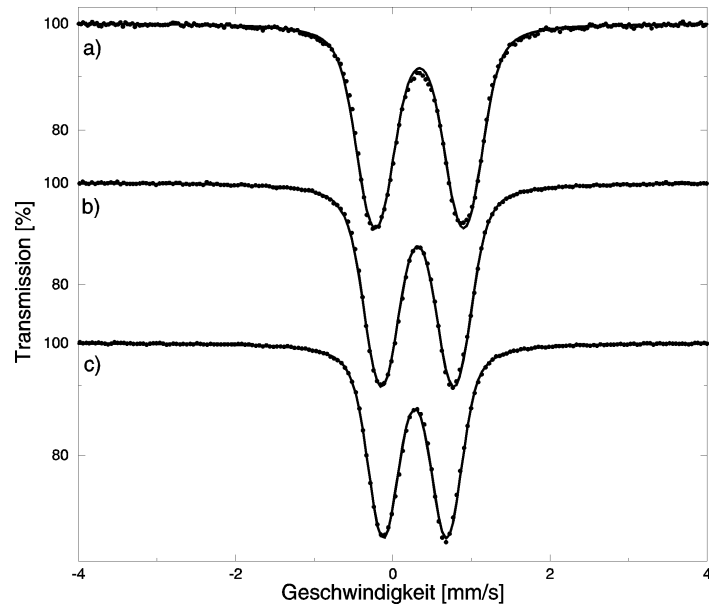


Abb. 5.15 Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP I *E. halophila* (Kreise) und Least-Squares-Fits mit einem Quadrupoldublett (durchgezogene Linien) bei a) $T = 5$ K, b) $T = 80$ K, c) $T = 160$ K

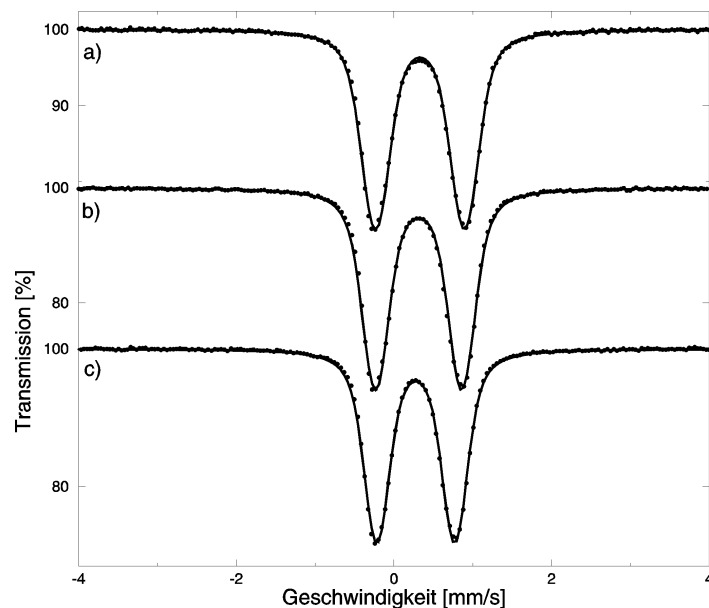


Abb. 5.16 Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT (Kreise) und Least-Squares-Fits mit einem Quadrupoldublett (durchgezogene Linien) bei a) $T = 5$ K, b) $T = 80$ K, c) $T = 160$ K

5.4.1.6 Teilweise entfaltetes reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT

In Tab. 5.9 sind die Mößbauer-Parameter von reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen dargestellt. In der ersten Spalte findet man die Ergebnisse in Abwesenheit von Guanidiniumchlorid (alle Proteinmoleküle gefaltet), in der zweiten bei 3.2 M GdmCl (50% gefaltet, 50% ungefaltet) und in der dritten für 4.0 M GdmCl (alle ungefaltet). In allen Konfigurationen und bei allen Temperaturen sind die Messspektren

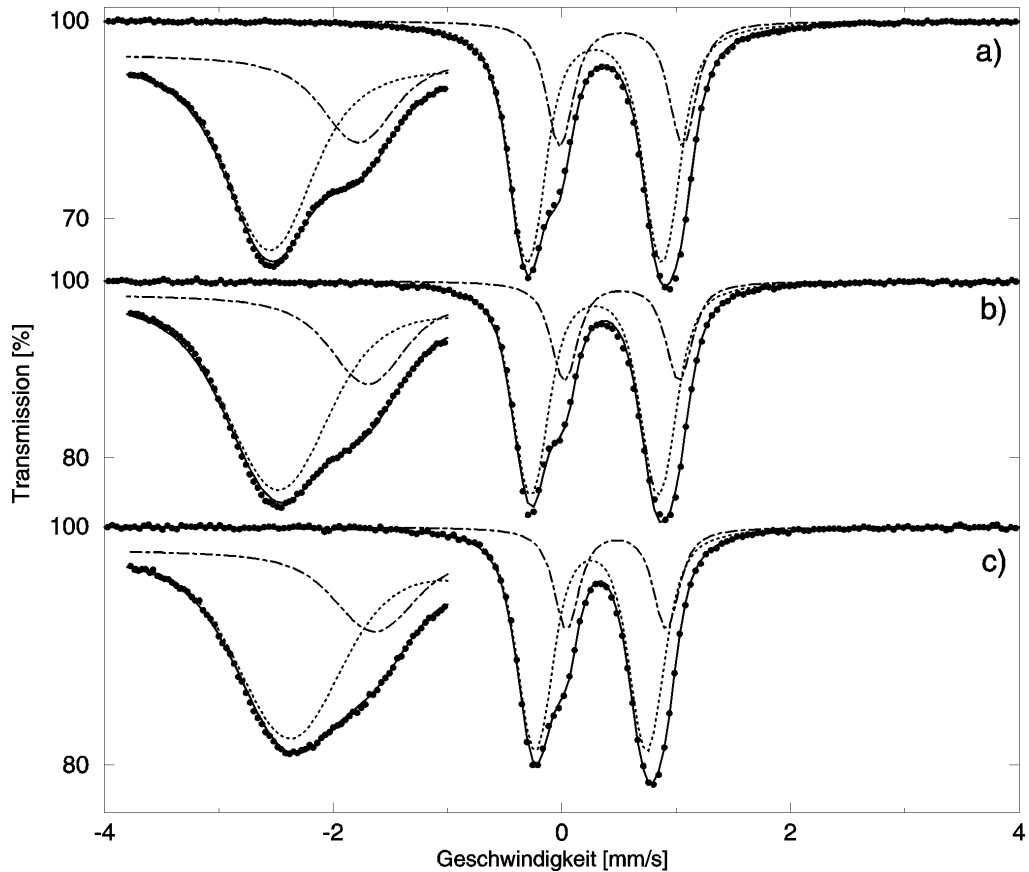


Abb. 5.17 Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* C77S (Kreise) und Least-Squares-Fits (durchgezogene Linien) mit zwei Quadrupoldoublets im Flächenverhältnis 3:1 zur Erfassung der drei cysteinligandierten (gepunktete Linie) und des einen serinligandierten Clustereisens (strichpunktierte Linie) bei a) $T = 5$ K, b) $T = 80$ K, c) $T = 160$ K; vergrößert eingezeichnet sind Detailmessungen zur genaueren Untersuchung des spektralen Knicks.

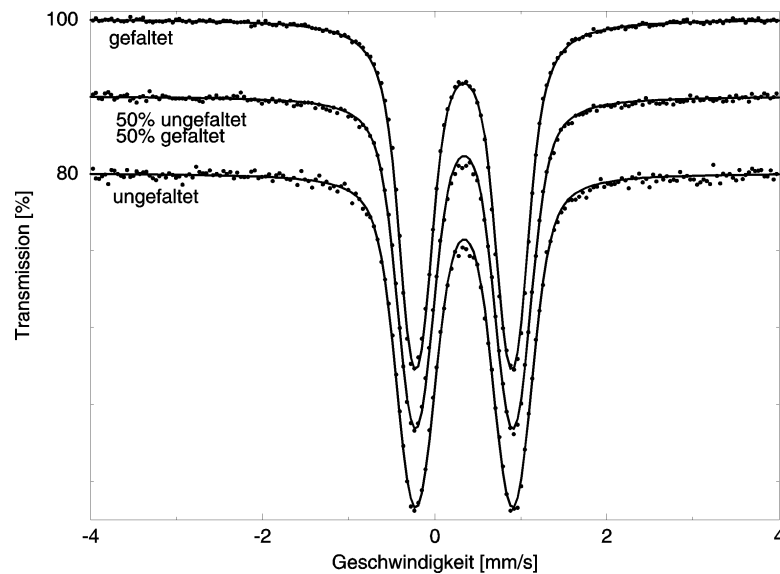


Abb. 5.18 Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT bei $T = 5$ K (Kreise) und Least-Squares-Fit mit einem Quadrupoldoublet (durchgezogene Linien) mit 0 M GdmCl/100% gefaltetes HiPIP (oben), 3.2 M GdmCl/50% ungefaltetes HiPIP (Mitte), 4.0 M GdmCl/100% ungefaltetes HiPIP (unten)

HiPIP C. v. WT reduziert	gefaltet		50 % gefaltet 50 % ungefaltet		ungefaltet	
	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q	δ	ΔE_Q
T = 5 K	0.44	1.13	0.45	1.13	0.45	1.13
T = 80 K	0.42	1.08	0.44	1.07	0.43	1.06
T = 160 K	0.39	0.99	0.40	0.98	0.40	0.98

Tab. 5.9 Mößbauer-Parameter in mm s^{-1} von reduziertem HiPIP C. *vinosum* WT in drei Faltungszuständen

mit einem Quadrupoldublett anpassbar. Experimentelle und theoretische Kurven sind für $T = 5 \text{ K}$ in Abb. 5.18 dargestellt. Die Mößbauer-Parameter aller drei Proben sind bei gleicher Temperatur im Rahmen der Unsicherheiten identisch.

5.4.2 Temperaturabhängige Messreihen

5.4.2.1 Dynamikmessungen

Die Temperaturabhängigkeit des mittleren Auslenungsquadrates der Eisenkerne wurde zwischen 80 K und etwa 250 K für jeweils reduziertes und oxidiertes HiPIP I *E. halophila*, HiPIP C. *vinosum* WT und für dessen C77S-Mutante mittels Mößbauer-Spektroskopie bestimmt (Dilg et al. 2000b). In allen Fällen wurde die Temperatur so weit erhöht, bis kein Mößbauer-Effekt mehr detektierbar war. Im unteren Temperaturbereich wurden Spektren im Abstand von 20 K aufgenommen, bei höheren Temperaturen wurde die Schrittweite auf 10 K, 5 K und teils noch weiter verfeinert.

Die Auswertung der Mößbauer-Spektren zur Bestimmung von $\langle x^2 \rangle(T)$ erfolgte wie in Kap. 3.2.4.3 beschrieben. Dazu wurde das Transmissionsintegral numerisch gelöst und die Spektren mittels voigtförmiger Quadrupoldubletts angepasst. Freie Parameter waren Isomerieverschiebung δ , Quadrupolaufspaltung ΔE_Q , effektive Dicke t_a sowie die Linienbreite ξ der in das Voigt-Profil eingehenden Gauß-Verteilung. Die Linienbreite der mit der Gauß-Verteilung gefalteten Lorentz-Kurve wurde wie in vorangegangenen Arbeiten zur Verringerung der Zahl freier Parameter auf der natürlichen Linienbreite von 0.0973 mm s^{-1} festgehalten (Scherk 1998). In diesem Rahmen konnten alle Experimente reproduziert werden. Für die verschiedenen Proben wurden die Anpassungen mit einer auf das jeweilige Protein zugeschnittenen Anzahl spektraler Komponenten durchgeführt. Für beide Wildtyp HiPIPs im reduzierten Zustand wurde ein Quadrupoldublett angenommen. Das gleiche phänomenologische Modell wurde auf die oxidierten nativen Proteine angewandt, wie in der Literatur üblich (Middleton et al. 1980). Ein solches Vorgehen ist zulässig bei Temperaturen, bei denen die Elektronenrelaxation schnell ist und wenn - wie im vorliegenden Kontext - nur der Wert der effektiven Dicke von Interesse ist. Für die reduzierte C77S-Mutante wurden entsprechend dem in Kap. 5.4.1.5 beschriebenen Ansatz zwei Spezies im Flächenverhältnis 3:1 verwendet. Auch bei der oxidierten Mutante wurde dieses phänomenologische Modell gewählt, das nur zwischen sauerstoff- und schwefelligandiertem Eisen unterscheidet.

Mößbauer-Spektren von Proteinen lassen sich nur bei tiefen Temperaturen mit einem Satz schmaler Linien anpassen (Parak et al. 1982, Bauminger et al. 1983). Bei Temperaturen ober-

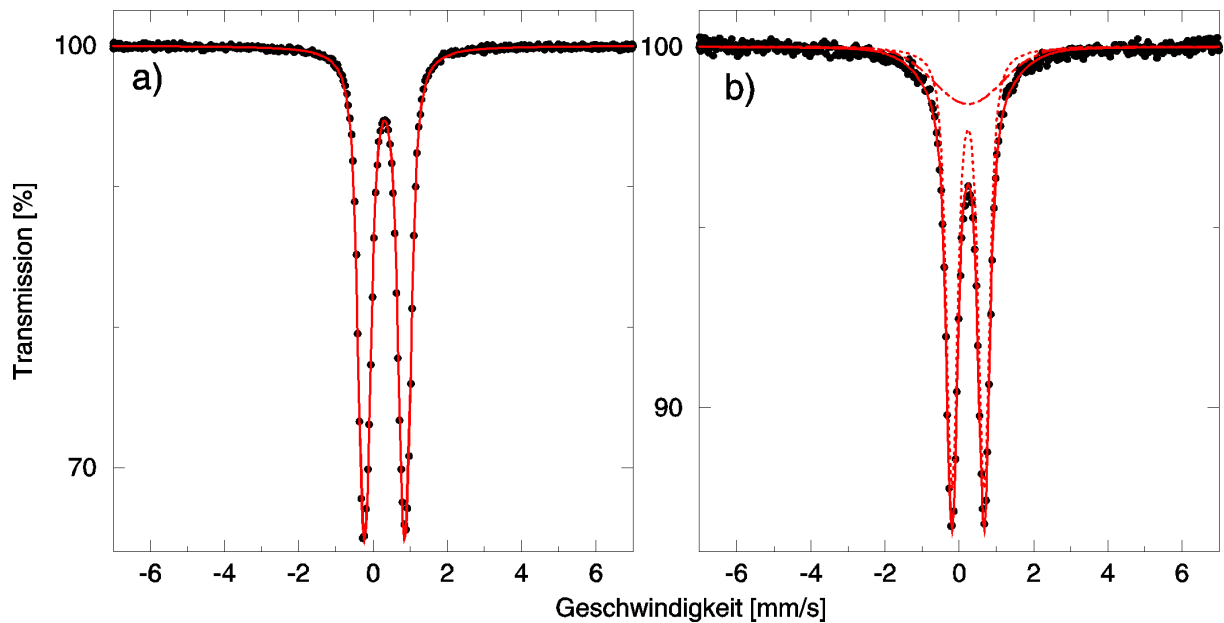


Abb. 5.19 Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT (Punkte) bei a) $T = 81$ K: Least-Squares-Fit mit einem Quadrupoldublett (durchgezogene Linie) b) $T = 245$ K: Least-Squares-Fit (durchgezogene Linie) mit schmalen (gepunktete Linie) und breitem (strichpunktierte Linie) Quadrupoldublett

halb etwa 190 - 200 K ist für eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment die Einführung zusätzlicher breiter Mößbauer-Linien erforderlich. Dieses Verhalten wurde auch bei allen hier untersuchten Proteinen gefunden. Exemplarisch sind hierzu in Abb. 5.19 die Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT bei Temperaturen von 81 K und 245 K dargestellt. Während im ersten Fall eine überzeugende Übereinstimmung zwischen experimenteller Kurve und theoretischer Anpassung mit einem schmalen Quadrupoldublett erreicht wurde, versagt dieses Konzept beim Hochtemperaturexperiment. Hier sind die spektralen Flanken nur reproduzierbar, wenn eine zusätzliche breite Linie eingeführt wird.

Anhang A stellt die Ergebnisse der Auswertungen zusammen. Die über hundert Mößbauer-Spektren, die für die Messung der Temperaturabhängigkeit des mittleren Auslenkungsquadrates der Eisenkerne nötig waren, sind in Anhang B gemeinsam mit den zugehörigen Least-Squares-Fits angefügt. In Abb. 5.20 sind die aus den experimentellen Daten berechneten Temperaturabhängigkeiten der mittleren quadratischen Auslenkung der Eisenkerne graphisch dargestellt. Im unteren Temperaturbereich steigen die Kurven linear an, was durch die eingezeichneten Regressionsgeraden verdeutlicht wird. Oberhalb einer charakteristischen Temperatur, die für die verschiedenen HiPIPs zwischen 190 K und 200 K liegt, knickt die Kurve nach oben ab. Dies fällt mit dem Temperaturpunkt zusammen, oberhalb dessen die Hinzunahme einer breiten Linie bei der Anpassung der Mößbauer-Spektren nötig wird. Ein solches Verhalten wurde bei diversen Proteinen gefunden (Parak et al. 1982, Bauminger et al. 1983, Mayo et al. 1983). Die Proteindynamik kennzeichnende Größen, nämlich die Steigung der Ausgleichsgerade, die charakteristische Temperatur sowie die Abweichung der Ausgleichsgerade vom experimentellen Auslenkungsquadrat nahe 250 K sind für alle sechs Versuchsobjekte in Tab. 5.10a zusammengestellt.

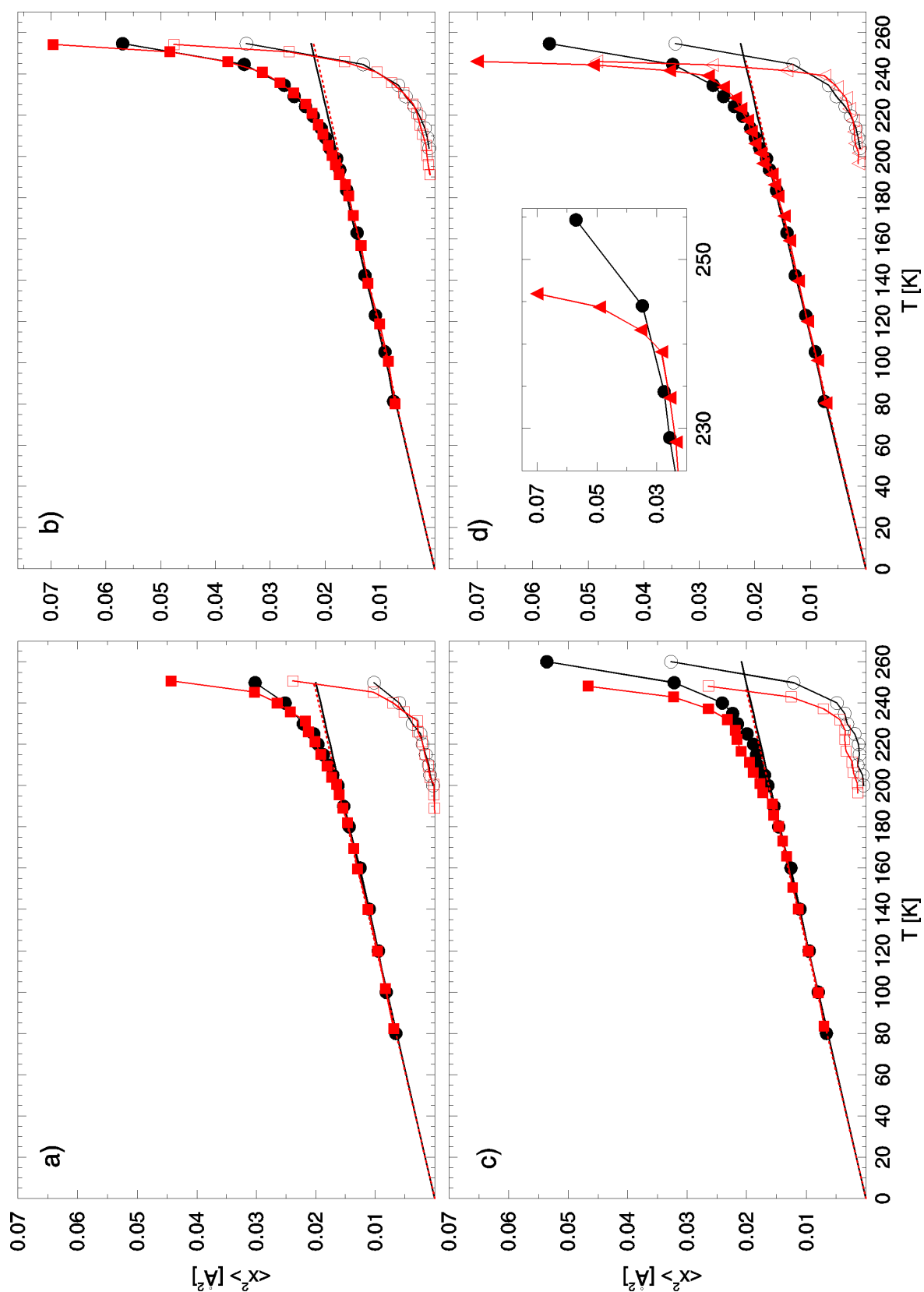


Abb. 5.20 a) Vergleich der gesamten Auslenkungsquadrate $\langle x^2 \rangle$ (ausgefüllte Symbole) und des Beitrags $\langle x^2 \rangle_t$ (offene Symbole) aus Mößbauer Spektroskopie; a) HiPIP I *E. halophila* b) HiPIP *C. vinosum* WT c) HiPIP *C. vinosum* C77S d) gefaltetes und entfaltetes HiPIP *C. vinosum* WT (Einschub: Vergrößerung des Hochtemperaturbereiches); ● reduziert, ■ oxidiert, ▲ reduziert ungefaltet, durchgezogene/gepunktete Linien: lineare Regression des Tieftemperaturbereichs

a) HiPIP		$\langle x^2 \rangle_{\sqrt{T}} [10^{-4} \text{Å}^2 \text{K}^{-1}]$	$T_C [K]$	$\langle x^2 \rangle (T \approx 250 \text{ K}) [\text{Å}^2]$
I <i>E. halophila</i>	reduziert	0.80±0.02	200±5	0.010 (250 K)
	oxidiert	0.81±0.02	201±5	0.024 (251 K)
<i>C. vinosum</i> WT	reduziert	0.89±0.03	199±5	0.024 (250 K)
	oxidiert	0.87±0.03	187±5	0.037 (251 K)
<i>C. vinosum</i> C77S	reduziert	0.80±0.02	190±5	0.012 (250 K)
	oxidiert	0.82±0.02	191±5	0.026 (248 K)
b) HiPIP <i>C.v.</i> reduziert		$\langle x^2 \rangle_{\sqrt{T}} [10^{-4} \text{Å}^2 \text{K}^{-1}]$	$T_C [K]$	$\langle x^2 \rangle (T \approx 245 \text{ K}) [\text{Å}^2]$
	gefaltet	0.89±0.03	199±5	0.013 (244.5 K)
	ungefaltet	0.88±0.02	192±5	0.028 (244.3 K)

Tab. 5.10 Dynamik-Parameter aus Mößbauer-Spektroskopie für a) verschiedene HiPIPs b) reduziertes HiPIP *C. vinosum* WT in verschiedenen Faltungszuständen.

Mit der beschriebenen Vorgehensweise wurden temperaturabhängige Messreihen an reduziertem HiPIP *C. vinosum* WT in verschiedenen Faltungszuständen ausgewertet. Eine Probe mit gefaltetem Protein ($c_{\text{GdmCl}} = 0$) wurde ebenso vermessen wie eine solche, in denen sämtliches HiPIP ($c_{\text{GdmCl}} = 4.05 \text{ M}$) entfaltet vorliegt. Alle Mößbauer-Spektren wurden bei tiefen Temperaturen mit einem schmalen Quadrupoldublett und bei hohen Temperaturen mit einer zusätzlichen breiten Linie angepasst. Die entfaltete Probe konnten nur bis knapp oberhalb 245 K vermessen werden, da infolge besonders starker Proteindynamik hier die Absorptionsfläche rasch gegen Null strebt. Die erhaltenen $\langle x^2 \rangle(T)$ -Kurven sind in Abb. 5.20d zu sehen, charakteristische Parameter zeigt Tab. 5.10b. Die Anhänge A und B stellen Spektren und Fitparameter dar.

5.4.2.2 Relaxationsuntersuchungen

Im Temperaturbereich zwischen flüssigem Helium und Stickstoff verändert das Mößbauer-Spektrum oxidiertes HiPIPs sein Aussehen fundamental, was exemplarisch für das HiPIP I *E. halophila* in Abb. 5.21 dargestellt ist. Die entsprechenden Anpassungen wurden im gesamten Temperaturbereich zwischen 2.4 K und 180 K mit dem Modell durchgeführt, das in Kap. 5.4.1.1 für $T = 5 \text{ K}$ beschrieben wurde. Die g - und A -Werte wurden auf denjenigen Werten festgehalten, die der Anpassung des Spektrums bei $T = 5 \text{ K}$ entsprechen (Tab. 5.4e) und lediglich Isomeriewerschiebung, Quadrupolaufspaltung und Relaxationsrate wurden freigegeben. Oberhalb etwa 180 K ist eine Anpassung der Spektren auf der Basis von (3.30) nicht mehr sinnvoll, da hier aufgrund des Einsetzens von proteinspezifischer Dynamik breite Linien hinzutreten. In Abb. 5.22 ist auf halblogarithmischer Skala die für drei oxidierte HiPIPs erhaltene Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate dargestellt. Während sich γ im untersuchten Temperaturintervall um mehrere Größenordnungen erhöht, sind die Temperaturverläufe von Isomeriewerschiebung und Quadrupolaufspaltung nur ganz schwach monoton fallend. Zusätzlich zu den drei hier untersuchten HiPIPs wurden auch Literaturspektren des HiPIP II von *E. halophila* (Bertini et al. 1993a) mittels (3.30) angepasst. Wenn auch der qualitative Verlauf aller Kurven ein einheitliches Muster aufweist, so sind doch die quantitativen Unterschiede zwischen verschiedenen HiPIPs beachtlich.

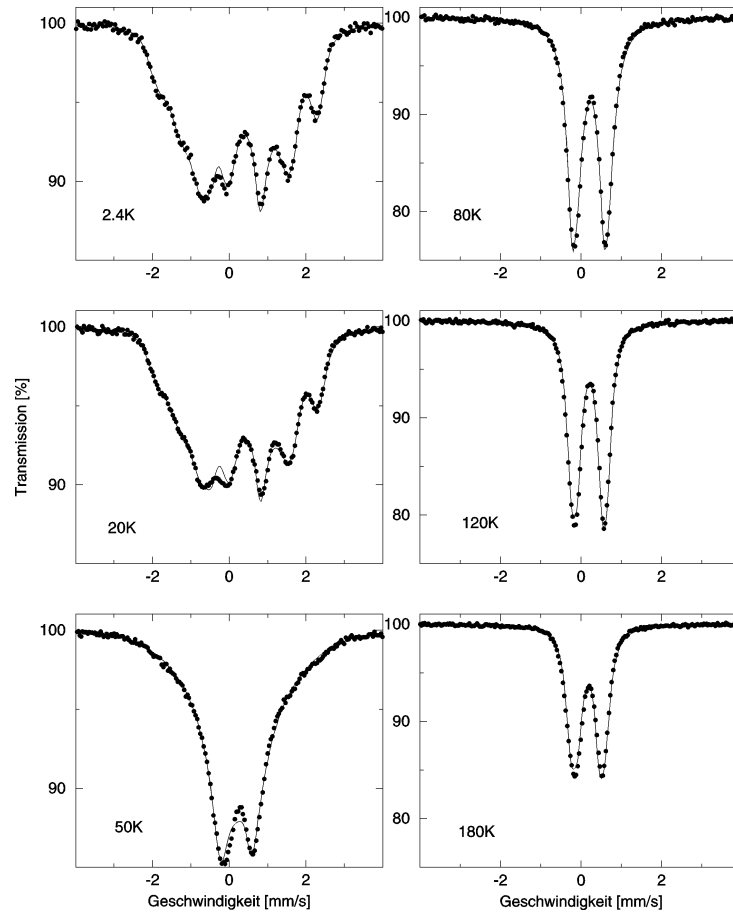


Abb. 5.21 Mößbauer-Spektren von oxidiertem HiPIP I *E. halophila* im schwachen transversalen externen Magnetfeld von 20 mT bei charakteristischen Temperaturen im Bereich [2.4 K; 180 K] (Kreise) und Anpassungen mit Parametern aus Tab. 5.4e, jedoch mit variablen Werten δ , ΔE_Q , γ (durchgezogene Linien)

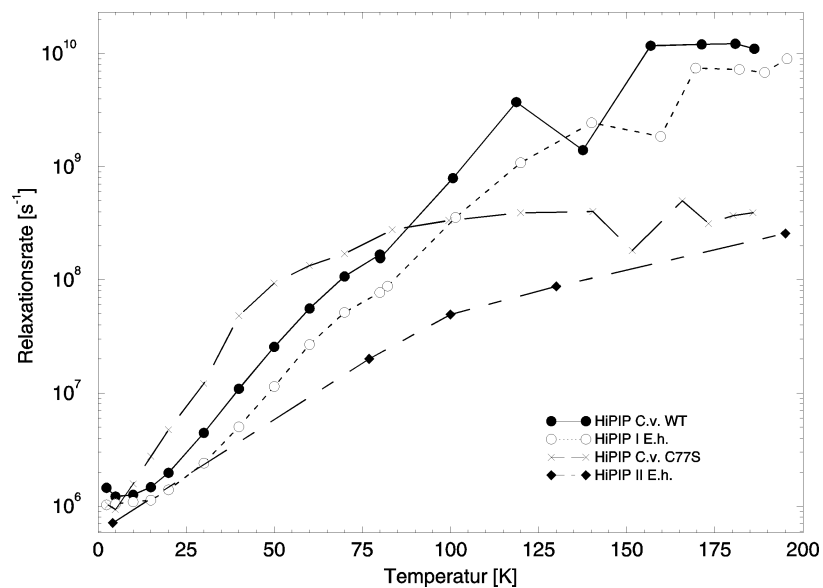


Abb. 5.22 Halblogarithmische Darstellung der aus Mößbauer-Anpassungen bestimmten Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate für oxidierte HiPIPs \circ I *E. halophila*; \blacklozenge II *E. halophila* (experimentelle Daten entnommen aus Bertini et al. 1993a); \bullet *C. vinosum* WT; \times *C. vinosum* C77S-Mutante;

