

Technische Universität München
Physik-Department E17

Struktur, Strukturfluktuationen und Relaxationen von Myoglobin: Optische Spektroskopie, Neutronen- und Röntgenstrukturanalyse

Niklas Engler

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. S. Fischer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak
2. Univ.-Prof. Dr. W. Petry
3. Univ.-Prof. Dr. J. O. Rädler, Ludwig-Maximilians-
Universität München (schriftliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 08.05.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 08.07.2002 angenommen.

Zusammenfassung

Die Strukturrelaxation eines metastabilen Zustands und der Konformationswechsel in einer Mutante von Myoglobin wurden mit optischer Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse untersucht. Die Neutronenstrukturanalyse von Met-Myoglobin wurde bei Raumtemperatur und 20K mit einem monochromatischen bzw. Laue-Diffraktometer gemessen. Die Positionen und die mittleren quadratischen Auslenkungen der Wasserstoffatome wurden analysiert.

Durch photoinduzierte Reduktion von Fe^{3+} -Met-Myoglobin bei tiefen Temperaturen wird ein metastabiler Zustand ($\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$) erzeugt. Die Struktur bleibt bei tiefen Temperaturen unverändert, der Wasserligand am Eisen bleibt erhalten. Die Messung optischer Spektren zeigt, dass innerhalb des Zustands $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ ab 100K eine Relaxation einsetzt. Die Analyse der Kopplung hochfrequenter Moden ($h\nu \gg kT$) demonstriert, dass die Struktur der Häm-Gruppe und des Liganden erhalten bleibt. Die Gauß-Verbreiterung der optischen Spektren steigt zusammen mit der Relaxation des Proteins an. Dies wird durch Anregung niederfrequenter Moden ($h\nu \leq kT$) verursacht und kann damit als Ursache der Relaxation identifiziert werden. Als struktureller Mechanismus der Relaxation wird eine Verschiebung der Häm-Gruppe inklusive des Liganden relativ zum Protein vermutet. Oberhalb von 150K relaxiert $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ zum Gleichgewichtszustand Deoxy-Myoglobin, der Wasserligand geht verloren.

Die H64V-Mutante von Pottwal-Met-Myoglobin zeigt einen temperaturabhängigen Konformationswechsel. Aus optischen Absorptionsspektren folgt, dass das temperaturabhängige Gleichgewicht zwischen den beiden Konformationen bei Temperaturen unterhalb 180K eingefroren ist. Röntgenstrukturanalysen wurden bei 300K und 110K bis zu einer Auflösung von 1.5\AA bzw. 1.3\AA durchgeführt. Beim Abkühlen bildet sich eine geordnete Wasserstruktur aus, die einen Übergang von fünffach zu sechsfach ligandiertem Häm-Eisen ermöglicht. Dabei verschiebt sich die Häm-Gruppe relativ zum Proteinrückgrat. Bei 110K liegt das aktive Zentrum in zwei Zuständen vor: ligandiert und unligandiert. Das Wasserstoffbrückennetzwerk, das den Wasserliganden bei 110K stabilisiert, erstreckt sich von der Proteinoberfläche bis ins aktive Zentrum. Dieser temperaturabhängige Konformationswechsel ist ein weiterer Beweis dafür, dass das Protein nur im Temperaturbereich über 180K quasi-diffusive Bewegungen ausführen kann, die den Konformationswechsel ermöglichen.

Die Temperaturabhängigkeit der Gauß-Verbreiterung optischer Absorptionsbanden der Häm-Gruppe in Myoglobin wurde in der Literatur bisher als Nachweis einer Anharmonizität niederfrequenter Moden des Proteins angeführt. Unter Berücksichtigung aller Moden, die aus einer Normal-Moden-Analyse zur Verfügung standen, konnte jedoch der gesamte Temperaturverlauf angepasst werden. Die Temperaturabhängigkeit resultiert danach aus der thermischen Anregung niederfrequenter Moden ($h\nu \leq kT$). Eine Anharmonizität der Schwingungen läßt sich aus der Gauß-Verbreiterung der optischen Spektren nicht ableiten.

Die Neutronenstrukturanalyse ist die einzige Methode, mit der man Struktur und Dynamik der Wasserstoffatome in Proteinen im Detail untersuchen kann. Bei der Auswertung einer Neutronenstruktur von Myoglobin bei 300K mit einer Auflösung von 1.5\AA wurde ein Verfahren zur Korrektur von Streudichtemappen eingeführt. Dieses ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Sichtbarkeit negativer Streudichte von ^1H -Atomen. Dies zeigt, dass bei

ausreichender Datenqualität und Auflösung eine vollständige Deuterierung des Proteins zur Bestimmung aller Wasserstoffatompositionen nicht nötig ist.

Ausgehend von den auch aus einer Röntgenstrukturanalyse bestimmbar Atompositionen wurden die Positionen von Wasserstoffatomen aufgrund der bekannten sterischen Randbedingungen hinzugefügt und anschließend die Energie der Struktur minimiert. Der Vergleich mit der Neutronenstrukturanalyse zeigt Differenzen für die Wasserstoffatome, die einen Freiheitsgrad besitzen. ^2H -Atome zeigen eher an der Proteinoberfläche Abweichungen. Dies kann mit der Konkurrenz der Wasserstoffbrückenpartner mit Wassermolekülen erklärt werden. Für die ^1H -Atome beobachtet man im Proteininneren große Abweichungen. Über 70% der ^1H -Atome in Methylgruppen weichen um mehr als 0.2\AA von den berechneten Positionen ab.

Aus den Debye-Waller-Faktoren des Strukturmodells bestimmte mittlere quadratische Auslenkungen der ^1H -Atome zeigen, dass es drei Klassen von Beweglichkeiten gibt. Diese lassen sich nach ihrer strukturellen Anordnung nach steigender Beweglichkeit einteilen: Hauptkette, Methylgruppen enthaltende Seitenketten und Lysinketten ähnliche Seitenketten. Die Verteilungen der Auslenkungen dieser drei Klassen und der Auslenkungen aller ^1H -Atome lassen sich gleichzeitig mit drei Gauß-Verteilungen anpassen. Die elastische inkohärente Streuung von Neutronen ist eine wertvolle Methode zur Untersuchung der Proteindynamik. Die hier erhaltenen Strukturdaten erlauben eine erweiterte Interpretation unter Verwendung der drei Klassen von Beweglichkeiten für Temperaturen über 180K. Dabei zeigt es sich, dass die elastische inkohärente Neutronenstreuung vor allem durch die Lysinketten ähnlichen Seitenketten bestimmt ist. Die Methylgruppen enthaltenden Seitenketten liefern einen kleineren Beitrag, der mit steigender Temperatur leicht ansteigt. Die ^1H -Atome in der Hauptkette liefern einen nahezu vernachlässigbaren Beitrag, der nur eine geringe Temperaturabhängigkeit aufweist. Damit leistet die Auswertung der Debye-Waller-Faktoren für Wasserstoffatome einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Proteindynamik aus inkohärenter Neutronenstreuung.

In einer Neutronenstrukturanalyse bei 20K mit einer Auflösung von 2.1\AA konnte die Position von 208 Wassermolekülen bestimmt werden, 98 davon als ganze D_2O -Moleküle, 110 nur als O-Atom. Bis auf drei konnten damit alle Wassermoleküle aus der Röntgenstrukturanalyse bei 300K als D_2O -Moleküle modelliert werden. Ferner wurde als Wassermoleküle interpretierte Streudichte in funktionell bedeutsamen Hohlräumen des Proteins gefunden. Die Protonierung der Histidin-Seitengruppen nimmt bei 20K im Vergleich zur Struktur bei 300K zu. Die Protonierung kann durch die lokale Struktur des Proteins und des Lösungsmittels erklärt werden.

Ein Vergleich der Laue-Methode mit der monochromatischen Messmethode für Neutronenstreuung zeigt, dass erstere bei niedriger Auflösung effizienter ist. Bei hoher Auflösung, die für die zuvor beschriebene detaillierte Analyse der Struktur unerlässlich ist, führen der höhere inkohärente Untergrund und der stärkere Überlapp von Reflexen dazu, dass die Laue-Methode trotz der besseren Ausnutzung des Neutronenflusses längere Messzeiten benötigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Theoretische Grundlagen.....	9
2.1	Optische Spektroskopie von Häm-Proteinen.....	9
2.2	Kristallstrukturanalyse von Proteinen	16
2.2.1	Theorie der Strukturuntersuchung von Proteinkristallen.....	16
2.2.2	Messprinzip: monochromatische und Laue-Methode	26
2.2.3	Vergleich der monochromatischen und der Laue-Methode für Neutronenstreuung an den Instrumenten BIX-3 und LADI.....	33
2.2.4	Strukturverfeinerung und Qualitätskriterien.....	35
3	Probenpräparation	41
3.1	Herstellung der H64V-Mutante von Myoglobin	41
3.2	Herstellung der Proben zur optischen Messung	41
3.3	Kristallisation und Präparation der Kristalle	43
4	Messapparaturen	46
4.1	Optische Spektroskopie	46
4.1.1	Apparatur und Messung.....	46
4.1.2	Auswertung der optischen Spektren	49
4.2	Röntgenstrukturanalyse	51
4.2.1	Röntgendiffraktometer und Tieftemperatureinrichtung	51
4.2.2	Messverfahren und Auswertung der Röntgendaten.....	54
4.3	Neutronenstrukturanalyse.....	55
4.3.1	Das Laue-Diffraktometer LADI	55
4.3.2	Funktionsweise von Neutronen-Bild-Platten (NBP)	57
4.3.3	Aufnahmeverfahren und Auswertung der Neutronendaten.....	59
5	Untersuchungen zur Proteindynamik an Myoglobin und einer Mutante	63
5.1	Untersuchung der H64V-Mutante von Myoglobin	63
5.1.1	Temperaturabhängige Ligandierung von H64V-Met-Myoglobin.....	64
5.1.2	Struktur der unterschiedlichen Ligandierungszustände.....	67
5.2	Auswertung der Temperaturabhängigkeit optischer Spektren mit einem Normal- Moden-Spektrum	74
5.2.1	Das Modell	74

5.2.2	Anpassung der temperaturabhängigen Gauß-Verbreiterung in verschiedenen Ligandierungszuständen und Lösungsmitteln.	76
5.3	Relaxation eines Zwischenzustands nach photoinduzierter Reduktion von Met-Myoglobin.....	78
6	Wasserstoffatome in Proteinen	84
6.1	Neutronenstruktur von Met-Myoglobin bei 20K und 300K.....	84
6.2	Röntgenstruktur von Met-Myoglobin in schwerem Wasser.....	89
6.3	Korrektur von Streudichtemappen zur besseren Visualisierung von ¹ H-Atomen.....	90
6.4	Vergleich der gemessenen Wasserstoffatompositionen mit der molekularmechanischen Berechnung	93
6.5	Mittlere quadratische Auslenkungen und Austausch der Wasserstoffatome	96
7	Diskussion.....	100
7.1	Struktur und Dynamik von Myoglobin aus optischer Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse	100
7.1.1	Proteindynamik und temperaturabhängige Struktur von H64V-Mbmet.....	100
7.1.2	Interpretation der Gauß-Breite der Soret-Bande	106
7.1.3	Relaxation des photoinduzierten metastabilen Zustands.....	110
7.2	Wasserstoffatome: Positionen und Dynamik aus Neutronenstreuung	114
7.2.1	Verbesserung der Sichtbarkeit von ¹ H-Atomen	115
7.2.2	Wassermoleküle und Protonierung der Histidine in der Neutronenstruktur bei 20K im Vergleich zu 300K.....	118
7.2.3	Vergleich der Wasserstoffatompositionen mit molekularmechanisch berechneten Positionen	124
7.2.4	Dynamik der Wasserstoffatome	127
8	Anhang.....	134
8.1	Die 20 α -L-Aminosäuren der Proteine.....	134
8.2	Erläuterungen zum Zeitkorrelator	135
9	Literaturverzeichnis	139

1 Einleitung

„Was haben wir aus allen diesen AGCTs¹ gelernt?“, fragt der Autor eines Begleitartikels zur Publikation der Ergebnisse des Humangenom-Projektes (Baltimore 2001). Mit etwas Abstand kann man die oben gestellte Frage neu betrachten. Die Hoffnung, molekulare Mechanismen auch zur Bekämpfung von Krankheiten aus der Sequenzinformation der DNS abzuleiten, wird sich wohl nicht so schnell erfüllen wie von manchen angenommen. Die molekularen Vorgänge sind maßgeblich durch Proteine bestimmt. Die Abfolge der Basenpaare in der DNS legt die Abfolge der Aminosäuren, die Primärstruktur, in einem Protein fest. Nach Untersuchungen von Anfinsen (1973) ist dadurch zugleich die dreidimensionale Struktur eines Proteins bestimmt. Die Struktur-Vorhersage aus der Primärstruktur ist aber bis heute nicht möglich, auch wenn Fortschritte erzielt wurden, die Hoffnung auf eine Lösung des Problems machen (Onuchic et al. 1997; Baker 2000).

Kennt man die Struktur eines Proteins, ist die Funktion keineswegs klar festgelegt (Skolnick et al. 2000). Selbst bei bekannter Struktur und Funktion eines Proteins reicht dies nicht aus, um zu verstehen, wie diese Funktion erfüllt wird. Ein besonders augenfälliges Beispiel ist der Konformationswechsel der Citratsynthase bei Bindung eines Oxalacetat-Moleküles, der in Abb. 1.1 dargestellt ist (Liao et al. 1991). Der Konformationswechsel ermöglicht die Bindung

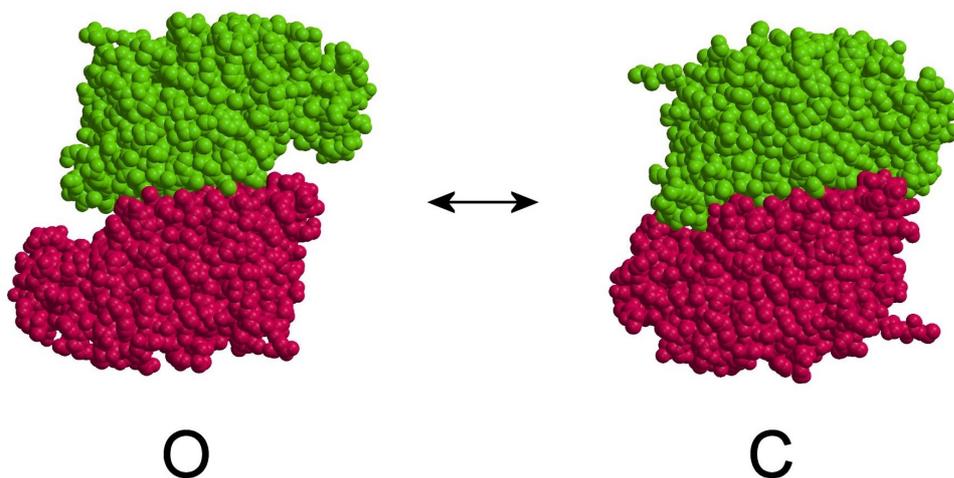


Abb. 1.1: Konformationswechsel der Citratsynthase von offen (O) zu geschlossen (C) bei Bindung von Oxalacetat (Liao et al. 1991). Die Farben unterscheiden die zwei Untereinheiten.

¹ AGCT steht dabei für die Basen der DNS: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T)

von Acetyl-Coenzym A, das mit dem Oxalacetat dann zu Citrat und Coenzym A umgesetzt wird (für Details zur Funktion siehe z.B. Stryer 1995). Aus der vorhergehenden Abbildung wird ersichtlich, dass man zumindest Informationen über die Struktur der verschiedenen Konformationen benötigt, die ein Protein zur Erfüllung seiner Funktion einnehmen kann. Doch auch dieses Bild ist statisch, es verrät nicht, wie das Protein zwischen den Konformationen wechselt.

Die in Abb. 1.1 dargestellte Citratsynthase hat eine Masse von ca. 100kD und ist damit mehr als fünf mal so schwer wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Myoglobin. Die Größe erweist sich jedoch als Nachteil, wenn es um ein detailliertes Verständnis der grundlegenden Zusammenhänge von Struktur, Funktion und Dynamik geht. Eine Möglichkeit, diese zu untersuchen, ist die Betrachtung eines Modellsystems, das gerade groß genug ist, um die wesentlichen Eigenschaften eines Proteins aufzuweisen, aber klein genug ist, um es im Experiment und Modell im Detail betrachten zu können. Je besser dieses Molekül charakterisiert ist, desto detaillierter kann man die Zusammenhänge untersuchen und hoffen in ein kohärentes Bild zusammenfassen zu können.