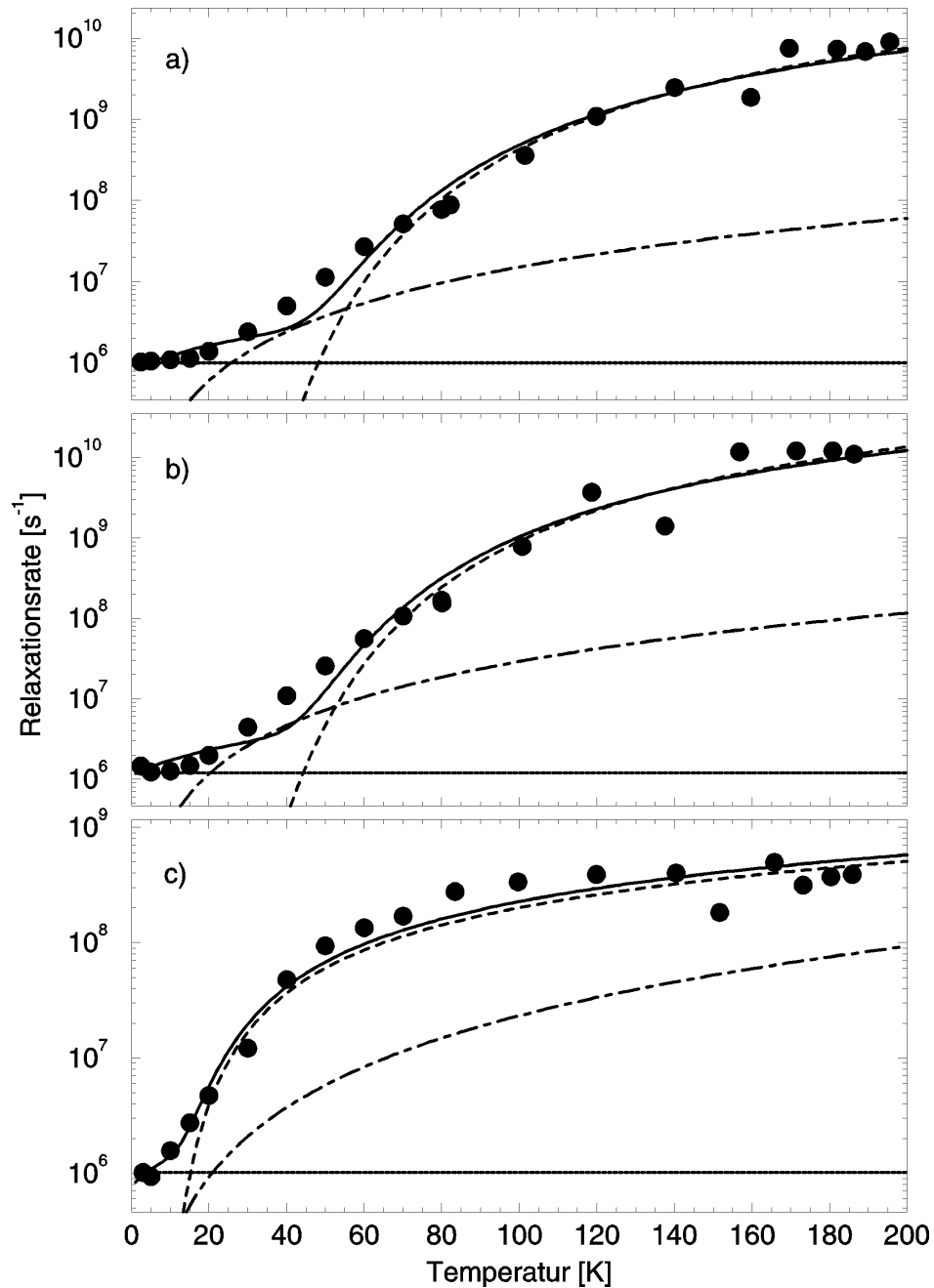


Abb. 5.23 Halblogarithmische Darstellung der aus Mößbauer-Experimenten bestimmten Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate (Kreise) und Theorieanpassung (durchgezogene Linie) mit Beiträgen von temperaturunabhängiger Spin-Spin-Relaxation (gepunktete Linie), Spin-Gitter-Relaxation durch Orbach-Prozesse (gestrichelte Linie) und direkter Spin-Gitter-Relaxation im "Phonon Bottleneck" (strichpunktierte Linie) für oxidierte HiPIPs a) *E. halophila*; b) *C. vinosum* WT; c) *C. vinosum* C77S

	C_1 [s ⁻¹]	C_2 [s ⁻¹]	C_3 [s ⁻¹ K ⁻²]	Δ [cm ⁻¹]
HiPIP <i>E. halophila</i>	$0.999 \cdot 10^6$	$1.17 \cdot 10^{11}$	$1.51 \cdot 10^3$	388
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	$1.19 \cdot 10^6$	$1.74 \cdot 10^{11}$	$2.91 \cdot 10^3$	363
HiPIP <i>C. vinosum</i> Cys77Ser	$1.01 \cdot 10^6$	$2.69 \cdot 10^8$	$2.33 \cdot 10^3$	62

Tab. 5.11 Parameter aus der Anpassung der semiexperimentellen $\gamma(T)$ -Kurven von Abb. 5.23 mit der Theoriefunktion (5.1)

Abb. 5.23 zeigt nochmals für die HiPIPs I *E. halophila*, *C. vinosum* WT und C77S-Mutante den Temperaturverlauf der Relaxationsrate und Anpassungen mit dem im folgenden erläuterten theoretischen Konzept. Für das HiPIP II von *E. halophila* wurde keine Anpassung vorgenommen, da hier nur fünf Temperaturpunkte verfügbar waren. Eine Summe von drei Relaxationsbeiträgen ermöglicht es, den halbexperimentellen $\gamma(T)$ -Verlauf in allen drei Fällen wiederzugeben: Die oben dargestellten gepulsten EPR-Messungen zeigen die Dominanz von Spin-Spin-Relaxation bei tiefen Temperaturen auf. Deshalb muss eine temperaturunabhängige Relaxationskomponente eingeführt werden, die den unteren Temperaturbereich der $\gamma(T)$ -Kurven zu erklären vermag. Die starke Temperaturabhängigkeit der effektiven Relaxationsrate bei höheren Temperaturen ist dagegen auf Spin-Gitter-Relaxation zurückzuführen. Die charakteristischen $\gamma(T)$ -Verläufe konnten für alle drei Proteine mit Orbach-Relaxation wiedergegeben werden. Trotzdem verbleiben bei mittleren Temperaturen zwischen etwa 30 K und 60 K Unstimmigkeiten zwischen Experiment und Theorie. Um diese Diskrepanzen zu beseitigen, wurde ein Beitrag direkter Spin-Gitter-Relaxation berücksichtigt, der im Normalfall einen in der Temperatur linearen Beitrag zur Relaxationsrate liefert. Da mit einer solchen Komponente keine Übereinstimmung erzielt werden konnte, wurde direkte Relaxation für den Sonderfall eines "Phonon Bottlenecks" eingeführt. Dieser Mechanismus ist bei nicht zu hohen Temperaturen für ähnliche Eisen-Schwefel-Proteine nachgewiesen worden (Gayda et al. 1979, Bertrand et al. 1981). Auch für die hier untersuchten drei HiPIPs konnte ein entsprechender Beitrag (vgl. (3.4)) eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentell bestimmten $\gamma(T)$ -Wertepaaren und der Theoriekurve herbeiführen. Die Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate oxidierter HiPIPs wird somit durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$\gamma = C_1 + \frac{C_2}{e^{\Delta/k_B T} - 1} + C_3 T^2 \quad (5.1)$$

Die mit der besten Anpassung korrespondierenden Parameter sind für alle drei HiPIPs in Tab. 5.11 zusammengestellt.

5.5 Fe-EXAFS

Abb. 5.24 zeigt k^3 -gewichtete, an der Eisen-Kante und einer Temperatur von etwa 40 K aufgenommene EXAFS-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* im nativen, im teilweise ungefalteten und im C77S-mutierten Zustand sowie dessen Fouriertransformierte (Dilg et al. 2000b). Die Rohdaten weisen eine hohe statistische Güte auf und konnten bis $k = 13.5 \text{ \AA}^{-1}$ bzw. $k = 14 \text{ \AA}^{-1}$ ausgewertet werden. Die Anpassung der Experimente erfolgte mit dem Softwarepaket EXKURV92 (Binsted et al. 1992). Im Weiteren werden in Kürze die Modelle beschrieben, welche die Tab. 5.12 zu entnehmenden Parameter lieferten. Im wesentlichen wurden hierzu die aus einem gewählten Modell resultierenden EXAFS-Parameter gemäß (3.57) ans Experiment angepasst.

Abb. 5.24a zeigt das Fe-EXAFS-Spektrum von nativem reduziertem HiPIP *C. vinosum*. An dessen Fouriertransformierten (Abb. 5.24b) erkennt man direkt die Bindungsabstände der Eisennachbarn bis etwa 3 \AA . Für die theoretische Auswertung wurden drei Schalen von Nachbarn berücksichtigt: die drei vom betrachteten Eisenatom aus sichtbaren anderen Eisenionen, der direkt ans Eisen ligandierende Cysteinschwefel und die drei unmittelbar benach-

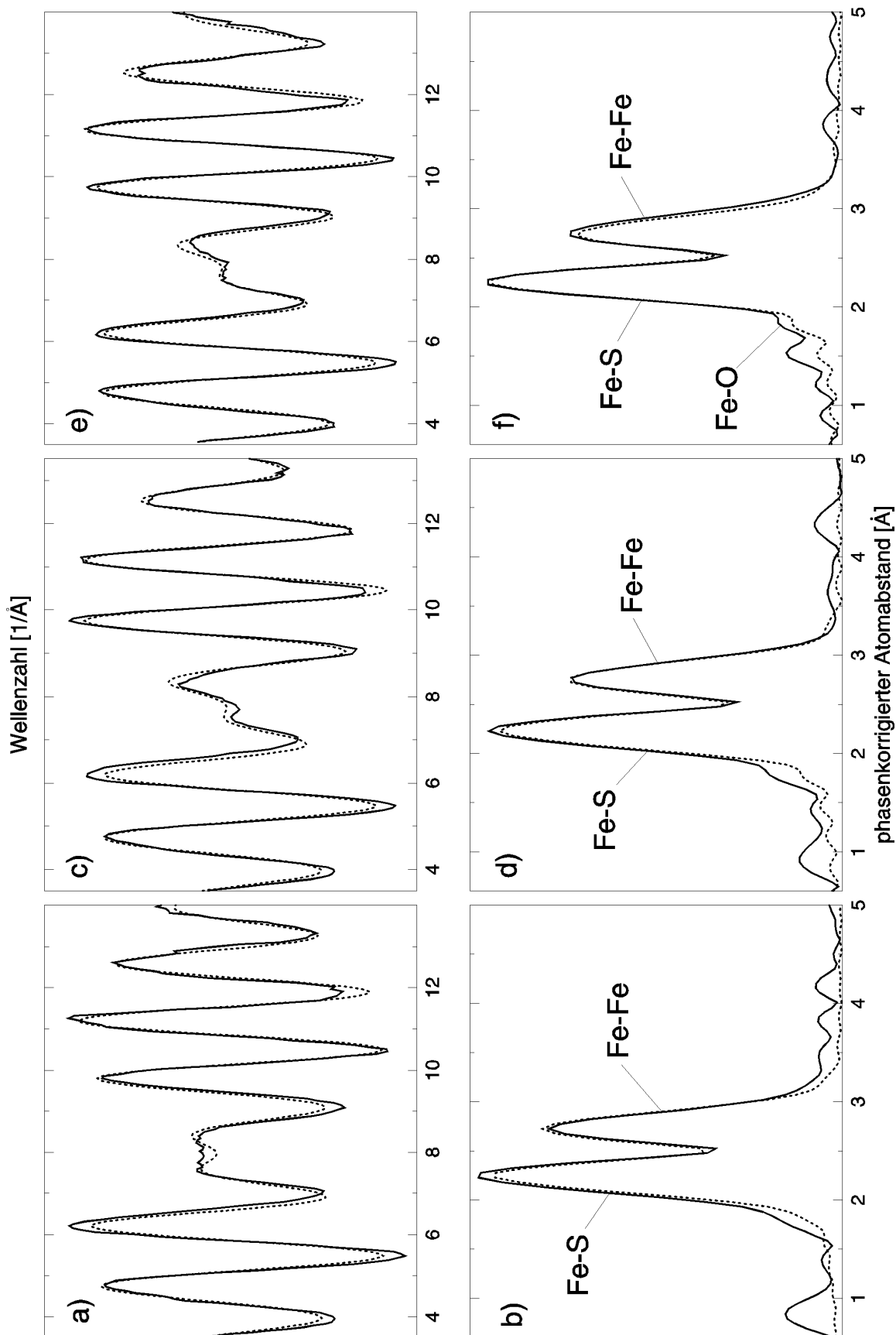


Abb. 5.24 durchgezogene Linien: k^3 -gewichtete Fe-EXAFS-Spektren bei $T = 40$ K (obere Reihe) und deren Fouriertransformierte (untere Reihe) von reduziertem HiPIP *C. vinosum* a), b) WT c), d) teilweise ungefaltet e), f) C77S-Mutante; gestrichelte Linien: Least-Squares-Fits mit Softwarepaket EXKURV92 (Binsted et al. 1992) entsprechend der Parameter von Tab. 5.12

barten anorganischen Schwefelatome (vgl. Abb. 2.1). Auf das vom betrachteten Eisenatom aus am weitesten entfernte anorganische Schwefelatome, das Röntgenstrukturdaten zufolge bei etwa 3.5 Å liegt (Tab. 2.1, Jensen et al. 1987), ist EXAFS offenbar nicht mehr sensitiv. So sieht man bei diesem Atomabstand weder in Abb. 5.24b eine merkliche Resonanz noch bei den anderen beiden fouriertransformierten HiPIP-Spektren (Abb. 5.24d, f). Folglich blieb dieser Fe-S-Abstand bei der Anpassung der Experimente ebenso unberücksichtigt wie bei EXAFS-Untersuchungen an verwandten Systemen (George et al. 1989, McDermott et al. 1988, Stephans et al. 1985). Entsprechendes gilt für die noch weiter entfernten Eisennachbarn mit Abständen von bereits über 4 Å, nämlich die Kohlenstoffe der Cysteine und diejenigen Cysteinschwefel, die an ein anderes als das betrachtete Eisenatom angelagert sind. Zwecks Parameterreduktion wurde hinsichtlich des A-Faktors nur zwischen Eisen und Schwefel unterschieden. Cystein- und anorganischer Schwefel wurden diesbezüglich gleich behandelt. Mit diesem Modell verbleiben nur sechs freie Parameter: drei Atomabstände, zwei A-Faktoren und die Kantenverschiebungsenergie E_F . Mit dieser für EXAFS sehr niedrigen Zahl freier Variablen wurde das in Abb. 5.24a, b als gestrichelte Linie gezeichnete Theoriespektrum erhalten, das die experimentellen Daten sehr gut erklärt und die Parameter von Tab. 5.12a liefert.

Abb. 5.24c, d zeigt experimentelle und theoretische EXAFS-Kurven im Impuls- und im Ortsraum für das teilweise entfaltete reduzierte HiPIP *C. vinosum*. Diese weisen im Vergleich zum nativen Protein kleine aber doch signifikante Änderungen auf. Die Experimente wurden mit demselben Modell wie im Fall des Wildtyps angepasst, und es wurden die in Tab. 5.12b dargestellten Parameter erhalten.

Schließlich sind in Abb. 5.24e, f EXAFS-Spektrum und Fouriertransformierte der reduzierten C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* dargestellt. Für die Anpassung musste der Sauerstoffligand des serinkoordinierten Eisens als eigene Komponente behandelt werden. Denn einerseits sind Fe-O- und Fe-S-Bindungsabstände typischerweise deutlich verschieden, andererseits sind die EXAFS-Streuphasen α_i (vgl. (3.57)) für Sauerstoff und Schwefel stark unterschiedlich. Hinsichtlich des A-Faktors wurden wiederum die Eisenionen als eine Spezies und Schwefel- und Sauerstoffatome als andere Spezies behandelt. Den erhaltenen Parametersatz zeigt Tab. 5.12c. Passt man alternativ den A-Faktor des Sauerstoffs separat an, so läuft dieser in ein artifizielles Minimum ein und nimmt ein unphysikalisches negatives Vorzeichen an. Ob dies optisch sich vom Spektrum des nativen Proteins nur wenig unterscheidet,

reduziertes HiPIP <i>C. v.</i>	a) WT			b) ungefaltet			c) C77S-Mutante		
	N	r_i [Å]	A [Å ²]	N	r_i [Å]	A [Å ²]	N	r_i [Å]	A [Å ²]
Fe-Fe	3	2.71	$5.16 \cdot 10^{-3}$	3	2.73	$5.62 \cdot 10^{-3}$	3	2.72	$6.08 \cdot 10^{-3}$
Fe-S _e	3	2.29	$1.86 \cdot 10^{-3}$	3	2.27	$5.21 \cdot 10^{-3}$	3	2.29	$1.92 \cdot 10^{-3}$
Fe-S _γ	1	2.20	-"	1	2.27	-"	0.75	2.22	-"
Fe-O _γ	0	-	-	0	-	-	0.25	1.98	-"
E_F [eV]	-5.04			-5.20			-4.61		
R (k ³)	19.6			15.6			15.3		

Tab. 5.12 Koordinationszahlen N, Bindungsabstände r_i und A-Faktoren $A = 2 \langle x^2_{XAS} \rangle$ für reduziertes HiPIP *C. vinosum* a) WT b) ungefaltet c) C77S-mutiert entsprechend der EXAFS-Anpassungen von Abb. 5.24; Fe: Eisen, S_e: anorganischer Clusterschwefel, S_γ: Cysteinschwefel, O_γ: Serinsauerstoff

denden EXAFS-Spektrums der Mutante könnte eine Anpassung mit dem Modell des Wildtyps versucht werden. Nimmt man aber statt des Sauerstoffes ein Schwefelatom an, so liefert die Anpassung einen höheren R-Faktor, kann in der Fouriertransformierten die Schulter an der linken Flanke der Fe-S-Resonanz nicht reproduziert werden und läuft der Fe-S-Bindungsabstand auf einen untypisch niedrigen Wert. Dies motiviert von einem anderen Blickwinkel aus die vorgenommene Unterscheidung zwischen Fe-O und Fe-S bei der Anpassung des EXAFS-Spektrums der Mutante.

6 Struktur und Dynamik von nativen, mutierten und teilweise entfalteten oxidierten und reduzierten HiPIPs

6.1 Atomstruktur von nativem und C77S-mutiertem reduziertem HiPIP *C. vinosum*

Die in Kap. 5.5 beschriebenen EXAFS-Experimente lieferten für natives und C77S-mutiertes reduziertes HiPIP *C. vinosum* die in Tab. 5.12a, c dargestellten Strukturdaten für das Metallzentrum samt angrenzenden Cysteinschwefeln. Diese wurden zwar bei 40 K aufgenommen, sind aber aufgrund der nur schwachen Temperaturabhängigkeit struktureller Parameter auch im Bereich physiologischer Temperaturen relevant. Die Eisen-Eisen- und Eisen-Schwefel-Abstände aus EXAFS unterscheiden sich von der Röntgenstruktur (Jensen 1987, Tab. 2.1 dieser Arbeit) nur unwesentlich. Allerdings sind die Unbestimmtheiten bei der EXAFS-Methode mit etwa ± 0.02 Å geringer als bei der Röntgenstrukturanalyse. Dass die Fe-Fe-Abstände um nahezu 1 Å größer sind als die S_e-S_e-Abstände, die sich aus den Daten von Tab. 5.12a zu 3.69 Å berechnen, unterstützt das Bild eines verzerrten Würfels, dessen Schwefelecken nach außen und dessen Metallecken in Richtung des Schwerpunktes verschoben sind. Die Cystein-Schwefelionen sind um etwa 0.1 Å näher bei den Eisenionen als die anorganischen Schwefelatome, was die Abweichung von tetraedrischer Eisensymmetrie quantifiziert. Die $\langle x^2_{\text{XAS}} \rangle$ -Werte für die Eisen-Schwefel-Paare sind fast dreimal kleiner als jene für die Eisenpaare. Die direkt benachbarten Eisen-Schwefel-Paare sind also erwartungsgemäß stärker korreliert als die Eisen-Eisen-Paare ohne gemeinsame chemische Bindung.

NMR-Strukturuntersuchungen an der reduzierten C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* liefern eine Familie von fünfzehn Strukturen, die sich vom nativen Protein nur unwesentlich unterscheiden (Bentrop et al. 1996). Der Fe-O-Abstand konnte anhand der NMR-Analyse nur grob eingegrenzt werden (2.3 ± 0.6 Å). Dieses Ergebnis sieht also - wenn auch mit einer großen Unsicherheit behaftet - den mittleren Fe-O-Abstand im Bereich des Fe-S-Abstandes,

Biologisches System	Referenz	Bindung	Abstand
Isopenicillin-N-Synthase <i>C. acremonium</i>	Scott et al. 1992	Fe-(N/O)	2.15±0.02 Å
		Fe-S	2.34±0.02 Å
Cytochrom AA3-300	Powers et al. 1994	Fe-(N/O)	2.10±0.02 Å
		Fe-(S/Cl)	2.36±0.02 Å
Fe-SOD <i>P. shermanii</i>	Scherk et al. 1996	Fe-O	1.86±0.02 Å
		Fe-O	1.96±0.02 Å
Phthalate DB01 Dioxygenase <i>P. cepacia</i>	Tsang et al. 1996	Fe-O	2.06, 2.11 Å
Bacterioferritin <i>S. olivaceus</i>	Winkler et al. 1994	Fe-O	1.95±0.02 Å
Rubredoxin <i>C. pasteurianum</i> WT	Xiao et al. 1998	Fe-S	2.33±0.02 Å
Rubredoxin <i>C. pasteurianum</i> C42S		Fe-S	2.36±0.02 Å
		Fe-O	1.93±0.02 Å

Tab. 6.1 EXAFS-Literaturwerte für Fe-S- und Fe-O-Abstände in verschiedenen Eisenproteinen; methodisch bedingt kann mit EXAFS Fe-(N/O) bzw. Fe-(S/Cl) aufgrund ähnlicher Streuphasen und Elektronenzahl nicht unterschieden werden.

oder sogar oberhalb des entsprechenden Fe-S-Abstandes im Wildtyp. Das EXAFS-Ergebnis von $1.98 \pm 0.02 \text{ \AA}$ (Tab. 5.12c) liegt zwar innerhalb des weiten Fehlerbereichs der NMR-Aussage. Der Mittelwert sieht jedoch das Sauerstoffatom näher beim Eisenatom als das entsprechende Schwefelatom. Vergleiche mit Literaturdaten für Eisen-Schwefel- und Eisen-Sauerstoff-Abstände in biologischen Systemen stützen das EXAFS-Ergebnis (Tab. 6.1 und Tab. 2.1). Fe-S-Abstände liegen im Intervall von 2.17 \AA bis 2.36 \AA , Fe-O-Abstände zwischen 1.86 \AA und 2.15 \AA . Damit sollte Fe-O im Vergleich zu Fe-S einen um etwa $0.2 - 0.3 \text{ \AA}$ verkürzten Bindungsabstand haben. Die EXAFS-Werte von 1.98 \AA für die Eisen-Serinsauerstoff-Bindungslänge und von 2.22 \AA für Eisen-Cysteinschwefel passen ideal zu den Literaturdaten. Auch die unter einer C42S-Mutation im reduzierten FeCys₄-Zentrum des Rubredoxins *C. pasteurianum* beobachteten Strukturänderungen sind mit den für die HiPIP-Mutante erhaltenen voll kompatibel (Xiao et al. 1998, Tab. 6.1).

Die anderen Strukturparameter der Mutante entsprechen recht genau jenen des nativen Proteins. Der Cluster scheint als Ganzes leicht in Richtung des Serins verschoben zu sein, was auf die starke ionische Eisen-Sauerstoff-Bindung zurückgeführt werden könnte. Zu dieser Deutung passt auch die sehr kurze Bindungslänge von Fe-Ser. Die $\langle x^2_{\text{XAS}} \rangle$ -Werte der Mutante gleichen denen des Wildtyps. Wiederum ist die Eisen-Eisen-Korrelation deutlich geringer als die der Eisen-Schwefel- und der Eisen-Sauerstoff-Paare. Die Absolutwerte von $\langle x^2_{\text{XAS}} \rangle$ sind gegenüber dem nativen Protein leicht erhöht. Dies ist Ausdruck eines Zuwachses an statischer Unordnung und nicht etwa einer ausgeprägteren Tieftemperaturdynamik. Letzteres ist aufgrund der sehr ähnlichen Steigungen der aus Mößbauer-Messungen erhaltenen $\langle x^2 \rangle$ -Kurven beider Proteine bei tiefen Temperaturen ausgeschlossen (vgl. Tab. 5.10a).

6.2 Elektronische und magnetische Konfiguration nativer und C77S-mutierter HiPIPs

6.2.1 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cys₄-Cluster in nativen oxidierten HiPIPs

6.2.1.1 Interpretation der Tieftemperatur-Mößbauer-Parameter

Tab. 5.4e und Tab. 5.5 zeigen die Mößbauer-Parameter der oxidierten HiPIPs I *E. halophila* und *C. vinosum* WT bei $T = 5 \text{ K}$. Hieraus leiten sich Informationen über Elektronenstruktur und magnetische Kopplung im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentrum ab. Die Anpassung des Mößbauer-Spektrums erfolgte mit zwei Komponenten gleicher Flächenbeiträge. Der Cluster besteht demzufolge aus zwei Eisenpaaren, innerhalb derer die Eisenionen mit identischen Mößbauer-Parametern beschreibbar und daher ununterscheidbar sind.

Ein sensitiver Indikator für den Oxidationszustand eines Mößbauer-Ions ist die Isomerieverschiebung δ . Eisenpaar (12) besitzt in den beiden hier untersuchten oxidierten nativen HiPIPs Werte von 0.29 mm s^{-1} bzw. 0.32 mm s^{-1} . Diese liegen innerhalb des für Eisen-Schwefel-Proteine mit trivalentem Eisen typischen Bereichs [0.25 mm s^{-1} ; 0.32 mm s^{-1}] (vgl. Abb. 3.5b, Bertini et al. 1995). Die Eisenionen des Paares (12) liegen also in einem Fe^{3+} -Zustand vor, weshalb man dieses "ferric-ferric-Paar" nennt. Anders liegen die Dinge beim Eisenpaar (34) mit Isomerieverschiebungen von 0.42 mm s^{-1} und 0.40 mm s^{-1} . Diese Werte

liegen deutlich oberhalb des für Fe^{3+} charakteristischen Intervalls. Andererseits sind sie zu klein, um als Fe^{2+} identifizierbar zu sein. Denn letzteres tritt in Eisen-Schwefel-Proteinen in einem Bereich [0.48 mm s^{-1} ; 0.73 mm s^{-1}] auf (vgl. Abb. 3.5b, Bertini et al. 1995). Der Oxidationszustand des Eisenpaares (34) ist somit als $\text{Fe}^{2.5+}$ zu klassifizieren. Das Paar enthält ein zweifach und ein dreifach geladenes Eisenion, wobei ein 3d-Elektron über die gemeinsame Wellenfunktion delokalisiert ist. Über dieses Zusatzelektron erfolgt Doppelaustausch zwischen den Einzelspins beider Eisenionen, die als "ferric-ferrous-Paar" bezeichnet werden.

Der Betrag des Asymmetrieparameters η ist sowohl in den beiden hier untersuchten als auch in den zwei in der Literatur beschriebenen (Bertini et al. 1993a, Middleton et al. 1980) HiPIPs im ferric-ferric-Paar deutlich kleiner sind als im ferric-ferrous-Paar. Für Fe^{3+} ergibt sich ein charakteristischer Bereich von 0.2 bis 0.5, $\text{Fe}^{2.5+}$ liefert typische Werte zwischen 0.7 und 1.1. Dies ist Ausdruck eines unterschiedlichen Symmetrieverhaltens beider Paare.

Die Quadrupolaufspaltungen der Eisenpaare sind sowohl im HiPIP I *E. halophila* als auch im HiPIP *C. vinosum* annähernd gleich groß und haben durchweg negatives Vorzeichen. Die Stärke des kristallelektrischen Feldes ist an den Orten der vier Eisenkerne des Clusters nicht sehr verschieden, was im Einklang mit der sehr ähnlichen Umgebung der vier Metallionen steht. Diese Aussage ist in Einklang mit den bei höheren Temperaturen gemessenen Mößbauer-Spektren, die keinen Anhaltspunkt dafür geben, dass Subspezies mit stark verschiedenen Quadrupolaufspaltungen vorliegen. In der Literatur und in der Anpassung zu Tab. 5.4a, in denen elektronische Relaxation unberücksichtigt blieb, unterscheiden sich dagegen die ΔE_Q -Werte von ferric-ferric- und ferric-ferrous-Paar um $0.15 - 0.2 \text{ mm s}^{-1}$ (Middleton et al. 1980).

Wesentliche Informationen liefern die für die beiden Eisenpaare stark unterschiedlichen **A**-Tensoren, deren Beträge mittels ^{57}Fe -ENDOR bestimmt wurden. Die Mößbauer-Anpassung ist mit diesen Parametern kompatibel und liefert zusätzlich die z-Komponente des **A**-Tensors des ferric-ferrous-Paares, für die mit ENDOR bei beiden nativen oxidierten HiPIPs nur eine Obergrenze erhalten wird. Auf die Vorzeichen der Tensorkomponenten ist ausschließlich die Mößbauer-Spektroskopie sensitiv. Alle **A**-Hauptachsenwerte des ferric-ferric-Paares sind positiv, wohingegen jene des ferric-ferrous-Paares ausnahmslos negativ sind. Dies bedeutet, dass die mit den gepaarten Spins S_{12} und S_{34} verknüpften magnetischen Momente zueinander antiparallel orientiert sind. Das größere magnetische Moment besitzt das ferric-ferrous-Paar mit durchschnittlichen **A**-Werten von -32.2 MHz bzw. -30.9 MHz . Dem stehen gemittelte **A**-Komponenten des ferric-ferric-Paares von $+21.4 \text{ MHz}$ und $+20.8 \text{ MHz}$ gegenüber. Wie in Falle monomeren Eisens (Moura et al. 1980) hat auch in HiPIPs der **A**-Tensor des in Richtung eines äußeren Magnetfeldes orientierten magnetischen Moments einer Spinspezies negatives Vorzeichen. Die antiparallele Kopplung der beiden gepaarten Eisenspins ist mit dem EPR-Ergebnis eines Netto-Cluster-Spins $S = 1/2$ verträglich, wie folgende Überlegung zeigt: Das ferric-ferric-Paar enthält die intrinsischen Spins $S_1 = S_2 = 5/2$, die im gekoppelten System freilich keine guten Quantenzahlen mehr sind. S_{12} kann folglich jeden ganzzahligen Wert zwischen null und fünf annehmen. Im ferric-ferrous-Paar mit formal einem Fe^{3+} ($S_3 = 5/2$) und einem Fe^{2+} ($S_4 = 2$) ist jeder halbzahlige Spin S_{34} zwischen $1/2$ und $9/2$ denkbar. Koppeln S_{12} und S_{34} nun antiparallel, wie von den entgegengesetzten Vorzeichen der **A**-Tensoren angezeigt, so stellt ein resultierender Gesamtspin $S = 1/2$ ein sinnvolles Ergebnis dar. Was die

Anisotropie der **A**-Tensoren anbetrifft, so liegt im Fe^{3+} -Paar die größte Abweichung einer Einzelkomponente vom arithmetischen Mittelwert gemittelt über beide untersuchte HiPIPs bei 9%, während die Diskrepanz im $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paar bei 14% liegt. Die geringe Anisotropie im Falle des trivalenten Eisens ist im Hinblick auf dessen kugelsymmetrische $3d^5$ -Schale plausibel und entspricht der Situation in oxidierten Rubredoxinen (LeGall et al. 1988, Schulz und Debrunner 1976, Dunham et al. 1971a). Für reduziertes Rubredoxin findet man hingegen Anisotropien in der Größenordnung von 50% (LeGall et al. 1988, Dunham et al. 1971a). Dies zeigt erneut, dass das $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paar hinsichtlich seiner physikalischen Eigenschaften zwischen denen von bivalentem und trivalentem Eisen angesiedelt ist. Man beachte, dass aus Analogieüberlegungen zu $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Systemen und aus dem einfachen Vektormodell für $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Systeme ein Fe^{3+} -Paar mit isotropen positiven und ein $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paar mit negativen **A**-Komponenten und Beträgen $|A_x| > |A_y| > |A_z|$ theoretisch vorausgesagt wurde (Trautwein et al. 1991). Das Experiment bestätigt die Richtigkeit dieser Hypothese (Tab. 5.4e, 5.5).

Die Vorstellung, die man nach dieser Analyse vom $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}\text{Cys}_4$ -Zentrum bei $T = 5$ K gewinnt, wird von den Mößbauer-Daten bei höheren Temperaturen bestätigt (vgl. Tab. 5.7). Der Zusammenbruch der magnetischen Hyperfeinstruktur ist im Lichte der erfolgreichen Anpassung der Spektren bei 80 K und 160 K mit den Parametern der Messung bei 5 K nicht etwa als ein Ausschmieren der Elektronenwolke über das gesamte Eisenzentrum zu deuten. Vielmehr besteht die paarweise Kopplung je zweier Eisenionen fort, sie schlägt sich aber im Grenzfall schneller Relaxation im Mößbauer-Spektrum nicht mehr sichtbar nieder.

6.2.1.2 Analyse des Spinzustandes $|S_{12} S_{34} S\rangle$ im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}\text{Cys}_4$ -Zentrum

Das Vektormodell, das aus experimentellen **A**-Komponenten einen Rückschluss auf die Spinquantenzahlen der zugehörigen paramagnetischen Zentren erlaubt, wurde in Kap. 2.3.2 beschrieben. Im Falle oxidiertener HiPIPs können damit Informationen über die beiden gepaarten Spins und den Netto-Cluster-Spin gewonnen und so Aussagen über die Grundzustandswellenfunktion $|S_{12} S_{34} S\rangle$ getroffen werden.

Für die Anwendbarkeit des Vektormodells wurden in Kap. 2.3.2 zwei Bedingungen formuliert, deren Gültigkeit für den Fall von oxidierten HiPIPs zu überprüfen sind. Zunächst setzt das Vektormodell isotrope **A**-Tensoren voraus. In den beiden hier untersuchten HiPIPs sind die Anisotropien klein genug, um das Vektormodell anwenden zu können. Problematischer gestaltet sich die zweite Voraussetzung. Gemäß (2.9) benötigt man für die Berechnung der Spinquantenzahlen die magnetischen Hyperfeinparameter a_i von ungekoppeltem Eisen in den auftretenden Oxidationszuständen und vergleichbarer chemischer Umgebung. Proteine mit FeCys_4 -Zentren wie das Desulforedoxin *D. gigas* (Moura et al. 1980) kommen hierfür in Frage, enthalten aber im Unterschied zu HiPIPs keinen anorganischen Schwefel. Solcher kommt zwar in den $[\text{Fe}_2\text{S}_2]\text{Cys}_4$ -Clustern pflanzlicher Ferredoxine vor (Dunham et al. 1971a), wo auch die Symmetrie jener innerhalb eines Eisenpaares des HiPIPs entspricht. Allerdings liegt das Eisen hier nicht ungekoppelt vor. Einen systemunabhängigen **A**-Wert für bi- und trivalentes Eisen in biologischem Milieu, der sich aus einer Mittelung mehrerer Literaturwerte ergibt, schlagen andere Autoren vor (Papaefthymiou et al. 1987). In einer weiteren Arbeit werden für rein dreifach geladenes und für gemischt-valentes Eisen semiempirische vom Kovalenzgrad der Eisen-Bindungen unabhängige **A**-Parameter berechnet (Mouesca et al. 1995). Für diese vier Referenzsysteme

Desulforedoxin <i>D. gigas</i> ¹ : $a(\text{Fe}^{3+}) = -21.2$ MHz, $a(\text{Fe}^{2+}) = -21.5$ MHz				
$ S_{12} S_{34} S\rangle$	A_{12}^{Vektor} [MHz]	A_{34}^{Vektor} [MHz]	$ A_{12}^{\text{exp}} - A_{12}^{\text{Vektor}} $	$ A_{34}^{\text{exp}} - A_{34}^{\text{Vektor}} $
			HiPIP <i>I. h.</i>	HiPIP <i>C. v.</i> WT
$ 3 \frac{7}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+21.2	-32.0	0.4	1.5
$ 4 \frac{9}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+28.3	-39.1	13.8	15.7
$ 2 \frac{5}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+14.1	-24.9	14.6	12.7
Mittlerer A-Wert für ungekoppeltes Eisen ² : $a(\text{Fe}^{3+}) = -20.0$ MHz, $a(\text{Fe}^{2+}) = -22.2$ MHz				
$ S_{12} S_{34} S\rangle$	A_{12}^{Vektor} [MHz]	A_{34}^{Vektor} [MHz]	$ A_{12}^{\text{exp}} - A_{12}^{\text{Vektor}} $	$ A_{34}^{\text{exp}} - A_{34}^{\text{Vektor}} $
			HiPIP <i>I. h.</i>	HiPIP <i>C. v.</i> WT
$ 3 \frac{7}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+20.0	-31.7	1.9	1.6
$ 4 \frac{9}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+26.7	-38.7	11.8	13.7
$ 2 \frac{5}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+13.3	-24.6	15.7	13.8
Spinat Ferredoxin ³ : $a(\text{Fe}^{3+}) = -20.3$ MHz, $a(\text{Fe}^{2+}) = -15.8$ MHz				
$ S_{12} S_{34} S\rangle$	A_{12}^{Vektor} [MHz]	A_{34}^{Vektor} [MHz]	$ A_{12}^{\text{exp}} - A_{12}^{\text{Vektor}} $	$ A_{34}^{\text{exp}} - A_{34}^{\text{Vektor}} $
			HiPIP <i>I. h.</i>	HiPIP <i>C. v.</i> WT
$ 3 \frac{7}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+20.3	-27.1	6.2	4.3
$ 4 \frac{9}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+27.1	-33.1	6.6	8.5
$ 2 \frac{5}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+13.5	-21.1	19.0	17.1
Semiempirische systemunabhängige Parameter ⁴ : $a(\text{Fe}^{3+}) = -19.5$ MHz, $a(\text{Fe}^{2.5+}) = -21.1$ MHz				
$ S_{12} S_{34} S\rangle$	A_{12}^{Vektor} [MHz]	A_{34}^{Vektor} [MHz]	$ A_{12}^{\text{exp}} - A_{12}^{\text{Vektor}} $	$ A_{34}^{\text{exp}} - A_{34}^{\text{Vektor}} $
			HiPIP <i>I. h.</i>	HiPIP <i>C. v.</i> WT
$ 3 \frac{7}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+19.5	-31.7	2.4	2.1
$ 4 \frac{9}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+25.9	-38.6	10.9	12.8
$ 2 \frac{5}{2} \frac{1}{2}\rangle$	+13.1	-24.7	15.8	13.9

Tab. 6.2 Aus dem Vektormodell ermittelte Spingrundzustände für oxidierte native HiPIPs; A_{12}^{Vektor} , A_{34}^{Vektor} : A-Werte des ferric-ferric-Paares (12) und des ferric-ferrous-Paares (34) berechnet mit dem Vektor-Modell für den jeweiligen Spinzustand $|S_{12} S_{34} S\rangle$; A_{12}^{exp} , A_{34}^{exp} : Mittelwerte der A-Tensoren aus simultaner Analyse von ⁵⁷Fe-ENDOR- und Mössbauer-Experimenten (HiPIP *I. E. halophila*: $A_{12}^{\text{exp}} = +21.4$ MHz, $A_{34}^{\text{exp}} = -32.2$ MHz, HiPIP *C. vinosum* WT: $A_{12}^{\text{exp}} = +20.8$ MHz, $A_{34}^{\text{exp}} = -30.9$ MHz); a: A-Werte (Mittelwert der Tensorkomponenten) aus den Referenzsystemen ¹Moura et al. 1980, ²Papaefthymiou et al. 1987, ³Dunham et al. 1971a, ⁴Mouesca et al. 1995

wurden aus dem Vektormodell in dieser Arbeit jeweils die drei Zustände $|S_{12} S_{34} S\rangle$ berechnet, für welche die experimentell bestimmten A-Werte der oxidierten HiPIPs *I. E. halophila* und *C. vinosum* WT bestmöglich mit der Theorie in Einklang stehen. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.2 zusammengestellt.

Das Vektormodell zeigt eine eindeutige Tendenz für einen $|3 \frac{7}{2} \frac{1}{2}\rangle$ -Grundzustand in beiden oxidierten HiPIPs. In allen in Tab. 6.2 dargestellten Fällen ist diese Wellenfunktion am besten mit den experimentellen Ergebnissen in Einklang. Abgesehen vom Referenzsystem Spinat Ferredoxin ist die Übereinstimmung sogar dramatisch besser als mit der am zweitbesten passenden Eigenfunktion $|4 \frac{9}{2} \frac{1}{2}\rangle$. Der drittgünstigste Zustand $|2 \frac{5}{2} \frac{1}{2}\rangle$ ist aufgrund von Suszeptibilitätsmessungen an Modellkomplexen auszuschließen (siehe Kap. 2.3.1.1). Unter der Prämisse einer reinen Spinwellenfunktion ist $|3 \frac{7}{2} \frac{1}{2}\rangle$ die einzige mit dem Experiment verträgliche Lösung. In der Literatur wurde das Vektormodell auf das HiPIP *I. E. halophila* angewendet, wobei Mössbauer-Daten (Bertini et al. 1993a) bzw. ⁵⁷Fe-ENDOR-Daten (Kappl et al. 1999, Mouesca et al. 1993) zugrundegelegt wurden. Wenngleich die

zugrundeliegenden Experimente mit $|3\ 7/2\ 1/2\rangle$ am besten im Einklang stehen, kann ein Grundzustand $|4\ 9/2\ 1/2\rangle$ nicht ausgeschlossen werden.

Auffällig ist, dass für alle Referenzsysteme die theoretischen **A**-Werte für die Wellenfunktion $|3\ 7/2\ 1/2\rangle$ für beide Eisenpaare und beide HiPIPs verglichen mit den experimentellen Parametern betragsmäßig zu klein und für den Eigenzustand $|4\ 9/2\ 1/2\rangle$ zu groß sind. Eine bessere Übereinstimmung ließe sich daher erreichen, wenn man eine Mischung von HiPIP-Molekülen in den reinen $|3\ 7/2\ 1/2\rangle$ - und $|4\ 9/2\ 1/2\rangle$ -Zuständen annimmt. Für die beiden untersuchten HiPIPs werden für folgende prozentuale Besetzungen die Diskrepanzen zwischen experimentellen und theoretischen **A**-Werten minimal:

HiPIP	$ 3\ 7/2\ 1/2\rangle$	$ 4\ 9/2\ 1/2\rangle$	A_{12}^{theo}	A_{12}^{ex}	A_{34}^{theo}	A_{34}^{ex}
I E. h.	77 %	23 %	+21.8 MHz	+21.4 MHz	-32.1 MHz	-32.2 MHz
C. v. WT	95 %	5 %	+20.7 MHz	+20.8 MHz	-30.9 MHz	-30.9 MHz

Eine solche Interpretation passt zu Suszeptibilitäts-Untersuchungen an HiPIP-Modellsubstanzen, die zwei energetisch nahe beieinander liegende Zustände $|3\ 7/2\ 1/2\rangle$ und $|4\ 9/2\ 1/2\rangle$ zeigen (Jordanov et al. 1990). Es ist zu unterstreichen, dass hier nicht von *gemischten* Wellenfunktionen die Rede ist, sondern von einem Ensemble, in dem ein Gemisch zweier Komponenten in verschiedenen *reinen* Spinzuständen vorliegt.

Das Vektormodell ermöglicht die Bestimmung der Spinquantenzahlen gekoppelter Magnetsysteme aus mittels EPR bestimmter **g**-Tensoren. Tab. 6.3 vergleicht gemittelte **g**-Werte für die beiden hier untersuchten nativen HiPIPs mit isotropen **g**-Faktoren, wie sie das Vektormodell für verschiedene Spinzustände voraussagt (Belinskii et al. 1995, Bertini und Luchinat 1996). Die experimentellen Parameter wurden aus Tab. 5.1 mit entsprechend den spektralen Intensitäten der EPR-Isomere gewichteten arithmetischen Mittelwerten der **g**-Tensorkomponenten berechnet.

Diese Resultate führen kaum weiter. Zwar ist die Übereinstimmung der experimentellen **g**-Werte im Vektormodell mit der Eigenfunktion $|4\ 9/2\ 1/2\rangle$ als Grundzustand etwas besser als mit $|3\ 7/2\ 1/2\rangle$, von einem signifikanten Unterschied kann jedoch nicht gesprochen werden. Die relativen Abweichungen beider Theoriewerte vom Experiment sind kleiner als ein Prozent, die **g**-Werte der beiden reinen Spinzustände stimmen gut mit dem Vektormodell überein, substanzielle Neuinformation kann die **g**-Analyse nicht liefern.

Die beste Übereinstimmung der **g**-Werte erzielt die gemischte Wellenfunktion:

HiPIP I E. h.	HiPIP C.v. WT	$ 3\ 7/2\ 1/2\rangle$	$ 4\ 9/2\ 1/2\rangle$	$0.95 4\ 9/2\ 1/2\rangle - 0.30 3\ 7/2\ 1/2\rangle$
$\bar{g} = 2.066$	$\bar{g} = 2.064$	$\bar{g} = 2.042$	$\bar{g} = 2.054$	$\bar{g} = 2.066$

Tab. 6.3 Mittlere **g**-Werte aus EPR-Experimenten an zwei HiPIPs (Tab. 5.1) und theoretisch für verschiedene Spingrundzustände erwartete **g**-Werte (Belinskii et al. 1995, Bertini und Luchinat 1996).

$$|\psi_g\rangle = 0.95 |4\ 9/2\ 1/2\rangle - 0.31 |4\ 7/2\ 1/2\rangle$$

die sich als Grundzustand im Rahmen des in Kap. 2.3.1.2 diskutierten Niedrigsymmetriemodells für den Eisen-Schwefel-Cluster ergibt (Belinskii et al. 1995, Belinskiy et al. 1996). Diese Wellenfunktion sagt als gemittelte Tensorkomponenten $A_{12} = +20.8$ MHz und $A_{34} = -32.3$ MHz voraus, was mit den experimentellen Ergebnissen ebenfalls sehr gut in Einklang steht.

Wesentliche Eigenschaften des Spinsystems ergeben sich aus allen aufgezeigten Modellen übereinstimmend. So ist der Netto-Cluster-Spin $S = 1/2$, und beide gepaarte Spins sind zueinander *vollständig* antiparallel ausgerichtet. Das größere magnetische Moment besitzt das gemischt-valente Spinpaar. Die Eisenspins innerhalb eines Paares koppeln entweder nahezu oder vollständig parallel. Für das ferric-ferrous-Paar beruht dies maßgeblich auf Doppelaustauschwechselwirkung, deren Relevanz sich aus beiden Konzepten ergibt. Dass sich auch die Einzelspins innerhalb des ferric-ferric-Paares zueinander parallel orientieren, ist auf das Phänomen der "Spin-Frustration" zurückzuführen. Fe_1^{3+} etwa spürt Superaustauschkraft der drei anderen Eisenspins, die allesamt die Tendenz haben, sich ihnen gegenüber antiparallel auszurichten. Diese drei Vorgaben sind aber nicht alle gleichzeitig erfüllbar. Deshalb orientiert sich Fe_1^{3+} antiparallel zu $\text{Fe}_{3,4}^{2,5+}$, was immerhin zwei von drei Superaustauschkraften Genüge tut und zudem die durch Doppelaustausch favorisierte Parallelorientierung beider gemischt-valenter Eisenionen zulässt. Der zwischen Fe_1^{3+} und Fe_2^{3+} wirkenden Austauschkraft zum Trotz orientieren sich S_1 und S_2 parallel.

Für den Fall einer reinen Wellenfunktion ist die elektronische Struktur des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Clusters, wie sie sich aus der Kombination der angewendeten Spektroskopien ergibt, schematisch in Abb. 6.1 skizziert.

6.2.2 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ Cys₄-Cluster in nativen reduzierten HiPIPs

Während des photosynthetischen Ladungstransfers wird dem Cluster ein Elektron hinzugefügt und das Metallzentrum dadurch reduziert. A priori ist unklar, ob sich dieses Elektron dem ferric-ferric-Paar anlagert und dieses in ein zweites gemischt-valentes System umwandelt oder ob es das vormalige ferric-ferrous-Paar in ein reines Fe^{2+} -System transformiert. Eine Antwort darauf liefern die Mößbauer-Spektren der reduzierten HiPIPs I *E. halophila* und *C. vinosum* WT, die mit einem einzigen Quadrupoldublett angepasst werden konnten (Kap. 5.4.1.5). Die spektrale Ununterscheidbarkeit der vier Mößbauer-Ionen zeigt, dass alle Eisenionen eine praktisch identische Elektronenstruktur besitzen. Kleine Unterschiede zwischen den vier Eisenatomen spiegelt die Inhomogenitätsverbreiterung des voigtförmigen Spektrums wider. Die einheitliche Isomerieverschiebung der vier Eisenionen in reduzierten HiPIPs von 0.45 mm s^{-1} bzw. 0.44 mm s^{-1} , die nur unwesentlich größer ist als jene des ferric-ferrous-Paares in den oxidierten Pendants, ist Ausdruck eines gemeinsamen Oxidationszustandes. Da δ zwischen den typischen Werten von bi- und trivalentem Eisen in ähnlicher Umgebung liegt (vgl. Kap. 6.2.1.1), befinden sich alle Eisenionen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrums im Oxidationszustand 2.5+. Dies lässt darauf schließen, dass das Zusatzelektron aus dem ferric-ferric-Paar ein gemischt-valentes Eisenpaar macht. Das reduzierte Metallzentrum

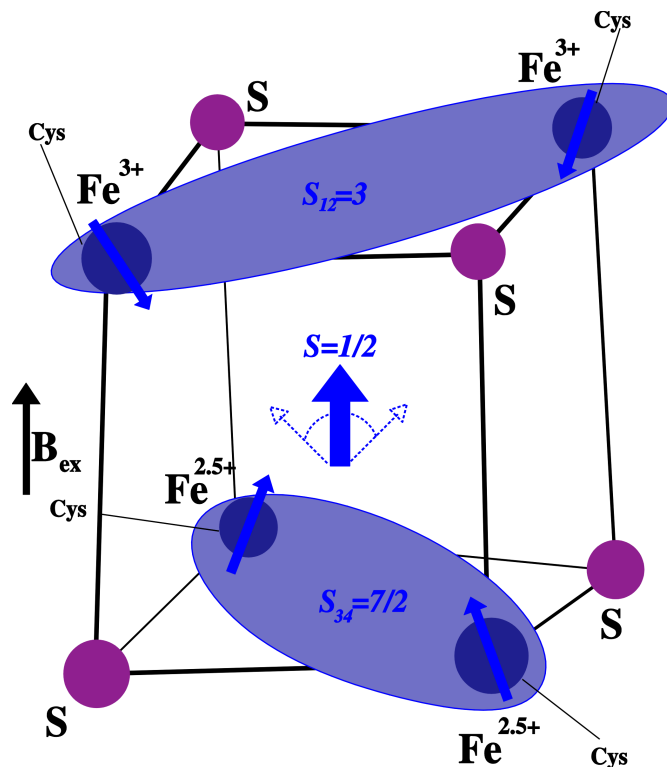


Abb. 6.1 Elektronenstruktur im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster von oxidierten nativen HiPIPs: je zwei Eisenionen sind im wesentlichen parallel zu einem Fe^{3+} -Paar mit $S_{12} = 3$ bzw. zu einem $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paar mit $S_{34} = 7/2$ gekoppelt, wobei die gepaarten Spins sich zueinander antiparallel ausrichten und den Netto-Cluster-Spin $S = 1/2$ bilden; infolge elektronischer Relaxation fluktuiert der Netto-Cluster-Spin selbst bei tiefsten Temperaturen.

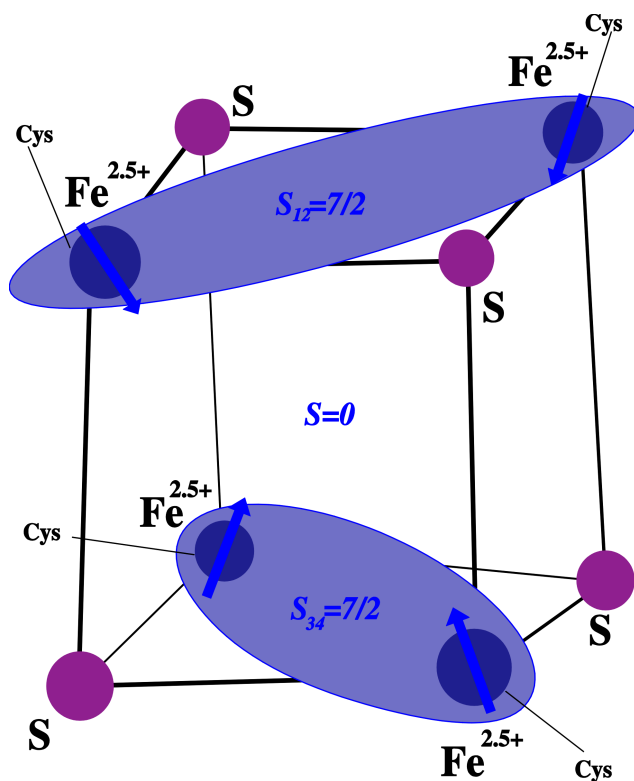


Abb. 6.2 Elektronenstruktur im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster von reduzierten nativen HiPIPs: je zwei Eisenionen sind im wesentlichen parallel zu zwei $\text{Fe}^{2.5+}$ -Paaren mit mutmaßlichen Spins $S_{12} = S_{34} = 7/2$ gekoppelt, wobei die gepaarten Spins sich zueinander antiparallel ausrichten und den Netto-Cluster-Spin $S = 0$ bilden.

ist hochsymmetrisch und zeigt wie bei NMR-Messungen vier Eisenionen mit sehr ähnlichen Eigenschaften (Banci et al. 1993a).

Das magnetische Verhalten des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrums wird durch einen verschwindenden Netto-Cluster Spin $S = 0$ charakterisiert. Dies belegen das Fehlen sowohl einer magnetischen Aufspaltung im Mößbauer-Spektrum als auch eines EPR-Signals. Folglich müssen sich die gepaarten Spins S_{12} und S_{34} exakt kompensieren. Ein magnetischer Grundzustand $|S_{12} S_{34} S\rangle$ von $|7/2 7/2 0\rangle$ scheint angesichts der Verhältnisse im oxidierten Cluster plausibel zu sein.

Durch den Einbau des Zusatzelektrons ins bisherige Fe^{3+} -Paar wird die parallele Kopplung innerhalb S_{12} durch das Hinzutreten von Doppelaustauschwechselwirkung unterstützt. Im Spin-Hamiltonian (Kap. 2.4) äußert sich dies in einem zusätzlichen Term $-B_{12}\mathbf{T}_{12}$, welcher die Gesamtenergie des Spinsystems herabsetzt und die magnetische Bindung stabilisiert. Die Alternative zur Anlagerung des Elektrons zum ferric-ferric-Paar wäre die Reduktion des bisherigen ferric-ferrous-Paars zu einem reinen Fe^{2+} -Paar. Dadurch entfielen die beiden energiereduzierenden Terme $-B_{12}\mathbf{T}_{12}$ und $-B_{34}\mathbf{T}_{34}$. Das Spinsystem würde dadurch erheblich an Stabilität einbüßen. Ein Zustand mit je einem Fe^{3+} - und einem Fe^{2+} -Paar im reduzierten Cluster repräsentiert einen hohen Anregungszustand¹ des Spinsystems und ist bei tiefen Temperaturen deshalb nicht beobachtbar. NMR-Spektren von reduzierten HiPIPs zeigen bei Raumtemperatur allerdings kleine paramagnetische Beimischungen höherenergetischer $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Spinzustände (Banci et al. 1993a). Analog zu dieser Betrachtung kann auch der oxidierte Cluster als magnetisch instabiler angesehen werden als der reduzierte. Denn im Vergleich zum $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrum fehlt dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -System die energieabsenkende Wirkung des Doppelaustausches im Paar 12, $-B_{12}\mathbf{T}_{12}$.

Abb. 6.2 fasst die Elektronenkonfiguration in reduzierten nativen HiPIPs bildhaft zusammen.

6.2.3 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ Cys₃Ser-Cluster in C77S-mutiertem reduziertem HiPIP *C. vinosum*

Die Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* C77S enthalten zwei Komponenten im Flächenverhältnis 3:1 und lassen jede magnetische Hyperfeinstruktur vermissen (Kap. 5.4.1.5). In Einklang mit dem fehlenden EPR-Signal ergibt sich damit, dass der Netto-Cluster-Spin in der reduzierten Mutante wie im Wildtyp $S = 0$ ist. Während die Zustände im Spinsystem trotz der Mutation im reduzierten HiPIP *C. vinosum* C77S also unverändert bleiben, sind in der Elektronenstruktur erhebliche Unterschiede zu erkennen. Die Mößbauer-Parameter der beiden Spezies mit spektralen Beiträgen von 75% und 25% zeigen ausgeprägte Unterschiede zwischen den drei unverändert cysteinligandierten Eisenionen und dem infolge der Mutation serinligandierten Eisenion an (vgl. Tab. 5.8). Die Ununterscheidbarkeit der vier Metallionen im Mößbauer-Spektrum des reduzierten Proteins wird durch den C77S-Austausch aufgehoben, die Symmetrie gebrochen. Die drei vierfach schwefelkoordinierten Cluster-Eisen mit ihrer geringfügig kleineren Isomerieverschiebung und ihrer leicht erhöhten Quadrupolaufspaltung weisen keine wesentlichen Änderungen im

¹ Aus (2.6) ergibt sich eine Anregungsenergie von $4(B_{12} + B_{34})$, wobei beide Kopplungsparameter bei einigen hundert cm^{-1} liegen dürften.

Vergleich zum Wildtyp auf. Anders verhält es sich mit dem an Aminosäure 77 angrenzenden Eisen, dessen Isomerieverschiebung sich der Mutation zufolge bei $T = 5 \text{ K}$ von 0.44 mm s^{-1} auf 0.63 mm s^{-1} dramatisch erhöht. Die Quadrupolaufspaltung hat sich hingegen etwas verkleinert. Die spektakuläre Veränderung der Isomerieverschiebung wird im Rahmen der sich anschließenden Diskussion der oxidierten Mutante interpretiert.

6.2.4 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}\text{Cys}_3\text{Ser}$ -Cluster in C77S-mutiertem oxidiertem HiPIP *C. vinosum*

Wie in Kap. 5.4.1.3 ausgeführt, kann das Tieftemperatur-Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* C77S aufgrund der hohen Zahl der einfließenden Parameter auf mehr als nur eine Weise mathematisch angepasst werden kann. Es erwies sich als möglich, sowohl mit Modell A (100% Fe^{3+} -Ser) als auch mit Modell B (50% Fe^{3+} -Ser, 50% $\text{Fe}^{2.5+}$ -Ser) eine formale Übereinstimmung mit dem Experiment herbeizuführen. Die Tatsache, dass eine Anpassung im Rahmen von Modell C (100% $\text{Fe}^{2.5+}$ -Ser) scheiterte, lässt aber immerhin den Schluss zu, dass in der oxidierten Mutante jedenfalls nicht in der Mehrheit der Proteinmoleküle das Serin an ein gemischt-valentes Eisenion ligandiert ist. Dieses Ergebnis ist chemisch zu erwarten, da ein harter Ligand wie Sauerstoff mit der hohen Pauli-Elektronegativität von 3.44 dreifach geladenes Eisen als Bindungspartner bevorzugt. Es steht darüber hinaus in Einklang mit dem NMR-Ergebnis für die C77S-Mutante, das im elektronischen Hauptisomer das serinligandierete Eisen als trivalent identifiziert (Kap. 2.3.3). Ferner ist diese Aussage kompatibel mit der Situation in Proteinen mit $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Zentrum, wo unter einem S \rightarrow O-Austausch eine Erhöhung der Oxidationszahl beobachtet wurde (Calzolari et al. 1997).

Zwischen den Modellen A und B, die beide eine mathematische Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zulassen, ist dasjenige Konzept vorzuziehen, das physikalisch plausibler ist. Obwohl im Modell A' nur elf, im Rahmen von Modell B hingegen vierzehn freie Parameter angepasst werden, ist der Gütefaktor bei Modell B nur unerheblich besser als bei Modell A' (Tab. 5.6). Andererseits erklärt Modell B die Hochtemperaturspektren etwas besser (Abb. 5.14). Das ausschlaggebende Argument zugunsten von Modell B ist jedoch, dass seine Kompatibilität mit den NMR- und den EPR-Messungen besser ist als die von Modell A. Im NMR-Experiment an der Mutante sind zwei elektronische Isomere erkennbar, an denen im einen Falle ein Fe^{3+} -Ion, im anderen ein $\text{Fe}^{2.5+}$ -Ion an das Serin angelagert ist (Abb. 2.4). Die in Abb. 5.3b und Tab. 5.1 dargestellten EPR-Ergebnisse, die bei $T = 30 \text{ K}$ und damit nahe der Temperatur der Mößbauer-Experimente ($T = 5 \text{ K}$) erhalten wurden, zeigen im Wesentlichen zwei gleich stark bevölkerte Isomere. Zwar ist nicht streng bewiesen, dass EPR- und NMR-Isomere gleichen physikalischen Ursprungs sind, aber es gibt doch konkrete experimentelle Hinweise darauf (LePape et al. 1997). Für die Identität spricht auch, dass *einzig* das HiPIP II *E. halophila* sowohl nur *ein* EPR- als auch nur *ein* NMR-Isomer aufweist, während alle anderen HiPIPs in sowohl mindestens *zwei* EPR- und *zwei* NMR-Isomeren auftreten. Sind also EPR- und NMR-Isomere konzeptionell identisch und berücksichtigt man die ähnliche Besetzung beider Grenzstrukturen im EPR-Experiment, so ist mit dieser Beobachtung *einzig* Modell B verträglich. Am wahrscheinlichsten liegen im oxidierten HiPIP *C. vinosum* C77S bei $T = 5\text{K}$ die beiden in Abb. 2.4 dargestellten Isomere etwa gleich stark besetzt vor und werden die vier Eisenionen durch die Mößbauer-Parameter von Tab. 5.6b beschrieben.

Obwohl Modell A und B sich hinsichtlich der Besetzung der beiden elektronischen Isomere unterscheiden, sind doch die auf den Mößbauer-Parametern basierenden Kernaussagen über die elektronische Struktur innerhalb eines Isomers der oxidierten C77S-Mutante sehr ähnlich (Tab. 5.6a, b). Wie im Wildtyp setzt sich auch der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster des modifizierten Proteins aus zwei antiparallel gekoppelten gepaarten Eisenspins zusammen, dem ferric-ferric- und dem ferric-ferrous-Paar. In beiden Modellen ergibt sich für die serinligandierten Eisenionen eine um $0.10 - 0.15 \text{ mm s}^{-1}$ höhere Isomerieverschiebung als für die entsprechenden Spezies im nativen Protein. In der reduzierten Mutante erhöht der Schwefel-Sauerstoff-Austausch δ um etwa 0.2 mm s^{-1} . Dies deckt sich mit Literaturwerten: die Isomerieverschiebung von vierfach koordiniertem Eisen erhöht sich durch einen Austausch der Schwefel- gegen Sauerstoffnachbarn um $0.1 - 0.3 \text{ mm s}^{-1}$ (Debrunner et al. 1977, Abb. 3.5c). Fee et al. (1983) beobachten beim Austausch zweier Schwefel- gegen zwei Sauerstoffliganden einen Anstieg der Isomerieverschiebung um $\approx 0.2 \text{ mm s}^{-1}$. Dieser Erhöhung von δ steht eine kleine Verringerung der Isomerieverschiebung der unverändert cysteinligandierten Eisenionen des Clusters gegenüber. Diese am C77S-Austausch unbeteiligten Eisenatome kompensieren also gemeinsam die vergrößerte Isomerieverschiebung des an Aminosäure 77 angrenzenden Eisens. Sinnvollerweise (Abb. 3.5a, c) ist in Modell B δ maximal für serinkoordiniertes $\text{Fe}^{2.5+}$ und minimal für cysteinligandiertes Fe^{3+} . Die erhaltenen Werte für den Asymmetrieparameter η und die Quadrupolaufspaltung ΔE_Q passen ins Gesamtkonzept.

Die aus den ^{57}Fe -ENDOR-Experimenten und aus der Mößbauer-Anpassung bestimmten A-Tensoren zeigen, dass mit der Mutation keine weitreichenden Änderungen im *magnetischen* System des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Clusters einhergehen. Aufgrund der sehr ähnlichen A-Mittelwerte von Wildtyp und Mutante sind die Aussagen des Vektormodells über den Grundzustand des Spinsystems $|S_{12} S_{34} S\rangle$ des nativen HiPIPs *C. vinosum* auch für das C77S-modifizierte Protein gültig (vgl. Kap. 6.2.1.2). Auch das EPR-Spektrum, dessen drei Komponenten nur hinsichtlich ihrer Gewichtung, nicht aber bezüglich Größe und Symmetrie ihrer *g*-Tensorkomponenten wesentlich zwischen natürlichem und mutiertem Protein divergieren, bekräftigt das Bild eines durch die Mutation nahezu unbeeinflussten Magnetsystems innerhalb eines elektronischen Isomers (Tab. 5.1, Abb. 5.3).