Myoglobin ist aus dieser Sicht ein idealer Kandidat. Es ist das Protein, dessen Struktur als erste aufgeklärt wurde (Kendrew et al. 1960). Es wurde eine Vielzahl von Experimenten mit Myoglobin durchgeführt und die Entwicklung vieler Methoden wurde mit diesem System getestet. Dies hat ihm auch die Bezeichnung „Wasserstoffatom der Biophysik“ eingebracht (Frauenfelder et al. 1999). Es besteht aus 153 Aminosäuren, die in acht α -Helices gefaltet sind und eine Häm-Gruppe umschließen (vgl. z.B. Abb. 5.7 und Abb. 7.16). Die Häm-Gruppe ist über ihr Eisenatom an ein Histidin, das in einer der Helices angeordnet ist, gebunden. Myoglobin speichert Sauerstoff durch Bindung an das Eisen der Häm-Gruppe und kann ihn durch die Zelle zu den Mitochondrien transportieren. Obwohl Myoglobin eines der am besten untersuchten Proteine ist, wurde die biologische Funktion erst kürzlich um die Bedeutung als NO-Fänger erweitert (Brunori 2001a; Brunori 2001b; Frauenfelder et al. 2001). NO inhibiert die Cytochrom-c Oxidase, das terminale Enzym der Atmungskette, schon in geringen Konzentrationen. Myoglobin kann dies durch die Reaktion von NO mit O_2 zu Nitrat (NO_3^-) verhindern. Myoglobin ist demnach nicht nur ein einfaches Speicher- und Transportprotein, sondern hat auch enzymatische Funktion. Eine Untersuchung der Faltung der Aminosäurekette ohne die Häm-Gruppe zeigt, dass Myoglobin ähnliche Missfaltungen aufweisen kann wie Prion-Proteine beim Rinderwahnsinn oder der Creutzfeldt-Jakob-

Krankheit (Fändrich et al. 2001). Myoglobin zeigt also zahlreiche Facetten, die Proteine so einzigartig machen, und ist damit ein ideales Untersuchungsobjekt.

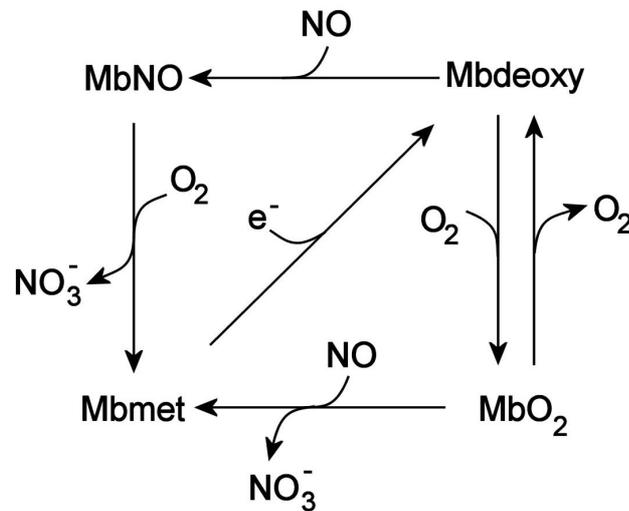


Abb. 1.2: Reaktionen von Myoglobin mit NO und O₂ (nach Brunori 2001a).

Bei der Speicherung von Sauerstoff ist das Eisenatom in der Häm-Gruppe im zweifach positiv geladenen Zustand (Fe^{2+}). Die Untersuchung der Blitzlicht-Photolyse von Kohlenmonoxidligandiertem Myoglobin (MbCO) und die anschließende Rückbindung des CO-Moleküls hat bedeutende Beiträge zur heutigen Vorstellung von der Energielandschaft der Proteine geleistet (Austin et al. 1975, MbCO ist ebenfalls im Fe^{2+} -Zustand und lässt sich mit höherer Quantenausbeute photolysieren als das oxygenierte Myoglobin MbO_2). Dabei erwies sich die Untersuchung dieses Prozesses in einem breiten Temperaturbereich vom physiologischen Bereich bis zu tiefsten Temperaturen von wenigen Kelvin als notwendig, um die eigentlich einfache Funktion der Bindung des kleinen Liganden zu verstehen. Die Rückbindungskinetik zeigte, dass die Proteine als inhomogenes Ensemble vorliegen. Man spricht von Konformationssubzuständen, die die gleiche Reaktion mit unterschiedlichen Raten erfüllen. Die Existenz der Konformationssubzustände ist mit zahlreichen weiteren experimentellen Methoden gezeigt worden, u.a. Mößbauer-Spektroskopie (Parak et al. 1982; Parak et al. 1999), temperaturabhängige Röntgenstrukturanalyse (Frauenfelder et al. 1979; Hartmann et al. 1982; Parak et al. 1987; Chong et al. 2001) und Lochbrennen in optische Banden (Friedrich 1995).

Erst in letzter Zeit wurden aufgrund experimenteller Fortschritte neue Einsichten in den schon gut verstanden geglaubten Prozess der Blitzlichtphotolyse gewonnen. Durch Einfrieren des

Proteins bei tiefen Temperaturen kann man transiente Zustände stabilisieren und diese mit der Röntgenstrukturanalyse im Detail betrachten (Brunori et al. 2000; Chu et al. 2000; Ostermann et al. 2000). Die Methode der zeitaufgelösten Röntgenstrukturanalyse ermöglicht dies sogar als Funktion der Zeit bei physiologischen Temperaturen (Srajer et al. 2001). Diese Untersuchungen zeigen, dass sich das CO-Molekül zwischen Hohlräumen im Protein bewegt. Diese Hohlräume spielen vermutlich auch eine Rolle bei der enzymatischen Funktion im NO-Stoffwechsel. Frauenfelder und Mitarbeiter beschreiben Myoglobin in diesem Zusammenhang als Mikroreaktor. Die Hohlräume können als Speicher und Orientierungshilfe dienen, um die Reaktion zu steuern (Frauenfelder et al. 2001). Neben der Methode der Blitzlicht-Photolyse kann man auch ausgehend von dreifach positiv geladenem Eisen, das durch ein Wassermolekül ligandiert ist (Met-Myoglobin, Mbmet) durch Reduktion des Eisenatoms einen Nicht-Gleichgewichtszustand ($\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}^*$) erzeugen (Prusakov et al. 1995). Dabei bleibt der Wasserligand erhalten. Abb. 1.3 stellt die Prozesse, die dabei beobachtet werden dar. Dieser metastabile Zustand kann mit Blitzlichtphotolyse untersucht werden (Lamb et al. 1998b). Die Reduktion kann mit Röntgenstrahlung (Prusakov et al. 1995) oder durch photoinduzierten Elektronentransfer initiiert werden (Lamb et al. 1998a). Die Struktur des metastabilen Zustands $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}^*$ wurde mittels der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Ostermann 2000). Diese zeigt, daß die Struktur der von Met-Myoglobin entspricht. $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}^*$ relaxiert ab Temperaturen von ca. 150K zum unligandierten Gleichgewichtszustand des deoxygenierten Myoglobins (Mbdeoxy). Dieser Relaxation geht eine Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands voraus, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

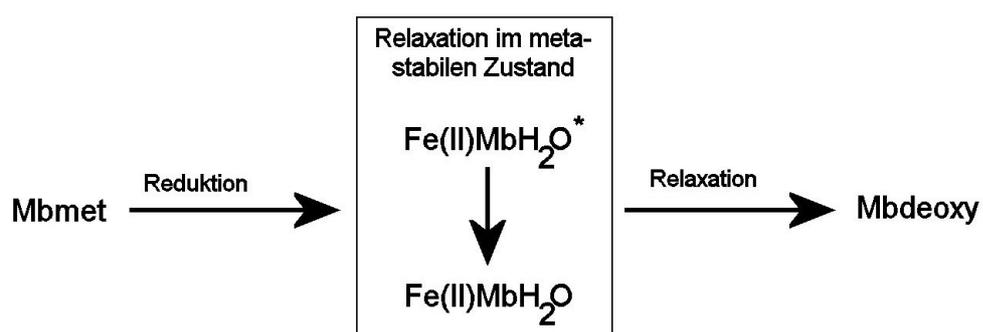


Abb. 1.3: Prozesse bei der Untersuchung des metastabilen Zustands $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$.

Aufgrund der neueren Erkenntnisse über die Bedeutung von Myoglobin im NO-Stoffwechsel erfährt die Untersuchung des Überganges von Mbmet zu Mbdeoxy zudem eine physiologische Bedeutung.

Die Untersuchung der Proteindynamik mit Mößbauerspektroskopie (Parak und Formanek 1971; Parak et al. 1982; Parak et al. 1999), inkohärenter Neutronenstreuung (Doster et al. 1989; Zaccai 2000) und Simulationen (Smith et al. 1990; Vitkup et al. 2000) zeigen die Fluktuationen des Proteins im Gleichgewichtszustand. Die Neutronenstruktur bei einer Auflösung von 1.5Å ermöglicht die Auswertung der mittleren quadratischen Auslenkungen der Wasserstoffatome. Die Auswertung im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann einen detaillierten Einblick in die der inkohärenten Streuung an Wasserstoffatomen zugrunde liegende Dynamik liefern. Aus allen Untersuchungen geht hervor, dass sich das Protein unterhalb von ca. 180K im wesentlichen wie ein Festkörper verhält und erst oberhalb dieser Übergangstemperatur seine physiologische Funktion erfüllen kann. Die Fluktuationen ermöglichen dann die für die Funktion nötigen Konformationswechsel. Die Temperaturabhängigkeit der Rückbindung nach Photolyse von MbCO und die Relaxation des metastabilen Zustands Fe(II)MbH₂O zu Mbdeoxy zeigen dies für Myoglobin. Ein analoges Verhalten beobachtet man für die Effizienz des Elektronentransfers im Photosystem höherer Pflanzen (Garbers et al. 1998). Ein weiteres Beispiel, die temperaturabhängige Ligandierung einer Mutante von Myoglobin mit einem Wassermolekül im Met-Zustand, wurde in der vorliegenden Arbeit mit optischer Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse untersucht.

Die einzigartigen Eigenschaften von Neutronen machen diese zur idealen Messsonde für Proteine und andere Biomaterialien (für einen Überblick siehe Byron und Bilbert 2000). Fortschritte in der Instrumentierung haben die Neutronenstrukturanalyse für Proteine auf einem neuen Niveau ermöglicht. Insbesondere die Weiterentwicklung von Neutronen-Bildplatten hat dazu beigetragen (Bücherl et al. 1993; Niimura et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit werden Messergebnisse von zwei unterschiedlichen Experimenten betrachtet, das Laue-Diffraktometer LADI am Institut Laue Langevin in Grenoble, Frankreich (Cipriani et al. 1996) sowie die monochromatische Apparatur BIX-3 am JRR-3M Reaktor in Tokai-Mura, Japan (Tanaka et al. 1999).

Proteine bestehen ungefähr zur Hälfte aus Wasserstoffatomen (vgl. Abb. 1.4 und Struktur der Aminosäuren in Anhang 8.1). Die Proteinstruktur ist durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Bevor die erste Struktur einer Helix in Myoglobin gefunden wurde (Kendrew et al. 1960) hatten Pauling und Corey (Pauling et al. 1951) die Struktur der α -Helix vorhergesagt. Die Wasserstoffbrücken zwischen der Aminosäure n und n+4, die in Abb. 1.4 markiert ist, stabilisiert die Helix.

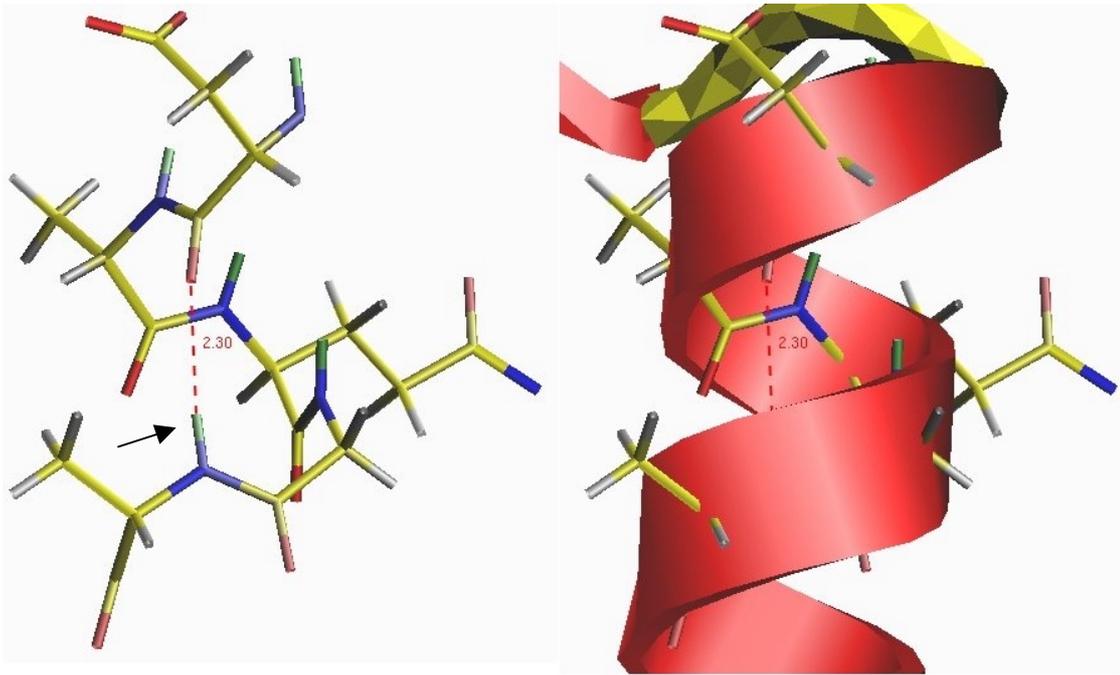


Abb. 1.4: Ausschnitt aus einem helikalen Bereich von Myoglobin. Eine Wasserstoffbrücke, die die Helix (rotes Band) stabilisiert, ist dargestellt (rote, gestrichelte Linie, Abstand in Å). Der Pfeil markiert das an der Wasserstoffbrücke beteiligte Wasserstoffatom. Kohlenstoff: gelb, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot, Wasserstoff: grau (^1H) und grün (^2H).

Die Streuung von Röntgenstrahlung an Wasserstoffatomen ist nur sehr schwach. In der Röntgenstrukturanalyse von Myoglobin konnten selbst bei einer Auflösung von 1.0Å keine Wasserstoffatome identifiziert werden (Vojtechovsky et al. 1999). Die kohärente Streuung von Neutronen an Wasserstoffatomen ist hingegen ungefähr gleich stark wie an den übrigen Atomen. Koordinaten für Wasserstoffatome mit hoher Präzision kann nur die Neutronenstrukturanalyse liefern. Da die Neutronenstreuung darüber hinaus auch sensitiv für verschiedene Isotope ist, lassen sich die Wasserstoffisotope ^1H und ^2H unterscheiden (in Abb. 1.4 grau bzw. grün). Wasserstoffatome in polaren Bindungen, wie das in Abb. 1.4 durch den Pfeil markierte Amidproton der NH-Gruppe des Proteinrückgrates, können austauschen. Wenn das Protein von H_2O -Puffer in D_2O -Puffer gebracht wird, kann dieser Austausch in der Neutronenstrukturanalyse sichtbar gemacht werden. Kovalent gebundene Wasserstoffatome z.B. in Methylgruppen sind nicht austauschbar. Die starke Streuung von Neutronen durch Deuterium (^2H) erlaubte schon bei einer Auflösung von 2.1Å die Zuordnung von Protonierungen von Aminosäureseitenketten und die Orientierung von D_2O -Molekülen an der Proteinoberfläche und in den oben erwähnten Hohlräumen der Proteinstruktur.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Optische Spektroskopie von Häm-Proteinen

Die Absorption elektromagnetischer Wellen im sichtbaren Bereich ist im Vergleich zur Spektroskopie mit Wellen kürzerer (z. B. Mößbauer-Spektroskopie oder XAS – „X-ray absorption spectroscopy“) oder größerer Wellenlänge (z.B. EPR oder NMR) technisch einfach zu handhaben. Der schematische Aufbau eines Absorptionsspektrometers ist in der folgenden Abbildung skizziert.

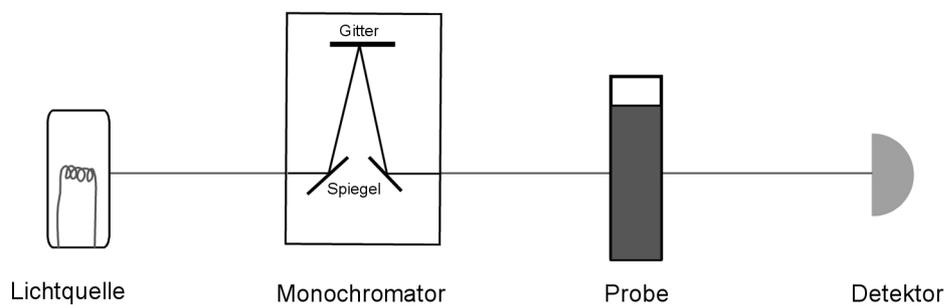


Abb. 2.1: Schema eines optischen Absorptionsspektrometers

Das Licht der Strahlungsquelle wird vom Monochromator in ein wellenlängenabhängiges Spektrum zerlegt. Dabei kommen in der Regel Gittermonochromatoren zum Einsatz. Der Detektor mißt die Intensität mit und ohne absorbierende Probe als Funktion der Wellenlänge. Ein Molekül mit dem Absorptionskoeffizienten $\mu(\nu)$ verringert die einfallende Intensität I_0 bei einer Lösung der Konzentration n und der Weglänge x des Lichts mit der Wellenlänge ν in der absorbierenden Probe nach dem Lambert-Beer Gesetz:

$$I(\nu) = I_0(\nu) \cdot e^{-\mu(\nu) \cdot n \cdot x} \quad (1)$$

Als Absorption bezeichnet man den negativen Logarithmus des Verhältnisses der durchgelassenen zur einfallenden Intensität: $A = -\log I/I_0$. Bei bekanntem Absorptionskoeffizienten kann man damit die Konzentration der Moleküle in der Lösung bestimmen. Als Funktion der Zeit kann man z.B. die Kinetik von Reaktionen über die Konzentrationsänderungen messen. Man kann jedoch aus dem Absorptionsspektrum auch Informationen über das Molekül selbst erhalten, z.B. Ladungs- und Spin-Zustand. Eine Analyse der Linienform der Absorption kann weitere Informationen liefern.