Die maßgebliche Veränderung der Elektronenstruktur des Metallzentrums durch die Mutation wird durch die Isomerieverschiebung angezeigt, die verglichen mit dem Wildtyp in beiden Oxidationszuständen modellunabhängig für serinligandiertes Eisen drastisch erhöht und für cysteinligandiertes Eisen leicht verringert ist. Die erhöhte Isomerieverschiebung von Eisen mit Sauerstoffnachbarn verglichen mit schwefelligandiertem Eisen wird in der Literatur auf den unterschiedlichen Charakter der chemischen Bindung zurückgeführt (Bill et al. 1989, Danon 1968). Da die Eisen-Schwefel-Bindung (Pauling-Elektro negativitäten $\chi_{\text{Fe}} = 1.83$, $\chi_{\text{S}} = 2.58$) einen höheren Kovalenzgrad aufweist als die deutlich ionischere Eisen-Sauerstoff-Bindung ($\chi_{\text{O}} = 3.44$), ist in der Eisen-Cystein-Bindung mehr 3d-Elektronendichte enthalten, die für die auf die s-Elektronen einwirkende Abschirmung der Kernladung verloren geht. Daher führt ein S \rightarrow O-Austausch zu einer Abnahme von s-Elektronenladung am Ort der Eisenkerne (vgl. (3.12)) und folglich zu einer Erhöhung der Isomerieverschiebung (Kap. 3.2.3). Serinligandiertes Eisen hat deshalb eine größere 3d-Elektronendichte als cysteinligandiertes Eisen und akkumuliert somit in seiner Umgebung Elektronendichte. Diese Ladungsanhäufung des Fe-Ser geht auf Kosten der Elektronenhüllen der übrigen Eisenionen

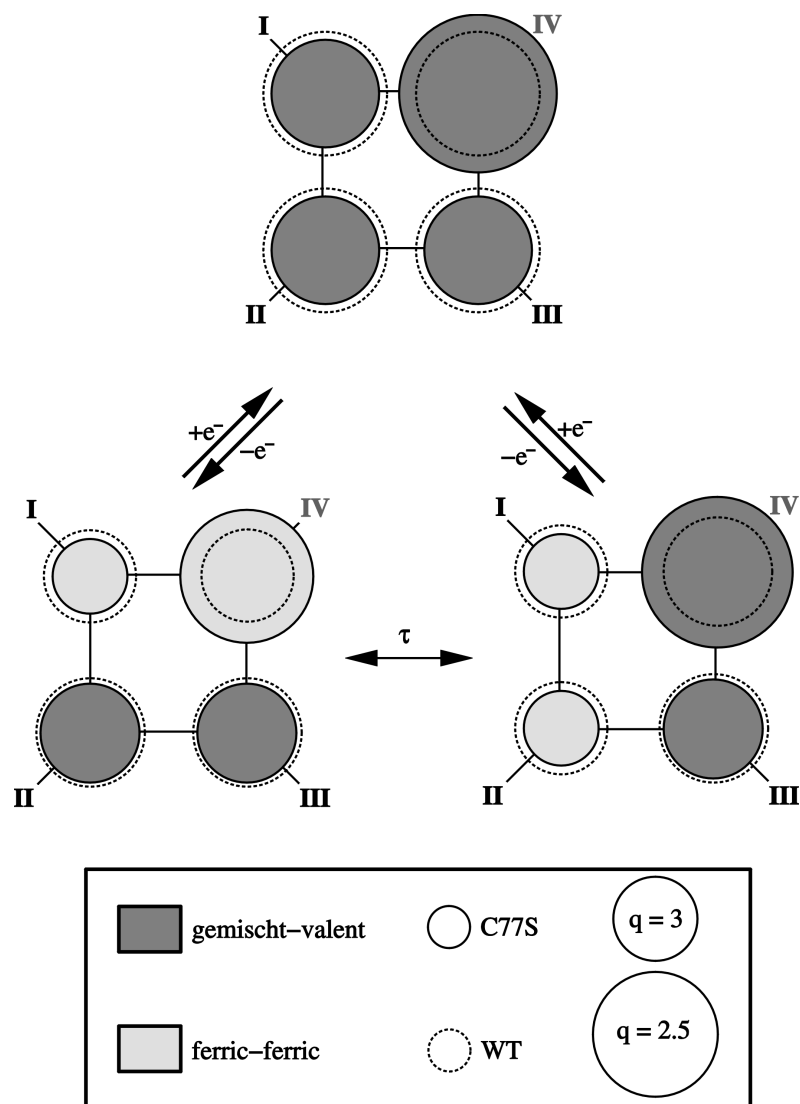


Abb. 6.3 Veränderung der Elektronenstruktur in reduziertem (oben) und oxidiertem (unten, zwei elektronische Isomere) HiPIP *C. vinosum* infolge der C77S-Mutation; serinligandiertes Eisen (IV) häuft dabei auf Kosten der anderen Eisen des Clusters Elektronendichte an; Kreisflächen sind entsprechend den im HiPIP-Modell im Rahmen von Modell B ermittelten Ladungszahlen maßstäblich; die Legende zeigt u. a. die zu einer bivalentem bzw. trivalentem Ladung zugehörigen Kreisflächen.

des Clusters. Infolgedessen verringert sich die Isomerieverschiebung der von der Mutation unbeeinflussten Eisenionen, wie experimentell in beiden Redoxformen beobachtet wird. Der C77S-Austausch bewirkt also eine Verschiebung der Elektronenwolke des [Fe₄S₄]-Clusters hin zum serinkoordinierten Eisen. Eine solche Strukturänderung als Konsequenz der Mutation lässt sich auch aus den mittels EXAFS gemessenen Bindungsabständen zwischen den Clustereisen und dessen Aminosäureliganden ablesen (vgl. Kap. 6.1).

Die Veränderung der Isomerieverschiebung unter einem Austausch von Cystein gegen Serin ist auch in der C42S-Mutante des Rubredoxins *C. pasteurianum* (Meyer et. al 1995) beobachtbar, die in der Gruppe von Münck untersucht wurde (Yoo et al. 2000). Die prosthetische Gruppe des Wildtyps dieses Eisen-Schwefel-Proteins besteht aus einem zwei- oder dreifach geladenen Eisenion, das über vier Cystein-Reste an das Proteinrückgrat ligandiert ist. Nach der C42S-Mutation erhöht sich die Isomerieverschiebung des reduzierten Eisens von $\delta = 0.70 \text{ mm s}^{-1}$ (Schulz und Debrunner 1976) auf $\delta = 0.79 \text{ mm s}^{-1}$. Im Falle des

paramagnetischen oxidierten Proteins ist die Erhöhung etwas kleiner ($\delta = 0.24 \text{ mm s}^{-1} \rightarrow 0.26 \text{ mm s}^{-1}$, Yoo et al. 2000). Im Rubredoxin *C. pasteurianum* C42S und im HiPIP *C. vinosum* C77S hat ein Cystein-Serin-Austausch also einen ähnlichen Einfluss auf die Isomerieverschiebung, der im reduzierten Zustand stärker ausgeprägt ist als im oxidierten. Ferner nimmt in den reduzierten Formen beider Mutanten die Quadrupolaufspaltung infolge des Cys→Ser-Austausches ab, im ersteren Falle von 1.13 mm s^{-1} auf 1.07 mm s^{-1} , im letzteren von 3.25 mm s^{-1} (Schulz und Debrunner 1976) auf 2.95 mm s^{-1} (Yoo et al. 2000). Ein prinzipieller Unterschied zwischen beiden Systemen besteht darin, dass beim HiPIP die erhöhte Isomerieverschiebung des serinligandierten Eisens durch die restlichen Eisenionen des Clusters kompensiert werden, indem deren Isomerieverschiebung leicht abnimmt. Mangels anderer Eisenionen kann ein solcher Ausgleichseffekt im C42S Rubredoxin nicht auftreten. Hier erhöht sich infolge der Mutation die gesamte Eisenladung auf Kosten der Proteinumgebung.

6.3 Berechnung reeller Ladungszahlen aus Isomerieverschiebungen

In der Literatur werden die Eisenionen des Metallzentrums in HiPIPs stets mit den Ladungszahlen 2.5+ und 3+ gekennzeichnet. Angesichts der asymmetrischen Proteinmatrix und des kovalenten Charakters der Eisenbindungen ist die Beschränkung auf ganz- und halbzahlige Oxidationszahlen stark idealisierend. Mit der Isomerieverschiebung steht eine messbare Größe zur Verfügung, aus der realistische Ladungszahlen der Eisenionen berechenbar sein sollten. Zwei Konzepte werden hierzu im Weiteren vorgeschlagen. Ausgangspunkt ist jeweils der theoretische Ausdruck für die Isomerieverschiebung (3.12), die - an einer bestimmten Quelle gemessen - ausschließlich von der s-Elektronendichte am Kernort abhängt. Letztere wird aufgrund eines Abschirmeffektes einzig durch die Zahl der 3d-Elektronen und somit durch den Oxidationszustand determiniert. Unter Einführung der Koeffizienten C_1 , C_2 kann (3.12) umgeschrieben werden in

$$\delta = C_1 q + C_2 \quad (6.1)$$

Gelingt es, beide unbekannt Konstanten zu bestimmen, so kann man mithilfe (6.1) aus der gemessenen Isomerieverschiebung den Ladungszustand des Mößbauer-Ions berechnen.

6.3.1 HiPIP-Modell

In Rahmen dieses Modells werden zur Festlegung von C_1 , C_2 die bei $T = 5 \text{ K}$ bestimmten Isomerieverschiebungen des HiPIP *C. vinosum* WT herangezogen. Das reduzierte Protein besitzt im $[\text{Fe}_4\text{S}^{2-}_4]^{2+}$ -Zentrum formal eine zehnfach positive Eisenladung, die sich gleichmäßig auf die vier Eisenionen mit identischen Isomerieverschiebungen verteilt. Dem angepassten Wert $\delta = 0.445 \text{ mm s}^{-1}$ wäre damit die Ladungszahl $q = 2.5$ zuzuordnen. Das ferric-ferrous-Paar im oxidierten HiPIP *C. vinosum* WT hat mit $\delta = 0.404 \text{ mm s}^{-1}$ eine kleinere Isomerieverschiebung, was gemäß (6.1) mit einer höheren Ladung $q = 2.5 + C_3$, wobei $C_3 > 0$, der Eisenionen korrespondiert. Da die formale Summe der Eisenladungen im oxidierten Cluster elf ist, muss das ferric-ferric-Paar die Ladung $q = 3 - C_3$ aufweisen. Diese drei Bedingungen erlauben eine Bestimmung von C_1 , C_2 , C_3 und führen auf folgendes Ergebnis:

HiPIP <i>C. vinosum</i> WT			HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S			
oxidiert		reduziert	reduziert			
Fe ³⁺	Fe ^{2.5+}	Fe ^{2.5+}	Fe ^{2.5+} -O		Fe ^{2.5+} -S	
2.87	2.63	≡ 2.5	1.93		2.64	
≡ ∑ 11		≡ ∑ 10	∑ 9.85			
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S						
oxidiert, Modell A			oxidiert, Modell B			
Fe ³⁺ -O	Fe ³⁺ -S	Fe ^{2.5+} -S	Fe ³⁺ -O	Fe ³⁺ -S	Fe ^{2.5+} -O	Fe ^{2.5+} -S
2.57	3.23	2.62	2.42	3.07	2.09	2.81
∑ 11.04			∑ 11.07			

Tab. 6.4 Ladungszahlen für die Eisenionen in reduzierten und oxidierten HiPIPs *C. vinosum* WT und C77S aus dem HiPIP-Modell (experimentelle Unsicherheiten $\Delta\delta \approx 0.01 \text{ mm s}^{-1}$ liefern Fehler $\Delta q \approx 0.03 |e|$).

$$\delta = -0.324 q + 1.255 \quad (6.2)$$

Daraus lassen sich die Ladungszustände der beiden Eisenpaare im oxidierten Wildtyp berechnen (Tab. 6.4). Aufgrund der sehr ähnlichen Struktur von nativem und C77S-modifiziertem Metallzentrum kann (6.2) ferner dazu benutzt werden, die Oxidationszahlen der Mutante abzuschätzen. Es ergeben sich äußerst vernünftige Werte, die ebenfalls Tab. 6.4 zu entnehmen sind. Addiert man die Ladungszahlen der vier Eisenionen, so erhält man eine unabhängige Bestätigung für die Anwendbarkeit des HiPIP-Modells auf die Mutante. Man würde für das reduzierte Protein eine Summe von zehn erwarten. Dies stimmt hervorragend mit dem tatsächlichen Wert $q = 9.85$ überein. Für die oxidierte Mutante mit einer zu erwartenden Summe von elf erhält man 11.07 im Rahmen von Modell B bzw. 11.04 für Modell A.

Die in Tab. 6.4 zusammengestellten Ergebnisse beschreiben quantitativ die Elektronenstruktur im Cluster, wie sie qualitativ aus der Interpretation der Tieftemperatur-Mößbauer-Spektren der Mutante erhalten wurde. Abb. 6.3 veranschaulicht graphisch die Vorstellung, die man von dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/3+}\text{Cys}_3\text{Ser}$ -Zentrum aus den vorgenommenen Analysen gewinnt. Dabei wird auf das am wahrscheinlichsten zutreffende Modell B Bezug genommen. Im reduzierten Zustand akkumuliert das serinligandierte gemischt-valente Eisen eine im Vergleich zum nativem Zustand zusätzliche Ladung in seiner Umgebung. Diese Elektronendichte fehlt den drei verbleibenden Eisenionen. Netto bleibt die Gesamtladung des Clusters durch die Mutation praktisch unberührt. Ähnlich ist die Situation im oxidierten Cluster, der bei $T = 5 \text{ K}$ etwa gleich häufig in den beiden in Abb. 6.3 dargestellten elektronischen Isomeren auftritt. In einem ist das sauerstoffkoordinierte Eisen Teil des ferric-ferric-Paares, im anderen Teil des gemischt-valenten Paares. Wie im reduzierten Protein hat das zu Ser77 benachbarte Eisenion in beiden Isomeren Elektronendichte angehäuft, während alle anderen drei Eisenionen nun stärker positiv geladen sind als im Wildtyp. Gemischt-valentes Eisen besitzt im reduzierten Protein eine höhere 3d-Elektronendichte als im oxidierten und zwar sowohl im nativen als auch im C77S-mutierten HiPIP *C. vinosum*.

a) Biologisches System		$\delta(\text{Fe}^{3+})$ [mm s ⁻¹]	$\delta(\text{Fe}^{2+})$ [mm s ⁻¹]	Quelle
Rubredoxin <i>C. pasteurianum</i>			0.70 ± 0.02	Schulz et al. 1976
Rubredoxin <i>C. pasteurianum</i>		0.24		Yoo et al. 2000
Desulforedoxin <i>D. gigas</i>		0.25 ± 0.06	0.70 ± 0.02	Moura et al. 1980
Rubredoxin <i>D. gigas</i>		-	0.71 ± 0.02	Moura et al. 1980
Desulforedoxin <i>D. vulgaris</i>		-	0.69 ± 0.02	Moura et al. 1990
Rubrerythrin <i>D. vulgaris</i>		0.27 ± 0.04	0.70 ± 0.03	LeGall et al. 1988
[FeS ₄] in Proteinumgebung		0.253	0.70	Mittelwerte
b) HiPIP <i>C. v.</i> WT		HiPIP <i>C. v.</i> C77S		
oxidiert		reduziert		
Fe ³⁺	Fe ^{2.5+}	Fe ^{2.5+}	Fe ^{2.5+} -O	Fe ^{2.5+} -S
2.84	2.66	2.57	2.15	2.67
Σ11.00		Σ10.16		
HiPIP <i>C. v.</i> C77S				
oxidiert, Modell A			oxidiert, Modell B	
Fe ³⁺ -O	Fe ³⁺ -S	Fe ^{2.5+} -S	Fe ³⁺ -O	Fe ³⁺ -S
2.62	3.10	2.66	2.52	2.98
Σ11.04			Fe ^{2.5+} -O	Fe ^{2.5+} -S
			2.27	2.79
			Σ11.06	

Tab. 6.5 a) Isomerieverschiebungen bei 4.2 K für verschiedene biologische [FeS₄]^{2+/3+}-Zentren sowie daraus berechnete Mittelwerte; b) Ladungszahlen für die Eisenionen in reduzierten und oxidierten HiPIPs *C. vinosum* WT und C77S aus dem Eisen-Schwefel-Protein-Modell (experimentelle Unsicherheiten $\Delta\delta \approx 0.01$ mm s⁻¹ liefern Fehler $\Delta q \approx 0.03$ |e|).

6.3.2 Eisen-Schwefel-Protein-Modell

Das HiPIP-Modell basiert auf der keineswegs trivialen Annahme, dass im nativen HiPIP *C. vinosum* die Summe der Eisenladungen *exakt* zehn bzw. elf ist. Ein Alternativmodell verzichtet auf diese Prämisse und zieht statt dessen monomeres Eisen in biologischem Milieu als Quelle für Wertepaare (q; δ) heran, um C₁, C₂ aus (6.1) festzulegen.

Wie man aus den Literaturwerten von Tab. 6.5a ersehen kann, ist es trotz völlig verschiedener Proteinstrukturen möglich, für biologische FeCys₄-Systeme charakteristische Werte für die Isomerieverschiebung des Eisens in beiden Redoxzuständen anzugeben. Aus diesen universellen Wertepaaren (q = 2; δ = 0.70 mm s⁻¹) und (q = 3; δ = 0.253 mm s⁻¹) leitet sich folgende Korrelation ab:

$$\delta = -0.447 q + 1.594 \quad (6.3)$$

Dieser Ausdruck erlaubt wiederum die Berechnung der Oxidationszahlen in nativem und mutiertem HiPIP *C. vinosum* WT und C77S (Tab. 6.5b).

Die Ergebnisse des Eisen-Schwefel-Protein-Modells sind trotz grundlegend verschiedener Ansätze mit jenen des HiPIP-Modells weitgehend deckungsgleich. Die aufsummierten Ladungszahlen der Clusterionen liegen in allen vier Proteinzuständen nahe bei den theoretisch erwarteten Werten von zehn bzw. elf. Auffällig ist allerdings, dass in keinem der Fälle die

formale Summe unterschritten wird. Dies könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass im HiPIP-Cluster etwas mehr 3d-Elektronendichte in den kovalenten Schwefelbindungen steckt als in FeCys₄-Proteinen. Das hohe Maß an Übereinstimmung zwischen beiden Modellen ist ein Beweis für die physikalische Substanz der berechneten Ladungszahlen und für die Plausibilität der zugrundeliegenden Prämissen. Beachtenswert ist insbesondere, dass die nahe bei den formal erwarteten Werten liegenden Summen der Oxidationszahlen im ersten Modell *Annahmen* und im zweiten Modell *Ergebnisse* sind. Ferner ergeben sich im ersten Konzept, das rein auf [Fe₄S₄]^{2+/3+}-Systeme ausgelegt ist, analoge Resultate wie mit dem zweiten, das HiPIPs ausgehend von den Verhältnissen im Rubredoxin analysiert. Damit scheint die Anwendbarkeit von (6.2), (6.3) über HiPIPs hinaus auf Eisen-Schwefel-Proteine im Allgemeinen ausdehnbar zu sein.

6.4 Elektronische Isomere von oxidierten HiPIPs

Die aktuelle Diskussion in der Literatur um die isomeren Grenzstrukturen oxidierteter HiPIPs (Kap. 2.3.3) wird hier gebündelt und mit neuen Überlegungen erweitert. Entwickelt wurde die Vorstellung elektronischer Isomere anhand der Interpretation von NMR-Experimenten an einer Vielzahl von HiPIPs (Bertini et al. 1995). Mit Ausnahme des HiPIP II *E. halophila* (Banci et al. 1991) liegen alle oxidierten HiPIPs bei Zimmertemperatur in einem charakteristischen Gleichgewicht zwischen den beiden in Abb. 2.4 dargestellten Isomeren vor. Fluktuationen zwischen den beiden Isomeren erfolgen bei Raumtemperatur schnell gegenüber der NMR-Zeitskala von etwa 10⁻⁴ s. Da die relative Besetzung der Isomere unter der *Annahme* ermittelt wird, dass *genau* zwei der rechnerisch sechs elektronischen Grenzstrukturen bevölkert sind, lässt NMR strenggenommen nur die Aussage zu, dass mindestens zwei isomere Zustände bevölkert sind. EPR-Untersuchungen bei 30 K zeigen für alle oxidierten HiPIPs mit Ausnahme des HiPIP II *E. halophila* mehrere spektrale Komponenten (Tab. 5.1, Bertini et al. 1993a, Frotscher et al. 1999). Wenn auch nicht von vornherein klar ist, dass EPR- und NMR-Isomere von ihrem physikalischen Ursprung her identisch sind (Dunham et al. 1991), so spricht doch das in beiden Spektroskopien beobachtete Fehlen des Phänomens mehrerer Spezies einzig beim HiPIP II *E. halophila* stark für die Identität beider Erscheinungen. Auch die gute quantitative Übereinstimmung der mit EPR und NMR bestimmten Prozentsätze beider Isomere ist ein Indiz dafür. Mit der ⁵⁷Fe-ENDOR-Methode können die verschiedenen Isomere nicht unterschieden werden. Die magnetischen Eigenschaften der elektronischen Isomere sind also praktisch identisch. Anpassungen von Mößbauer-Spektren nativer oxidierteter HiPIPs erfordern keine Differenzierung zwischen den Isomeren, weil diese hinsichtlich der für die Mößbauer-Parameter relevanten Eigenschaften Oxidationszustand, Spinzustand sowie Zahl und Art der nächsten Nachbarn keine Unterschiede aufweisen. Dies führt dazu, dass die Tieftemperatur-Mößbauer-Spektren verschiedener oxidierteter nativer HiPIPs sehr ähnlich aussehen, obwohl ihre isomeren Besetzungen äußerst unterschiedlich sind (vgl. Tab. 2.3). Für die C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* ist die einheitliche Behandlung beider Isomere jedoch nicht haltbar, da das an Aminosäure 77 ligandierete Eisenion für den Mößbauer-Effekt nun nicht länger äquivalent mit den drei übrigen Metallionen des Clusters ist, die Symmetrie ist gebrochen.

Eine vergleichende Betrachtung von EPR- und NMR-Spektroskopie hinsichtlich der Eigenschaften der HiPIP-Isomere ermöglicht das Studium der Temperaturabhängigkeit der

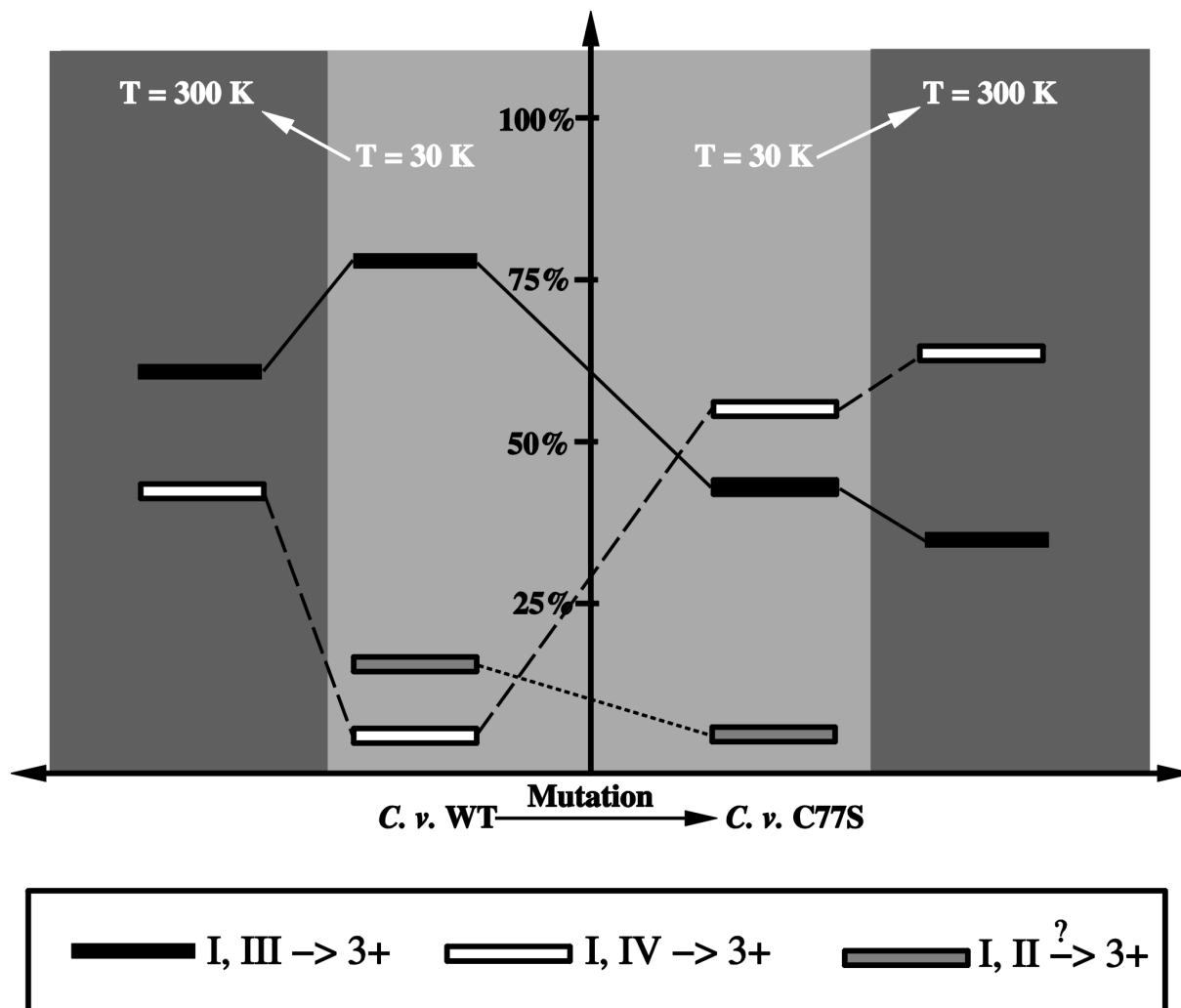


Abb. 6.4 Veränderung der Besetzungen der elektronischen Isomere in oxidiertem HiPIP *C. vinosum* bei Temperaturänderung bzw. C77S-Mutation (Erklärung siehe Text)

Besetzungsstatistik. Das HiPIP I *E. halophila* besitzt zum Beispiel ein NMR-Hauptisomer mit 80 % Populierung bei Zimmertemperatur (Bertini et al. 1995b). Geht man von einer Boltzmann-Statistik aus, so müsste das Nebenisomer mit 20 % Anteil bei Raumtemperatur energetisch etwa 300 cm^{-1} über dem durch das Hauptisomer definierten Grundzustand liegen. Für ein durch diese Energielücke getrenntes Zweiniveausystem ergäbe eine Extrapolation auf die EPR-Temperatur ($T = 30 \text{ K}$) eine Bevölkung des Anregungszustandes von etwa 1 ppm. Da dies in krassem Widerspruch zum experimentellen Befund eines zehnpromentlichen Anteils steht (Tab. 5.1), ist die Annahme einer einfachen Boltzmann-Statistik offensichtlich fehlerhaft. Analoge Überlegungen für die HiPIPs *C. vinosum* WT und C77S führen zu dem selben Ergebnis (vgl. Tab. 2.3, 5.1). Diese Beobachtungen können durch Entropieeffekte erklärt werden. Ein thermodynamisches System bei gegebener Temperatur T und konstantem Druck p minimiert im Gleichgewichtszustand nämlich nicht die innere Energie U , sondern die gibbssche freie Enthalpie G

$$G = U + pV - TS \quad (6.4)$$

Anhand von (6.4) erkennt man, dass insbesondere eine Erhöhung der Entropie S die gibbssche freie Enthalpie herabsetzt. Folglich kann es für ein System thermodynamisch günstig sein, für den Gegenwert einer Entropieerhöhung einen Anstieg von innerer Energie in Kauf zu nehmen, falls der erste Effekt den zweiten überkompensiert. Überträgt man diese abstrakte Betrachtung auf das Ensemble der HiPIP-Moleküle, so könnte die starke Besetzung des energetisch hochliegenden Neben-Isomers bei tiefen Temperaturen entropiegetrieben sein. Schon die bloße Durchmischung zweier Komponenten eines thermodynamischen Systems vergrößert dessen Unordnung und erhöht S um die sogenannte Mischungsentropie. Während also ein einfaches Boltzmann-Gesetz mit der Temperaturabhängigkeit der Besetzung der elektronischen Isomere im Widerspruch steht, kann die Betrachtung der gibbsschen freien Enthalpie dies qualitativ erklären. Die Populierung elektronischer Isomere in HiPIPs ist nicht das einzige Beispiel für entropiegetriebene Prozesse in Proteinen, so erfolgt beispielsweise auch die Besetzung und Umbesetzung von Konformationssubzuständen nach einem solchen Prinzip (Parak 1987, Gaßmann 2000).

Unter der Prämisse, dass EPR- und NMR-Isomere ein und dasselbe Phänomen beschreiben, sollen nun für das HiPIP *C. vinosum* die experimentellen Befunde über die Besetzung der elektronischen Isomere beim Wildtyp und der C77S-Mutante, bei tiefen und bei hohen Temperaturen, zu einem einheitlichen Bild zusammengesetzt werden, Abb. 6.4. Die in Kap. 5.1 beschriebene Auswertung der EPR-Spektren von oxidiertem HiPIP *C. vinosum* WT und C77S ergab, dass natives und mutiertes Protein mit denselben drei EPR-Komponenten, jedoch stark verschiedenen Gewichtungsfaktoren simulierbar sind. Diese drei EPR-Isomere und ihre Umgewichtung infolge der Mutation sind im zentralen Bereich von Abb. 6.4 dargestellt. Die Zuordnung von EPR- und NMR-Isomeren erfolgt unter der Annahme, dass das Hauptisomer bei einer Temperaturänderung von 30 K auf 300 K sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante erhalten bleibt. Diese plausible Prämisse wird durch folgende experimentelle Beobachtung gestützt: im nativen Zustand ist das linke in Abb. 2.4 dargestellte Isomer das hauptsächliche im NMR-Experiment, während "Isomer A" aus Tab. 5.1 das Haupt-Isomer im EPR-Experiment ist. Durch die Mutation wird nicht nur das NMR-Nebenisomer des nativen Proteins zum NMR-Hauptisomer, gleichzeitig wird auch das bisherige Neben-Isomer "C" nun zum Hauptisomer im EPR-Experiment. Umbesetzungen im NMR-Bild führen also auch im EPR-Bild zu analogen Umbesetzungen. Auf diese Art und Weise können die in Abb. 6.4 durch schwarz- bzw. weißgefüllte Rechtecke gekennzeichneten Spezies einander zugeordnet werden. Übrig bleiben die grau-gefüllten Rechtecke, die das "Isomer B" aus EPR repräsentieren. Für sie gibt es im NMR-Bild keine Entsprechung - entweder, weil deren Besetzung bei hohen Temperaturen sehr gering ist oder weil eine korrekte Auswertung der NMR-Experimente die Berücksichtigung von drei Isomeren erfordern würde. Über die sequenzspezifische Zuordnung des grauen Rechtecks kann spekuliert werden. Beide NMR-Isomere weisen als Liganden für Cys I *trivalentes* Eisen auf. Cys I unterscheidet sich in der Proteinstruktur von den anderen Cysteinen dadurch, dass es am weitesten im Proteininneren liegt. In dieser hydrophoben Umgebung wäre chemisch zu erwarten, dass es stets an ein Fe^{3+} -Ion angelagert ist. Dies wäre erfüllt, wenn das grau-gefüllte Rechteck dasjenige Isomer repräsentierte, dessen ferric-ferric-Paar an Cys I und Cys II ligandiert ist.

6.5 Paramagnetische Elektronenrelaxation in oxidierten HiPIPs

6.5.1 Relaxationsmechanismen bei tiefen Temperaturen

Die effektiven Relaxationsraten aller drei hier untersuchter oxidierten HiPIPs sind bei flüssigem Helium temperaturunabhängig (Abb. 5.23). Passend dazu belegen die gepulsten EPR-Messungen an diesen Proteinen, dass in allen drei Fällen bei $T = 5$ K Spin-Spin-Relaxation der dominante Mechanismus ist (Tab. 6.6a, b). Die Relaxationsraten sind jeweils zwischen einer und zwei Zehnerpotenzen größer als die Beiträge der Spin-Gitter-Relaxation. Zur gleichen Aussage gelangt man durch die isolierte Betrachtung des Einzelbeitrags transversaler Relaxation zur mittels Mößbauer-Spektroskopie ermittelten $\gamma(T)$ -Kurve, die dem jeweils ersten Summand von (5.1) entspricht (Tab. 6.6a, b). Die Übereinstimmung zwischen beiden Methoden ist äußerst zufriedenstellend, da gerade bei der Mößbauer-Spektroskopie die Unbestimmtheit der Relaxationsrate mit etwa einer halben Größenordnung beträchtlich ist. Die gepulsten EPR-Ergebnisse sind dagegen nur mit einem geringen Fehler von 10 - 20% behaftet. Die Dominanz von Spin-Spin-Relaxation im untersten Temperaturbereich ist physikalisch einleuchtend, da der halbzahlige Netto-Cluster-Spin $S = 1/2$ nur schwach, nämlich erst in zweiter Ordnung Störungstheorie, an das thermische Bad ankoppelt und bei tiefen Temperaturen zudem kaum Phononen angeregt sind. Dies hält den Beitrag der Spin-Gitter-Relaxation bei $T = 5$ K niedrig. Der temperaturunabhängige Spin-Spin-Relaxationsmechanismus ist im Gegensatz dazu auch bei flüssigem Helium effektiv. Die quantitativen Unterschiede zwischen den beiden Relaxationsraten beider nativer HiPIPs sind deutlich größer als die Divergenzen zwischen dem Wildtyp und der C77S-Mutante.

Die Relaxationszeiten des Netto-Cluster-Spins im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Zentrum oxidierten HiPIPs können anhand von Tab. 6.6c mit Literaturwerten für Proteine mit $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Zentrum vergli-

a) Spin-Spin-Relaxationszeit (5 K)		gepulste EPR		Mößbauer-Regression		
HiPIP I <i>E. halophila</i>		0.68 μs		1.0 μs		
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT		0.44 μs		0.84 μs		
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S		0.43 μs		0.98 μs		
b) Spin-Gitter-Relaxationszeit (5 K)		gepulste EPR		Mößbauer-Regression		
HiPIP I <i>E. halophila</i>		21.5 μs		26.5 μs		
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT		10.5 μs		13.8 μs		
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S		19.0 μs		17.2 μs		
c)	System	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{n+}$	T_1 [μs]	T_2 [μs]	T_{eff} [μs]	T [K]
	HiPIP I <i>E. halophila</i>	n = 3	21.5	0.68	0.66	5
	HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	n = 3	10.5	0.46	0.44	5
	HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	n = 3	19	0.44	0.43	5
	Hydrogenase <i>D. gigas</i> ¹	n = 1	5	0.2	0.19	4.2
	Fumerat Reduktase <i>E. coli</i> ²	n = 1	14.3 (10 K)	0.60 (20 K)	0.58	10, 20

Tab. 6.6 a) Spin-Spin-Relaxationszeiten aus gepulster EPR und dem temperaturunabhängigen Anteil der $\gamma(T)$ -Regressionskurven aus Mößbauer-Spektroskopie; b) Spin-Gitter-Relaxationszeiten aus gepulster EPR und dem temperaturabhängigen Anteil der $\gamma(T)$ -Regressionskurven aus Mößbauer-Spektroskopie; c) Relaxationszeiten von Proteinen mit paramagnetischem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{n+}$ -Cluster in verschiedenen Oxidationszuständen n bei tiefen Temperaturen (Quellen: ¹Guigliarelli et al. 1995, ²Shergill et al. 1991).

chen werden. Überraschenderweise zeigen sich keine systematischen Unterschiede, obwohl aufgrund der höheren Beimischung von bivalentem Eisen für das einfach positiv geladene Metallzentrum eine effektivere Spin-Gitter-Relaxation zu erwarten wäre². Dies zeigt, dass die Einzelspins in gekoppelten Systemen keinerlei Relevanz für die physikalischen Eigenschaften mehr haben, da sie keine guten Quantenzahlen mehr sind.

6.5.2 Relaxationsmechanismen bei hohen Temperaturen

Abb. 5.23 zeigt, dass Spin-Spin-Relaxation bei den Wildtyp-HiPIPs nur unterhalb etwa 20 - 25 K vorherrschend ist, bei der C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* noch nicht einmal bis zu 10 K. Danach folgt bei beiden nativen Proteinen ein bis etwa 50 K reichender Temperaturbereich, in dem direkte Phononenprozesse mit einem Phonon-Bottleneck den stärksten Einzelbeitrag zur Relaxation liefern. Darüber sind in allen drei Fällen Orbach-Prozesse dominant. Beim oxidierten HiPIP *C. vinosum* C77S fehlt der Zwischenbereich, statt dessen schließt sich hier an das durch Spin-Spin-Relaxation dominierte Temperaturintervall unmittelbar der von Orbach-Relaxation bestimmte Bereich an.

Physikalisch sinnvoll ist zunächst, dass direkte Phonon-Bottleneck-Prozesse nur bei tiefen Temperaturen maßgeblich sind. Schließlich setzt ihre Anwesenheit voraus, dass nur so wenige Phononen angeregt sind, dass dadurch der Energieausgleich zwischen Gitter und Heliumbad behindert wird. Auch in Proteinen mit $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ - und $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Zentren wurden bei tiefen Temperaturen direkte Phonon-Bottleneck-Prozesse gefunden (Gayda et al. 1979, Bertrand et al. 1981).

In letzteren Arbeiten ist überdies bei höheren Temperaturen ein Beitrag von Orbach-Relaxation berücksichtigt worden. Obwohl dieser Mechanismus damit auch für oxidierte HiPIPs plausibel erscheint und entscheidend für die Wiedergabe des charakteristischen Temperaturverlaufs der experimentellen $\gamma(T)$ -Kurven verantwortlich ist, nimmt doch ein Theorieparameter der Anpassung einen auffallend großen Wert an. Denn die in Abb. 3.1c zu erkennende Energiebarriere Δ , die wegen $\Delta \gg \delta$ in etwa der Energie $\Delta - \delta$ eines für Orbach-Relaxation erforderlichen Phonons entspricht, nimmt für die beiden Wildtyp-HiPIPs die sehr hohen Werte von 563 K (entspricht 388 cm^{-1}) bzw. 526 K (363 cm^{-1}) an. Diese Werte sind viel größer als die für $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Proteine abgeschätzte Debye-Temperatur $\theta_D \approx 60 \text{ K}$ (Bertrand et al. 1981), die auch für HiPIPs grob gelten sollte. Da θ_D eine Obergrenze für Normalmodenenergien des Proteins darstellt, erscheinen hochenergetische Phononen mit mehreren hundert cm^{-1} unverständlich. Deren Existenz ist für das Auftreten von Orbach-Relaxation jedoch unverzichtbare Voraussetzung, setzt doch die Absorption dieser Phononen und die damit verbundene Bevölkering des hochangeregten Eigenzustands Orbach-Prozesse erst in Gang. Der scheinbare Widerspruch löst sich auf, wenn man Resonanz-Raman-Spektren am reduzierten HiPIP *C. vinosum* betrachtet (Spiro et al. 1988, Czernuszewics et al. 1987, Tang et al. 1975). Darin sind acht ramanaktive Normalmoden im Bereich $247 - 395 \text{ cm}^{-1}$ sichtbar, die clusterinternen Eisen-Schwefel-Schwingungen zugeschrieben werden. Die

² Schließlich wechselwirken ganzzahlige Spins wie $S = 2$ von Fe^{2+} *high spin* schon in erster, halbzahlige Spins wie $S = 5/2$ von Fe^{3+} *high spin* erst in zweiter Ordnung Störungsrechnung mit dem Phononenfeld.

intensivste Eigenschwingung im Raman-Spektrum mit einer Wellenzahl von 337 cm^{-1} etwa wird einer Bewegung aller vier Eisenionen gegen alle acht Schwefelionen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]\text{Cys}_4$ -Zentrums zugeordnet (Czernuszewics et al. 1987). Diese hochenergetischen Normalmoden liegen bei den Energien, die Orbach-Relaxation mit der Energiebarriere $\Delta - \delta$ erfordert. Damit stehen ausreichend kurzwellige Gitterschwingungen zur Verfügung, um einen im ersten Anregungszustand δ befindlichen HiPIP-Spin S in den zweiten Anregungszustand bei Δ zu befördern und damit Orbach-Relaxation nach dem Schema von Abb. 3.1c herbeizuführen.

Dass die Absolutwerte von γ für die Mutante deutlich kleiner sind als für beide Wildtypen (Tab. 5.11, Abb. 5.22) ist auf deren wesentlich kleinere Energielücke Δ zurückzuführen, da die Orbach-Relaxationsrate gemäß (3.3) zu deren dritter Potenz proportional ist.

6.5.3 Interpretation der Orbach-Relaxation: Übergänge zwischen Isomeren

Der Orbach-Relaxationstheorie zufolge repräsentiert das Niveau mit der hohen Anregungsenergie Δ einen wohldefinierter Eigenzustand des Spin-Systems. Die folgenden Überlegungen befassen sich mit der Frage, wie man diesen hochangeregten Zustand anschaulich auffassen kann bzw. zwischen welchen beiden HiPIP-Zuständen Übergänge stattfinden, die im Experiment als Relaxation sichtbar werden. Ausgangspunkt der Argumentation ist die phänomenologische Gegenüberstellung von relativer Besetzung des EPR-Isomers und zweier die Orbach-Relaxation charakterisierender Parameter, nämlich der Anregungsenergie des hochenergetischen Eigenzustands Δ sowie der Temperatur T_0 , oberhalb derer Orbach-Prozesse den stärksten Einzelbeitrag zur Elektronenrelaxation liefern. Tab. 6.7 zeigt, dass beide Erscheinungen offensichtlich korreliert sind: Orbach-Relaxation erfolgt um so effektiver, je stärker der prozentuale Beitrag des Neben-Isomers ausfällt, d. h. je kleiner α ist. Denselben Eindruck gewinnt man, wenn man die in Abb. 6.5 für drei oxidierte HiPIPs und drei Temperaturen dargestellte Mößbauer-Spektren betrachtet. Anhand der eingezeichneten horizontalen Linien kann man an charakteristischen Stellen des Messspektrums den Fortschritt der Relaxation bei vergleichbaren Temperaturen erkennen. Mit Abstand am langsamsten relaxiert das oxidierte HiPIP II *E. halophila*, welches bei flüssigem Stickstoff noch deutliche Reste einer paramagnetischen Aufspaltung zeigt. Auf die ungewöhnlich langsame Elektronenrelaxation im HiPIP II wird in der Literatur hingewiesen (Referenz 14 in Bertini et al. 1993a). Dieses Protein nimmt also auch bezüglich der Relaxationseigenschaften innerhalb der HiPIPs eine Sonderrolle ein, ist es doch das einzige Beispiel dieser Proteinklasse mit nur *einem* NMR- und nur *einem* EPR-Isomer (Banci et al. 1991, Bertini et al. 1993a). Das nächst schneller relaxierende HiPIP ist das HiPIP I *E. halophila*, dessen EPR-Isomer 90 % der Protein-Moleküle repräsentiert. Noch effektiver voll-

HiPIP	α [%]	Δ [cm^{-1}]	T_0 [K]
HiPIP II <i>E. halophila</i>	100	-	-
HiPIP I <i>E. halophila</i>	90	388	56
HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	80	363	53
HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	55	62	28

Tab. 6.7 Anteil des EPR-Haupt-Isomers α , Energie des Orbach-Anregungszustands Δ und Grenztemperatur T_0 , oberhalb derer Orbach-Relaxation dominant ist, für vier HiPIPs.

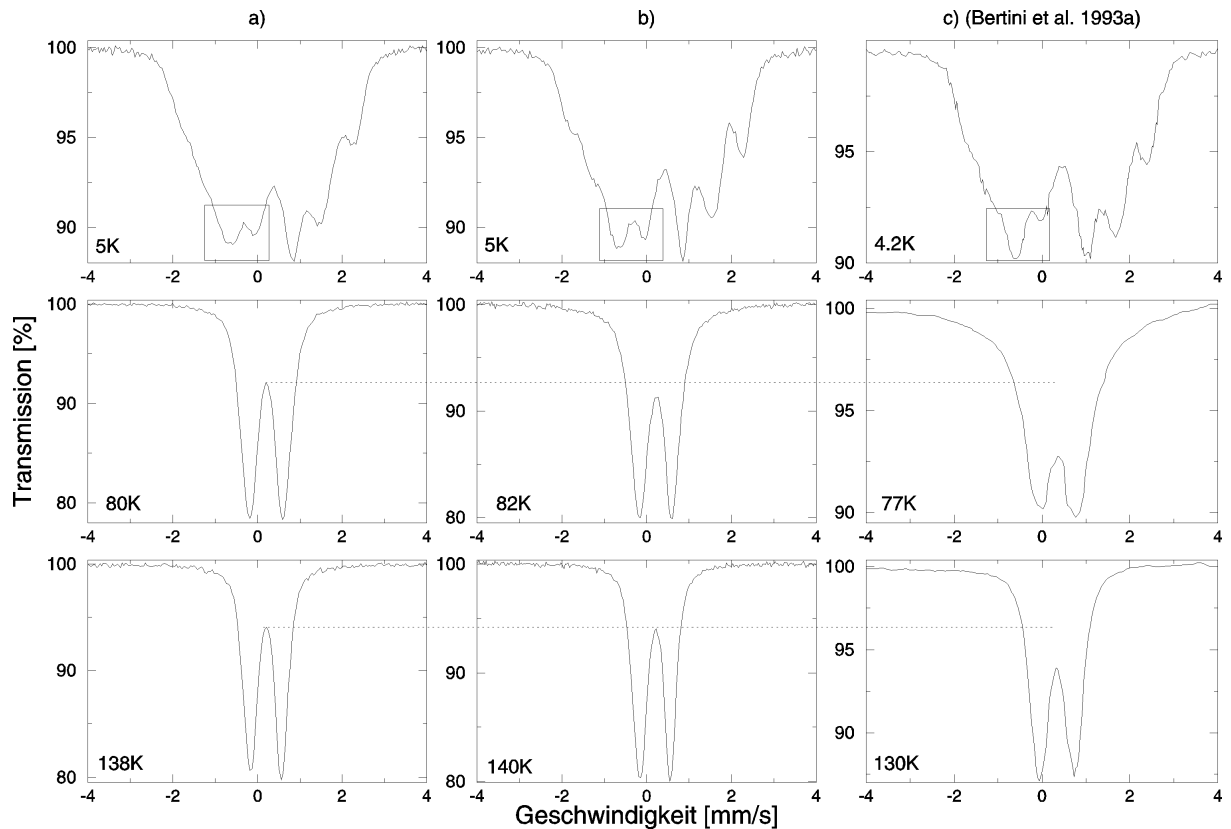


Abb. 6.5 Mößbauer-Spektren der oxidierten HiPIPs a) *C. vinosum* WT, b) I *E. halophila*, c) II *E. halophila* (aus Bertini et al. 1993a) im schwachen externen Magnetfeld bei drei für den Fortschritt von Elektronenrelaxation charakteristischen Temperaturen; bei den Tieftemperaturspektren verschiebt sich im durch Rechtecke hervorgehobenen Bereich im Laufe der Relaxation spektrale Fläche vom linken zum rechten der beiden Peaks (vgl. hierzu auch Abb. 5.21); bei den beiden Hochtemperaturspektren nimmt die Linienbreite (erkennbar an der gestrichelten Linien) mit fortschreitender Relaxation ab.

führt der Netto-Cluster-Spin im HiPIP *C. vinosum* WT mit einem 80 %-EPR-Isomer Orbach-Relaxation. Am schnellsten relaxiert jedoch dessen C77S-Mutante, bei der bereits bei 28 K Orbach-Relaxation die stärkste Einzelkomponente stellt. Nur 55 % des Protein-Ensembles hält sich unter EPR-Bedingungen im Hauptisomer auf. Orbach-Relaxation hat also einen umso wichtigeren Einfluss, je ausgeglichener die Besetzung von Haupt- und Neben-Isomer ist. Diese Korrelation begründet die Vermutung, dass Orbach-Relaxation zu Übergängen zwischen beiden elektronischen Isomeren führt. In diesem Rahmen erfährt die Energiebarriere Δ eine völlig neue Interpretation. Wenn tatsächlich der hochangeregte Eigenzustand des Systems als Neben-Isomer und der Grundzustand als Haupt-Isomer aufzufassen ist, zwischen denen mittels lokalisierter Cluster-Moden Orbach-Relaxation auftritt, dann wäre Δ nichts anderes als der energetische Abstand zwischen den beiden elektronischen Isomeren von Abb. 2.4. Die aus der Anpassung der $\gamma(T)$ -Kurve ermittelten Werte für Δ passen sehr gut zu dieser Überlegung. Die am effektivsten relaxierende C77S-Mutante hat ein sehr kleines Δ . Da die Anregungsenergie zwischen beiden Isomeren in diesem Protein gering ist, befinden sich nur 55 % der Proteine im Haupt-Isomer, alle anderen Moleküle sind in einem angeregten Zustand. Der kleinen Energielücke zufolge sind thermisch angetriebene Übergänge zwischen den elektronischen Isomeren wahrscheinlich und die Relaxation ist daher effektiv. Der zugehörige Wildtyp mit $\alpha = 80$ % hat bereits die sehr hohe Anregungsenergie $\Delta = 363 \text{ cm}^{-1}$ und relaxiert langsamer. Noch höher ist die Hürde für Orbach-Relaxation und Übergänge zwischen Isome-

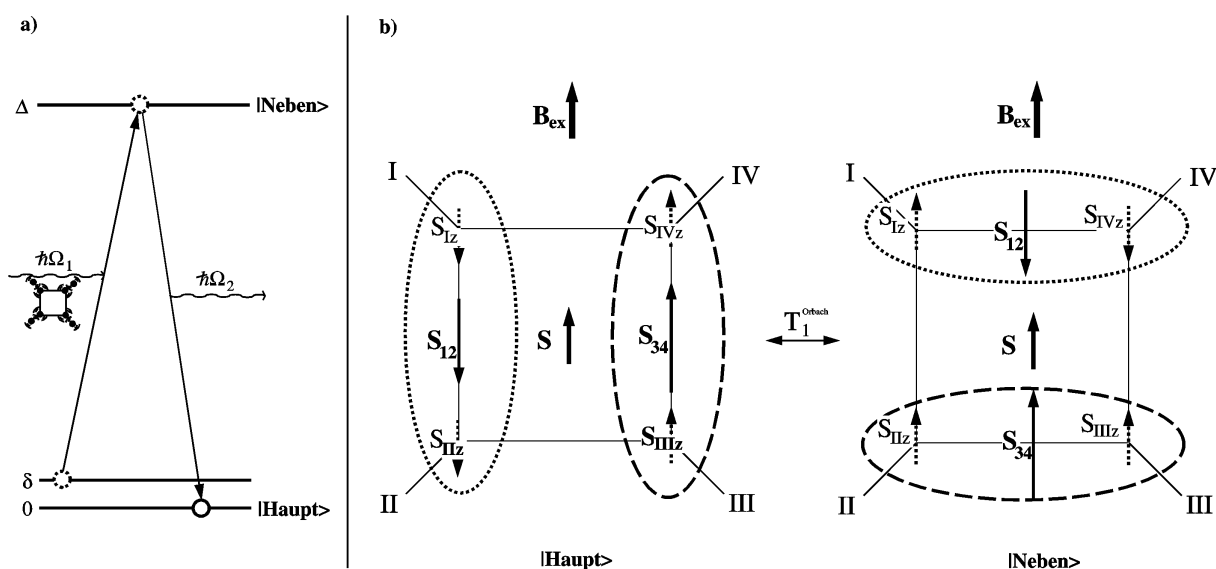


Abb. 6.6 a) Energieniveauschema für Orbach-Relaxation zwischen elektronischen Isomeren in oxidierten HiPIPs angetrieben durch lokalisierte Clustermoden; b) Orientierung der in oxidierten HiPIP-Clustern auftretenden Spins in beiden elektronischen Isomeren; mit isomeren Übergängen sind Spinumklappprozesse verbunden, die zu Orbach-Relaxation äquivalent sind.

ren beim HiPIP I *E. halophila* mit 90 % Hauptisomer. Das Schlusslicht bildet das HiPIP II *E. halophila*, in dem alle Moleküle im Hauptisomer befindlich sind und das unter allen vier HiPIPs am schlechtesten relaxiert. Die mit den Grenzfall $\alpha = 100\%$ korrespondierende Anregungsenergie entspräche formal $\Delta \rightarrow \infty$.

Dass Orbach-Relaxationsprozesse in HiPIPs äquivalent sind mit Übergängen zwischen den elektronischen Isomeren (Abb. 6.6a), wäre auch anschaulich verständlich. In Abb. 6.6b sind die Orientierungen der einzelnen, der gepaarten und des gesamten Spins im Cluster in beiden elektronischen Isomeren zu sehen. Der Netto-Cluster-Spin wird in beiden Grenzstrukturen bevorzugt in Richtung des externen Magnetfeldes, durch das eine Vorzugsrichtung definiert wird, ausgerichtet sein³. Da aber in den beiden Isomeren ferric-ferric- und ferric-ferrous-Paar auf verschiedenen Eisenplätzen sitzen, müssen sich beim Übergang eines Proteinmoleküls von der einen zur anderen Konformation zumindest einige der auftretenden Spins umorientieren (Abb. 6.6b). Fluktuierende Spins bedeuten aber nichts anderes als paramagnetische Elektronenrelaxation.

6.6 Dynamik von HiPIPs

Das mittlere Auslenkungsquadrat aus Mößbauer-Spektroskopie, $\langle x^2 \rangle$, ist auf alle Bewegungen sensitiv, die sich auf einer Zeitskala schneller als 100 ns abspielen und an das Eisen ankoppeln. Die Temperaturabhängigkeit von $\langle x^2 \rangle$ der Eisenkerne von HiPIPs (Abb. 5.20) zeigt die beiden für Proteine typischen Bereiche. Unterhalb einer charakteristischen Temperatur, T_C , nehmen die $\langle x^2 \rangle$ -Werte für alle HiPIPs linear mit der Temperatur zu. Hier liefern harmonische Gitterschwingungen den alleinigen Beitrag $\langle x^2 \rangle_v$ ("v" für Vibration) zum

³ Schließlich ist in (3.30) die elektronische Zeeman-Wechselwirkung über alle anderen Terme dominant.

mittleren Auslenkungsquadrat. Die Geradensteigungen $\langle x^2 \rangle_v / T$ liegen in der schmalen Bandbreite von $0.80 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1}$ bis $0.89 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1}$. Ausgehend davon könnte man die Behauptung aufstellen, dass der einheitliche Zahlenwert von $\langle x^2 \rangle_v / T$ keinen wesentlichen Informationsgehalt beinhaltet und lediglich die Eigenschaften eines in Wasser eingefrorenen Makromoleküls widerspiegelt. Dass dies nicht der Fall ist und $\langle x^2 \rangle_v / T$ für verschiedene Proteine ganz verschiedene Werte annimmt, zeigt ein Vergleich mit Literaturdaten (Tab. 6.8). Die Eisen-Dynamik in Hämproteinen reicht von $0.31 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1}$ in reduziertem über $0.55 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1}$ in oxidiertem Cytochrome *c* (Frolov et al. 1997) bis zu $0.94 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1}$ in Deoxy-Myoglobin (Gaßmann 2000). Des weiteren ist bemerkenswert, dass die Tieftemperaturdynamik von reduziertem und oxidiertem HiPIP identisch ist. Beim Cytochrom *c* und der Superoxiddismutase dagegen sind die Unterschiede der Geradensteigungen für die beiden Eisen-Oxidationsniveaus erheblich (Tab. 6.8). Die Proteinklasse der HiPIPs zeigt im Bereich harmonischer Festkörperschwingungen also ein weitgehend einheitliches Verhalten. Die parabolische Einhüllende des Proteinpotentials für HiPIPs in den untersuchten Konfigurationen weist also eine sehr ähnliche Krümmung auf (Abb. 6.7).

Für Myoglobin wurde eine Normalmodenanalyse durchgeführt (Melchers et al. 1996), in der gezeigt wurde, dass die $\langle x^2 \rangle_v$ -Werte durch die an das Eisen ankoppelnden Normalmoden erklärt werden können. Der Hauptbeitrag zum mittleren Auslenkungsquadrat kommt dabei von Eigenschwingungen, bei denen sich alle Atome der Hämebene gemeinsam gegen die gefaltete Aminosäurekette bewegen. Überträgt man dieses Bild auf HiPIPs, so könnten Bewegungen des gesamten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters gegen das Proteinrückgrat dominant sein. Dies würde die identische Tieftemperaturdynamik von HiPIPs in verschiedenen Oxidationszuständen erklären, da die gleichbleibende Masse des schwingenden Metallzentrums zu keinen Unterschieden in den harmonischen Bewegungseigenschaften führen sollte. Lokalisierte Intra-Cluster-Moden im Bereich $247 - 395 \text{ cm}^{-1}$ wurden mit Raman-Experimenten für das reduzierte HiPIP *C. vinosum* gefunden (Czernuscewicz et al.

Protein	Eisenumgebung	$\langle x^2 \rangle_v / T$	Referenz
Deoxy-Myoglobin	Häm-Ebene	0.94	Gaßmann 2000
CO-Myoglobin (Kristalle)		0.79	
Met-Myoglobin (Kristalle)		0.54	
Deoxy-Hämoglobin		0.93	Frolov et al. 1991
oxidiertes Cytochrom <i>c</i>	fünffach koordiniert (3x N, 2x O)	0.55	Frolov et al. 1997
reduziertes Cytochrom <i>c</i>		0.31	
Photosystem II Spezies A	A, C: Häm-Ebene	0.35	Garbers 1997
Photosystem II Spezies B	B: sechsfach koordiniert (4x N, 2x O)	0.93	
Photosystem II Spezies C		1.05	
oxidierte Superoxiddismutase	fünffach koordiniert (3x N, 2x O)	0.63	Scherk 1998
reduzierte Superoxiddismutase		0.84	
HiPIP-Mittelwert	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]$-Kubus	$0.83^{+0.06}_{-0.03}$	Tab. 5.10

Tab. 6.8 Geradensteigungen $\langle x^2 \rangle_v / T$ in $10^{-4} \text{ \AA}^2 / \text{K}$ aus Mößbauer-Untersuchungen für diverse Eisenproteine, Mittelwert aus sechs HiPIPs.

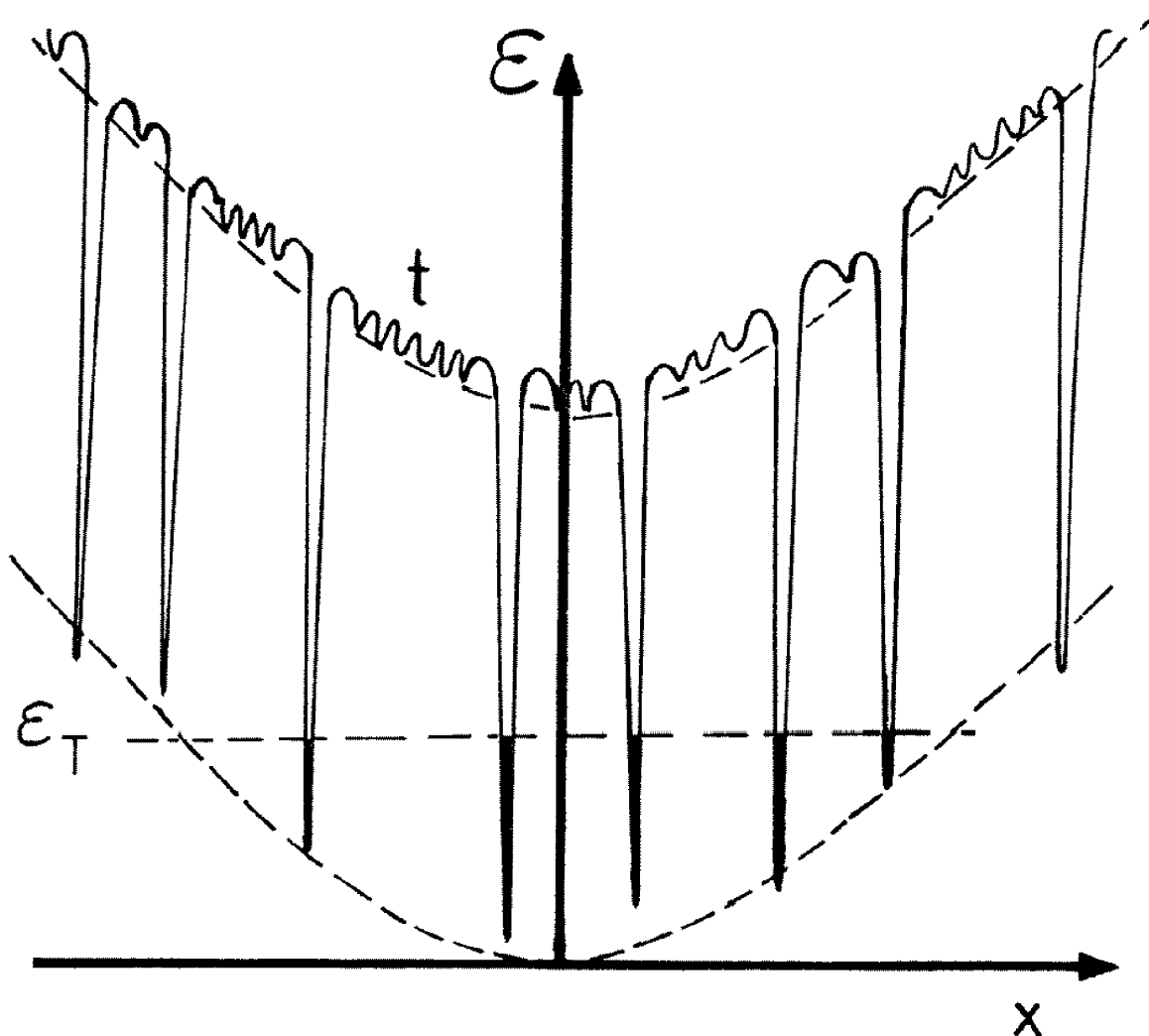


Abb. 6.7 Modell für das Potential ε eines Proteinmoleküls in Abhängigkeit einer Proteinkoordinate x zum Verständnis der proteinspezifischen Dynamik, nach Parak et al. (1982), Erläuterung siehe Text.

1987). Allerdings sind diese Phononen zu hochenergetisch, um im Tieftemperaturbereich in ausreichender Zahl angeregt zu sein. Deshalb ist ein maßgeblicher Beitrag dieser Moden zu $\langle x^2 \rangle$ bei tiefen Temperaturen nicht zu erwarten. Eine anschauliche Größe zur Quantifizierung der Tieftemperaturdynamik von HiPIPs ist die Schwingungsamplitude bei 80 K, die sich aus den Mößbauer-Experimenten zu etwa 0.12 Å ergibt. Diese Größe ist in Relation zu typischen Bindungsabständen von 2.2 - 2.3 Å zu setzen.