Die absorbierenden Chromophore in Proteinen können in drei Klassen eingeteilt werden: die Peptidbindung, aromatische Aminosäureseitengruppen und prosthetische Gruppen. Im sichtbaren Bereich beobachtet man die Absorption der prosthetischen Gruppen. Im Falle des Myoglobins ist das ein Protoporphyrin IX mit Eisen als Zentralatom.

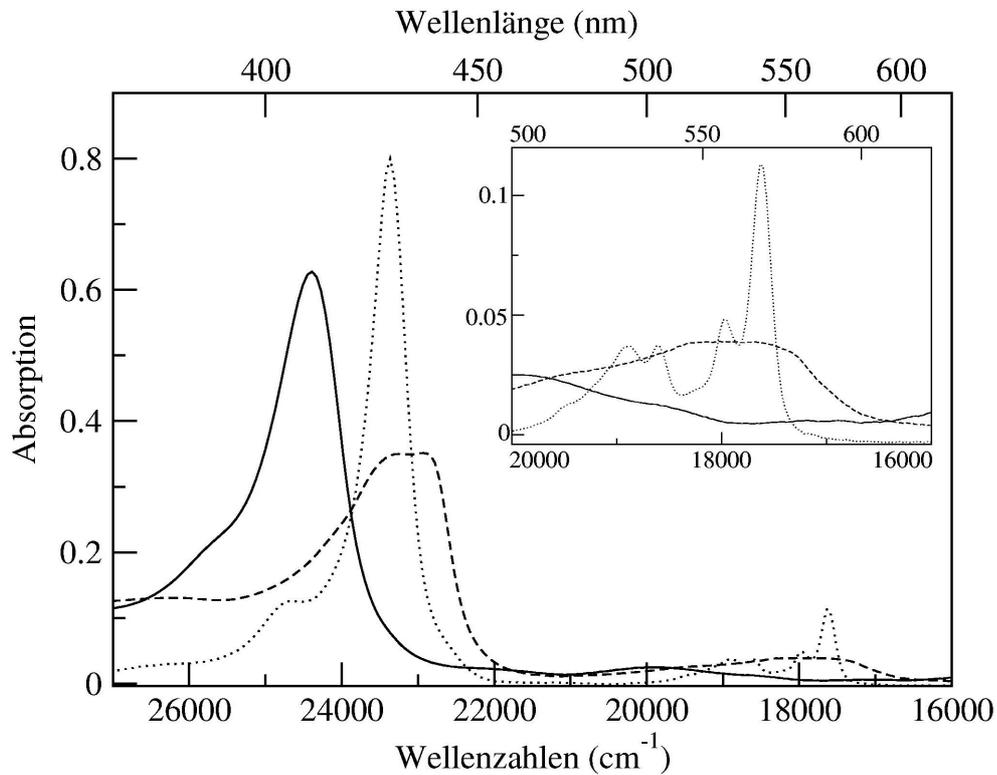


Abb. 2.2: Absorptionsspektrum von Myoglobin bei 20K. Einsatz: Bereich der Q-Banden. Met-Myoglobin (Fe^{3+} , durchgezogene Linie), metastabiler Zustand $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ (Fe^{2+} low spin, gepunktete Linie), deoxy-Myoglobin (Fe^{2+} high spin, gestrichelte Linie).

Die in der obigen Abbildung intensivste Absorptionsbande wird als Soret- oder B-Bande bezeichnet. Sie rührt wie die im kleinen Bild dargestellten Q-Banden von $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergängen im Porphyrin her (Gouterman 1978). Aufgrund des unterschiedlichen Ladungs- und Ligandierungszustands des Eisens wird das Spektrum in der Abbildung in der ersichtlichen Weise verändert. Das optische Spektrum ermöglicht daher eine schnelle und aufschlussreiche Charakterisierung einer Probe. Eine detaillierte Betrachtung der Absorptionsspektren findet man bei Makinen und Churg (1983).

Ein Formalismus zur Beschreibung der Absorption von Molekülen, bei denen eine Kopplung an eine große Anzahl von Schwingungen vorliegt, wurde von Hizhnyakov und Tehver (1967)

entwickelt, durch Page und Mitarbeiter verbessert (Page und Tonks 1981; Chan und Page 1984) und von Champion und Mitarbeitern auf Proteine angewandt (Schomacker und Champion 1986; Srajer et al. 1986). Dieser Formalismus des Zeitkorrelators wird im Folgenden dargestellt. Auch die Betrachtungen von Cordone, Cupane und Mitarbeitern, die weiter unten zusammengefasst werden, bauen darauf auf (DiPace et al. 1992; Cupane et al. 1995; Cordone et al. 1998).

Im Folgenden wird ein elektronischer Übergang mit der Kopplung von Schwingungen betrachtet. Dabei werden die folgenden Näherungen zugrunde gelegt: (1) adiabatische Näherung. (2) Die harmonische Näherung für die Schwingungen der Kerne. (3) Die Existenz eines einzelnen angeregten Elektronen-Zustands und (4) lineare Elektron-Phononen-Kopplung. Die letzte Annahme ist nicht zwingend und der Formalismus lässt sich auf quadratische Kopplung erweitern. Die lineare Kopplung berücksichtigt eine Änderung der Gleichgewichtskoordinaten der Atome im angeregten Zustand relativ zum Grundzustand. Die quadratische Kopplung berücksichtigt eine Änderung des harmonischen Potentials bei Anregung des Moleküls. Dies führt zu geänderten Phononfrequenzen und zum Mischen der Moden. Die quadratische Kopplung wird im Folgenden nicht berücksichtigt. Die Herleitung des Zeitkorrelatorformalismus findet man bei Page (1991). Im Folgenden wird die Kreisfrequenz $\omega=2\pi\nu$ verwendet. Der Absorptionskoeffizient ist durch

$$\mu(\omega) = C \cdot \omega \cdot \text{Im} \Phi(\omega) \quad (2)$$

gegeben (Chan und Page 1984), wobei C eine Konstante ist. Die Funktion Φ ist dem resonanten Teil der komplexen Suszeptibilität (Loudon 1973), die mit dem elektronischen Übergang verbunden ist, proportional, und wird zu

$$\Phi(\omega) = i \cdot \int_0^{\infty} dt \exp(i\omega t - \Gamma t) \cdot \eta(t) \quad (3)$$

berechnet. Sie beschreibt die Reaktion des Moleküls auf die einfallende elektromagnetische Welle der Frequenz ω durch den elektronischen Übergang mit der natürlichen Lebensdauer Γ^{-1} . Die Wechselwirkung mit dem Molekül steckt im Zeitkorrelator $\eta(t)$:

$$\eta(t) = \exp(-i\omega_0 t) \cdot \exp \left\{ - \sum_j S_j \left[(2\langle n_j \rangle + 1) \cdot (1 - \cos \omega_j t) + i \cdot \sin \omega_j t \right] \right\} \quad (4)$$

Dieser beschreibt die resonante Schwingung des Elektronensystems mit der Übergangsfrequenz ω_0 und die Kopplung an die Kernschwingungen ω_j . Die Stärke der Kopplung wird durch die Parameter S_j , und die Bose-Einstein-Besetzung der Vibrationszustände durch $\langle n_j \rangle$ angegeben. Die lineare Kopplungskonstante ist durch die Verschiebung des Energieminimums vom elektronischen Grund- zum angeregten Zustand entlang der Normal-Koordinate der Schwingung bestimmt (vgl. z.B. Cupane et al. 1995). Der oszillierende Anteil führt zu Seitenbanden im Spektrum. Die Dämpfung resultiert aus dem Auseinanderlaufen der Vibrationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Schwingungsfrequenzen (engl. „dephasing“). Voraussetzung dafür ist die Existenz einer großen Zahl von Moden in ausreichender Besetzung höher angeregter Schwingungszustände. Dies wird an Beispielen im Anhang 8.2 gezeigt.

Gleichung (3) beschreibt die Fouriertransformation einer Funktion, die mit der natürlichen Lebensdauer Γ^{-1} abklingt. Darüber hinaus tragen die niederfrequenten Moden zu einem schnelleren Abfall des Zeitkorrelators bei. Dies sind Moden, die ausreichend hohe Besetzungszustände erreicht haben, d.h. für die

$$\sum_j S_j (2 \cdot \langle n_j \rangle + 1) \gg 1 \quad (5)$$

gilt. Dann kann man $\cos(\omega_j t)$ und $\sin(\omega_j t)$ bis zur quadratischen Näherung entwickeln und kommt so zur Näherung für kurze Zeiten (engl. „short time approximation“, Chan und Page 1984). Die Voraussetzung für die Näherung ist für eine große Anzahl von Moden niedriger Frequenz, die somit ausreichend große Besetzungszahlen $\langle n_j \rangle$ haben, erfüllt. Man teilt daher nach diesem Kriterium die Moden in hochfrequente (Index h) und niederfrequente (Index l) auf und erhält so:

$$\begin{aligned} \eta(t) = & \exp\left[-i \cdot t \left(\omega_0 + \sum_l S_l \cdot \omega_l\right)\right] \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \sigma^2 t^2\right) \cdot \\ & \times \exp\left\{-\sum_h S_h [(2\langle n_h \rangle + 1) \cdot (1 - \cos \omega_h t) + i \cdot \sin \omega_h t]\right\} \end{aligned} \quad (6)$$

Dabei beschreibt der zweite Exponentialterm eine Dämpfung der Moden, die im Frequenzspektrum zu einer Gauß-Verbreiterung führt, wobei

$$\sigma^2 = \sum_l S_l (2 \cdot \langle n_l \rangle + 1) \cdot \omega_l^2 \quad (7)$$

gilt. Ferner wird die elektronische Übergangsfrequenz nach Gl. (6) durch den Einfluss der niederfrequenten Moden verschoben. Im Anhang 8.2 werden zur Veranschaulichung der Näherung für kurze Zeiten ein paar Beispiele diskutiert.

In der folgenden Abbildung ist die Zustandsdichte von Myoglobin aus einer Normal-Moden-Analyse gezeigt (aus Melchers et al. 1996). Dabei wurden auch die in der Röntgenstruktur sichtbaren Wassermoleküle berücksichtigt. Man sieht, dass von 7 bis 200cm^{-1} eine Vielzahl an Moden beobachtbar sind. Bei den Moden niedrigster Frequenz handelt es sich um Bewegungen der Sekundärstrukturelemente gegeneinander. Die große Zahl an Moden lässt vermuten, dass die Näherung für kurze Zeiten bei Myoglobin eine sinnvolle Anpassung von Spektren ermöglicht.

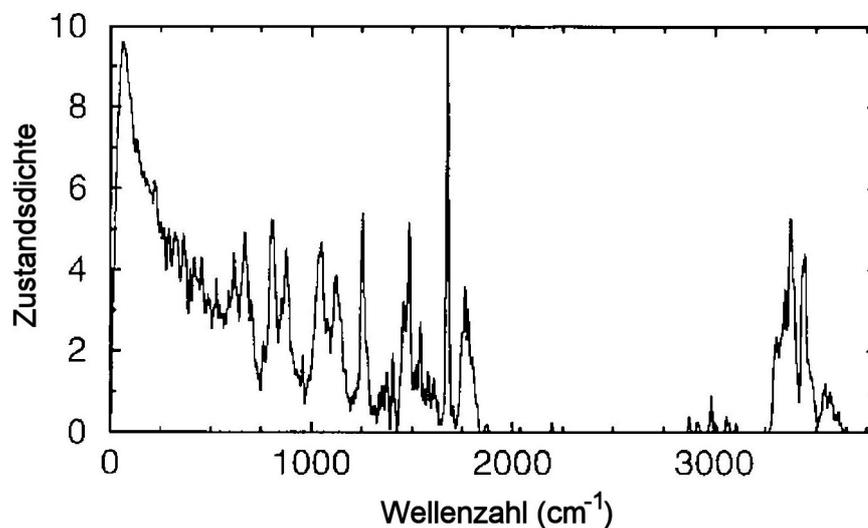


Abb. 2.3: Zustandsdichte von MbCO aus einer Normal-Moden-Analyse (aus Melchers et al. 1996).

Eine Analyse der Verbreiterung der optischen Spektren kann mit dem gesamten Normal-Moden-Spektrum erfolgen. Die Kopplungskonstanten kann man nicht auf einfache Art und Weise aus einer Normal-Moden-Analyse erhalten. Eine gangbare Näherung wird in der Auswertung in Abschnitt 5.2 dargestellt.

Nimmt man die Gleichungen (2), (3) und (6) zusammen, so kann man die Absorption durch die Faltung von Lorentz-Linien mit einer gaußschen Verbreiterung beschreiben. Dieser analoge Formalismus wurde von Cordone, Cupane und Mitarbeitern beschrieben (DiPace et al. 1992; Cupane et al. 1995). Die Absorption lässt sich somit durch

$$\mu(\nu) = M \cdot \nu \cdot \{L(\nu) \otimes G(\nu)\} \quad (8)$$

berechnen. Die Faltung wird dabei durch das Symbol \otimes dargestellt. Die Frequenz $\nu = \omega/2\pi$ wird im Folgenden verwendet, um die Konsistenz mit der Terminologie aus den oben angegebenen Veröffentlichungen zu bewahren. Die Lorentz-Funktionen beschreiben dabei den elektronischen Übergang und die Nebenlinien durch die Anregung von Schwingungen:

$$L(\nu) = \sum_{m_{h1}, m_{h2}, \dots, m_{hN}} \left[\prod_{j=1}^N \frac{(S_{hj})^{m_{hj}} \cdot e^{-S_{hj}}}{m_{hj}!} \right] \frac{\Gamma}{\left[\nu - \nu_0(T) - \sum_{j=1}^N m_{hj} R_{hj} \nu_{hj} \right]^2 + \Gamma^2} \quad (9)$$

Die Lebensdauer des angeregten Zustands ist wiederum durch Γ gegeben. Die Resonanzfrequenz des elektronischen Überganges ist $\nu_0(T)$. Diese ist aufgrund der sich mit der Temperatur ändernden Besetzung der niederfrequenten Moden in der quadratischen Kopplung ebenfalls von dieser abhängig. Die lineare Kopplung der Phononen ist durch S_{hj} gegeben, die quadratische durch R_{hj} . Die quadratische Kopplung gibt an, wie sich das harmonisch genäherte Potential zwischen Grund- und angeregtem Zustand ändert. Die Quantenzahlen m_{hj} bezeichnen den Anregungszustand der jeweiligen Schwingung. Der Index h steht für hochfrequente Moden. Die durch die niederfrequenten Moden verursachte Gauß-Verbreiterung wird durch

$$G(\nu) = \frac{1}{\sigma(T)} e^{-\frac{\nu^2}{2\sigma^2(T)}} \quad (10)$$

beschrieben. Diese ist ebenfalls wegen der sich mit der Temperatur ändernden Besetzung der Moden von dieser abhängig. Man erhält für die Breite der Gauß-Funktion

$$\sigma^2 = \sum_j^{N_l} R_{lj}^2 \cdot S_{lj} \cdot \nu_{lj}^2 \cdot \coth\left(\frac{h\nu_{lj}}{2k_B T}\right) \quad (11)$$

in Analogie zu Gl. (7). (Man beachte, dass $\coth(h\nu_j/2k_B T) = 2\langle n_j \rangle + 1$ gilt. h : Plancksche Konstante, k_B : Boltzmann-Konstante, T : Temperatur.) Der Index l steht für niederfrequente Moden. Zur Auswertung von gemessenen Spektren verwenden Cordone, Cupane und Mitarbeiter die hochfrequenten Modenfrequenzen, die mit Raman-Spektroskopie gemessen wurden. Als anzupassende Parameter stehen dann ν_0 , Γ , σ und die Kopplungskonstanten S_{hj} zur Verfügung, die quadratischen Kopplungskonstanten R_{hj} werden zu eins festgehalten. Die

Gauß-Breite wird dabei ohne zugrunde liegendes Modell gemäss Gl. (10) bestimmt. Um Informationen über die niederfrequenten Moden zu erhalten, wurde bisher Gl. (11) durch ein Einstein-Modell genähert. Dabei wurde das Spektrum der niederfrequenten Moden durch eine repräsentative niederfrequente Mode $\langle \nu \rangle$ ersetzt:

$$\sigma^2 = N_1 \cdot S_1 \cdot R_1^2 \cdot \langle \nu \rangle^2 \cdot \coth\left(\frac{h\langle \nu \rangle}{2k_B T}\right) + \sigma_{inh}^2 \quad (12)$$

Der Temperaturverlauf der Gauß-Breite wird dann in diesem Modell mit den Parametern $\langle \nu \rangle$ und $N_1 S_1 R_1^2$ sowie einer additiv zur Breite σ möglichen inhomogenen Verbreiterung σ_{inh} angepasst. Ein Beispiel ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

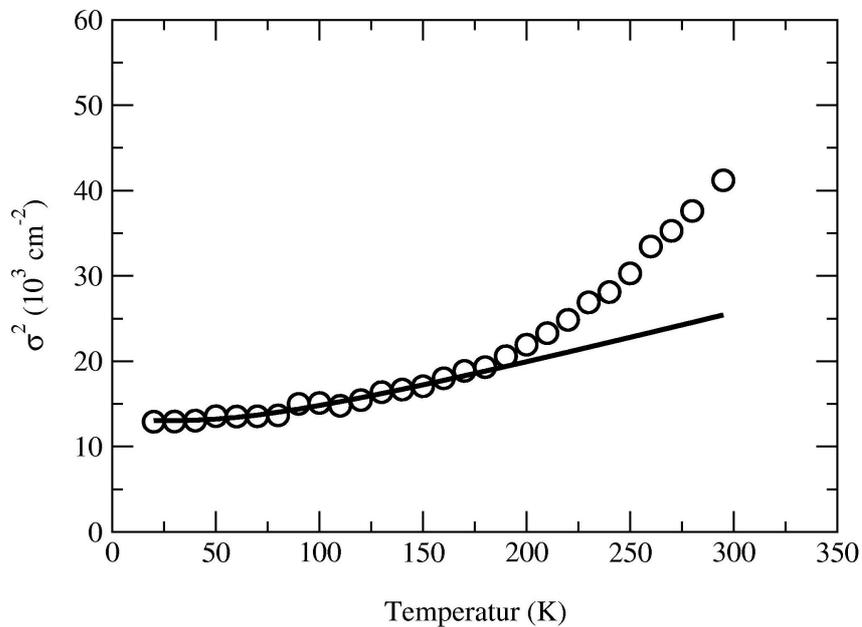


Abb. 2.4: Temperaturabhängige Gauß-Breite von MbCO in 65% Glycerin/Wasser-Puffer (offene Kreise, Daten aus Cupane et al. 1995) und eine Anpassung nach Gl. (12) (durchgezogene Linie).

Dieses Einstein-Modell kann nicht den ganzen Temperaturbereich von 20K bis 300K korrekt beschreiben. Daher wird unter der Annahme, dass es bei tiefen Temperaturen gilt, die Temperatur bestimmt, bis zu der eine akzeptable Anpassung erzielt werden kann. Die Differenz zwischen den aus den Spektren bestimmten Werten für die Breite σ und den aus dem Einstein-Modell nach Gl. (12) bestimmten Werten wird dann in der Literatur als anharmonische Abweichung interpretiert (DiPace et al. 1992; Cupane et al. 1995; Cordone et al. 1998).

2.2 Kristallstrukturanalyse von Proteinen

Die Streuung von Röntgen- oder Neutronenwellen an einem Atom unterliegt unterschiedlichen physikalischen Wechselwirkungen. Dies wird durch verschiedene Streuamplituden beschrieben. Abgesehen vom Streuprozess am einzelnen Atom wird die Interferenz der gestreuten Wellen für kohärente Röntgen- und Neutronenstreuung durch den gleichen Formalismus beschrieben. Dabei ist bei der Berechnung des Strukturfaktors nur die entsprechende Streuamplitude einzusetzen. Anschließend werden die beiden Messmethoden, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden, dargestellt. Die monochromatische Methode ist die Standardmethode in der Röntgenstrukturanalyse und wurde auch am Neutronendiffraktometer BIX-3 am JRR-3 Reaktor in Tokai-mura (Japan) umgesetzt (Tanaka et al. 1999). Die Laue-Methode, die am Neutronendiffraktometer LADI in Grenoble verwirklicht wurde (Cipriani et al. 1996), wird anschließend vorgestellt. Schließlich wird die Datenauswertung, insbesondere die Verfeinerung der Strukturmodelle, die analog verläuft, zusammengefasst.

2.2.1 Theorie der Strukturuntersuchung von Proteinkristallen

Die Röntgenstreuung erfolgt an der Elektronenhülle der Atome. Neutronen werden hingegen am Atomkern aufgrund von Kernkräften und magnetischen Kräften gestreut. Für diamagnetische Systeme wie Proteine ist die magnetische Streuung im Vergleich zur Kernstreuung vernachlässigbar und wird daher im Folgenden nicht berücksichtigt. Zunächst wird die Streuung von Neutronen betrachtet.

Ein Neutron der Masse m_n und der Geschwindigkeit \vec{v} besitzt den Impuls $\vec{p} = m_n \vec{v} = \hbar \vec{k}_n$, wobei \vec{k}_n der Wellenvektor des Neutrons und \hbar die Plancksche Konstante h geteilt durch 2π sind. Die kinetische Energie des Neutrons ist dann

$$E = \frac{\vec{p}^2}{2m_n} = \frac{\hbar^2 \vec{k}_n^2}{2m_n}. \quad (13)$$

Und für die Wellenlänge $\lambda = 2\pi/k_n$ folgt somit

$$\lambda = \sqrt{\frac{h^2}{2m_n E}}. \quad (14)$$

Die Neutronen werden entsprechend ihrer Energie bzw Wellenlänge als kalt, thermisch oder heiß bezeichnet. In Tab. 2.1 sind die Definitionen der Bereiche und die entsprechenden Wellenlängen aufgeführt, wobei die Einteilung von Lovesey (1984) übernommen wurde.

Bezeichnung	Energie (meV)	Wellenlänge (Å)
Kalt	0.1 – 10	28.6 - 2.86
Thermisch	10 – 100	2.86 - 0.9
Heiß	100 – 500	0.90 - 0.40

Tab. 2.1: Definition von kalten, thermischen und heißen Neutronen (Lovesey 1984).

Die allgemeine Darstellung der Streuung eines Teilchens bzw. Wellenpakets an einem Teilchen findet man z.B. bei Lovesey (1984). In ausreichender Entfernung vom Streuzentrum gilt für die Wellenfunktion ψ :

$$\psi = e^{i\vec{k}_0 \vec{r}} + f(\vec{k}) \frac{e^{i\vec{k}_1 r}}{r}. \quad (15)$$

Wobei $e^{i\vec{k}_0 \vec{r}}$ die einlaufende Wellen und $e^{i\vec{k}_1 r}$ die gestreute Kugelwelle beschreibt. $f(\vec{k})$ wird als Streuamplitude bezeichnet. \vec{k} , der Streuvektor, gibt die Änderung des Wellenvektors an:

$$\vec{k} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0. \quad (16)$$

Die Streuamplitude ist durch das Potential $V(\vec{r}, \vec{R})$ des Streutargets bestimmt (\vec{R} : Koordinaten des Targets). Die Streuamplitude für Neutronen $f_n(\vec{k})$ ist:

$$f_n(\vec{k}) = -\frac{m_n}{2\pi\hbar^2} \int d^3r' e^{-i\vec{k}_1 \vec{r}'} \int d^3R' \Phi_1^*(\vec{R}') V(\vec{r}', \vec{R}') \Phi_0(\vec{R}') e^{i\vec{k}_0 \vec{r}'}. \quad (17)$$

Wobei $\Phi_0(\vec{R})$ und $\Phi_1(\vec{R})$ die Wellenfunktionen des Atoms vor bzw. nach dem Streuvorgang sind. Der differentielle Wirkungsquerschnitt ist

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = |f(\vec{k})|^2. \quad (18)$$

Die Reichweite der Neutron-Kern-Wechselwirkung liegt im Bereich von 10^{-15} m und ist damit bedeutend kleiner als die Wellenlänge niederenergetischer Neutronen, die für die Strukturanalyse interessant sind (10^{-10} m). Beschreibt man die Streuung im Rahmen einer Zerlegung in Partialwellen, so ist nur die isotrope s-Wellenstreuung zu beachten. Das

Kernpotential, an dem die Streuung erfolgt, wird durch das Fermi-Pseudo-Potential dargestellt:

$$V(\vec{r}, \vec{R}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m_n} b \delta(\vec{r} - \vec{R}). \quad (19)$$

Wie Lovesey (1984) anmerkt, ist das Potential nach Gl. (19) nicht das korrekte Potential für die Neutronen-Kern-Wechselwirkung, sondern ist vielmehr ein Kunstgriff, durch den in der Bornschen Näherung die isotrope s-Wellenstreuung erhalten wird, die man auch experimentell beobachtet.

Nach Gl. (17) ist die Streuamplitude somit die Fouriertransformierte einer Diracschen δ -Funktion:

$$f_n(\vec{k}) = -\frac{m_n}{2\pi\hbar^2} \int d^3r' \frac{2\pi\hbar^2}{m_n} b \delta(\vec{r} - \vec{R}) e^{-i\vec{k}\vec{r}'} = b \quad (20)$$

Die Streuamplitude ist eine winkelunabhängige Konstante, die sogenannte Streulänge b . Die kohärenten Streulängen für die in Proteinen interessierenden Elemente sind in Tab. 2.2 zusammen mit den Werten für Absorption angegeben.

Bei Kernen, die einen Spin I ungleich Null haben, unterscheiden sich die Streulängen $b^{(\pm)}$ für parallele ($b^{(+)}$) und antiparallele ($b^{(-)}$) Anordnung von Neutronen und Kernspin. Der Gesamtspin ist im einen Falle $I + 1/2$ im anderen $I - 1/2$. Da die Spins der Atomkerne im zu untersuchenden Kristall statistisch orientiert sind, kann man Interferenz nur von einem mittleren Potential beobachten. Die kohärente Streuung wird also von einer mittleren Streulänge \bar{b} bestimmt (b_{koh} in Tab. 2.2). Die inkohärente Streuung hingegen wird durch den nicht korrelierten Anteil, also die mittlere quadratische Abweichung $\overline{|b|^2} - |\bar{b}|^2$, bestimmt.

Da ein System mit Spin J insgesamt $2J+1$ Zustände besitzt, müssen die Streulängen bei der Berechnung der mittleren Streulänge entsprechend gewichtet werden. Die mittlere Streulänge berechnet sich dann wie folgt:

$$\bar{b} = \frac{I+1}{2I+1} b^{(+)} + \frac{I}{2I+1} b^{(-)}. \quad (21)$$

Und ferner folgt

$$\overline{|b|^2} = \frac{I+1}{2I+1} |b^{(+)}|^2 + \frac{I}{2I+1} |b^{(-)}|^2. \quad (22)$$

Der totale Wirkungsquerschnitt berechnet sich dann zu

$$\sigma_{\text{tot}} = \sigma_{\text{koh}} + \sigma_{\text{ink}} = 4\pi \overline{|b|^2} + 4\pi \left(\overline{|b|^2} - \overline{|b|^2} \right) = 4\pi \overline{|b|^2}. \quad (23)$$

Bemerkenswert ist, dass die Streulänge nicht monoton von der Kernladungszahl abhängt. Eine Besonderheit ist für die zwei Wasserstoffisotope zu beobachten: sie haben sogar Streulängen mit unterschiedlichen Vorzeichen. Die Streulänge von Stickstoff und Sauerstoff unterscheidet sich ebenfalls deutlich. Ist bei einem katalytischen Prozess die Orientierung eines Asparagins oder Glutamins (vgl. Anhang 8.1) von Bedeutung, so ist die Orientierung der Amidgruppe in der Neutronenstrukturanalyse erkennbar.

Element	Z	$b_{\text{koh}} (10^{-12} \text{ cm})$	$\sigma_{\text{koh}} (10^{-24} \text{ cm}^2)$	$\sigma_{\text{ink}} (10^{-24} \text{ cm}^2)$	$\sigma_{\text{abs}} (10^{-24} \text{ cm}^2)$
^1H	1	-0.374	1.7599	79.91	0.3326
^2H	1	0.667	5.597	2.04	0.00051
C	6	0.665	5.554	0.001	0.00350
N	7	0.921	11.01	0.49	1.90
O	8	0.581	4.235	0.000	0.00019
S	16	0.285	1.0186	0.007	0.53
Fe	26	0.954	11.44	0.39	2.56

Tab. 2.2: Kernladungszahl Z , kohärente Streulänge, kohärenter, inkohärenter und Absorptions-Wirkungsquerschnitt ($\lambda = 1.8\text{\AA}$) für niederenergetische Neutronen (aus Bée 1988). Außer bei den Wasserstoffisotopen sind die Werte für das natürlich vorkommende Isotopengemisch angegeben.

In Tab. 2.2 ist auch der inkohärente Wirkungsquerschnitt aufgeführt. Für ^1H ist er mit Abstand am größten. Bei einem Streuexperiment zur Strukturbestimmung ist das ein unerwünschter Effekt, da schwache Signale aus kohärenter Streuung dadurch schwieriger messbar sind.

Zur Veranschaulichung sei noch kurz der Fall des Wasserstoffs näher betrachtet. Dieser ist für die Strukturuntersuchung von Proteinen mittels Neutronen von großer Bedeutung, da ca. die Hälfte aller Atome in einem Protein Wasserstoffatome sind und Proteinkristalle nur in

wässriger Lösung stabil sind. Die Streulängen für ^1H zu unterschiedlichen Spineinstellungen sind $b^{(+)} = 1.04 \cdot 10^{-12} \text{cm}$ und $b^{(-)} = -4.74 \cdot 10^{-12} \text{cm}$. Allgemein gilt, dass der inkohärente Streuquerschnitt umso größer ist, je stärker sich die Streulängen für die beiden unterschiedlichen Spineinstellungen unterscheiden. Beim Deuteron (^2H) unterscheiden sich die Werte weniger: $b^{(+)} = 0.95 \cdot 10^{-12} \text{cm}$ und $b^{(-)} = 0.12 \cdot 10^{-12} \text{cm}$. Der inkohärente Wirkungsquerschnitt ist deutlich kleiner. Bei Kernen mit Spin Null, wie z.B. ^{12}C ist natürlich auch keine inkohärente Streuung zu erwarten. Dass der inkohärente Streuquerschnitt in Tab. 2.1 dennoch nicht Null ist, liegt am natürlichen Isotopengemisch. Da das Kernpotential und somit die Streulänge auch für verschiedene Isotope unterschiedlich ist, muss die Berechnung der mittleren Streulänge auch noch eine Mittelung über die Isotope entsprechend ihrer Häufigkeit in der Probe beinhalten. Analoges gilt natürlich für die Berechnung der inkohärenten Streuung.

Bei der Röntgenstreuung wird die einfallende elektromagnetische Welle an den Elektronen eines Atoms gestreut. Die Streuamplitude $f_x(\vec{k})$ ist nichts anderes als die Fouriertransformierte der Elektronendichte $\rho(\mathbf{r})$:

$$f_x(\vec{k}) = \int d^3 r' \rho(\vec{r}') e^{i\vec{k}\vec{r}'} \quad (24)$$

Die Streuamplitude wird für Röntgenstrahlung als Atomformfaktor bezeichnet und ist in den International Tables of X-ray Crystallography (MacGillavry und Rieck 1985) zu finden. Die Atomformfaktoren werden in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Programmen durch eine Summe von vier Gauß-Funktionen mit Parametern a_i und b_i sowie einer Konstanten c für jedes Element dargestellt:

$$f_x(\vec{k}) = \sum_{i=1}^4 u_i \exp\left(-v_i \frac{k^2}{4}\right) + w \quad (25)$$

Eine Anpassung der Programme für die Neutronenstrukturanalyse kann daher durch eine Änderung der Parameter der Gauß-Funktionen erfolgen ($u_1 = b$, alle anderen Koeffizienten gleich Null). Da Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff sich durch nur je ein Elektron in der Hülle unterscheiden, sind sie bei der in der Proteinstrukturanalyse üblicherweise erzielten Auflösung nicht unterscheidbar. Wasserstoff ist mit einem Elektron, das auch noch eine sehr hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Bindung z.B. zu einem Kohlenstoffatom hat, kaum sichtbar. Die folgende Abbildung zeigt den Atomformfaktor $f_x(\vec{k})$ für Kohlenstoff und Wasserstoff im Vergleich.