Die $\langle x^2 \rangle$ -Ergebnisse aus Mößbauer Spektroskopie sind zu den $\langle x^2_{XAS} \rangle$ -Werten aus EXAFS-Experimenten komplementär. Letztere Technik ist sensitiv auf sämtliche Relativbewegungen zwischen dem Eisenatom und dem rückstreuenden Atom, auf statische Unordnung zwischen verschiedenen Proteinmolekülen und auf Inhomogenitäten zwischen den zu einer Schale zusammengefassten Atomen. Tab. 6.9 stellt die aus einer Extrapolation der Mößbauer-Ausgleichsgeraden auf die EXAFS-Meßtemperatur erhaltenen Werte $\langle x^2 \rangle$ ($T = 40$ K) den entsprechenden EXAFS-Ergebnissen $\langle x^2_{XAS} \rangle$ für natives, C77S-mutiertes und entfaltetes reduziertes HiPIP *C. vinosum* gegenüber. In allen Fällen ist der Mößbauer-Wert fast doppelt

HiPIP <i>C. vinosum</i> reduziert	nativ	C77S-mutiert	teilweise entfaltet
Mößbauer-Spektroskopie $\langle x^2 \rangle$	$3.56 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^2$	$3.20 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^2$	$3.52 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^2$
EXAFS $\langle x^2_{XAS} \rangle$	$1.64 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^2$	$1.85 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^2$	$2.69 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^2$

Tab. 6.9 Mittlere Auslenkungsquadrate bei $T = 40 \text{ K}$ aus Mößbauer-Spektroskopie (berechnet aus den Ausgleichsgeraden von Tab. 5.10) und EXAFS (gemittelt über alle Resonanzen von Eisen-Nachbarn mit Abständen $< 3 \text{ \AA}$, vgl. Tab. 5.12) für reduziertem HiPIP *C. vinosum* in drei verschiedenen Zuständen

so groß wie jener aus EXAFS. Eine ähnliche Tendenz wurde beim Vergleich der Parameter von Met-Myoglobin gefunden (Scherk et al. 2000). Diese Analysen lassen die Aussage zu, dass ein wesentlicher Anteil des EXAFS-Debye-Waller-Faktors auf statische Unordnung zurückgeht. Diese resultiert aus der Tatsache, dass Proteinmoleküle in verschiedenen Konformationssubzuständen auftreten.

Oberhalb einer charakteristischen Temperatur, T_C , die für HiPIPs zwischen 190 und 200 K liegt, weicht der $\langle x^2 \rangle(T)$ -Verlauf vom linearen Verhalten ab, und es ist ein dramatischer Anstieg des mittleren Auslenkungsquadrates der Eisenkerne zu verzeichnen (vgl. Abb. 5.20). Dieser Effekt wurde zuvor bereits bei diversen anderen Proteinen wie dem Hämoglobin (Frolov et al. 1991), dem Myoglobin (Parak und Formanek 1971, Parak et al. 1982, Gaßmann 2000), der Superoxiddismutase (Scherk 1998), dem Cytochrom C (Frolov et al. 1997) oder Membranfragmenten des Photosystems II (Garbers 1997) beobachtet. Dieses für Makromoleküle typische Verhalten wird dahingehend gedeutet, dass oberhalb der Grenztemperatur neue quasidiffusive Bewegungsmoden angeregt werden können. Diese beschreiben diffusionsartige Bewegungen großer Proteinbereiche und werden als proteinspezifische Dynamik bezeichnet. Der Beitrag der proteinspezifischen Bewegungsmoden zum mittleren Auslenkungsquadrat, $\langle x^2 \rangle$, heißt $\langle x^2 \rangle_t$:

$$\langle x^2 \rangle = \langle x^2 \rangle_v + \langle x^2 \rangle_t \quad (6.5)$$

Der Index "t" steht für *transition* (Übergang), was verständlich wird, wenn man die von Parak et al. (1982) entwickelte und in Abb. 6.7 graphisch dargestellte Interpretation der proteinspezifischen Bewegungsmoden nachvollzieht. Das eindimensionale Potentialbild für Proteine geht von einer harmonischen Einhüllenden aus, die den rücktreibenden hookeschen Kräften bei der Auslenkung von im Proteinverband gebundenen Atomen aus der Ruhelage Rechnung trägt. Die tiefen Potentialmulden repräsentieren die Konformationssubzustände (Frauenfelder et al. 1979), die besonders stabile Proteinstrukturen beschreiben. Bei tiefen Temperaturen sind die einzelnen Proteinmoleküle in den jeweiligen Konformationssubzuständen eingefroren. In diesen lokalen Energieminima führen sie harmonische Schwingungen aus, die den linearen Anstieg von $\langle x^2 \rangle$ im Tieftemperaturbereich zur Folge haben. Erst oberhalb einer Grenztemperatur T_C können die Proteine entropiegetrieben aus den tiefen Potentialmulden ins "Kontinuum" gehoben werden, wo sie sich auf der Suche nach einem neuen stabilen Minimum strukturell umorientieren. Diese quasidiffusiven Bewegungen im Übergangszustand t liefern den erheblichen Beitrag $\langle x^2 \rangle_t$ zum mittleren Auslenkungsquadrat. Nach dem reibungsbehafteten Driften, im Potentialbild beschrieben

durch die Rauigkeit des Übergangsbereichs, fällt das Protein wieder in einen der stabilen Konformationszustände zurück.

Der Temperaturbereich, wo Beiträge $\langle x^2 \rangle_t$ auftreten, heißt auch physiologischer Temperaturbereich, da ein Protein nur oberhalb der charakteristischen Temperatur T_C seine native Funktion erfüllt (Garbers 1997⁴). Die Mößbauer-Daten zeigen hier deutliche Unterschiede zwischen reduzierten und oxidierten HiPIPs (Abb. 5.20). Für alle HiPIPs ist der Anstieg von $\langle x^2 \rangle_t$ im höheren Oxidationsniveau des Clusters wesentlich ausgeprägter (vgl. letzte Spalte in Tab. 5.10). Dies bedeutet, dass im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster das Auftreten proteinspezifischer Bewegungen gegenüber dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Zentrum bevorzugt ist. Das reduzierte Protein benötigt mehr Energie, um aus einem Konformationszustand herauszuspringen und ist in diesem Sinne rigider als das oxidierte. Dies scheint mit der Tatsache korreliert zu sein, dass in der praktischen Handhabung oxidierte HiPIPs weniger stabil sind als reduzierte. Beispielsweise gelingt die teilweise Entfaltung nur mit dem reduzierten HiPIP *C. vinosum*, während das oxidierte Protein sofort irreversibel denaturiert (Bertini et al. 1997). Auch sei an die theoretische Analyse der Spinkopplung im Eisenzentrum erinnert, die für den reduzierten Cluster eine stärkere magnetischen Kopplung und einen höheren Symmetriegrad ergab als für den oxidierten (Kap. 6.2.2). Im Potentialbild von Abb. 6.7 wirkt sich die unterschiedliche Stabilität der Metallzentren in den beiden Oxidationszuständen dahingehend aus, dass die Potentialmulden bei reduzierten HiPIPs durchschnittlich tiefer sind als bei oxidierten. Für reduzierte HiPIPs sind deshalb größere thermische Energien und somit höhere Temperaturen erforderlich, um Übergänge zwischen Konformationszuständen herbeizuführen. Einen bestimmten Wert von $\langle x^2 \rangle_t$ erreichen reduzierte HiPIPs also erst bei höheren Temperaturen als oxidierte.

Im folgenden werden die verschiedenen HiPIP-Proben aus *C. vinosum* miteinander anhand der $\langle x^2 \rangle_t$ -Werte nahe $T = 250 \text{ K}$ verglichen (Tab. 5.10). Für den Wildtyp erhält man nicht sehr verschiedene $\langle x^2 \rangle_t$ -Werte. Erst bei sehr hohen Temperaturen wird das oxidierte native Protein deutlich flexibler als das reduzierte. Der C77S-Austausch hat einen starken Einfluss auf die Dynamik. Überraschenderweise ist das Eisenzentrum in der reduzierten Mutante rigider als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigt die oxidierte Mutante eine im Vergleich zum nativen Protein erhöhte Flexibilität. Die proteinspezifische Dynamik von reduziertem und oxidiertem HiPIP *C. vinosum* C77S ist im gesamten physiologischen Temperaturbereich deutlich verschieden.

6.7 Charakterisierung teilweise entfalteter HiPIPs

Die aus den beschriebenen Fe-EXAFS- und Mößbauer-Experimenten am reduzierten nativen und teilweise entfalteten HiPIP *C. vinosum* abzuleitenden strukturellen Informationen sind im Kontext vorliegender NMR-Resultate zu deuten (Bertini et al. 1997). Letztere Arbeiten zeigen eine weitgehend aufgelöste Sekundärstruktur des entfalteten Proteins (Abb. 1.6). Die

⁴ So wird beispielsweise ein starker Anstieg der photosynthetischen Elektronentransferrate im bakteriellen und pflanzlichen Photosystem sowie das Einsetzen proteinspezifischer Dynamik bei derselben Grenztemperatur beobachtet.

vierfache Cysteinligandierung des nach wie vor intakten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Kubanes bleibt NMR zufolge bei der teilweisen Entfaltung jedoch erhalten. Letzteres deckt sich mit den EXAFS-Ergebnissen von Tab. 5.12. Diese zeigen eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Clusterstruktur im Wildtyp und im entfalteten Protein (Abb. 5.24a-d). In Details sind jedoch Unterschiede im EXAFS-Spektrum zu erkennen, man vergleiche etwa den Bereich der Wellenzahlen um $k = 8 \text{ \AA}^{-1}$. Die Eisen-Schwefel-Bindungen sind trotz der Entfaltung unverseht, wenngleich sich die Bindungsabstände moderat verändern. Die Cysteinschwefel entfernen sich um fast 0.1 \AA von ihren Eisen-Bindungspartnern. Innerhalb des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters hingegen verändern sich die Eisen-Schwefel-Distanzen nur äußerst marginal. Dass die Elektronenkonfiguration im Metallzentrum durch die Entfaltung unverändert fortbesteht, wird durch die identischen Mößbauer-Parameter angezeigt (Tab. 5.9). Während also die Entfaltung des Proteinrückgrats im *molten globule* bereits fortgeschritten ist, hält das Metallzentrum in seiner Umgebung einen erheblichen Ordnungsgrad aufrecht. Wenn die prosthetische Gruppe also eine geordnete Struktur in seiner Umgebung unterstützt, während die Aminosäurekette keine Sekundärstruktur ausbildet, so ist im Umkehrschluss zu folgern, dass der Eisen-Schwefel-Cluster physiologisch als Keimstelle für Proteinfaltung fungiert. Seine Bindung mit dem ansonsten strukturell undefinierten Proteinrückgrat bildet ein Zentrum der Stabilität.

Auch das sechsfach koordinierte Hämeisen in nativem und ungefaltetem Cytochrom *c* wurde mittels Fe-EXAFS untersucht (Zhang und Stern 1995), und die Resultate sind mit den am HiPIP erhaltenen kompatibel. Der Ordnungsgrad in der teilweise entfalteten Aminosäurekette des Cytochroms *c* wurde mit dem Begriff *random coil* ("Zufallsknäuel") beschrieben. EXAFS-Messungen an diesem System zeigten allerdings, dass die direkte Umgebung des Metallzentrums wiederum nur sehr geringe Änderungen verglichen mit dem Wildtyp aufweist. Auch in Hämgruppen scheint das biologische Eisen also ein Stabilisierungsfaktor zu sein, in dessen Umgebung selbst dann noch eine mit dem nativen Zustand vergleichbare Ordnung herrscht, wenn die Aminosäurekette ihre Sekundärstruktur bereits weitgehend verloren hat. Wie im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster des HiPIPs sind auch im Cytochrom die Bindungsabstände innerhalb der prosthetischen Gruppe praktisch unverändert, während sich die Liganden infolge der teilweisen Entfaltung vom Metallzentrum entfernen.

Damit liegen für zwei bedeutende Typen von Metallzentren in Proteinen - Hämgruppe und Eisen-Schwefel-Cluster - deutliche Hinweise vor, dass in der direkten Umgebung prosthetischer Gruppen ein Stabilitätsmaximum innerhalb des Proteins vorliegt. Der weit fortgeschrittenen Denaturierung großer Proteinbereiche zum Trotz ist an dieser Stelle die Bindung des Metallzentrums an die Aminosäurekette erhalten und die Struktur nur geringfügig modifiziert. Es liegt damit nahe, Eisenzentren eine Schlüsselrolle in der Frühphase des Faltungsprozesses eines Proteins zuzusprechen. Wenn sich die Bindung des Metallzentrums mit der Aminosäurekette erst einmal ausgebildet hat, kann der Rest des Proteins die Energielandschaft abtasten und dann durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken in ein tieferes Energieminimum einlaufen. Die Formierung der Eisen-Cystein-Bindungen könnte als Keimbildungsprozess und wichtiger Zwischenschritt auf dem Weg zum gefalteten HiPIP anzusehen sein. In dem in Abb. 6.8 modellhaft dargestellten Faltungsprozess symbolisiert das als *molten globule* bezeichnete lokale Potentialminimum folglich einen HiPIP-Zustand, in dem die Aminosäurekette bereits über die Cysteine an das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum

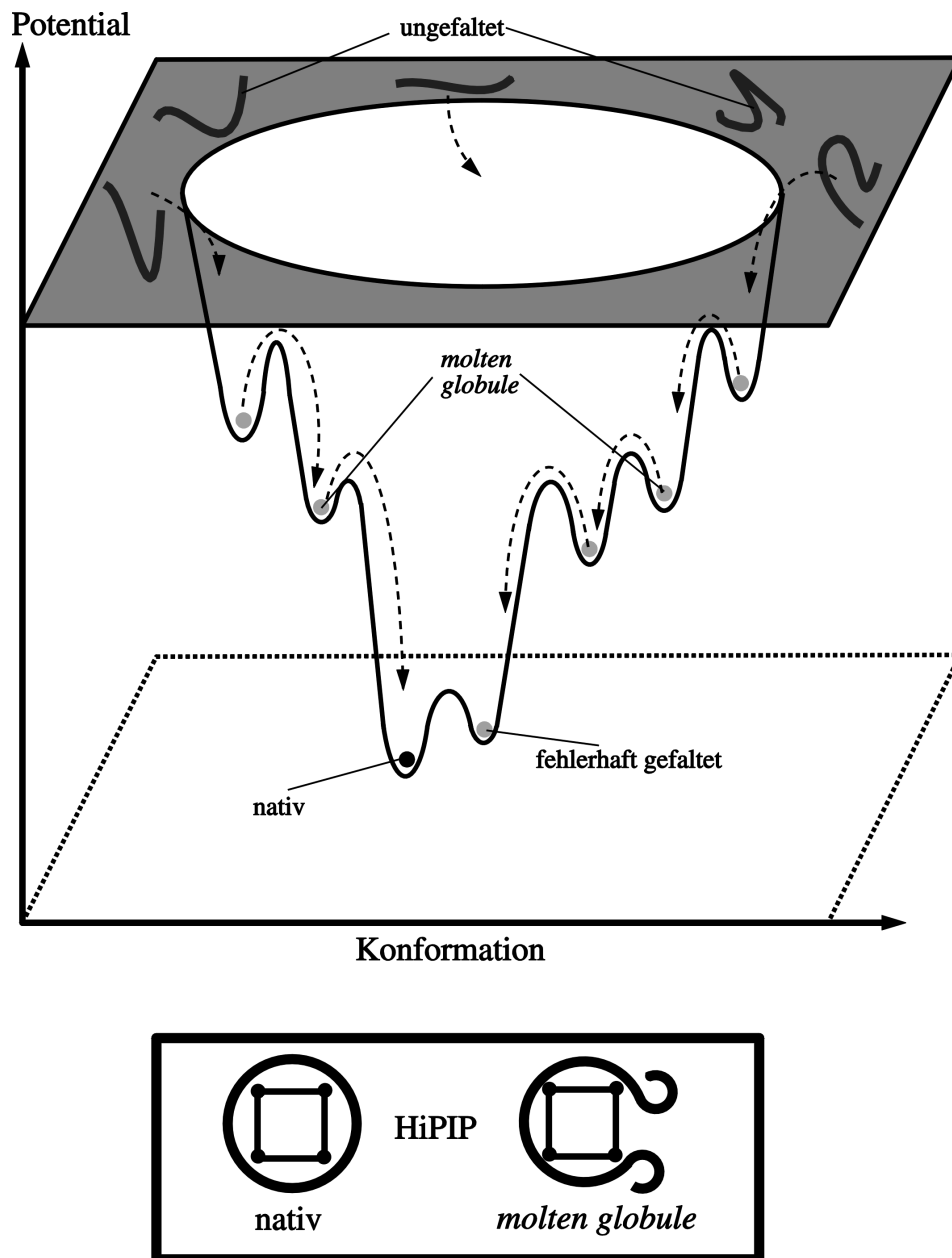


Abb. 6.8 Faltung von HiPIPs in der Energielandschaft

angedockt hat, aber noch keine Sekundärstruktur ausgebildet hat (Schultz 2000). Durch die Anlagerung des Metallzentrums an das Proteinrückgrat wird der in Frage kommende Bereich der Energielandschaft eingeschränkt und das Protein darin unterstützt, in kürzerer Zeit die native Endkonformation zu erreichen. Die katalytische Wirkung von Metallzentren auf die Proteinfaltung wird auch durch das Phänomen des *cofactor-assisted folding* angezeigt. Dieses beschreibt die Tatsache, dass bei der Zugabe des Co-Faktors zu einer Lösung von Apo-Protein spontane Faltung erfolgt (Grandori et al. 2000).

Die mit dem Mößbauer-Effekt untersuchte Tieftemperaturdynamik von ungefaltetem und gefaltetem HiPIP *C. vinosum* WT zeigt keine nennenswerten Unterschiede (Tab. 5.10b). Damit bildet auch das *molten globule* keine Ausnahme von der Regel, dass der von harmonischen Gitterschwingungen geprägte Temperaturbereich sich zwischen HiPIPs in

verschiedenartigen Zuständen nicht unterscheidet. In diesem Licht ist der im ungefalteten Protein deutlich erhöhte EXAFS-Debye-Waller-Faktor mitnichten als Zeichen erhöhter Flexibilität interpretierbar. Er ist vielmehr Ausdruck eines Verlustes an struktureller Korrelation innerhalb des Metallzentrums: die Inhomogenität in der Probe nimmt durch die Entfaltung zu, Bindungsabstände streuen breiter um ihre Mittelwerte.

Im physiologischen Temperaturbereich allerdings beeinflusst die Entfaltung die dynamischen Eigenschaften maßgeblich. Abb. 5.20d zeigt die $\langle x^2 \rangle(T)$ -Kurven in beiden untersuchten Faltungszuständen. Oberhalb der charakteristischen Temperatur, T_C , knickt die Kurve des ungefalteten Proteins weitaus drastischer nach oben ab als im nativen Protein. Ab 240 K nimmt die proteinspezifische Dynamik schlagartig so stark zu, dass oberhalb 246 K kein Mößbauer-Spektrum mehr aufgenommen werden konnte. Damit ist die reduzierte *molten globule* Probe wesentlich flexibler als alle anderen untersuchten HiPIP-Konfigurationen (Abb. 5.20). Die Stabilität der reduzierten Proteinstruktur ist also durch die Entfaltung herabgesetzt. Oxidiertes HiPIP *C. vinosum*, das bei Zugabe des Entfaltungsagenten irreversibel denaturiert, scheint eine noch stärkere Dynamik zu zeigen als sein reduziertes Pendant. Der starke Anstieg an Flexibilität wird daher als Schritt in Richtung zu vollständiger Denaturierung zu deuten sein. Wiederum bestätigt sich die in Kap. 6.6 formulierte Regel, dass reduziertes HiPIP rigider ist als oxidiertes. Der dramatisch erhöhte Anteil $\langle x^2 \rangle_t$ spiegelt die Tatsache wider, dass sich infolge der Entfaltung die Freiheit des Proteins im Konformationsraum vergrößert. Ein Zuwachs an Dynamik aufgrund verstärkter Übergänge zwischen Konformationszuständen ist auch in NMR-Untersuchungen am teilweise ungefalteten HiPIP *C. vinosum* WT zu Tage getreten und dort als *conformational averaging* bezeichnet worden (Bentrop et al. 1999). Somit liefern auch in Bezug auf die Proteindynamik des ungefalteten HiPIPs die verschiedenen Spektroskopien ein rundes Bild.

Anhang A Mößbauer-Parameter von sieben HiPIPs

reduziertes HiPIP I <i>E. halophila</i>								
T [K]	R _{cor} [%]	t _a	δ [mm s ⁻¹]	ΔE _Q [mm s ⁻¹]	ξ ₁ [mm s ⁻¹]	ξ ₂ [mm s ⁻¹]	<x ² > [10 ⁻² Å ²]	<x _t ² > [10 ⁻² Å ²]
80	95.447	3.77645	0.431	0.919	0.31	-	0.658	-
100	95.373	3.47908	0.423	0.884	0.30	-	0.812	-
120	95.207	3.24257	0.414	0.855	0.29	-	0.944	-
140	95.294	2.98958	0.405	0.829	0.28	-	1.096	-
160	95.175	2.75142	0.395	0.804	0.27	-	1.253	-
180	94.082	2.49966	0.383	0.782	0.26	-	1.433	-
190	95.473	2.37566	0.385	0.783	0.27	-	1.529	-
200	94.520	2.25652	0.373	0.763	0.25	-	1.625	-
205	95.440	2.14928	0.376	0.765	0.26	2.25	1.717	0.078
210	95.291	2.08240	0.370	0.770	0.25	2.28	1.776	0.098
215	95.514	1.98028	0.367	0.762	0.25	2.51	1.870	0.152
220	94.480	1.88385	0.365	0.757	0.25	2.17	1.964	0.208
225	95.525	1.81527	0.365	0.746	0.25	2.19	2.034	0.235
230	95.351	1.65504	0.359	0.746	0.25	2.16	2.207	0.369
240	95.367	1.40608	0.355	0.728	0.25	2.11	2.513	0.595
250	95.325	1.07544	0.348	0.711	0.26	2.68	3.017	1.019

Ausgleichsgerade [80 K; 200 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.799 \pm 0.019)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} T \pm 2.8 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
⁵⁷Fe-Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 2.09 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2}$

oxidiertes HiPIP I <i>E. halophila</i>								
T [K]	R _{cor} [%]	t _a	δ [mm s ⁻¹]	ΔE _Q [mm s ⁻¹]	ξ ₁ [mm s ⁻¹]	ξ ₂ [mm s ⁻¹]	<x ² > [10 ⁻² Å ²]	<x _t ² > [10 ⁻² Å ²]
82	91.624	1.47161	0.326	0.782	0.34	-	0.688	-
102	91.698	1.36407	0.325	0.760	0.23	-	0.831	-
120	91.637	1.27452	0.319	0.745	0.21	-	0.958	-
140	91.393	1.16640	0.309	0.723	0.20	-	1.125	-
160	91.421	1.06609	0.300	0.714	0.22	-	1.294	-
170	91.261	1.02581	0.297	0.707	0.22	-	1.366	-
182	91.163	0.97345	0.292	0.697	0.19	-	1.464	-
189	91.555	0.93274	0.286	0.693	0.20	-	1.544	-
196	91.344	0.90350	0.284	0.691	0.21	-	1.604	-
201	91.279	0.88226	0.281	0.687	0.20	-	1.649	-
204	91.434	0.84210	0.277	0.687	0.18	1.23	1.736	0.077
210	91.436	0.80917	0.276	0.689	0.18	1.61	1.811	0.108
215	91.489	0.76368	0.272	0.682	0.19	1.45	1.920	0.170
221	91.325	0.72830	0.270	0.682	0.20	1.71	2.009	0.211
226	91.459	0.68579	0.268	0.679	0.18	1.45	2.122	0.284
231	91.302	0.66872	0.264	0.676	0.20	2.00	2.169	0.288
236	91.571	0.58172	0.261	0.673	0.24	1.58	2.431	0.514
240	91.392	0.51759	0.258	0.673	0.20	1.58	2.650	0.699

245	91.184	0.42287	0.256	0.668	0.25	2.40	3.030	1.036
251	91.347	0.20127	0.226	0.672	0.42	3.54	4.424	2.386

Ausgleichsgerade [82 K; 201 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.813 \pm 0.013)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 2.0 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
 ^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 8.29 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$

reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> WT								
T	R _{cor}	t _a	δ	ΔE _Q	ξ ₁	ξ ₂	⟨x ² ⟩	⟨x _t ² ⟩
[K]	[%]		[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[10 ⁻² Å ²]	[10 ⁻² Å ²]
81	91.890	2.76965	0.426	1.085	0.20	-	0.750	-
105	92.184	2.54293	0.418	1.066	0.20	-	0.910	-
123	91.941	2.31884	0.409	1.044	0.20	-	1.083	-
142	92.174	2.09539	0.402	1.020	0.20	-	1.274	-
163	92.100	1.93901	0.390	0.988	0.20	-	1.419	-
183	91.705	1.75320	0.379	0.958	0.19	-	1.608	-
193	91.551	1.64379	0.376	0.946	0.20	-	1.729	-
199	92.360	1.59250	0.372	0.933	0.20	-	1.789	-
204	91.910	1.49127	0.370	0.926	0.20	1.50	1.912	0.103
209	91.912	1.43038	0.369	0.920	0.20	4.48	1.991	0.136
214	91.760	1.36662	0.366	0.909	0.19	3.29	2.076	0.180
219	91.974	1.26297	0.359	0.896	0.20	2.73	2.220	0.272
224	91.837	1.17380	0.359	0.890	0.19	2.10	2.362	0.372
229	92.104	1.05513	0.354	0.885	0.19	2.08	2.562	0.531
234	92.022	0.95668	0.353	0.875	0.20	2.28	2.746	0.666
245	91.973	0.64903	0.346	0.866	0.19	2.07	3.474	1.305
255	92.011	0.19921	0.343	0.831	0.36	3.79	5.692	3.432

Ausgleichsgerade [81 K; 199 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.887 \pm 0.022)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 3.3 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
 ^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 1.61 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2}$

oxidiertes HiPIP <i>C. vinosum</i> WT								
T	R _{cor}	t _a	δ	ΔE _Q	ξ ₁	ξ ₂	⟨x ² ⟩	⟨x _t ² ⟩
[K]	[%]		[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[10 ⁻² Å ²]	[10 ⁻² Å ²]
80	93.295	1.63276	0.323	0.805	0.32	-	0.728	-
101	93.139	1.53079	0.326	0.767	0.21	-	0.849	-
119	93.387	1.41055	0.322	0.755	0.19	-	1.003	-
138	93.096	1.27082	0.314	0.743	0.21	-	1.219	-
157	93.323	1.17796	0.305	0.732	0.20	-	1.341	-
171	93.248	1.09180	0.297	0.725	0.19	-	1.484	-
181	93.613	1.04277	0.293	0.721	0.18	-	1.570	-
186	93.368	1.00793	0.288	0.720	0.20	-	1.634	-
191	93.693	0.95197	0.288	0.716	0.17	2.33	1.741	0.085
196	93.417	0.91560	0.284	0.716	0.19	1.49	1.814	0.115
200	93.740	0.88635	0.282	0.712	0.18	1.94	1.875	0.137
205	93.429	0.85746	0.279	0.711	0.19	2.68	1.937	0.158
211	93.686	0.80929	0.278	0.710	0.18	1.87	2.046	0.219
215	93.628	0.77347	0.272	0.709	0.25	2.08	2.131	0.264
221	93.454	0.73045	0.269	0.707	0.26	2.60	2.238	0.325

225	93.544	0.68860	0.267	0.705	0.27	2.57	2.349	0.394
231	93.383	0.61139	0.265	0.704	0.24	2.23	2.573	0.571
236	93.500	0.53351	0.263	0.705	0.21	1.94	2.823	0.784
241	93.639	0.45119	0.260	0.696	0.23	2.70	3.143	1.055
246	93.446	0.32232	0.259	0.695	0.26	3.07	3.775	1.642
251	93.347	0.18371	0.244	0.700	0.34	3.80	4.830	2.656
254	93.440	0.05892	0.223	0.701	0.59	4.71	6.966	4.760

Ausgleichsgerade [80 K; 186 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.867 \pm 0.024)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 3.4 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
 ^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 9.40 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$

reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S								
T	R _{cor}	ta ₁ +ta ₂	δ _{1/2}	ΔE _{Q1/2}	ξ _{1/2}	ξ _{3/4}	⟨x ² ⟩	⟨x _t ² ⟩
[K]	[%]	=4/3 t _{a1}	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[10 ⁻² Å ²]	[10 ⁻² Å ²]
80	95.031	1.93418	0.388/0.626	1.116/1.004	0.18/0.05	-	0.664	-
100	94.749	1.79838	0.383/0.615	1.086/0.979	0.19/0.05	-	0.801	-
120	94.560	1.65632	0.374/0.606	1.047/0.944	0.19/0.03	-	0.955	-
140	94.707	1.53060	0.366/0.597	1.015/0.910	0.18/0.01	-	1.103	-
160	94.834	1.40665	0.357/0.581	0.976/0.871	0.19/0.03	-	1.262	-
180	94.897	1.26431	0.351/0.563	0.939/0.834	0.19/0.09	-	1.462	-
190	94.929	1.21196	0.345/0.552	0.915/0.809	0.19/0.07	-	1.541	-
200	94.885	1.14449	0.344/0.533	0.892/0.779	0.20/0.11	2.94/2.80	1.649	0.043
205	95.000	1.11182	0.344/0.522	0.878/0.764	0.21/0.09	3.10/1.90	1.703	0.058
210	95.188	1.04576	0.341/0.522	0.864/0.764	0.19/0.07	2.83/2.47	1.818	0.132
215	95.206	1.03770	0.338/0.510	0.859/0.747	0.20/0.07	3.51/2.14	1.833	0.107
220	95.197	0.99156	0.338/0.503	0.847/0.732	0.21/0.08	1.80/4.30	1.887	0.120
225	95.207	0.95195	0.334/0.499	0.838/0.732	0.20/0.05	2.33/2.02	1.995	0.188
230	95.176	0.87308	0.334/0.494	0.835/0.719	0.20/0.05	1.45/3.44	2.157	0.311
235	95.192	0.83567	0.332/0.482	0.829/0.697	0.22/0.08	2.52/2.01	2.224	0.353
240	95.120	0.76344	0.333/0.483	0.821/0.708	0.22/0.08	2.65/4.13	2.409	0.482
250	95.205	0.49532	0.320/0.491	0.818/0.713	0.21/0.08	1.70/4.91	3.222	1.214
260	95.109	0.15857	0.317/0.474	0.815/0.680	0.44/0.34	4.57/5.00	5.360	3.273

Ausgleichsgerade [80 K; 190 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.803 \pm 0.021)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 2.9 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
 ^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 1.08 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2}$