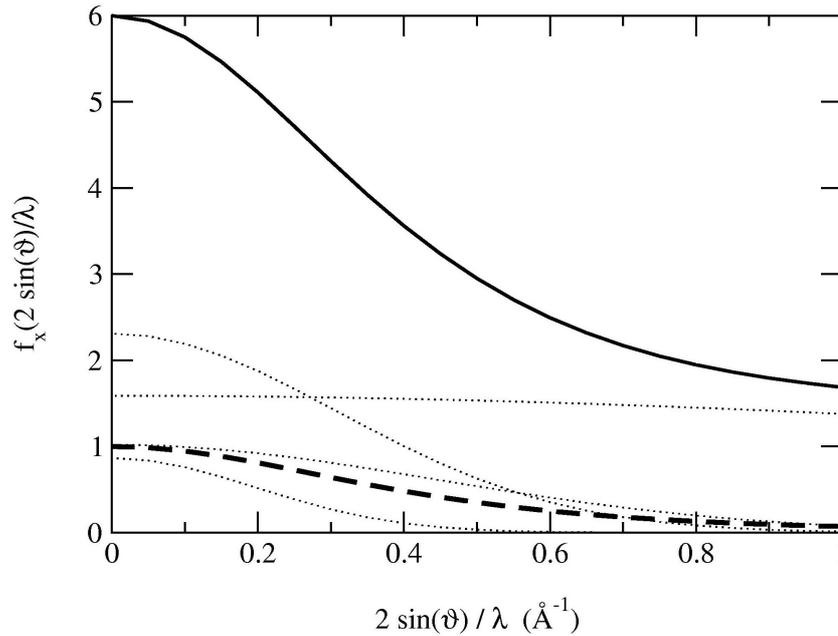


Abb. 2.5: Vergleich des Atomformfaktors für Kohlenstoff (durchgezogene Linie) und Wasserstoff (gestrichelte Linie). Es gilt $|\vec{k}| = 4\pi \sin \vartheta / \lambda$. Für Kohlenstoff ist die Zusammensetzung aus den vier Gauß-Funktionen dargestellt (gepunktete Linien).

Neutronen und Röntgenwellen werden aufgrund unterschiedlicher Mechanismen von Materie gestreut. Betrachtet man nun eine Anzahl von Streuern, so streut ein jeder mit der Streuamplitude $f(\vec{k})$. Für Neutronen ist im Folgenden stets die Streuamplitude $f_n(\vec{k})$ (also die Streulänge b) einzusetzen und für Röntgenstreuung entsprechend $f_x(\vec{k})$. Die Überlagerung aller Wellen ergibt dann den Strukturfaktor F . Durch Fouriertransformation des Strukturfaktors erhält man die Dichte des Inhalts der Einheitszelle eines Kristalls. In der Röntgenstrukturanalyse ist dies die Elektronendichte, bei der Neutronenstrukturanalyse spricht man von Streudichte. Mit Dichte sind im Folgenden sowohl Elektronendichte als auch Streudichte gemeint.

Den grundlegenden Sachverhalt kann man am einfachen Modell der Streuung an zwei Atomen darlegen, wie in Abb. 2.6 dargestellt.

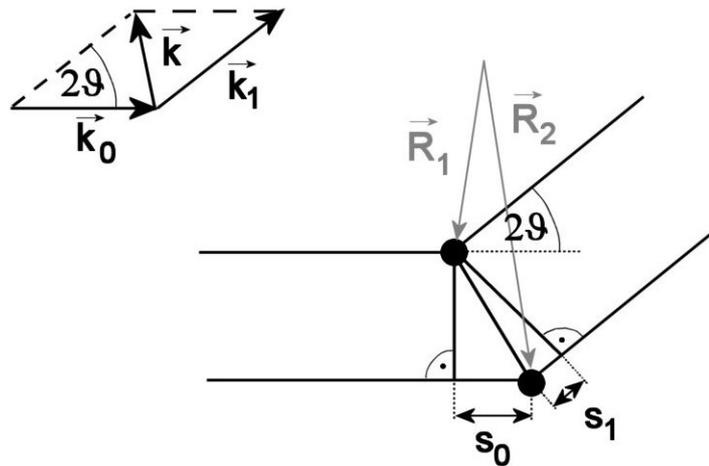


Abb. 2.6: Streuung an einem zweiatomigen Molekül. Die einfallende Welle \vec{k}_0 wird an den beiden Atomen an den Orten \vec{R}_1 und \vec{R}_2 gestreut. Aufgrund des Wegunterschiedes s_0+s_1 haben die gestreuten Wellen einen entsprechenden Phasenunterschied in der Richtung \vec{k}_1 .

Um die Amplitude der gesamten gestreuten Welle zu bestimmen, muss man die Amplituden phasenrichtig addieren:

$$F_{\vec{k}} = f_1(\vec{k}_1 - \vec{k}_0)e^{i(\vec{k}_1 - \vec{k}_0)\vec{R}_1} + f_2(\vec{k}_1 - \vec{k}_0)e^{i(\vec{k}_1 - \vec{k}_0)\vec{R}_2}. \quad (26)$$

Dabei wird die Streuamplitude f_1 und f_2 für das jeweilige Atom eingesetzt. Der Strukturfaktor ist eine komplexe Größe.

Erweitert man das System auf J Atome, so geht man zur Summation über alle Atome über:

$$F_{\vec{k}} = \sum_{j=1}^J f_j(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{R}_j}. \quad (27)$$

Jedes Atom streut dabei mit seiner Streuamplitude f_j . In einem Kristall ist nun diese Summe aus Gl. (27) auf alle Atome des Kristalls zu erweitern. Da der Kristall aus einer periodischen Anordnung der Moleküle besteht, kann man den Ort eines jeden Atoms durch seine Position innerhalb der Einheitszelle \vec{R}_j und die Position der Einheitszelle im Kristall \vec{r}_{G_n} bestimmen (vgl. Abb. 2.7). Die so genannten Gittervektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} spannen die Einheitszelle auf und bilden auch die Basis für das Koordinatensystem.

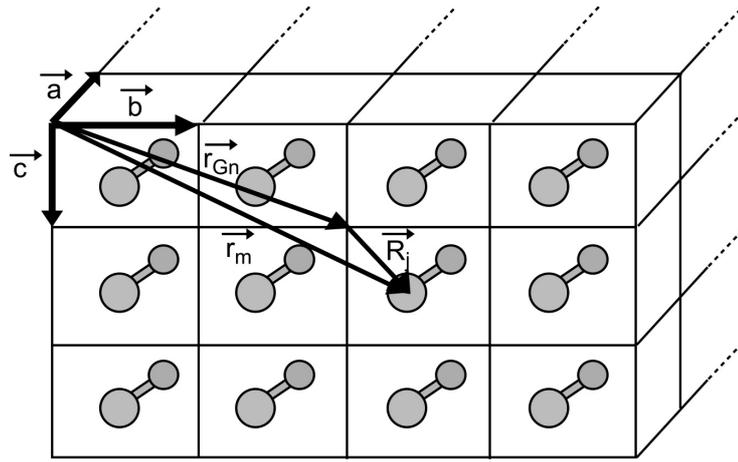


Abb. 2.7: Der Aufbau eines Kristalls. Der Inhalt der Einheitszelle ist schematisch dargestellt.

In einer Einheitszelle können sich mehrere Moleküle befinden. Diese können über Symmetrieoperationen verknüpft sein. Dabei sind die Symmetrieoperationen durch die Kristallsymmetrie bedingt oder auch nicht kristallographisch. Die kleinste Einheit, mit der sich durch Anwendung der kristallographischen Symmetrien der Inhalt der gesamten Einheitszelle darstellen lässt, wird auch als asymmetrische Einheit bezeichnet, die ebenfalls mehrere Moleküle beinhalten kann.

Die Summe über alle Atome im Kristall (hochgestellter Index K) kann man nun zerlegen, wobei eine Summe über die Atome in der Einheitszelle läuft (Index j) und eine Summe über die Elementarzellen (Index n):

$$F_H^K = \sum_{j,n} f_j(\vec{H}) e^{2\pi i \vec{H} \cdot (\vec{r}_{Gn} + \vec{R}_j)} = \sum_{j=1}^J f_j(\vec{H}) e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{R}_j} \cdot \sum_{n=1}^N e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{r}_{Gn}} = F_H \cdot \sum_{n=1}^N e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{r}_{Gn}} \quad (28)$$

Dabei wurde die in der Kristallographie übliche Definition des Streuvektors $\vec{H} = \vec{k}/2\pi$ verwendet. In einem Kristall ist nur in ausgezeichneten Richtungen gestreute Intensität zu erwarten. Die letzte Summe in Gl. (28) ist eine Summation von Phasen $e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{r}_{Gn}}$. Im Kristallgitter gilt $\vec{r}_{Gn} = u \cdot \vec{a} + v \cdot \vec{b} + w \cdot \vec{c}$, wobei u, v und w ganze Zahlen sind und der Index n dann durch eine dreifache Summe über u, v und w zu ersetzen ist: $\sum e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{r}_{Gn}} = \sum e^{2\pi i u \cdot \vec{H} \cdot \vec{a}} \cdot \sum e^{2\pi i v \cdot \vec{H} \cdot \vec{b}} \cdot \sum e^{2\pi i w \cdot \vec{H} \cdot \vec{c}}$. Betrachtet man die Summe der Phasenvektoren in der komplexen Ebene, so sieht man, dass sie für große Zahlen, d.h. viele Einheitszellen, nur dann nicht verschwindende Beiträge liefert, wenn die Laue-Bedingungen erfüllt sind:

$$\begin{aligned}
\vec{H} \cdot \vec{a} &= h \\
\vec{H} \cdot \vec{b} &= k \\
\vec{H} \cdot \vec{c} &= l
\end{aligned}
\tag{29}$$

So dass h, k und l wieder ganze Zahlen sind. Die zweite Summe in Gl. (28) ergibt dann einfach die Zahl der Einheitszellen N.

Man kann nun den Streuvektor \vec{H} im reziproken Koordinatensystem darstellen, das die letzte Summe in Gl. (28) vereinfacht: $\vec{H} = h \cdot \vec{a}^* + k \cdot \vec{b}^* + l \cdot \vec{c}^*$. Die Basisvektoren dieses Koordinatensystems sind so gewählt, dass das Skalarprodukt $\vec{H} \cdot \vec{r}_{Gn}$ besonders einfach zu berechnen ist. Dabei steht im reziproken Gitter jeder Basisvektor senkrecht auf zwei Gittervektoren im Kristallgitter:

$$\vec{a}^* \equiv \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}; \quad \vec{b}^* \equiv \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}; \quad \vec{c}^* \equiv \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}.
\tag{30}$$

Man kann die Reflexe im Streubild des Kristalls mit den Indizes h, k und l durchnummerieren. Die Reflexionsbedingungen nach Gl. (29) kann man auch grafisch mittels der Ewald-Konstruktion darstellen, die im nächsten Abschnitt eingeführt wird.

Bisher wurden die Atompositionen als „starr“ angenommen. In einem Festkörper erwartet man Bewegungen der Atome aufgrund von Phononen. Für Proteine sind ferner noch quasi-diffusive Bewegungsmoden zu beachten (Parak und Formanek 1971; Parak et al. 1982). Neben diesen dynamischen Auslenkungen ist noch statische Unordnung der Atome um ihre Mittellage zu berücksichtigen (Frauenfelder et al. 1979; Hartmann et al. 1982). Da die Strukturanalyse keine Zeit- bzw. Energieauflösung besitzt, muss über alle Auslenkungen gemittelt werden. Hat ein Atom mit der mittleren Koordinate \vec{R}_j eine Abweichung $\Delta\vec{R}_j$, die sowohl von der Zeit als auch vom Ort abhängen kann, so muss in Gl. (27) die Koordinate $\vec{R}_j + \Delta\vec{R}_j$ berücksichtigt werden. Für den Strukturfaktor folgt somit

$$F_{hkl}^K = N \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{R}_j} \cdot \left\langle e^{2\pi i \vec{H} \cdot \Delta\vec{R}_j} \right\rangle,
\tag{31}$$

wobei die Mittelung durch die spitzen Klammern symbolisiert wird. Nimmt man eine isotrope gaußförmige Verteilung der Koordinatenunschärfe an, so folgt für den Mittelwert der Verteilung mit $|\vec{H}| = 2 \cdot \sin(\vartheta) / \lambda$ (für $\langle \Delta x_j^2 \rangle$ schreibt man üblicherweise $\langle x_j^2 \rangle$):

$$\left\langle e^{2\pi i \vec{H} \cdot \Delta \vec{R}_j} \right\rangle = e^{-2\pi^2 |\vec{H}|^2 \langle \Delta x_j^2 \rangle} = e^{-8\pi^2 \langle x_j^2 \rangle \left(\frac{\sin(\vartheta)}{\lambda} \right)^2} \quad (32)$$

Der Ausdruck auf der rechten Seite in Gl. (32) wird als Debye-Waller-Faktor bezeichnet. In der Protein-Kristallographie wird der Ausdruck B-Faktor für $8\pi^2 \langle x_j^2 \rangle$ verwendet. Der Strukturfaktor ist dann:

$$F_{hkl} = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{H} \cdot \vec{R}_j} \cdot e^{-8\pi^2 \langle x_j^2 \rangle \left(\frac{\sin(\vartheta)}{\lambda} \right)^2} \quad (33)$$

In Umkehrung der Fouriertransformation nach Gl. (33) lässt sich nun die Anordnung der Atome bei gemessenem F_{hkl} als Dichte berechnen:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_E} \sum_{h,k,l} F_{hkl} \cdot e^{-2\pi i (h \cdot x + k \cdot y + l \cdot z)}. \quad (34)$$

In dieser lassen sich dann Atompositionen als Orte hoher Dichte identifizieren und man kann ein molekulares Modell entwickeln.

Aus der Messung erhält man nur einen Wert für das Amplitudenquadrat $|F_{hkl}|^2$. Die Phase der gestreuten Welle kann nicht direkt gemessen werden. Dies ist als Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse bekannt. Die Berechnung der Dichte nach Gl. (34) verlangt aber die Kenntnis von Phasen. Kennt man ein näherungsweise Molekül-Modell, so kann man, von dessen berechneten Phasen ausgehend, eine vorläufige Dichte berechnen. Mit dieser lässt sich das Modell dann neu interpretieren und verfeinern. Dies ist bei den vorliegenden Auswertungen stets der Fall. Zur Lösung des Phasenproblems bei unbekanntem Startmodell sei auf die Literatur verwiesen (Drenth 1994). Eine Illustration des Phasenproblems zeigt die folgende Abbildung. Da die Phasen die Darstellung dominieren, ist bei der Interpretation von Dichte Vorsicht geboten.

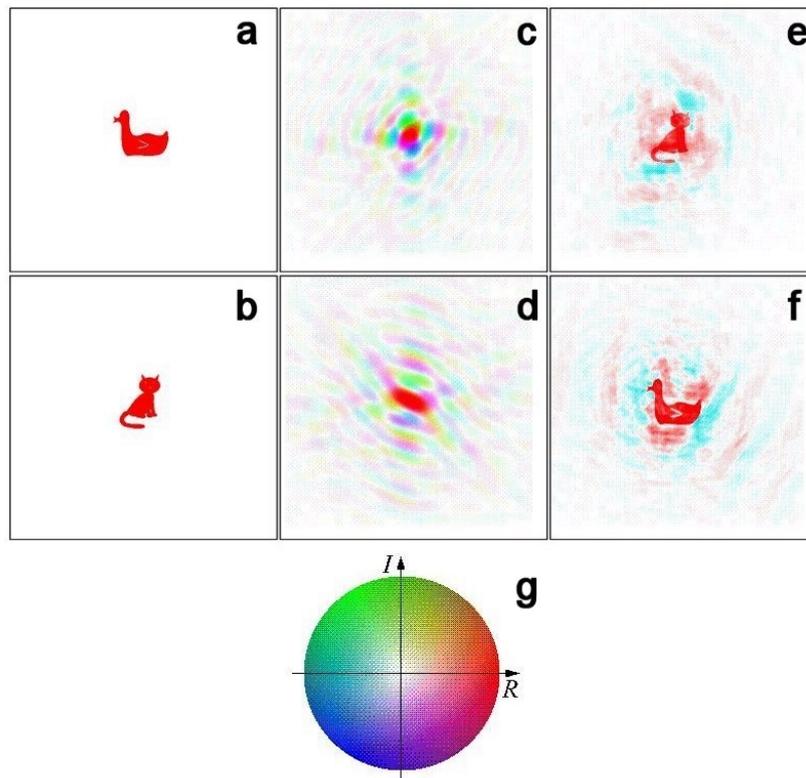


Abb. 2.8: Illustration des Phasenproblems. a,b: ursprüngliche Bilder. c,d: Fouriertransformierte von a,b. Amplitude als Farbsättigung und Phase als Farbton (vgl. g). e,f: Rücktransformation von c,d mit vertauschten Phasen (mit freundlicher Genehmigung von Cowtan 1994).

2.2.2 Messprinzip: monochromatische und Laue-Methode

Zur Bestimmung der Dichte nach Gl. (34) und somit der Proteinstruktur, muss man einen möglichst vollständigen Satz an Reflexen F_{hkl} messen. Die Fouriertransformation ist empfindlich auf das systematische Fehlen von Daten.

Der größte Streuvektor, unter dem noch auswertbare Intensitäten messbar sind, bestimmt die sogenannte Auflösung. Das ist der Kehrwert dieses Streuvektors und entspricht der kleinsten Fourierwellenlänge in der Berechnung der Dichte. Die Wert für die Auflösung entspricht keineswegs der Präzision, mit der die atomaren Positionen im Kristall bestimmt werden. Diese ist in der Regel eine Größenordnung kleiner. Für die Auflösung d_{\min} gilt also:

$$d_{\min} = \frac{1}{|\vec{H}_{\max}|} = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin \vartheta_{\max}} \quad (35)$$

Wobei ϑ_{\max} der Winkel ist, unter dem noch auswertbare Reflexe beobachtet werden können.

Das Messverfahren lässt sich mit Hilfe des unten stehenden Bildes verstehen. Zunächst wird dabei der Fall der monochromatischen Messung betrachtet. In der nach P.P. Ewald benannten Konstruktion lassen sich die Laue-Bedingungen (Gl. (29)) gut darstellen. Wenn der Streuvektor $\vec{H} = \vec{k}/2\pi$ ein reziproker Gittervektor ist, erfolgt konstruktive Interferenz. Da \vec{k}_0 und \vec{k}_1 bei elastischer Streuung gleichen Betrag haben, kann man ihre Endpunkte von einem gemeinsamen Zentrum M ausgehend auf einer Kugel, der so genannten Ewald-Kugel, konstruieren. Der Schnittpunkt der Richtung der einfallenden Welle mit dem reziproken Gitter bestimmt den Ursprung O. Im folgenden Bild erfolgt also konstruktive Interferenz in der Richtung von \vec{k}_1 , da im Punkt P die Laue-Bedingungen erfüllt sind.

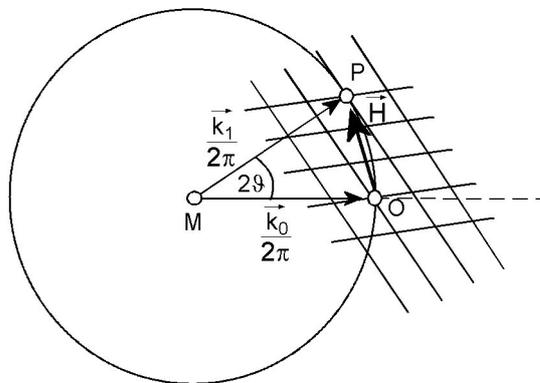


Abb. 2.9: Ewald-Konstruktion: Die Kugel hat den Radius $1/\lambda$. Wenn der Streuvektor \vec{H} zwei reziproke Gitterpunkte (O und P, O ist der Ursprung des reziproken Gitters) verbindet, tritt konstruktive Interferenz auf.

Die Grundidee der Messung ist nun, den Kristall möglichst in alle Richtungen um O zu drehen, so dass man eine möglichst große Anzahl von Reflexen messen kann, um einen möglichst vollständigen Satz für die Fouriertransformation zu erhalten.

Beim Experiment wird die Wellenlänge mit einem Monochromator und einem Kollimator bestimmt. Dadurch werden Wellenlängen in einem Bereich $\Delta\lambda$ um die mittlere Wellenlänge λ ausgewählt. Die Divergenz der einfallenden Strahlung entspricht einer Verteilung der einfallenden Strahlrichtung. Man hat es daher mit einer Verteilung von Ewald-Kugeln zu tun, die das reziproke Gitter in O schneiden. Proteinkristalle sind keine idealen Einkristalle, sondern können als sogenannte Mosaikkristalle betrachtet werden. Danach ist der Kristall aus kleinen, gegeneinander verkippten Kristallen aufgebaut, die jeder für sich ideale Einkristalle sind. Die reziproken Gitterpunkte sind daher um einen mittleren Wert verteilt. Will man also

einen Reflex in seiner gesamten Intensität messen, so muss der Kristall und somit der Reflex während der Messung durch die Ewald-Kugel gedreht werden. Der Detektor nimmt dabei die gesamte Intensität auf. Bei einem Vieldrahtzähler wird dabei der Reflex in aufeinanderfolgenden Bildern aufgenommen und bei der so genannten Datenreduktion zu einer integralen Intensität aufsummiert. Die Position der Reflexe kann dabei mit hoher Präzision bestimmt werden. Daraus wird das Kristallgitter und die Orientierungsmatrix bezüglich des Laborkoordinatensystems bestimmt. Bei der Messung mit einem monochromatischen Diffraktometer ist die gesamte Intensität eines Reflexes durch

$$I_{hkl} = K \cdot L \cdot P \cdot \lambda^3 \cdot \frac{V}{V_c} \cdot |F_{hkl}|^2 \quad (36)$$

gegeben. Der Kristall hat das Einheitszellenvolumen V_c . Die Strahlung durchleuchtet das Kristallvolumen V . Die Korrektur P für die Polarisierung und der Lorentzfaktor L hängen von der Aufnahmegeometrie ab (für Details siehe z.B. Helliwell 1992; Zach 2001). Der Faktor K steht für alle sonstigen Einflüsse, die analytisch nicht berechenbar sind, wie z.B. Absorption, Primärstrahlintensität und Detektorempfindlichkeit in Reflexrichtung. Die Wellenlänge λ , die Volumen V und V_c werden in der Regel im Faktor K erfasst (Wölfel 1987). K wird als Skalierungsfaktor in der Datenreduktion angepasst. Dabei gehen die Position der Reflexe auf dem Detektor und die Position der Reflexe im Verhältnis zur Kristallposition ein. Bei Vernachlässigung anormaler Dispersion gilt stets die sogenannte Friedel-Symmetrie $I_{hkl} = I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$, da F_{hkl} und $F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$ den gleichen Betrag, aber entgegengesetzte Phasen besitzen. Zusätzlich führen Symmetrien im Kristallgitter zu Symmetrien im reziproken Raum. Reflexe, die durch Symmetrioperationen verknüpft sind, sollten die gleiche Intensität aufweisen und man kann somit Skalierungsfaktoren für die oben genannten Korrekturen festlegen. Man misst möglichst viele symmetrieäquivalente Reflexe und die Reflexe mehrfach in verschiedenen Kristallorientierungen, um die Skalierungsfaktoren zu bestimmen. Die Qualität einer Messung wird auch anhand der Redundanz der Daten beurteilt, das heißt der Anzahl der wiederholten Messungen eines Reflexes unter verschiedenen Winkeln und der symmetrieäquivalenten Reflexe. Daneben ist das Verhältnis der gemessenen Intensität im Vergleich zur Variation des Untergrundes $\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ von Bedeutung. Ein wichtiges Qualitätskriterium für eine Messung ist der Wert von R_{merge} :

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{h,k,l} \sum_i |I_{hkl}^i - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{h,k,l} \sum_i I_{hkl}^i} \quad (37)$$

Die unabhängigen Intensitätsmittelwerte $\langle I_{hkl} \rangle$ werden zur Bestimmung des Molekülmodells und der Verfeinerung eingesetzt. Zur Bestimmung von R_{merge} wird über die symmetrieäquivalenten Reflexintensitäten und Mehrfachmessungen I_{hkl}^i summiert. Der R_{merge} -Wert wird im Rahmen der gegenseitigen Skalierung der Reflexintensitäten minimiert. Man beachte, dass nur alle Kriterien zusammengenommen einen Maßstab für die Datenqualität ergeben. Durch die Skalierungsfaktoren ist es möglich, den einen Wert auf Kosten eines anderen zu verbessern. Ferner ist die Zahl der verwendeten Skalierungsparameter kritisch zu beobachten.

Bei der Laue-Methode wird ein Spektrum an einfallender Strahlung bei einem still stehenden Kristall verwendet. Zum Verständnis der Messmethode muss man die Ewald-Konstruktion wie in der folgenden Abbildung erweitern.

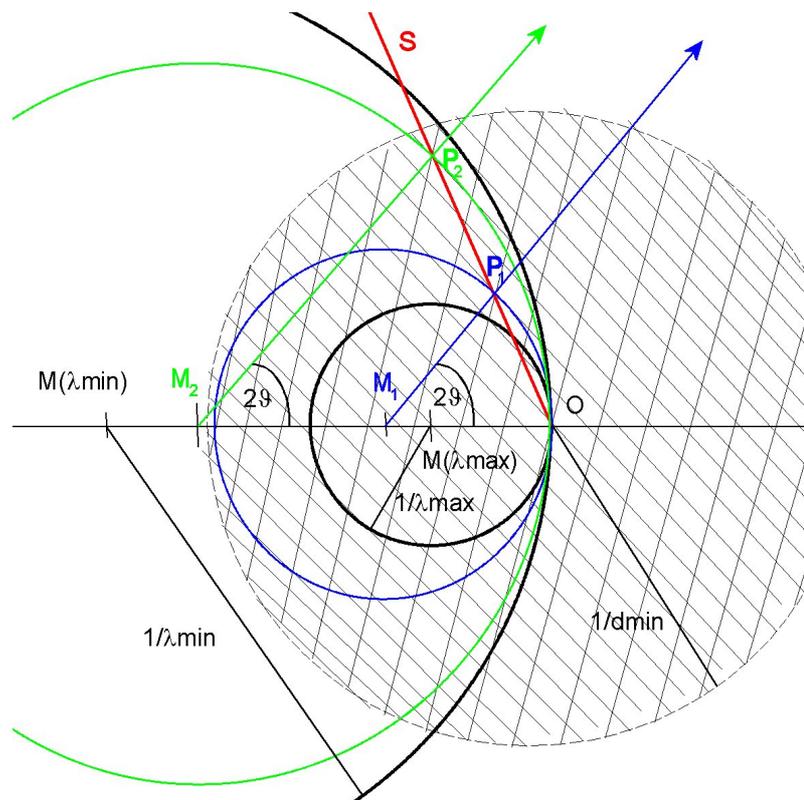


Abb. 2.10: Erweiterung der Ewald-Konstruktion auf die Laue-Methode. Kugeln zur maximalen und minimalen Wellenlänge in schwarz, zwei Kugeln für verschiedene Wellenlängen aus dem Spektrum in blau und grün mit Mittelpunkten M_1 und M_2 . Die Schnittpunkte P_1 und P_2 dieser Kugeln mit dem reziproken Gitter erzeugen einen harmonisch überlappenden Reflex. Die Schnittpunkte liegen auf dem roten Strahl S.

Dazu zeichnet man zwei Ewald-Kugeln, eine zur maximalen und eine zur minimalen Wellenlänge. Gitterpunkte im Bereich des reziproken Raumes zwischen den Kugeln erzeugen dann Reflexe. Jeder Reflex ist unter Vernachlässigung der Mosaizität des Kristalls von einer bestimmten Wellenlänge erzeugt.

Man sieht nun in der Abbildung, dass in gleicher Streurichtung verschiedene Reflexe angeregt werden können: die Kugeln um M_1 und M_2 schneiden das reziproke Gitter in den Punkten P_1 und P_2 so, dass die beiden Reflexe überlappen. Da dabei die Indizes h , k und l gemeinsame Vielfache eines Zahlen-Tripels sind, bezeichnet man diese auch als harmonisch überlappende Reflexe oder Multipletts. Die Gitterpunkte, die zu harmonisch überlappenden Reflexen führen, liegen auf einem gemeinsamen „Strahl“. Dieser geht vom Ursprung des reziproken Gitters aus. Jeder Strahl entspricht einem Reflex. Die Zahl der überlappenden Reflexe ist durch die Auflösung begrenzt. In der Abbildung ist dies durch die kreisförmige Begrenzung des reziproken Gitters dargestellt.

Neben dem harmonischen Überlappen von Reflexen ist noch das räumliche Überlappen von Reflexen zu beachten. Damit wird das Übereinanderliegen von Reflexen aufgrund ihres geringen Abstandes und ihrer großen Breite bezeichnet. Dabei kommen mehrere Ursachen zusammen. In einer Laue-Aufnahme ist die Zahl der Reflexe je Raumwinkel deutlich größer als in einer monochromatischen Aufnahme. Arbeitet man mit Neutronen, so muss noch eine erhöhte Divergenz des Primärstrahls in Kauf genommen werden, um einen möglichst hohen Neutronenfluss am Probenort zu erhalten. Schließlich besitzen Proteinkristalle in der Regel Kantenlängen der Einheitszelle von mehreren 10 bis mehreren 100Å. Unter der Voraussetzung, dass die Überlappung der Reflexe nicht zu groß ist, kann für die Integration der Reflexe ein Profil entwickelt werden. Eine Aufteilung der Intensitäten überlappender Reflexe ist dann möglich (Campbell et al. 1998).

Die Intensität eines Reflexes für die Streuung von Neutronen in der Laue-Methode ist durch

$$I_{hkl} = \Phi(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot \frac{V}{V_c^2} \cdot \frac{1}{2 \sin^2 \vartheta} K \cdot |F_{hkl}|^2 \quad (38)$$

gegeben (Wilkinson und Lehmann 1991). Der Faktor K umfasst die Absorptions- und Detektorkorrektur, sowie Korrekturen, die von Aufnahme zu Aufnahme vorgenommen werden müssen (Arzt et al. 1999; Ren et al. 1999). Eine Polarisation muss für Neutronen nicht berücksichtigt werden. Das durchstrahlte Kristallvolumen ist mit V , das Volumen der

Einheitszelle mit V_c bezeichnet. $\Phi(\lambda)$ ist der differentielle Neutronenfluss (Neutronen pro Zeit, Fläche und Wellenlängenbereich). Die wellenlängenabhängigen Korrekturen können in einen Faktor $f(\lambda)$ zusammengefasst werden. Dieser muss entweder aus der Messung oder durch Skalierung der Reflexe gegen einen Datensatz, der mit der monochromatischen Methode gemessen wurde bestimmt werden (Arzt et al. 1999).

Ein vollständiger Datensatz wird gemessen indem der Kristall zwischen aufeinanderfolgenden Aufnahmen um einen Winkel $\Delta\varphi$ gedreht wird. Um die Vollständigkeit der Messung grob zu bestimmen, muss man sich klar machen, dass eine Laue-Aufnahme bei einer Auflösung d einer Rotationsaufnahme entspricht, bei der das reziproke Gitter von der minimalen Wellenlänge λ_{\min} bis zur maximalen Wellenlänge λ_{\max} gedreht wird. Dabei wird der Winkel

$$\Delta\varphi_{\max} = \pi \cdot \frac{\lambda_{\max} - \lambda_{\min}}{d} \quad (39)$$

überstrichen. Dreht man den Kristall zwischen zwei Aufnahmen um kleinere Winkel als $\Delta\varphi_{\max}$, so erhält man eine vollständige Messung. Sowohl Abb. 2.10, als auch Gl. (39) zeigen, dass die Messung bei niedriger Auflösung kleinere Drehwinkel erfordert, um vollständige Daten zu erhalten, als dies bei hoher Auflösung erforderlich ist.

Durch die mehrfache Messung von Reflexen lässt sich die Datenqualität durch Mittelung verbessern. Die Redundanz r der Daten ist ebenfalls stark von der Auflösung abhängig. Dreht man um einen Winkel $\Delta\varphi$, so ist diese durch

$$r = \Delta\varphi_{\max} / \Delta\varphi = \pi \cdot \frac{\lambda_{\max} - \lambda_{\min}}{d \cdot \Delta\varphi} \quad (40)$$

gegeben. Für das Beispiel einer Messung an LADI ergibt das für zwei verschiedene Drehwinkel als Funktion der Auflösung die Darstellung in Abb. 2.11. Die Laue-Methode ergibt danach eine hohe Redundanz bei hoher Auflösung und eine niedrige Redundanz bei niedriger Auflösung.

Für die Auswertung von Laue-Messungen ist es von großer Bedeutung, wie groß der Anteil der Reflexe mit harmonischer Überlappung ist, denn nur einzelne Reflexe können für die Bestimmung der Wellenlängen-Abhängigkeit verwendet werden. Multipletts müssen zudem im Gegensatz zu den einfachen Reflexen, den so genannten Singletts, bei der

Datenauswertung separiert werden. Cruickshank et al. (1987) haben berechnet, dass der Anteil der Singletts an allen Reflexen 87.5% beträgt. Dabei wurde ein einfallendes Spektrum von der Wellenlänge Null bis unendlich betrachtet. Der Anteil der Singletts ist für ein begrenztes Spektrum größer. Das räumliche Überlappen von Reflexen ist davon unabhängig und tritt insbesondere bei hoher Auflösung auf.