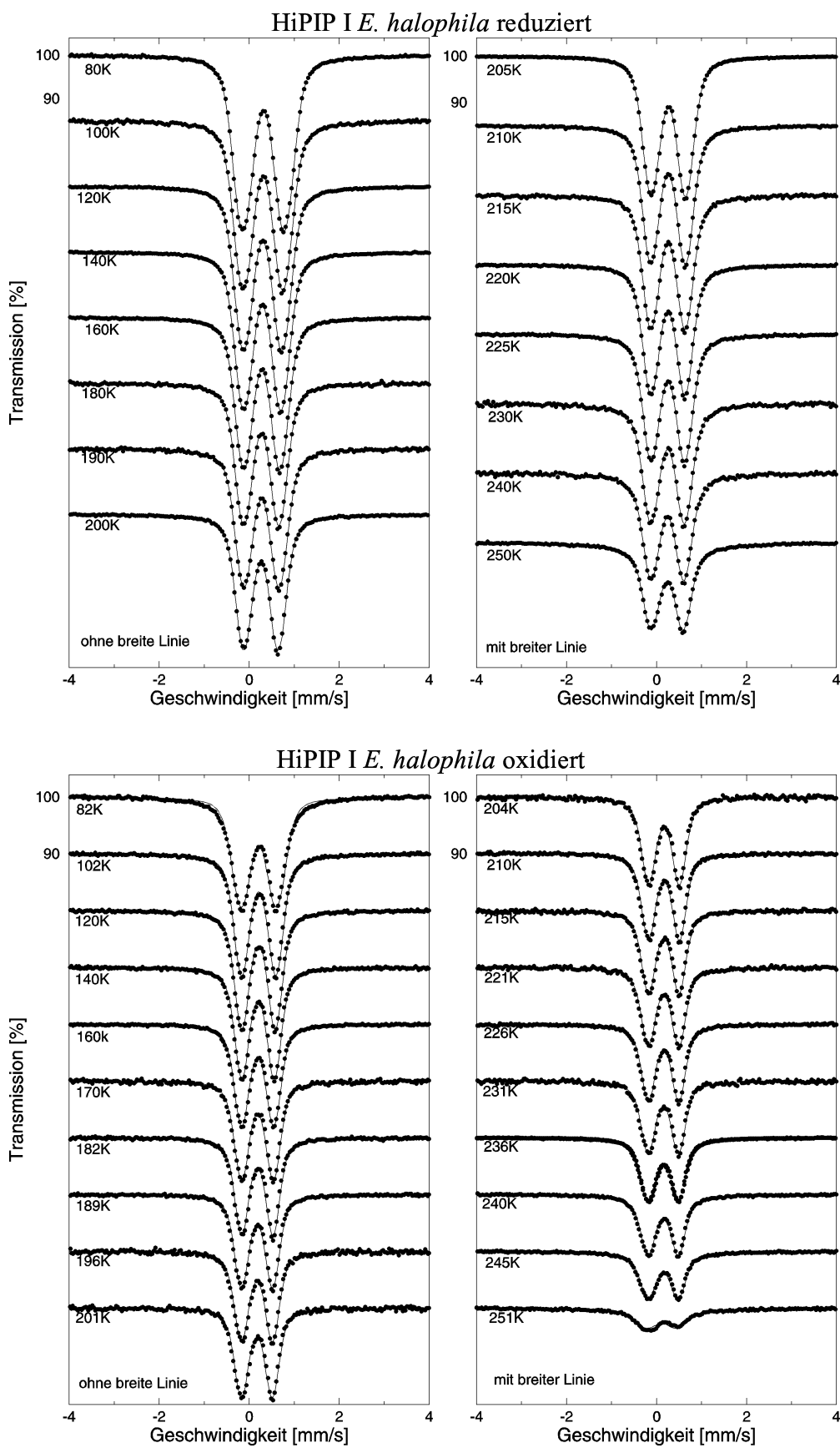
oxidiertes HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S								
T	R _{cor}	ta ₁ +ta ₂	δ _{1/2}	ΔE _{Q1/2}	ξ _{1/2}	ξ _{3/4}	⟨x ² ⟩	⟨x _t ² ⟩
[K]	[%]	=4/3 t _{a1}	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[10 ⁻² Å ²]	[10 ⁻² Å ²]
83	93.879	0.55456	0.328/0.459	0.868/0.810	0.21/0.32	-	0.707	-
100	93.751	0.52738	0.323/0.457	0.858/0.782	0.20/0.29	-	0.801	-
120	94.049	0.48253	0.314/0.437	0.841/0.772	0.21/0.24	-	0.968	-
140	94.027	0.44209	0.303/0.440	0.825/0.766	0.20/0.24	-	1.133	-
152	93.625	0.42039	0.301/0.422	0.813/0.777	0.27/0.33	-	1.227	-
166	93.639	0.39690	0.294/0.403	0.814/0.759	0.21/0.21	-	1.335	-
173	93.535	0.38337	0.284/0.415	0.803/0.762	0.22/0.24	-	1.400	-
180	94.091	0.37133	0.281/0.425	0.805/0.758	0.20/0.22	-	1.460	-
186	94.043	0.35439	0.285/0.416	0.799/0.758	0.21/0.25	-	1.548	-

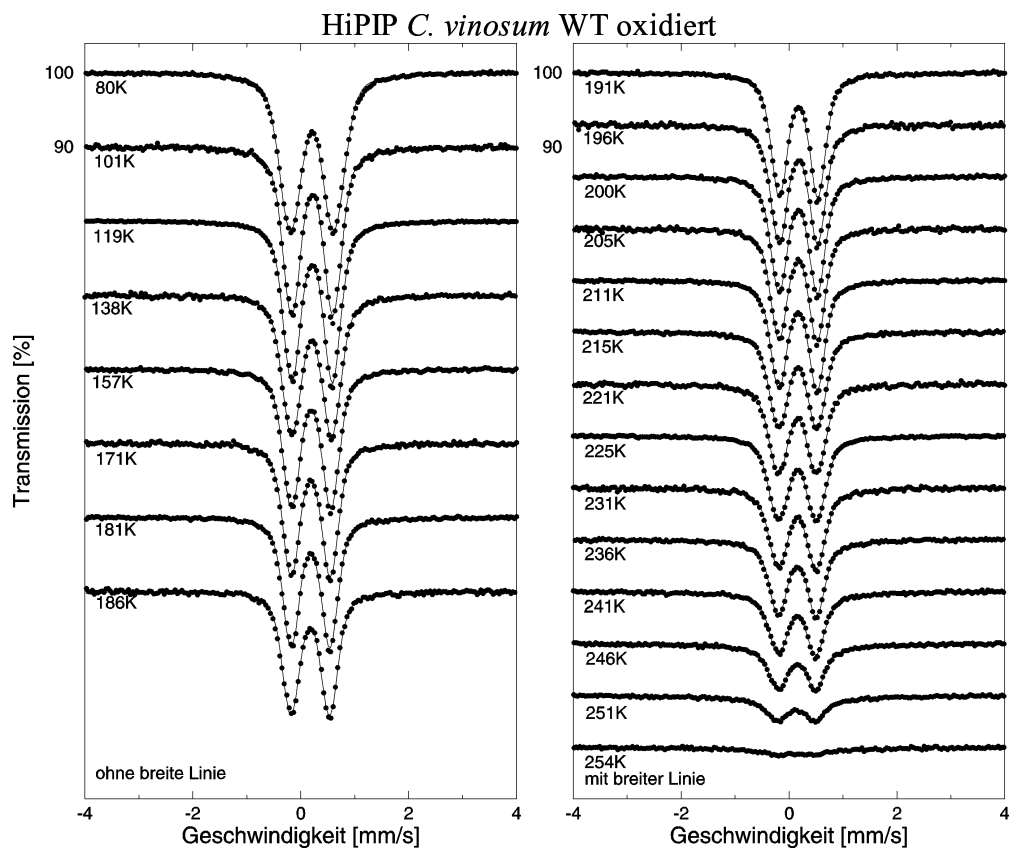
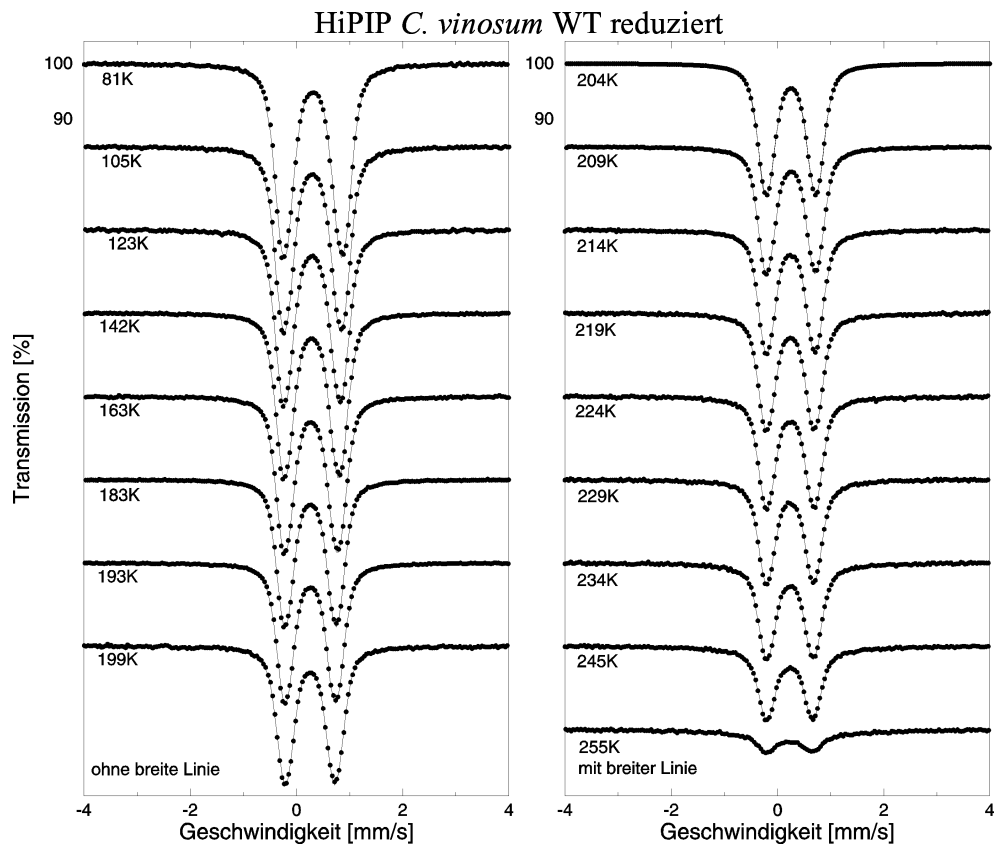
191	94.138	0.35007	0.274/0.421	0.804/0.744	0.22/0.22	-	1.571	-
196	94.077	0.32095	0.274/0.407	0.804/0.768	0.21/0.20	0.96/1.47	1.734	0.132
201	94.066	0.31323	0.270/0.411	0.794/0.777	0.22/0.19	1.16/2.21	1.780	0.140
206	94.096	0.29488	0.262/0.415	0.803/0.766	0.21/0.18	0.99/1.89	1.893	0.210
211	93.601	0.28563	0.270/0.387	0.794/0.761	0.21/0.20	1.22/2.42	1.953	0.229
217	93.627	0.26415	0.261/0.400	0.794/0.782	0.21/0.19	1.26/3.58	2.100	0.333
222	93.650	0.25480	0.261/0.383	0.790/0.782	0.20/0.23	1.37/1.56	2.167	0.354
227	93.939	0.25122	0.249/0.423	0.771/0.782	0.23/0.19	1.42/4.08	2.194	0.345
232	93.492	0.23447	0.257/0.425	0.780/0.749	0.20/0.19	1.90/4.68	2.323	0.432
237	93.438	0.19717	0.262/0.400	0.787/0.747	0.22/0.29	1.42/1.84	2.649	0.715
243	93.864	0.14453	0.263/0.407	0.765/0.771	0.26/0.31	1.89/3.74	3.232	1.252
248	93.585	0.06731	0.267/0.394	0.750/0.730	0.38/0.38	2.57/3.74	4.667	2.642

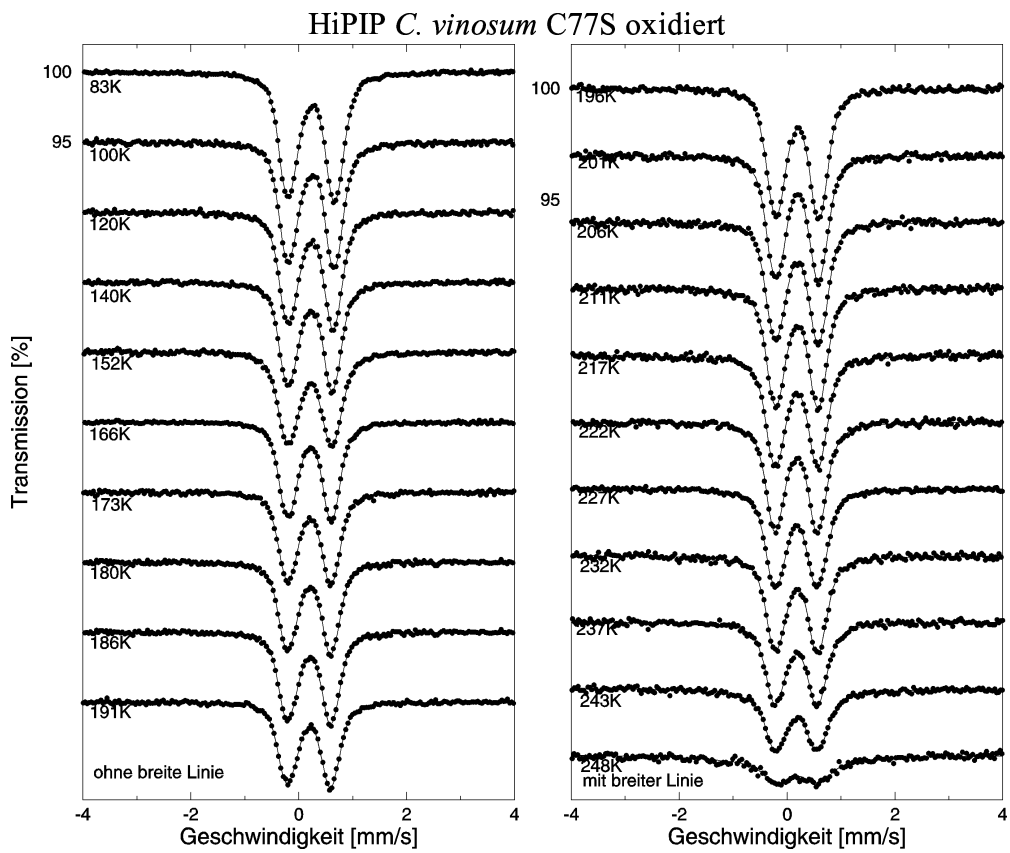
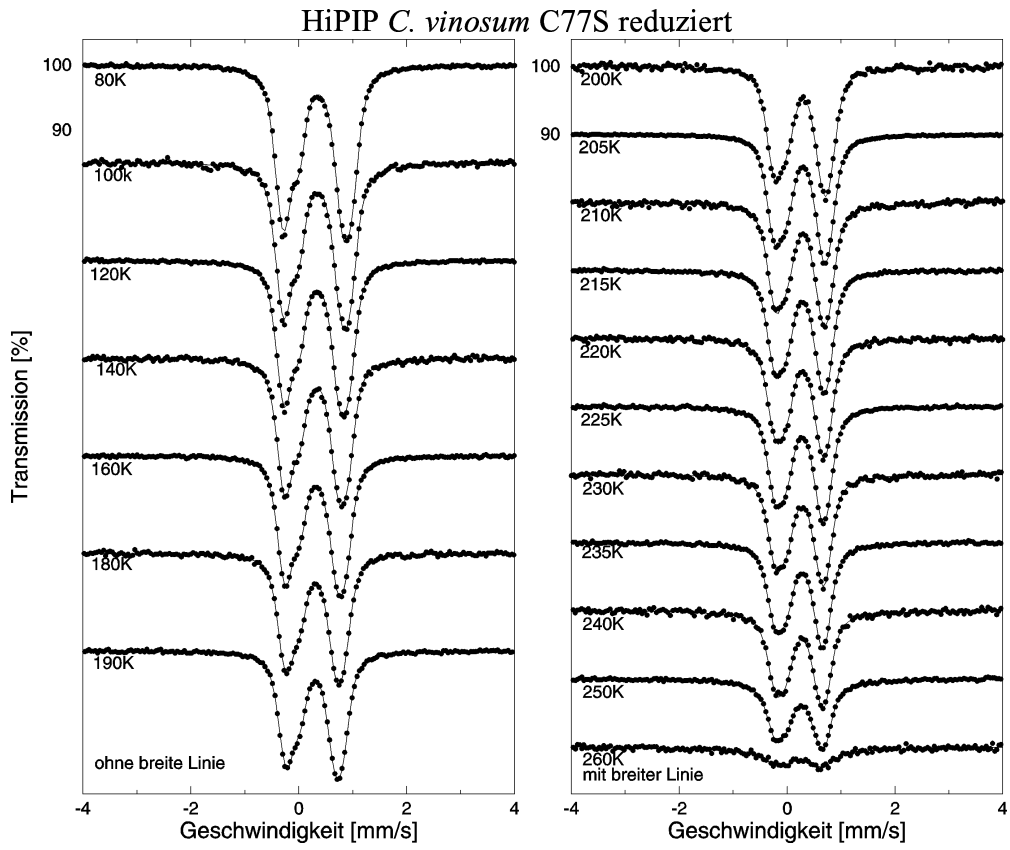
Ausgleichsgerade [83 K; 191 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.815 \pm 0.017)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 2.6 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
 ^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 3.16 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$

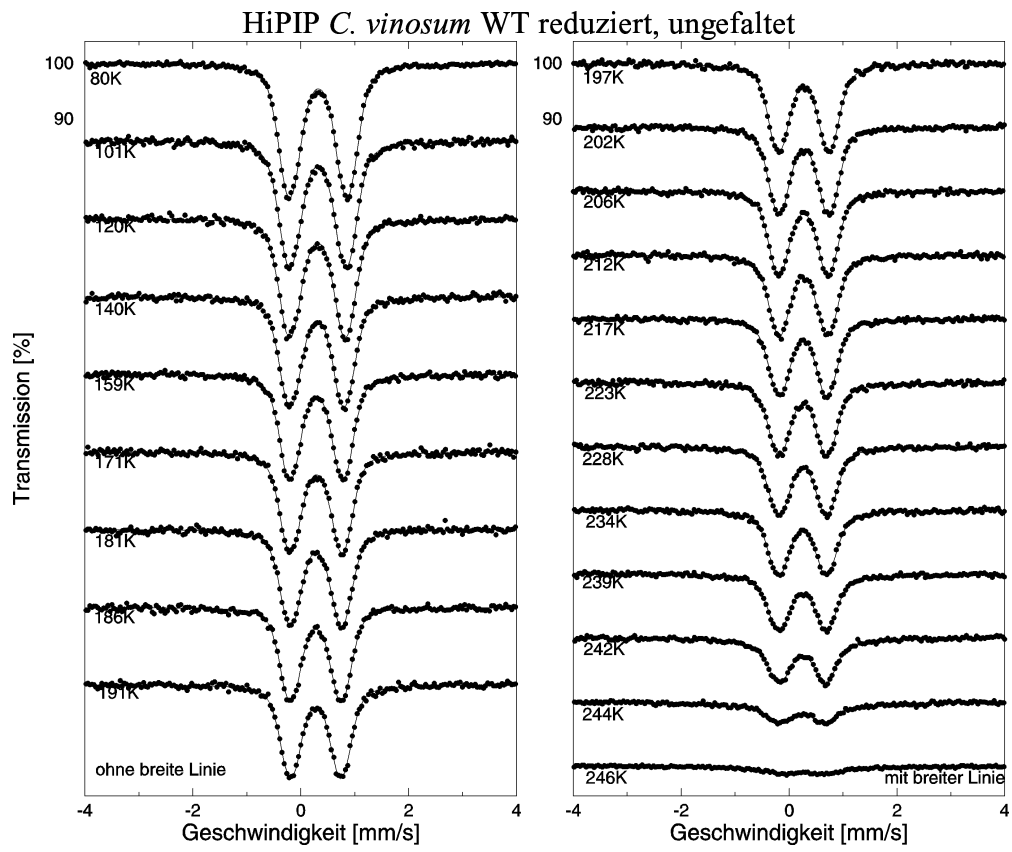
reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> WT ungefaltet								
T	R _{cor}	t _a	δ	ΔE _Q	ξ ₁	ξ ₂	$\langle x^2 \rangle$	$\langle x_t^2 \rangle$
[K]	[%]		[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[mm s ⁻¹]	[10 ⁻² Å ²]	[10 ⁻² Å ²]
80	89.019	2.23010	0.437	1.063	0.30	-	0.720	-
101	89.373	2.05289	0.432	1.042	0.30	-	0.876	-
120	89.641	1.86820	0.425	1.026	0.30	-	1.053	-
140	89.358	1.71251	0.417	0.998	0.31	-	1.216	-
159	89.570	1.57525	0.405	0.979	0.29	-	1.372	-
171	89.787	1.49202	0.401	0.959	0.29	-	1.475	-
181	89.853	1.40886	0.398	0.949	0.30	-	1.583	-
186	89.573	1.36203	0.392	0.941	0.29	-	1.646	-
191	89.724	1.32697	0.392	0.932	0.29	-	1.695	-
197	89.753	1.21884	0.385	0.930	0.29	2.76	1.855	0.134
202	90.064	1.19207	0.386	0.924	0.28	1.27	1.896	0.133
206	89.959	1.12757	0.381	0.913	0.28	1.45	2.001	0.196
212	89.824	1.08891	0.380	0.898	0.29	2.27	2.066	0.211
217	89.846	1.05158	0.373	0.887	0.30	2.28	2.132	0.230
223	90.334	0.98374	0.371	0.883	0.30	3.13	2.257	0.304
228	89.852	0.93470	0.368	0.881	0.32	3.73	2.353	0.354
234	89.779	0.83318	0.363	0.885	0.30	2.31	2.569	0.524
239	89.761	0.72064	0.362	0.878	0.32	2.48	2.841	0.749
242	89.708	0.49706	0.358	0.865	0.30	2.16	3.539	1.424
244	90.096	0.23939	0.355	0.841	0.41	3.75	4.911	2.773
246	90.192	0.07848	0.386	0.749	0.40	4.25	7.005	4.853

Ausgleichsgerade [80 K; 191 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.875 \pm 0.015)10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$
 ^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 1.28 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2}$

Anhang B Mößbauer-Spektren von sieben HiPIPs







Quellenverzeichnis

Abraham, A, Bleaney, B "Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions" Dover Publications, New York, 1986

Afanas'ev, AM, Gorobchenko, VD, Dézsi, I, Lukashevich, II, Filippov, NI (1972) Soviet Physics JETP 35:355-360

Afanas'ev, AM, Gorobchenko, VD (1974) Soviet Phys JETP 39:690-696

Afanas'ev, AM, Tsymbal, EY, Iakovleva, OA (1988) Hyperfine Interactions 39:269-293

Agarwal, A, Li, D, Cowan, JA (1996) J Am Chem Soc 118:927-928

Alger, RS "Electron Paramagnetic Resonance: Techniques and Applications" Interscience Publishers, New York, 1968

Altschuler, SA, Kosyrew, BM "Paramagnetische Elektronenresonanz" Verlag Harry Deutsch, Zürich, 1964

Anderson, RE, Anger, G, Petersson, L, Ehrenberg, A, Cammack, R, Hall, DO, Mullinger, R, Rao, KK (1975) Biochim Biophys Acta 356:63-71

Antanaitis, BC, Moss, TH (1975) Biochim Biophys Acta 405:262-279

Ausubel et al. (Herausgeber) "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Publishers, 1992 (Abschnitt 1.8))

Babini, E, Bertini, I, Borsari, M, Capozzi, F, Dikiy, A, Eltis, LD, Luchinat, C (1996) J Am Chem Soc 118:75-80

Banci, L, Bertini, I, Briganti, F, Scozzafava, A, Oliver, MV, Luchinat, C (1991) Inorg Chim Acta 180:171-175

Banci, L, Bertini, I, Ciurli, S, Ferretti, S, Luchinat, C, Piccioli, M (1993) Biochemistry 32:9387-9397

Banci, L, Bertini, I, Ferretti, S, Luchinat, C, Piccioli, M (1993a) J Molecular Structure 292:207-220

Banci, L, Bertini, I, Eltis, LD, Felli, IC, Kastrau, DHW, Luchinat, C, Piccioli, M, Pierattelli, R, Smith, M (1994) Eur J Biochem 225:715-725

- Bauminger, ER, Cohen, SG, Nowik, I, Ofer, S, Yariv, J (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:736-740
- Belinskii, M, Bertini, I, Galas, O, Luchinat, C (1995) Z Naturforsch 50a:75-80
- Belinskiy, M, Bertini, I, Galas, O, Luchinat, C (1996) Inorg Chim Acta 243:91-99
- Bencini, A, Gatteschi, D "Electron paramagnetic resonance of exchange-coupled systems", VCH Verlag, Berlin, 1990
- Bentrop, D, Bertini, I, Capozzi, F, Dikey, A, Eltis, L, Luchinat, C (1996) Biochemistry 35:5928-5936
- Bentrop, D, Bertini, I, Iacoviello, R, Luchinat, C, Niikura, Y, Piccioli, M, Presenti, C, Rosato, A (1999) Biochemistry 38:4669-4680
- Bertini, I, Ciurli, S, Dikiy, A, Luchinat, C (1993) J Am Chem Soc 115:12020-12028
- Bertini, I, Campos, AR, Luchinat, C, Teixeira, M (1993a) J Inorg Biochem 52:227-234
- Bertini, I, Ciurli, S, Luchinat, C (1995) Struct Bonding 83:1-53
- Bertini, I, Dikey, A, Kastrau, DHW, Luchinat, C, Sompornpisut, C (1995a) Biochemistry 34:9851-9861
- Bertini, I, Capozzi, F, Eltis, LD, Felli, IC, Luchinat, C, Piccioli, M (1995b) Inorg Chem 34:2516-2523
- Bertini, I, Luchinat, C (1996) JBIC 1:183-185
- Bertini, I, Cowan, JA, Luchinat, C, Natarajan, K, Piccioli, M (1997) Biochemistry 36:9332-9339
- Bertrand, P, Gayda, JP (1981) J Chem Phys 76:4715-4719
- Bill, E, Haas, C, Ding, XD, Maret, W, Winkler, H, Trautwein, AX, Zeppezauer, M (1989) Eur J Biochem 180:111-121
- Binsted, N, Strange, RW, Hasnain, SS (1992) Biochemistry 31:12117-12125
- Blondin, G, Girerd, JJ (1990) Chem Rev 90:1359-1375
- Blume, M (1967) Phys Rev Letters 18:305-308

- Breiter, DR, Meyer, TE, Rayment, I, Holden, HM (1991) *J Biol Chem* 266:18660-18667
- Calzolari, L, Gorst, CM, Zhao, ZH, Teng, Q, Adams, MW, La-Mar, GN (1995) *Biochemistry* 34:11373-11384
- Calzolari, L, Gorst, CM, Bren, KL, Zhou, ZH, Adams, MWW, La Mar, GN (1997) *J Am Chem Soc* 119:9341-9350
- Cammack, R, Sykes AG (Herausgeber) "Iron sulfur proteins" *Advances in inorganic chemistry*, Vol. 38, Academic Press San Diego, 1992
- Capozzi, F, Ciurli, S, Luchinat, C (1998) *Struct Bonding* 90:127-160
- Carter, CW In: Lovenberg, W (Herausgeber) "Iron-Sulphur Proteins, Vol. 3, S. 157-204" Academic Press, New York, 1977
- Carter, CWJ, Kraut, J, Freer, ST, Alden, RA, Sieker LC, Adman, ET, Jensen, LH (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69:3526-3529
- Carter, CWJ, Kraut, J, Freer, ST, Xuong, NH, Alden, RA, Bartsch, RG (1974) *J Biol Chem* 249:4212-4225
- Chang, I (1992) "Mößbauerspektroskopie an Myoglobin: Untersuchung der Dynamik von Deoxy-Myoglobin-Kristallen" Diplomarbeit Johannes-Gutenberg Universität Mainz, Institut für Molekulare Biophysik
- Christensen, H, Pain, RH (1991) *Eur Biophys J* 19:221-229
- Ciszewska, H, Bagyinka, C, Tigyi, G, Kovács, KL (1989) *Acta Biochim Biophys Hung* 24:361-375
- Conover, RC, Kowal, AT, Fu, W, Park, JB, Aono, S, Adams, MWW, Johnson, MK (1990) *J Biol Chem* 265:8533-8541
- Creighton, TE "Protein Folding" In: Meyers, RA (Herausgeber) "Encyclopedia of molecular Biology and molecular Medicine, Vol. 5", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996
- Czernuscewicz, RS, Macor, KA, Johnson, MK, Gewirth, A, Spiro, TG (1987) *J Am Chem Soc* 109:7178-7187
- Danon, J "⁵⁷Fe: Metal, Alloys and Inorganic Compounds" In: Goldanskii, VI, Herber, RH (Herausgeber) "Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy", Academic Press, New York, 1968

Darnell, J, Lodish, H, Baltimore, D "Molecular Cell Biology", Scientific American Books
Freeman and Company, New York, 1990

Debrunner, PG, Münck, E, Que, L, Schulz, CE "Iron Sulphur Proteins, Vol. 3" Academic
Press New York San Francisco London, 1977

Dickson, DPE, Cammack, R (1974) *Biochem J* 143:763-765

Dilg, AWE, Mincione, G, Achterhold, K, Iakovleva, O, Mentler, M, Luchinat, C, Bertini, I,
Parak, FG (1999) *JBIC* 4:727-741

Dilg, AWE, Capozzi, F, Mentler, M, Iakovleva, O, Luchinat, C, Bertini, I, Parak, FG (2000a)
JBIC (im Druck)

Dilg, AWE, Grantner, K, Iakovleva, O, Parak, FG, Babini, E, Bertini, I, Capozzi, F, Luchinat,
C, Meyer-Klaucke, W (2000b) *Eur Biophys J* (eingereicht)

Doolittle, RF "Proteine" In: "Die Moleküle des Lebens", Spektrum der Wissenschaft Verlag
Heidelberg, 1986

Dunham, WR, Palmer, G, Sands, RH, Bearden, AJ (1971) *Biochim Biophys Acta* 253:373-
384

Dunham, WR, Bearden, AJ, Salmeen, IT, Palmer, G, Sands, RH, Orme-Johnson, WH,
Beinert, H (1971a) *Biochim Biophys Acta* 253:134-152

Dunham, WR, Hagen, WR, Fee, JA, Sands, RH, Dunbar, JB, Humblet, C (1991) *Biochim
Biophys Acta* 1079:253-262

Eltis, LD, Iwagami, SG, Smith, M (1994) *Protein Eng* 7:1145-1150

Fee, JA, Findling, KL, Yoshida, T, Hille, R, Tarr, GE, Hearshen, DO, Dunham, WR, Day,
EP, Kent, TA, Münck, E (1983) *J Biol Chem* 259:124-133

Feher, G (1956) *Phys Rev* 103:834-840

Fink, M, Geiger, J "Moleküle – Spektroskopie und Struktur" In: Raith, W (Herausgeber)
"Bergmann Schäfer – Lehrbuch der Experimentalphysik Band 4", de Gruyter Verlag, Berlin,
1992

Frauenfelder, H, Petsko, GA, Tsernoglou, D (1979) *Nature* 280:558-563

Frolov, EN, Fischer, M, Graffweg, E, Mirishly, MA, Goldanskii, VI, Parak, FG (1991) *Eur
Biophys J* 19:253-256

Frolov, EN, Gvosdev, R, Goldanskii, VI, Parak, FG (1997) *J Biol Inorg Chem* 2:710-713

Frotscher, M, Cullmann, C, Kappl, R, Hüttermann, J, Eltis, LD, Ciurli, S, Luchinat, C (1999) "EPR and ENDOR Studies on High-Potential Iron Sulfur Proteins: Electronic and Structural Aspects", Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Ulm, 1999

Gaffney, BJ, Silverstone, HJ "Simulation of the EMR Spectra of High-Spin Iron in Proteins" In: Berlinerand, L, Reuben, J (Herausgeber) "EMP of Paramagnetic Molecules" Plenum Verlag, New York, 1993

Garbers, A (1997) "Untersuchung der natürlichen Eisenzentren des Photosystems II aus *Spinacia oleracea* mit Hilfe der Mößbauer-Spektroskopie" Dissertation Technische Universität München, Institut für Kernphysik und Nukleare Festkörperphysik, Lehrstuhl E17 für Experimentalphysik

Gaßmann, A (2000) "Proteinspezifische Dynamik und Relaxation in Myoglobin" Dissertation Technische Universität München, Institut für Kernphysik und Nukleare Festkörperphysik, Lehrstuhl E17 für Experimentalphysik

Gayda, JP, Bertrand, P, Deville, A, More, C, Roger, G, Gibson, JF, Cammack, R (1979) *Biochim Biophys Acta* 581:15-26

George, GN, Prince, RC, Stockley, KE, Adams, MWW (1989) *Biochem J* 259:597-600

George, SJ, Armstrong, FA, Hatchikian, EC, Thomson, AJ (1989) *Biochem J* 264:275-284

Goldanskii, VI, Herber, R (Herausgeber) "Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy", Academic Press New York, 1968

Gonser, U (Herausgeber) "Mössbauer Spectroscopy", Topics in Applied Physics, Vol. 5, Springer Verlag Berlin, 1975

Gonser, U (Herausgeber) "Mössbauer Spectroscopy II", Topics in Current Physics, Springer Verlag Berlin, 1981

Grandori, R, Schwarzinger, S, Müller, N (2000) *Eur J Biochem* 267:1168-1172

Guigliarelli, B, More, C, Fournel, A, Asso, M, Hatchikian, E, Williams, R, Cammack, R, Bertrand, P (1995) *Biochemistry* 34:4781-4790

Hagen, WR "EPR spectroscopy on Iron-Sulphur Proteins" In: Cammack, R (Herausgeber) "Advances in Inorganic Chemistry, Vol. 38, Iron Sulphur Proteins" Academic Press, San Diego, 1992