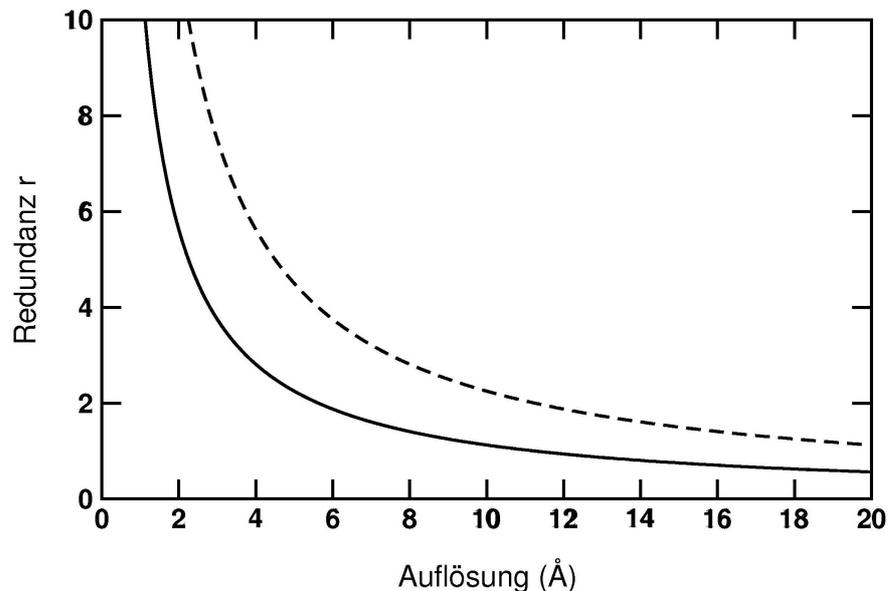


Abb. 2.11: Abhängigkeit der Redundanz r von der Auflösung d bei verschiedenen Drehwinkeln $\Delta\phi$ zwischen den Laue-Aufnahme ($\lambda_{\min}=2.8\text{\AA}$, $\lambda_{\max}=3.6\text{\AA}$). Durchgezogene Linie: $\Delta\phi = 16^\circ$, gestrichelte Linie: $\Delta\phi = 8^\circ$.

Die Aufteilung der Multipletts kann erfolgen, wenn man eine Wellenlängenskalierung $f(\lambda)$ bestimmt hat. Um $f(\lambda)$ zu bestimmen, verwendet man die Intensitäten von symmetrieäquivalenten Reflexen, die mehrfach und bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden. Die hohe Redundanz von Reflexmessungen mit der Laue-Methode erweist sich somit als sehr wichtig. Das Spektrum der einfallenden Wellenlängen wird mit Chebyshev-Polynomen angepasst, wobei der Grad des Polynoms für die Anpassung vorgegeben wird (mit dem Programm LSCALE, Arzt et al. 1999).

Hat man ein Wellenlängenspektrum bestimmt, so kann man die Multipletts in ihre Anteile separieren (Campbell und Hao 1993). Ein Multiplett muss dazu bei verschiedenen Kristallorientierungen gemessen werden. Die Anteile eines reziproken Gitterpunktes am Multiplett sind dann aufgrund der verschiedenen Wellenlängen, bei denen die Anregung erfolgte, unterschiedlich. Da die Gewichtung mit der Skalierung für die Wellenlängen bekannt

ist, bleibt ein lineares Gleichungssystem zu lösen. Das Gleichungssystem wird dann durch eine Anpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate gelöst (Arzt et al. 1999).

2.2.3 Vergleich der monochromatischen und der Laue-Methode für Neutronenstreuung an den Instrumenten BIX-3 und LADI

Bei der Strukturanalyse mit Neutronen ist der Neutronenfluss durch die Quelle limitiert. Die Messmethode muss daher die Neutronen möglichst effizient verwenden. Bei der Neutronenstrukturanalyse von Proteinen kommt die Begrenzung des verwertbaren Flusses durch die Kristalldimensionen hinzu, die im Bereich von Millimetern, meist sogar darunter, liegen. Der am Probenort eintreffende Neutronenfluss ist aufgrund der Erzeugung spektral verteilt und divergent. Die Apparatur sollte daher möglichst ein breites Spektrum und eine hohe Divergenz akzeptieren. Prinzipiell stehen die zwei schon zuvor beschriebenen Grenzfälle der monochromatischen Datenaufnahme und der Laue-Methode zur Verfügung. Der Übergang zwischen diesen beiden ist fließend. So wird das Laue-Diffraktometer LADI als Quasi-Laue-Diffraktometer bezeichnet (Wilkinson und Lehmann 1991), da es einen Wellenlängenbereich $\Delta\lambda/\lambda$ von ca. 20% verwendet. Im Falle des Diffraktometers BIX-3 am JAERI in Japan beträgt $\Delta\lambda/\lambda$ ca. 2%. Die Divergenz an LADI ist nach Bon et al. (1999) durch die Reflektivität des Nickel-Neutronenleiters von 0.009rad bei 3Å gegeben. Dies entspricht einer Divergenz von ca. $\pm 0.5^\circ$. Die Divergenz an BIX-3 wird ebenfalls zu ca. $\pm 0.5^\circ$ angegeben (Andreas Ostermann, persönliche Mitteilung). Der verwendete Fluss differiert zwischen der an LADI verwirklichten Laue-Methode und der an BIX-3 umgesetzten monochromatischen Methode ungefähr um einen Faktor zehn.

Um die Methoden zu vergleichen muss man das Verhältnis der gemessenen Intensität I zur Standardabweichung σ betrachten. Die inkohärente Streuung stellt die Hauptquelle für den Untergrund U dar. Sie ist dem einfallenden Fluss und somit dem Wellenlängenband der einfallenden Strahlung $\Delta\lambda_e$ proportional. Ein Reflex wird durch die Mosaizität des Kristalles von einem begrenzten Wellenlängenband $\Delta\lambda_m$ stimuliert. Von der einfallenden Strahlung wird also nur ein Bruchteil zur Anregung des Reflexes beitragen. Die Wellenlängenakzeptanz eines Reflexes ist nun von der Auflösung abhängig. Ren et al. (1999) geben die folgende Abschätzung an:

$$\Delta\lambda_m = \delta \cdot \sqrt{4d^2 - \lambda^2} . \quad (41)$$

Dabei ist die Mosaizität δ im Bogenmaß einzusetzen. Mit einer Mosaizität von 0.5° (0.009rad) erhält man so für einen Reflex bei 1.5\AA Auflösung, der mit einer Wellenlänge von 2.5\AA gemessen wird, ein akzeptierendes Wellenlängenband $\Delta\lambda_m$ von 0.014\AA . Bei einer Auflösung von 10\AA sind es 0.17\AA .

Für die Standardabweichung $\sigma(I \cdot t)$ bei der Intensitätsmessung I über die Zeit t gilt näherungsweise (Wilkinson und Lehmann 1991; Cipriani et al. 1994):

$$\sigma^2(I \cdot t) \approx (I + 2U) \cdot t. \quad (42)$$

Der Untergrund U und die Intensität des Reflexes I sind dabei in Zählheiten (Neutronen) pro Zeiteinheit angegeben. Die Messung eines Reflexes dauert dann für $2U \gg I$ (diese Näherung ist für den hohen inkohärenten Untergrund durch ^1H -Atome gerechtfertigt, Cipriani et al. 1994)

$$t \approx \frac{2U}{I^2} \cdot \left(\frac{I \cdot t}{\sigma(I \cdot t)} \right)^2. \quad (43)$$

Durch die Länge der Messzeit kann man die Genauigkeit der Intensitätsmessung bestimmen. Die Messzeit lässt sich durch die Verwendung von volldeuterten Proben verkürzen, da dies den inkohärenten Untergrund drastisch verringert. Nach den obigen Überlegungen gilt nun

$$U \propto \Delta\lambda_e \quad \text{und} \quad I \propto \Delta\lambda_m. \quad (44)$$

Will man einen gegebenen Wert von I/σ erreichen, so skaliert die Messzeit nach Gl. (43). Für die Messdauer einer monochromatischen Messung t_M und einer Laue-Messung t_L erhält man bei ansonsten gleichen Parametern:

$$\frac{t_L}{t_M} \approx \frac{\Delta\lambda_{e,L}}{\Delta\lambda_{e,M}} \approx \frac{20}{2} \approx 10. \quad (45)$$

Für die Breite des Spektrums $\Delta\lambda_{e,L}$ und $\Delta\lambda_{e,M}$ wurden die Werte für LADI und BIX-3 verwendet. Eine Laue-Messung dauert also ca. 10 mal so lange wie die monochromatische Messung gleicher Qualität. Bei hoher Auflösung ist die Breite des Spektrums $\Delta\lambda_{e,M}$ größer als $\Delta\lambda_m$ und die obige Betrachtung ist gültig. Bei niedriger Auflösung ist ein Reflex in einer monochromatischen Aufnahme nicht auf einer Aufnahme zu messen, da $\Delta\lambda_{e,M}$ kleiner als $\Delta\lambda_m$ ist, verteilt er sich auf aufeinanderfolgende Aufnahmen. Die Laue-Methode ist daher bei

niedriger Auflösung vorzuziehen (mit den zuvor verwendeten Werten gilt bei einer Auflösung von ca. 2.6\AA $\Delta\lambda_{e,m} = \Delta\lambda_m$). Die Laue-Methode kann zwar mehr Reflexe auf einem Streubild aufnehmen, die Messzeit ist aber durch die Qualität der Messung des einzelnen Reflexes bestimmt. Wilkinson und Lehmann (1991) haben zu erwartende Messzeiten mit einem Neutronen-Laue-Diffraktometer berechnet. Da sie die begrenzte Wellenlängenakzeptanz eines Reflexes nicht berücksichtigen, kommen sie zu unrealistisch kurzen Messzeiten.

Die gängigen Programme zur Auswertung von Laue-Messungen berücksichtigen die Wellenlängenakzeptanz $\Delta\lambda_m$ eines Reflexes nicht. Bei einem relativ begrenzten Wellenlängenband wie es bei LADI zur Anwendung kommt ($\Delta\lambda/\lambda = 20\%$) ist bei niedriger Auflösung das einfallende Wellenlängenband $\Delta\lambda_e$ in der gleichen Größenordnung wie $\Delta\lambda_m$. Dies kann dazu führen, dass Reflexe, deren mittlere Wellenlänge sich am Rande des einfallenden Bandes befindet, nur partiell auf den Detektor integriert werden und daher systematische Fehler für diese auftreten. Diese wirken sich insbesondere auf die Interpretation des Lösungsmittelbereiches aus, da dieser aufgrund des geringeren Ordnungsgrades von den niedrig aufgelösten Reflexen stärker beeinflusst wird als das Protein.

Die Variation der einfallenden Divergenz und des Wellenlängenbandes für eine Apparatur sind durch die räumliche Überlappung benachbarter Reflexe limitiert. Wird der Grad der Überlappung zu groß, so sind die Daten nicht mehr auszuwerten. Begrenzend wirkt die Dimension der Einheitszellen von interessierenden Proteinkristallen, die im Bereich von mehreren zehn bis mehreren hundert Ångström liegen. Will man Kristalle mit großen Einheitszellen bis zu hoher Auflösung messen, so ist das Wellenlängenband und die Divergenz entsprechend einzuschränken. Ein Quasi-Laue-Experiment wird somit zwangsläufig zu einem monochromatischen Experiment (Kalb (Gilboa) et al. 2001). Eine Bestimmung der Divergenz und des Wellenlängenbandes zur optimalen Ausnutzung des Neutronenflusses kann nur durch Simulationen erfolgen.

2.2.4 Strukturverfeinerung und Qualitätskriterien

Wie zu Beginn von Abschnitt 2.2.2 erwähnt, fehlt bei der Messung von Intensitäten die Phaseninformation. Kennt man nun ein Modell, das schon nahe an der zu untersuchenden Struktur liegt, so kann man aus dem Modell Phasen berechnen und damit beginnen. Im Zuge der besseren Beschreibung der Daten durch das Modell werden die Phasen verbessert. Dieses

Vorgehen ist bei der Untersuchung von mutierten Proteinen, Temperaturabhängigkeiten oder auch Ligandierungswechseln möglich.

Ausgehend vom Startmodell beginnt die Verfeinerung. Die Parameter des Modells sind dabei drei Koordinaten und ein isotroper B-Faktor je Atom, sowie ein Faktor, der die gemessenen Amplituden zu den berechneten skaliert. Das Modell wird dabei angepasst, um die gemessenen Intensitäten möglichst gut wiederzugeben. Als Maß für die Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten verwendet man den kristallographischen R-Wert:

$$R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{h,k,l} \left| |F_{hkl}^o| - |F_{hkl}^c| \right|}{\sum_{h,k,l} |F_{hkl}^o|} \quad (46)$$

$|F_{hkl}^o|$ sind die gemessenen Beträge der Strukturfaktoren (Index „o“ für engl. observed), $|F_{hkl}^c|$ sind die Beträge der aus dem Strukturmodell gemäß Gl. (33) berechneten Strukturfaktoren (Index „c“ für engl. calculated).

Ein Problem der Strukturanalyse von Makromolekülen ist die geringe Anzahl von Observablen im Vergleich zu der Vielzahl an Parametern, die das Modell beschreiben. In Tab. 2.3 sind die Zahl der Parameter sowohl für die Röntgen- als auch die Neutronenstrukturanalyse und die Zahl der Reflexe gegenübergestellt. Bei den betrachteten Auflösungen sind in der Röntgenstreuung keine Wasserstoffatome sichtbar, was die Parameterzahl im Vergleich zur Neutronenstreuung drastisch verringert.

Auflösung (Å)	Verhältnis der Observablen- zur Parameterzahl	
	Röntgenstruktur	Neutronenstruktur
2.0	1.8	0.9
1.5	4.3	2.2

Tab. 2.3: Verhältnis der Observablen- zur Parameterzahl bei der Strukturanalyse für verschiedene Auflösungen für Myoglobin in der Raumgruppe $P2_1$ (ohne den Skalierungsfaktor für die Amplituden). Parameterzahl (nur Protein, kein Lösungsmittel): Röntgenstrukturanalyse 5040, Neutronenstrukturanalyse 9708. Anzahl der Reflexe: 9203 bei 2.0Å, 21493 bei 1.5Å.

Da das Verhältnis der Zahl der Observablen zu der Zahl der Modell-Parameter bei der Proteinstrukturanalyse nicht sehr groß ist, verwendet man weitere Informationen für die

Modellverbesserung. Dies sind z.B. die Bindungslängen und -winkel der Aminosäuren und der Peptidbindung, die man sehr genau kennt (Engh und Huber 1991). Man unterscheidet dabei die Anwendung harter und weicher Randbedingungen. Bei harten Randbedingungen (engl. „constraints“) wird die Zahl der Modellparameter verringert, z.B. indem Bindungslängen festgehalten werden. Bei weichen Randbedingungen (engl. „restraints“) bleibt die Parameterzahl erhalten, es werden aber Energieterme eingeführt, die ihre Minima bei der idealen Geometrie haben. Insbesondere bei der Neutronenstrukturanalyse ist das Verhältnis der Zahl der Observablen zu Parametern klein. Da aber eine Röntgenstruktur in der Regel verfügbar ist, kann man diese als „Randbedingung“ verwenden. Im einfachsten Falle hält man dazu die aus einer Röntgenstrukturanalyse erhaltenen Koordinaten fest. Daneben können auch elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen verwendet werden. Die Energieterme, die in den Verfeinerungs-Programmen X-plor und CNS (Brünger 1992a; Brünger et al. 1998a) eingesetzt werden, sind denen in molekulardynamischen Rechnungen und Energieminimierung für Proteine (z.B. „CHARMM“, Brooks et al. 1983) analog. Wichtig ist, dass die nichtbindenden Wechselwirkungen bei festzulegenden Grenzen abgeschnitten werden, um die Anzahl der zu berechnenden Wechselwirkungsterme zu begrenzen (Smith 1991). Dies ist insbesondere bei Verwendung von elektrostatischen Kräften zu berücksichtigen, da man im Protein von einer sehr kleinen Dielektrizitätskonstanten ϵ ausgeht. Für Simulationen wird meist eine Dielektrizitätskonstante von eins verwendet. Eine Zusammenfassung der Energieterme für die kristallographische Betrachtung findet man bei Brünger (1992a) und für molekulardynamische Rechnungen bei Karplus und Petsko (1990).

Wegen des oftmals kleinen Verhältnisses der Zahl der Observablen zu Parametern kann man bei rücksichtsloser Beachtung eines minimalen R-Faktors leicht zu einer „Überverfeinerung“ kommen. Das erhaltene Modell ist dann unter Umständen inkorrekt. Deshalb trennt man vor Beginn der Verfeinerung ca. 10% der Reflexe ab und berechnet für diesen einen getrennten R-Wert (R_{free}). Die zufällig ausgewählten Reflexe werden bei der Verfeinerung nicht in die zu minimierende Funktion einberechnet (Brünger 1992b). Der oben eingeführte Wert R_{cryst} wird für die ca. 90% der Reflexe, die der Verfeinerung dienen, berechnet. Das Verhalten des statistischen Testdatensatzes kann daher im Verlauf der Verfeinerung als Entscheidungshilfe herangezogen werden, ob die Strategie sinnvoll ist oder nicht. Die Differenz zwischen dem Wert von R_{cryst} und R_{free} ist ein wichtiges Qualitätskriterium für die Beurteilung der Verfeinerung und sollte wenige Prozent nicht überschreiten.