- Heering, HA, Bultink, YBM, Hagen, WR, Meyer, TE (1995) *Biochemistry* 34:14675-14686
- Hochkoeppler, A, Ciurli, S, Venturoli, G, Zannoni, D (1995) *FEBS Lett* 357:70-74
- Jäger, E, Perthel, R "Magnetische Eigenschaften von Festkörpern", Akademie Verlag Berlin, 1996
- Jensen, LH "The Iron-Sulfur Proteins: An Overview" In: Matsubara, H, Katsube, Y, Wada, K (Herausgeber) "Iron-Sulfur Protein Research", Japan Scientific Societies Press, Tokio, 1987
- Jordanov, J, Roth, EKH, Fries, PH, Noodleman, L (1990) *Inorg Chem* 29:4288-4292
- Kahn, O "Molecular Magnetism", VCH Publishers, New York, 1993
- Kaim, W, Schwerderski, B "Bioanorganische Chemie", Teubner Studienbücher Chemie Stuttgart, 1991
- Kapll, R, Ciurli, S, Luchinat, C and Hüttermann, J (1999) *J Am Chem Soc* 121:9-19
- Koningsberger, DC, Prins, R (Herausgeber) "Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES", Wiley Publishers, New York, 1988
- Kronmüller, H, Lambeck, M "Magnetismus in Festkörpern" In: Raith, W (Herausgeber) "Bergmann – Schäfer Lehrbuch der Experimentalphysik Band 6 Festkörper", de Gruyter Verlag Berlin, 1992
- Langen, R, Jensen, GM, Jacob, U, Stephens, PJ, Warshel, A (1992) *J Biol Chem* 267:25625-25627
- LeGall, J, Prickril, C, Moura, I, Xavier, A, Moura, J, Huynh, J (1988) *Biochemistry* 27:1636-1642
- LePape, L, Lamotte, B, Mouesca, JM, Rius, G (1997) *J Am Chem Soc* 119:9757-9770
- Lippard, SJ, Berg, JM "Bioanorganische Chemie", Spektrum Verlag, Heidelberg, 1995
- Lowe, DJ (1992) *Prog Biophys Molec Biol* 57:1-22
- Makinen, MW, Wells, GB "Application of EPR Saturation Methods to Paramagnetic Metal Ions in Proteins" In: Sigel, H (Herausgeber) "Metal Ions in Biological Systems, Vol. 22", Maral Decker Inc., New York, 1987
- Margulis, L, Sagan, D "Leben vom Ursprung zur Vielfalt", Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999

- Mayo KH, Kucheida D, Parak F, Chien JCW (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:5294-5296
- McDermott, AE, Yachandra, VK, Guiles, RD, Britt, RD, Dexheimer, SL, Sauer, K, Klein, MP (1988) Biochemistry 27:4013-4020
- Melchers, B, Knapp, EW, Parak, FG, Cordone, L, Cupane, A, Leone, M (1996) Biophys J 70:2092-2099
- Mentler, M (1999) "Untersuchung von Metallzentren in Proteinen mit Hilfe der EPR-Spektroskopie" Diplomarbeit Technische Universität München, Institut für Kernphysik und Nukleare Festkörperphysik, Lehrstuhl E17 für Experimentalphysik
- Meyer, T (1985) Biochim Biophys Acta 806:175-183
- Meyer, J, Gaillard, J, Lutz, M (1995) Biochem Biophys Res Comm 212:827-833
- Meyer, TE, Przysiecki, CT, Watkins, JA, Bhattacharyya, A, Simonsen, RP, Cusanovich, MA, Tollin, G (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:6740-6744
- Middleton, P, Dickson, DPE, Johnson, CE, Rush, JD (1978), Eur J Biochem 88:135-141
- Middleton, P, Dickson, DPE, Johnson, CE, Rush, JD (1980) Eur J Biochem 104:289-296
- Mouesca, JM, Rius, G, Lamotte, B (1993) J Am Chem Soc 115:4714-4731
- Mouesca, JM, Chen, JL, Noodleman, L, Bashford, D, Case, DA (1994) J Am Chem Soc 116:11898-11914
- Moura, I, Huynh, BH, Hausinger, RP, LeGall, J, Xavier, AV, Münck, E (1980) J Biol Chem 255:2493-2498
- Moura, I, Tavares, P, Moura, JJG, Ravi, N, Hunyh, BH, Liu, MY, LeGall, J (1990) J Biol Chem 265:21596-21602
- Muir, AH, Ando, KJ, Coogan, HM (Herausgeber) "Mössbauer Effect Data Index 1958-1964" Interscience Publishers, New York, 1966
- Noodleman, L (1988) Inorg Chem 27:3677-3679
- Noodleman, L (1991) Inorg Chem 30:256-260
- Papaefthymiou, V, Girerd, JJ, Moura, I, Moura, JJG, Münck, E (1987) J Am Chem Soc 109:4703-4710

Parak, FG "Dynamische Vorgänge in Proteinen", Vortrag N355 vor der Rheinisch-Westfälischen Akademie der Wissenschaften am 7. 11. 1984, Westdeutscher Verlag, 1987

Parak, FG, Achterhold "Structural distributions, fluctuations and structural relaxations in proteins" In: Fragnopol, P, Smith, J (Herausgeber) "Current Topic in Biophysics" Al I Ceiza University Press, Iasi (Rumänien), 1995

Parak, F, Formanek, H (1971) Acta Cryst A27:573-578

Parak, FG, Frauenfelder, H (1993) Physica A 201:332-345

Parak, F, Kalvius, GM "Anwendung des Mößbauer-Effekts auf Probleme der Biophysik" In: Hoppe, W (Herausgeber) "Biophysik" Springer Verlag, Berlin, 1982

Parak, F, Knapp, EW, Kucheida, D (1982) J Mol Biol 161:177-194

Parak, F, Reinisch, L "Mössbauer Effect in the Study of Structure Dynamics" In: Hirs, CHW, Timasheff, SN (Herausgeber) "Structural dynamics and Mobility of Proteins" Methods in Enzymology 131:568-607, 1986

Parak, FG, Trautwein, AX (Herausgeber) "Applications of the Mössbauer Effect (ICAME'99). Proceedings of the 25th International Conference on the Applications of the Mössbauer Effect", Hyperfine Interactions 126:1-4, Baltzer Science Publishers, Niederlande, 2000

Pilbrow, J "Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance" Clarendon Press, Oxford, 1990

Powers, L, Lauraeus, M, Reddy-Konda, S, Britton, C, Wikstrom, M (1994) Biochim Biophys Acta 1183:504-512

Prusakov, VE, Steyer, J, Parak, FG (1995) Biophys J 68:2524-2530

Przysiecki, CT, Meyer, TE, Cusanovich, MA (1985) Biochemistry 24:2542-2549

Que, L, Bobrik, MA, Ibers, JA, Holm, RH (1974) J Am Chem Soc 96:4168-4178

Reinhold, J "Quantentheorie der Moleküle", Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart, 1994

Rius, G, Lamotte, B (1989) J Am Chem Soc 111:2464-2469

Sambrook, Fritsch, Maniatis "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 (Appendix A.3)

Sauermost, R (Herausgeber) "Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie", Herder Verlag, Freiburg, 1992

Schatz, G, Weidinger, A "Nukleare Festkörperphysik" Teubner Studienbücher Physik, Stuttgart, 1992

Scherk, C, Schmidt, M, Nolting, HF, Meier, B, Parak, F (1996) Eur Biophys J 24:243-250

Scherk, C (1998) "Untersuchung der Struktur und Dynamik einer Superoxid Dismutase" Dissertation Technische Universität München, Institut für Kernphysik und Nukleare Festkörperphysik, Lehrstuhl E17 für Experimentalphysik

Scherk, CG, Ostermann, A, Achterhold, K, Iakovleva, O, Nazikkol, B, Krebs, B, Knapp, EW, Parak, FG (2000) Eur Biophys J (eingereicht)

Schneider, F, Plato, M "Elektronenspin-Resonanz" Verlag Karl Thieme KG, München, 1971

Schünemann, V, Winkler, H (2000) Rep Prog Phys 63:263-353

Schultz, CP (2000) Nature Structural Biology 7(1):7-10

Schulz, C, Debrunner, P (1976) J Physique 37:153-158

Scott, PL, Jeffries, CD (1962) Phys Rev 127:32-38

Scott, RA, Wang, S, Eidsness, MK, Kriauciunas, A, Frolik, CA, Chen, VJ (1992) Biochemistry 31:4596-4601

Shergill, JK, Cammack, R, Weiner, JH (1991) J Chem Soc Faraday Trans 87:3199-3202

Smirnov, GV (1996) Hyperfine Interactions 97/98:551-588

Soriano, A, Li, D, Bian, S, Agarwal, A, Cowan, JA (1996) Biochemistry 35:12479-12486

Spiro, TG, Czernuscewicz, RS, Han, S "Iron-Sulphur Proteins and Analog Complexes" In: Spiro, TG (Herausgeber) "Biological Applications of Raman Spectroscopy, Volume 3: Resonance Raman Spectra of Heme and Metalloproteins", John Wiley & Sons, New York, 1988

Stephans, PJ, Morgan, TV, Devlin, F, Penner-Hahn, JE, Hodgson, KO, Scott, RA, Stout, CD, Burgess, BK (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:5661-5665

Stevens, JG, Stevens, VE (Herausgeber) "Möbbauser Effect Data Index", IFI/Plenum Data Company, New York, 1977

- Stryer, L "Biochemistry" WH Freeman and Company, New York, 1988
- Tang, SPW, Spiro, TG, Antanaitis, C, Moss, TH, Holm, RH, Hershkovitz, T, Mortensen, LE (1975) *Biochem Biophys Res Comm* 62:1-6
- Teo, BK, Joy, DC (Herausgeber) "EXAFS Spectroscopy, Techniques and Application", Plenum Press, New York 1981
- Thiele, H, Erstling, J, Hoefler, P, Such, P (1992) BRUKER Report 138/92:42-45
- Trautwein, A, Bill, E, Bominaar, E, Winkler, H (1991), *Struct Bonding* 78:1-95
- Tsang, HT, Batie, CJ, Ballou, DP, Penner-Hahn, JC (1996) *J Biol Inorg Chem* 1:24-33
- Weber, RT, Such, P, Erstling, J, Thiele, H (1995) Bruker Report 141/95:28-30
- Wegener, A "Der Mössbauereffekt und seine Anwendungen in Physik und Chemie", Hochschultaschenbücher Verlag Berlin, 1965
- Wickman, HH, Wertheim, GK "Spin Relaxation in Solids and Aftereffects of Nuclear Transformations" In: Goldanskii, VI, Herber, R (Herausgeber) "Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy", Academic Press New York, 1968
- Winkler, H, Meyer, W, Trautwein, A, Matzanke, B (1994) *Hyperfine Interactions* 91:841-846
- Wolynes, PG, Eaton, WA (1999) *Physics World* 12(9):39-44
- Xiao, Z, Lavery, MJ, Ayhan, M, Scrofani, DB, Wilce, MCJ, Guss, JM, Tregloan, PA, George, GN, Wedd, AG (1998) *J Am Chem Soc* 120:4135-4150
- Yoo, SJ, Meyer, J, Achim, C, Peterson, J, Hendrich, MP, Münck, E (2000) *JBIC* 5:475-487
- Youvan, D, Marrs, B (1984) *Cells* 29:1-15
- Youvan, D, Marrs, B "Molekulare Mechanismen der bakteriellen Photosynthese" In: *Spektrum der Wissenschaft* 8/87:62-68, Spektrum der Wissenschaft Verlag Heidelberg, 1987
- Zach, C (1996) "Proteindynamikuntersuchungen an Myoglobin durch Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung" Diplomarbeit Technische Universität München, Institut für Kernphysik und Nukleare Festkörperphysik, Lehrstuhl E17 für Experimentalphysik
- Zhang, Y, Stern, EA (1995) *Physica B* 208/9:727-728

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellen

Tab. 1.1	Eigenschaften verschiedener HiPIPs.....	9
Tab. 2.1	Bindungsabstände in [Fe ₄ S ₄]-Clustern	12
Tab. 2.2	Theorieparameter aus dem Vektormodell	20
Tab. 2.3	Anteil des NMR-Hauptisomers in verschiedenen HiPIPs.....	21
Tab. 3.1	Hyperfeinwechselwirkungen beim Mößbauer-Effekt.....	31
Tab. 3.2	Mößbauer-Parameter beim Transmissionsintegral.....	36
Tab. 3.3	Informationsgehalt von EPR-Spektren.....	43
Tab. 4.1	Zusammenhang zwischen "Intermediate"-Spezies und GdmCl-Konzentration ...	62
Tab. 4.2	Eigenschaften des Mößbauer-Übergangs von ⁵⁷ Fe	63
Tab. 4.3	Messparameter bei EPR und ENDOR.....	68
Tab. 5.1	EPR-Komponenten in verschiedenen HiPIPs	71
Tab. 5.2	Elektronische Relaxationszeiten aus gepulster EPR	76
Tab. 5.3	A-Werte oxidierter HiPIPs aus ENDOR.....	83
Tab. 5.4	Mößbauer-Parameter von oxidiertem HiPIP I <i>E. halophila</i> bei 5 K.....	85
Tab. 5.5	Mößbauer-Parameter von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT bei 5 K.....	88
Tab. 5.6	Mößbauer-Parameter von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S bei 5 K.....	91
Tab. 5.7	Mößbauer-Parameter oxidierter HiPIPs bei verschiedenen Temperaturen.....	93
Tab. 5.8	Mößbauer-Parameter reduzierter HiPIPs	95
Tab. 5.9	Mößbauer-Parameter reduzierter HiPIPs in drei Faltungszuständen	98
Tab. 5.10	Dynamik-Parameter von HiPIPs aus Mößbauer-Spektroskopie	101
Tab. 5.11	Parameter aus der $\gamma(T)$ -Anpassung oxidierter HiPIPs.....	103
Tab. 5.12	EXAFS-Parameter reduzierter HiPIPs in verschiedenen Zuständen	106
Tab. 6.1	Eisen-Schwefel- und Eisen-Sauerstoff-Abstände aus EXAFS	108
Tab. 6.2	Spingrundzustände für oxidierte native HiPIPs aus dem Vektormodell.....	112
Tab. 6.3	g-Werte aus EPR und aus dem Vektormodell.....	113
Tab. 6.4	Ladungszahlen des Eisens aus dem HiPIP-Modell	121
Tab. 6.5	Ladungszahlen des Eisens aus dem Eisen-Schwefel-Protein-Modell.....	122
Tab. 6.6	Elektronenrelaxationszeiten in Eisen-Schwefel-Proteinen	126
Tab. 6.7	Isomere Besetzung und Parameter der Orbach-Relaxation.....	128
Tab. 6.8	Proteindynamik in Eisen-Schwefel-Proteinen.....	131
Tab. 6.9	Mittlere Auslenkungsquadrate aus Mößbauer-Spektroskopie und EXAFS.....	133

Abbildungen

Abb. 1.1	Der Lebensraum phototroper Bakterien	4
Abb. 1.2	Die phototropen purpurnen Schwefelbakterien <i>Chromatium vinosum</i>	4
Abb. 1.3	Schematischer Ablauf der bakteriellen Photosynthese	5
Abb. 1.4	Prosthetische Gruppen von Eisen-Schwefel-Proteinen	7
Abb. 1.5	Proteinstrukturen der HiPIPs <i>C. vinosum</i> und <i>E. halophila</i>	10
Abb. 1.6	Cluster-Umgebung im nativem und teilweise entfaltetem HiPIP <i>C. vinosum</i>	11
Abb. 2.1	Der [Fe ₄ S ₄]-Cluster aus HiPIPs und seine vier Cystein-Liganden	13
Abb. 2.2	Magnetische Austauschwechselwirkung in Eisen-Schwefel-Proteinen	15
Abb. 2.3	Modelle für die magnetische Kopplung der Eisenspins in oxidierten HiPIPs	17
Abb. 2.4	Die elektronischen Isomere oxidierteter HiPIPs aus NMR-Untersuchungen	22
Abb. 3.1	Spin-Gitter-Relaxationsmechanismen im Energieniveauschema	25
Abb. 3.2	Wechselwirkung eines gedämpften Wellenzuges mit einem Mößbauer-Kern	28
Abb. 3.3	Schema des charakteristischen Zeitfensters bei Mößbauer-Spektroskopie	29
Abb. 3.4	Isomeriewerschiebung, Oxidationszustand und Kovalenzgrad	32
Abb. 3.5	Isomeriewerschiebung, Oxidationszustand, Spinzustand und Nachbaratomart	33
Abb. 3.6	Energieniveauschema und EPR-Signal	40
Abb. 3.7	EPR-Signal eines HiPIPs und dessen Orientierung zum externen Magnetfeld	41
Abb. 3.8	Energieniveauschema und ENDOR-Signal	44
Abb. 3.9	Schema von Spins, Magnetisierung und $\pi/2$ -Mikrowellenpuls	46
Abb. 3.10	Zeitliche Abfolge dreier Pulssequenzen	47
Abb. 3.11	Abragams mechanisches Analogon für Entstehung eines Spinechos	48
Abb. 4.1	Gentechnologisches Verfahren zur Exprimierung von HiPIPs in <i>E.coli</i> -Zellen	53
Abb. 4.2	Petrischale mit modifizierten antibiotikaresistenten <i>E.colis</i>	54
Abb. 4.3	Gewachsene Bakterienkultur	54
Abb. 4.4	Abzentrifugierte Bakterienkultur mit Nährlösung und purer Zellpaste	54
Abb. 4.5	Suspension aus proteinhaltigem Überstand, Zellmembranen und DNS	55
Abb. 4.6	Proteinreinigung auf der HiTrap-Säule	55
Abb. 4.7	Proteinreinigung auf der DEAE-Säule	58
Abb. 4.8	Optisches Spektrum von reduziertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	59
Abb. 4.9	Anaerobe Mischung von HiPIP und Guadiniumchlorid	61
Abb. 4.10	Prinzipdarstellung eines Mößbauer-Spektrometers	64
Abb. 4.11	Zerfallsschema der 14.4 keV-Strahlung von ⁵⁷ Fe	65
Abb. 4.12	Skizze eines EPR-Spektrometers	67
Abb. 4.13	Aufbau des EXAFS-Messplatzes	70
Abb. 5.1	EPR-Spektrum von oxidiertem HiPIP I <i>E. halophila</i>	72
Abb. 5.2	EPR-Spektrum von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	72

Abb. 5.3	EPR-Spektren der oxidierten HiPIPs <i>C. vinosum</i> WT und C77S-Mutante.....	73
Abb. 5.4	Signalfolgen und Magnetisierungserholung bei gepulsten EPR-Experimenten ...	75
Abb. 5.5	3D-Signal und Magnetisierungserholung bei einem Spin-Echo-Experiment	77
Abb. 5.6	Gepulste EPR-Experimente an oxidierten HiPIPs	78
Abb. 5.7	⁵⁷ Fe-ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP I <i>E. halophila</i>	80
Abb. 5.8	⁵⁷ Fe-ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	81
Abb. 5.9	⁵⁷ Fe-ENDOR-Spektren von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S.....	82
Abb. 5.10	Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP I <i>E. halophila</i> bei 5 K.....	84
Abb. 5.11	Mößbauer-Spektrum von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT bei 5 K.....	88
Abb. 5.12	Mößbauer Spektrum von oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S bei 5 K.....	90
Abb. 5.13	Mößbauer-Spektren von oxidierten nativen HiPIPs bei hohen Temperaturen.....	93
Abb. 5.14	Mößbauer-Spektren von oxidiertem HiPIP <i>C. v. C77S</i> bei hohen Temperaturen	94
Abb. 5.15	Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP I <i>E. halophila</i>	96
Abb. 5.16	Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	96
Abb. 5.17	Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S	97
Abb. 5.18	Mößbauer-Spektren reduzierter HiPIPs <i>C. v.</i> in diversen Faltungszuständen	97
Abb. 5.19	Proteindynamik in Mößbauer-Spektren von reduziertem HiPIP <i>C. vinosum</i> WT	99
Abb. 5.20	Mittleres Auslenkungsquadrat der Eisenkerne in HiPIPs	100
Abb. 5.21	Mößbauer-Spektren oxidierten HiPIPs I <i>E. halophila</i> innerhalb [2.4 K ;180 K]	102
Abb. 5.22	Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate für oxidierte HiPIPs	102
Abb. 5.23	Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate und Theorieanpassung.....	103
Abb. 5.24	Fe-EXAFS-Spektren diverser reduzierter HiPIPs	105
Abb. 6.1	Elektronenstruktur im [Fe ₄ S ₄] ³⁺ -Cluster von oxidierten nativen HiPIPs	115
Abb. 6.2	Elektronenstruktur im [Fe ₄ S ₄] ²⁺ -Cluster von reduzierten nativen HiPIPs	115
Abb. 6.3	Veränderung der Elektronenstruktur im HiPIP <i>C. v.</i> unter C77S-Mutation	119
Abb. 6.4	Besetzung der Isomere in oxidiertem HiPIP <i>C. vinosum</i>	124
Abb. 6.5	Elektronenrelaxation in den Mößbauer-Spektren oxidierter HiPIPs.....	129
Abb. 6.6	Spinorientierung von oxidierten HiPIPs in beiden elektronischen Isomeren.....	130
Abb. 6.7	Potentialmodell für Proteine.....	132
Abb. 6.8	Faltung von HiPIPs in der Energielandschaft	136

Verzeichnis der Formelzeichen

a		Index für angeregten Zustand
a	[mm·s ⁻¹]	magnetischer Hyperfeintensor für ungekoppelten Spin
A		Index für Absorber
A	[mm·s ⁻¹]	Absorptionsfläche unter Mößbauer-Spektrum
A		Strahlungsfeld
A	[mm·s ⁻¹]	magnetischer Hyperfeintensor
B	[T]	Magnetfeld
B _{ij}	[cm ⁻¹]	Doppelaustauschintegral für Spins i, j
c	[m·s ⁻¹]	Vakuumlichtgeschwindigkeit
C		Systemkonstante
D	[cm ⁻¹]	Kristallfeldmatrix
e	[C]	Elementarladung
eff		Index für effektiv
ex		Index für extern angelegt
E	[J]	Energie
E		Einheitsmatrix
f		Rückstreuwahrscheinlichkeit
f		Lamb-Mößbauer-Faktor
g		Index für Grundzustand
g		elektronischer g -Tensor
g _n		nuklearer g-Faktor
G		Green-Funktion
G	[J]	gibbssche freie Enthalpie
h	[J·s]	Planck'sches Wirkungsquantum
\hbar	[J·s]	Planck'sches Wirkungsquantum dividiert durch 2π
hf		Index für Hyperfein
H	[mm·s ⁻¹]	Hamiltonian
i	[√-1]	komplexe Einheit (eulersche Zahl)
I	[W·m ⁻²]	Intensität
I		Kernspinquantenzahl
I		Kernspinoperator
Im		Imaginärteil von
J _{ij}	[cm ⁻¹]	Heisenberg-Austauschintegral für Spins i, j
J		nuklearer Stromdichteoperator
k	[cm ⁻¹]	Wellenzahl
k _B	[J·K ⁻¹]	Boltzmann-Konstante
K _i		Kopplungsparameter für i-ten Kernspin im Vektormodell
L		Liouville-Superoperator
m	[kg]	Masse
m _i		magnetische Kernspinquantenzahl (z-Komponente)
m _S		magnetische Elektronenspinquantenzahl (z-Komponente)
n _{Fe}	[cm ⁻²]	Teilchenzahldichte der ⁵⁷ Fe-Kerne
N		Koordinationszahl
p	[bar]	Druck
q	[C]	Ladungszahl
Q	[s·mm ⁻¹]	Quellen-Emissionsspektrum
Q	[cm ²]	Kernquadrupolmoment
Q	[cm ²]	Kernquadrupoltensor
\tilde{Q}	[s·mm ⁻¹]	Faltung von Quellen-Emissionsspektrum, Verteilungsfunktion
Q		Index für Quadrupolwechselwirkung
r	[m]	Abstand
R	[m]	Kernradius

R		Untergrundkorrekturfaktor bei Mößbauer-Spektroskopie
R	[mm s ⁻¹]	Relaxations-Superoperator
s		Index für Quelle
S	[J K ⁻¹]	Entropie
S		Elektronenspinoperator
t	[s]	Zeit
t _A		effektive Dicke
T	[K]	Temperatur
T		Transmission
T _C	[K]	Grenztemperatur für Einsetzen proteinspezifischer Dynamik
T ₁	[s ⁻¹]	elektronische Spin-Gitter Relaxationszeit
T ₂	[s ⁻¹]	elektronische Spin-Spin Relaxationszeit
T _{eff}	[s ⁻¹]	effektive elektronische Relaxationszeit
T _n	[s ⁻¹]	nukleare Relaxationszeit
T _x	[s ⁻¹]	nukleare Cross-Relaxationszeit
T _{ij}		Spin dependent delocalization operator
U	[J]	innere Energie
V	[m ³]	Volumen
V _{zz}	[V·m ⁻²]	zz-Komponente des elektrischen Feldgradienten
x		Index für x-Komponente
x	[m]	Auslenkung
<x ² > _v	[Å ²]	mittleres Auslenkungsquadrat aufgrund vibronischer Moden
<x ² > _t	[Å ²]	mittleres Auslenkungsquadrat infolge quasidiffusiver Moden
<x ² >	[Å ²]	mittleres Auslenkungsquadrat bei Mößbauer-Spektroskopie
<x ² _{XAS} >	[Å ²]	mittleres Auslenkungsquadrat bei EXAFS
v	[mm·s ⁻¹]	Geschwindigkeit
w		Verteilungsfunktion
y		Index für y-Komponente
z		Index für z-Komponente
Z		Zählrate
Z		Kernladungszahl
α		Besetzungsanteil des elektronischen Hauptisomers
α		Konversionskoeffizient
α	[rad]	Drehwinkel
α	[rad]	Phasenverschiebung
β _e	[J T ⁻¹]	bohrsches Magneton
β _n	[J T ⁻¹]	Kernmagneton
χ		EXAFS-Funktion
δ	[mm·s ⁻¹]	Isomerieverschiebung
δ	[rad]	Phasenwinkel
δ	[cm ⁻¹]	Anregungsenergie des mittleren Orbach-Niveaus
Δ	[cm ⁻¹]	Anregungsenergie des höchsten Orbach-Niveaus
ΔE _Q	[mm·s ⁻¹]	Quadrupolaufspaltung
ε ₀	[C ² ·N ⁻¹ ·m ⁻²]	allgemeine Dielektrizitätskonstante
γ	[mm s ⁻¹]	Relaxationsrate
γ	[s ⁻¹ T ⁻¹]	gyromagnetisches Verhältnis
Γ	[mm·s ⁻¹]	Linienbreite
Γ _a	[mm·s ⁻¹]	effektive Linienbreite
Γ _{dick}	[mm·s ⁻¹]	Dickenverbreiterung
Γ _{diff}	[mm·s ⁻¹]	Diffusionsverbreiterung
Γ _{inh}	[mm·s ⁻¹]	Inhomogenitätsverbreiterung
η		Asymmetrieparameter
η		Polarisation
φ	[rad]	Azimutwinkel [0; 2π]

λ	[m]	Wellenlänge
μ	[cm ⁻¹]	Absorptionskoeffizient
ν	[Hz]	Frequenz
π		Kreiszahl (3.14159...)
θ	[rad]	Elevationswinkel [0; π]
Θ_D	[K]	Debye-Temperatur
σ	[barn]	Absorptionskoeffizient
$\tilde{\sigma}$	[barn]	Faltung aus Absorptionskoeffizient und Verteilungsfunktion
τ	[s]	mittlere Lebensdauer
τ	[s]	Zeit
ω	[s ⁻¹]	Winkelgeschwindigkeit
ω_L	[s ⁻¹]	Larmor-Frequenz
Ψ	[m ^{-3/2}]	Wellenfunktion
ξ	[mm·s ⁻¹]	Halbwertsbreite einer Verteilungsfunktion
0		Index für Amplitude
\pm		Index für Aufsteige-/Absteigeoperator
∞		unendlich
*		komplex Konjugierte
+		Fouriertransformierte
		Index für parallel
\perp		Index für senkrecht

Danksagung

Der erste Dank gilt meinem akademischen Lehrer Prof. Dr. Fritz Parak für die Überlassung und intensive Betreuung des für mich ungewöhnlich interessanten Promotionsthemas. Seine vielfältigen Anregungen und sein aktives Engagement waren für diese Arbeit höchst befruchtend.

Die Bereitstellung hervorragender Proteinproben verdanke ich unserer Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Ivano Bertini und Prof. Claudio Luchinat in Florenz sowie von Prof. Francesco Capozzi in Cesena. Dr. Elena Babini und Dr. Giovanna Mincione danke ich für faszinierende Einblicke in die Bereiche der Proteinisolierung und der Gentechnologie. Neben hervorragenden Wissenschaftlern durfte ich in Italien sehr wertvolle Menschen kennenlernen.

Meinen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Parak danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima, das von Kooperation, Hilfsbereitschaft und Freude an der Wissenschaft geprägt ist. Matthias Mentler und Dr. Klaus Achterhold sei für die hervorragende Zusammenarbeit bei den EPR- und ENDOR-Experimenten gedankt. Klaus Grantner war nicht nur bei dem gemeinsam durchgeführten EXAFS-Projekt ein höchst angenehmer Kollege und Freund. Meinen Mößbauer-Lehrmeistern Dr. Michael Reiner in experimenteller und Dr. Olga Iakovleva in theoretischer Hinsicht gebührt besonderer Dank. Einen großen Anteil an der Freude, die mir die Arbeit bei E17 bereitete, hatten meine ebenso außergewöhnlichen wie unterschiedlichen Zimmergenossen Dr. Christoph Scherk, Dr. Alexandra Huenges, Matthias Mentler und Simonetta Croci.

Wie soll ich Worte finden, meiner Frau Gitika und meinen Eltern Dr. Wolfgang und Renate Dilg zu danken? Ihr seid mir in allen Lebenslagen ein fester Halt, meine Vergangenheit und meine Zukunft.

Zum Schluss danke ich der Natur, die den Wissenschaftlern immer noch so viele ungelöste und faszinierende Rätsel aufgibt. Unvergleichlich ist das seltene Gefühl, Einblick in einen winzigen Bereich ihrer Geheimnisse erlangen zu dürfen.

Curriculum vitae

Name	<u>Andreas Wolfgang Edgar Dilg</u>
Geburt	24. März 1972 in München (deutscher Staatsbürger)
Eltern	Dr. Wolfgang Dilg und Renate Dilg, geb. Gesler
Familienstand	verheiratet mit Gitika Dilg, geb. Sethi, keine Kinder
Adresse	Kurfürstenstraße 47, 80801 München
Email	adilg@vjp.de
Schulbildung	1978-1982 Grundschule Putzbrunn, 1982-1991 Gymnasium Neubiberg (Abitur)
Wehrdienst	1991-1992 Stabsdienst beim Heeresflugabwehrregiment in München
Hochschulstudium	1992-1997 Technische Physik an der TU München (Diplom-Physiker)
Aufbaustudium	1997-2000 Wirtschafts- und Arbeitsrecht an der Fernuniversität Hagen
Promotion	1997-2000 Lehrstuhl E17 für Experimentalphysik am Physikdepartment der TU München bei Prof. F. G. Parak (molekulare Biophysik)
Berufsausbildung	seit Oktober 2000 Ausbildung zum Europäischen Patentanwalt in der Sozietät "Viering, Jentschura & Partner", München
Publikationen	<p>Dilg, AWE, Mincione, G, Achterhold, K, Iakovleva, O, Mentler, M, Luchinat, C, Bertini, C, Parak, FG (1999) Simultaneous interpretation of Mössbauer-, EPR- and ^{57}Fe-ENDOR-spectra of the $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$-cluster in the High-Potential Iron Protein (HiPIP) I from <i>Ectothiorhodospira halophila</i>. Journal of Biological Inorganic Chemistry 4:727-741</p> <p>Dilg, AWE, Capozzi, F, Mentler, M, Iakovleva, O, Luchinat, C, Bertini, I, Parak, FG (2000) Comparison and Characterization of the $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/3+}$-centre in the wild type and Cys77Ser mutated HiPIPs from <i>C. vinosum</i> monitored by Mössbauer, ^{57}Fe-ENDOR and EPR spectroscopies. Journal of Biological Inorganic Chemistry (im Druck)</p> <p>Dilg, AWE, Grantner, K, Iakovleva, O, Parak, FG, Babini, E, Bertini, I, Capozzi, F, Luchinat, C, Meyer-Klaucke, W (2000) Dynamics of wild type HiPIPs, a Cys77Ser-mutant and a partially unfolded HiPIP. European Biophysical Journal (eingereicht)</p>