Eine weitere Schwierigkeit stellt die Vielzahl der lokalen Minima in der zu minimierenden Funktion dar. Eine Minimierung der Zielfunktion mit der Konjugierten-Gradienten-Methode ist daher problematisch. Sie endet leicht in lokalen Minima, die nahe an der Startstruktur liegen und aus denen es kein Entrinnen mehr gibt. In der Protein-Kristallographie hat sich daher die Methode des simulierten Härtens („simulated annealing“) durchgesetzt (Kirkpatrick et al. 1982; Brünger et al. 1999). In Analogie zum technischen Verfahren des Härtens wird eine molekulardynamische Kalkulation unter drastischer Erhöhung der Temperatur durchgeführt (typischerweise werden Temperaturen von 1000-2000K simuliert). Beim Abkühlen können neue Minima der Zielfunktion gefunden werden.

Die zu minimierende Funktion setzt sich aus zwei Teilen zusammen: den empirischen Energietermen für die chemische Struktur E_{chem} und einem Term, der die Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Daten bewertet. Die zu minimierende Funktion ist dann:

$$E_{\text{Ziel}} = E_{\text{chem}} + w_X \cdot E_X \quad (47)$$

Der Faktor w_X wird im Laufe der Verfeinerung bestimmt. Zur Anpassung des Modells an die Daten kam in der Regel stets eine Zielfunktion zum Einsatz, die der Methode der kleinsten Quadrate entspricht (Brünger et al. 1998b):

$$E_{X,\text{LSQ}} = \sum_{h,k,l} \left(|F_{hkl}^o| - \kappa |F_{hkl}^c| \right)^2 \quad (48)$$

(Der Index LSQ steht dabei für „least squares fit“.) Der zuvor schon angesprochene Skalierungsfaktor für die Amplituden ist mit κ bezeichnet. Die Minimierung der Zielfunktion nach der Methode der kleinsten Quadrate unterliegt der Voraussetzung, dass der Fehler in den Messungen und im Modell einer Gauß-Verteilung um den erwarteten Mittelwert nahe kommt. Dies ist in den meisten Fällen, die von Interesse sind, erfüllt und erklärt auch die verbreitete Anwendung dieser Methode. Die fehlende Phaseninformation führt jedoch zu einer Überbewertung der berechneten Phasen und eine Methode der kleinsten Quadrate versucht eine (falsche) Verteilung mit dem Schwerpunkt bei den berechneten Struktur Faktoren F_{hkl}^c anzupassen. In der Strukturanalyse hat sich deshalb die Methode der größten Wahrscheinlichkeit („maximum likelihood“) durchgesetzt (Pannu und Read 1996; Adams et al. 1997; Murshudov et al. 1997). Diese passt das Modell unter der Berücksichtigung der Fehler im Modell und experimenteller Fehler an. Die Werte für den wahrscheinlichsten Wert für den Strukturfaktor $\langle |F_{hkl}^o| \rangle$ und die Standardabweichung σ_{ML} werden aus dem Wert von σ_A ,

den gemessenen Strukturfaktoren F_{hkl}^o und denen des Modells F_{hkl}^c berechnet. Der σ_A -Wert gibt an, welcher Anteil des Strukturfaktors eines Modells vertrauenswürdig ist (Read 1986). Die Zielfunktion wird somit zu (Brünger et al. 1999)

$$E_{X,ML} = \sum_{h,k,l} \frac{1}{\sigma_{ML}^2} \left(F_{hkl}^o - \langle F_{hkl}^o \rangle \right)^2 \quad (49)$$

Es konnte gezeigt werden, dass der Phasenfehler im Vergleich zur Methode der kleinsten Quadrate signifikant besser wird. Der konventionelle R-Faktor kann dabei etwas größer ausfallen als im Falle der Zielfunktion nach der Methode der kleinsten Quadrate. Dies ist jedoch Ausdruck der Vermeidung einer „Überverfeinerung“ (Brünger et al. 1998b).

Bei der Verfeinerung werden verschiedene Teile der Parameter variiert. Das Molekül kann als Ganzes in der Einheitszelle bewegt werden („rigid-body-refinement“). Man kann Gruppen von Atomen definieren, die durch ein harmonisches Potential um ihren Startpunkt festgehalten oder frei beweglich sind. Das gleiche Verfahren lässt sich auch auf die Verfeinerung der B-Faktoren anwenden (Brünger 1992a).

Ein wichtiges Hilfsmittel bei der Verfeinerung sind Dichtemappen. Die meistverwendeten Dichtemappen sind $2F^o-F^c$ - und F^o-F^c -Dichtemappen. Dabei werden die Phasen aus dem Modell berechnet. Die Amplituden für die Fouriertransformation sind entsprechend $2F^o-F^c$ und F^o-F^c . Auch diese Dichtemappen sind durch die kalkulierten Phasen beeinflusst, jedoch deutlich weniger als solche, die mit gemessenen Phasen F^o berechnet wurden (McRee 1999). Die einfache Differenzdichtemappe, die mit der Amplitude von F^o-F^c berechnet wird, zeigt an Stellen, an denen im Modell etwas fehlt, positive Werte und an solchen, an denen im Modell zu viel Dichte gefunden wird, negative Werte. Bei der Betrachtung von Dichtemappen aus Neutronenstreuung muss das negative Vorzeichen für das ^1H -Wasserstoffisotop berücksichtigt werden. Eine $2F^o-F^c$ -Dichtemappe zeigt die Summe einer F^o -Dichtemappe und einer F^o-F^c -Dichtemappe und ist somit einfacher zu interpretieren. Von besonderer Bedeutung bei problematischen Fällen, in denen die $2F^o-F^c$ -Dichtemappe nicht sicher zu interpretieren ist, ist eine „omit“-Dichtemappe. Bei dieser Variante wird eine Dichtemappe berechnet, bei der die Phasen ohne einen Teil des Modells berechnet werden („omitted part“), so dass dieser Teil nicht durch die eigenen Phasen beeinflusst wird. Noch einen Schritt weiter gehen die so genannten „simulated-annealing omit-maps“. Dabei wird für den nicht weggelassenen Teil des Proteins eine Molekulardynamik-Simulation durchgeführt. Der Einfluss der Phasen aus

dem Strukturmodell ist dadurch gering gehalten (Hodel et al. 1992). Diese Methode ist insbesondere bei der Beurteilung von Doppellagen von Seitenketten bei hoher Auflösung eine Entscheidungshilfe. Zur Beurteilung der Mappen und des Modells, sowie der Erstellung von Bildern kamen in der vorliegenden Arbeit die Programme „O“ und „XtalView“ zum Einsatz (Jones et al. 1991 bzw. McRee 1999). Dichtemappen werden dargestellt, indem ein Konturniveau festgelegt wird, das einem Dichtewert entspricht. Punkte gleichen Niveaus werden dann durch ein Gitternetz verbunden und dargestellt. Dabei wird ein Wert verwendet, der einem Vielfachen der Standardabweichung σ der Dichte entspricht: bei $2F^0-F^c$ -Dichtemappen ist dies in der Regel ein Wert von 1.5σ , bei F^0-F^c -Dichtemappen ein Wert von 3σ bzw. -3σ .

Nach beendeter Verfeinerung dient neben den Werten von R_{cryst} und R_{free} , der oben schon angesprochenen Differenz zwischen R_{cryst} und R_{free} die Berechnung von Fehlern mittels der Methode von Luzzati (Luzzati 1952) und der von Read (Read 1986) vorgeschlagenen σ_A -Darstellung als Qualitätskriterium. Die dabei abgeschätzten mittleren Koordinatenfehler liegt für eine Strukturanalyse mit einer Auflösung von 1.5\AA im Bereich von 0.1\AA . Dies spiegelt die Verwertung der Randbedingungen zur Modellerstellung wieder. Die Qualität eines Modells lässt sich auch an der Einhaltung der stereochemisch erwarteten Geometrie messen. Programme wie etwa „Procheck“ (Laskowski et al. 1993) berechnen die Kennwerte und stellen diese grafisch dar, so dass etwaige Fehler schnell aufgefunden werden können.

3 Probenpräparation

3.1 Herstellung der H64V-Mutante von Myoglobin

Ein *Escherichia coli* Stamm (Tb-1, pMb413), der das synthetische Gen zur Herstellung von mutiertem Myoglobin in einem Expressionsvektor (pUC19) enthält, wurde von Herrn Prof. G.U. Nienhaus (Abteilung Biophysik, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Dabei ist das Histidin an der Aminosäureposition 64 gegen ein Valin ausgetauscht. Die Aufzucht der Bakterien sowie die Reinigung des Proteins wurde wie von Springer und Sligar (1987) beschrieben durchgeführt.

Zur Reinigung wurde in einem ersten Schritt eine Anionenaustauschchromatographie mit einem Salzgradienten (HiLoad 16/10 Q Sepharose Säule, Pharmacia, Deutschland, 1M NaCl, 20mM Tris, pH8.4), gefolgt von einer Gelpermeation (HiLoad 16/60 Superdex 75 prepgrade Säule, Pharmacia, 50mM NaH₂PO₄, pH 6.0) durchgeführt. Abschließend wurde ein Kationenaustausch mit einem pH-Gradienten vorgenommen (Hi Load 16/10 SP Sepharose, Pharmacia, 50mM NaH₂PO₄, pH 6.0). Das optische Absorptionsspektrum des gereinigten Myoglobins zeigt die breite Soret-Bande, die für das fünffach-ligandierte H64V-Met-Myoglobin charakteristisch ist (siehe Abschnitt 5.1.1, Morikis et al. 1990). Eine Oxidation des Häms war nicht nötig.

3.2 Herstellung der Proben zur optischen Messung

Die optischen Messungen bedürfen stets des Zusatzes einer Substanz, die ein Gefrieren des Wassers in einer Eisform verhindert, was zu einer optisch nicht messbaren Probe führen würde. Um eine transparente Probe zu erhalten, verwendet man meist Zucker oder Alkohole. Die Proben, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vermessen wurden, enthielten daher stets Glycerin, in einem Falle wurde sie in Trehalose getrocknet. Im Folgenden wird das Herstellungsverfahren beschrieben. Die Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Zunächst werden zwei Phosphat-Puffer hergestellt: KH₂PO₄ und K₂HPO₄ (Merck, Darmstadt). Durch Mischen nach Zugabe des Glycerins kann man später den gewünschten pH-Wert einstellen ohne zusätzlich zu titrieren. Die Molarität der Phosphat-Puffer

berücksichtigt dabei schon die spätere Zugabe von Glycerin. Im nächsten Schritt wird das Glycerin (Fluka Chemie AG, Schweiz) im gewünschten Volumenverhältnis zugegeben (50% oder 75%, vgl. Tab. 3.1). Aufgrund der hohen Viskosität von Glycerin wurde das Volumen durch Einwiegen der entsprechenden Menge Glycerin bestimmt. Durch Mischen der beiden Ausgangspuffer kann nun der gewünschte pH-Wert eingestellt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Zugabe großer Mengen Ruthenium tris(2,2-bipyridine) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, Fluka Chemie) und EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid, Sigma Chemie) zu einer Verschiebung des pH-Wertes führen kann. Die in Tab. 3.1 angegebenen pH-Werte beziehen sich auf die fertige Probe. Als nächstes werden $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ und EDTA hinzugegeben. Dies erfolgt aufgrund der Lichtempfindlichkeit von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ im Dunkeln. Bei Proben, die nur Protein enthalten, wird dieser Schritt ausgelassen und das Protein direkt hinzugegeben. Dazu wurde direkt das lyophilisierte Myoglobin verwendet (Sigma Chemie, für natives Mb). Um etwaige unlösliche Anteile aus der Probe zu entfernen, wurden die Proben anschließend bei 25000g mindestens 10 Minuten zentrifugiert. Die Herstellung der Proben erfolgte stets kurz vor der Messung.

Für die Probe von H64V-Mbmet in Trehalose wurde das Protein in 50mM Kalium-Phosphat-Puffer mit 1M Trehalose gelöst und zentrifugiert. Ein Tropfen von ca. 20 μl wurde auf einem Quarzglas über Nacht im Exikator über Kieselgel getrocknet.

Nummer	Protein	Zusatz	Puffer
1	5mM H64V-Mbmet	-	50mM KPO4, 50% Glycerin, pH7.0
2	0.5mM H64V-Mbmet	-	1M Trehalose (getrocknet)
3	5mM Mbmet	60mM Ru, 100mM EDTA	50mM KPO4 75% Glycerin pH6.6
4	5mM Mbmet	-	
5	5mM Mbdeoxy	Reduziert mit Dithionit	
6	-	60mM Ru, 100mM EDTA	
7	-	-	
8	0.5mM Mbmet	-	

Tab. 3.1: Probenzusammensetzung für die optischen Messungen. Probe 3 wurde getrocknet, die Konzentrationen beziehen sich auf die zuvor präparierten Lösungen. Es wurde außer der Mutante H64V nur das Myoglobin des Pottwales verwendet. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ wurde mit Ru abgekürzt.

Die Proben Nr.1 und 2 wurden zur Untersuchung der temperaturabhängigen Ligandierung von H64V-Mbmet verwendet (Abschnitt 5.1). Die Proben Nr. 3 bis 7 dienten der Messung der Relaxation eines metastabilen Zustands nach photoinduzierter Erzeugung eines Zwischenzustands (Abschnitt 5.2). Probe Nr. 8 wurde zur Messung von Resonanz-Raman-Spektren verwendet, die für die Charakterisierung des Zwischenzustands und die Auswertung der optischen Spektren verwendet wurden.

3.3 Kristallisation und Präparation der Kristalle

Zur Kristallisation von H64V-Mbmet wurde eine Lösung mit 50mM KH_2PO_4 , 2.9M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei pH 6.8 hergestellt. Das Protein wurde in einer Konzentration von 30mg/ml gelöst. Die Lösung wurde in Kristallisationsröhrchen mit Kristallisationskeimen von nativem Myoglobin der Raumgruppe $P2_1$ angesetzt. Zum Übertragen der Keime wurde ein Katzenhaar verwendet, das in eine stark verdünnte Lösung von zerquetschten Kristallen getaucht und anschließend kurz in die Kristallisationslösung eingetaucht wurde. Nach ein paar Wochen waren Kristalle mit Kantenlängen von ca. 1mm gewachsen. Die Kristallisations-Lösung wurde langsam gegen frischen Kristallisations-Puffer ausgetauscht, um das restliche Protein aus der Lösung zu entfernen (50mM KH_2PO_4 , 2.9M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6.8). Um die Kristalle gegen Einfrierschäden zu schützen, wurde der Puffer abermals langsam gegen einen Puffer ausgetauscht, der zusätzlich 0.8M Trehalose enthielt (Roth, Karlsruhe).

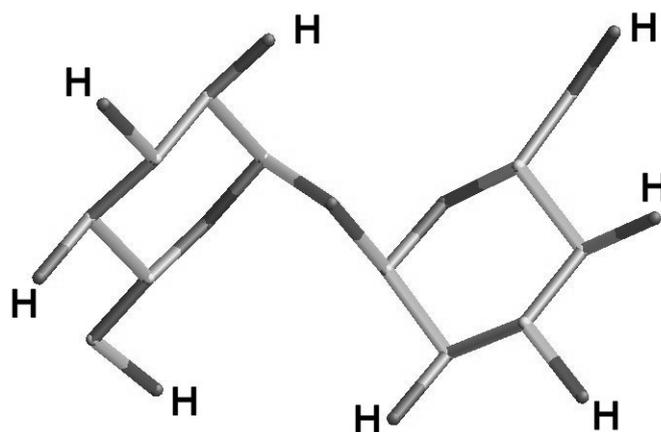


Abb. 3.1: Das Trehalose-Molekül: Wasserstoffatome sind nicht dargestellt. Die acht austauschbaren Wasserstoffatome befinden sich an den Sauerstoffatomen, die mit H gekennzeichnet sind (dunkel: Sauerstoff, hell: Kohlenstoff).

Zur Strukturbestimmung mit Neutronenstrahlung wurden Kristalle verwendet, die nach der gleichen Methode hergestellt waren. Zur Verringerung des Untergrundes durch inkohärente

Streuung von Wasserstoff wurde der Puffer gegen einen analogen Puffer ausgetauscht, der zuvor deuteriert wurde. Da sowohl das Ammoniumsulfat als auch das Kaliumphosphat austauschbare Protonen enthalten, wurden die Salze in D₂O gelöst und anschließend in einem Rotationsverdampfer destilliert (bei 60°C und 50mbar Druck), und anschließend wieder in D₂O gelöst. Durch mehrmaliges Wiederholen wurden ca 95% ¹H zu ²H ausgetauscht. Für die Neutronenstrukturanalyse bei tiefen Temperaturen wurde zusätzlich die Trehalose nach demselben Verfahren behandelt. Da Trehalose jedoch lediglich 8 von 22 Protonen austauscht, ist der maximal austauschbare Anteil auf 36% beschränkt (vgl. Abb. 3.1). Durch mehrmaliges Rotationsverdampfen wurden diese ebenfalls zu 95% ausgetauscht. Die Kristalle für die Neutronenstrukturanalyse bei 300K waren ca. 10 Jahre in deuteriertem Puffer gelagert worden. Die Kristalle für die Messung bei 20K wurden zwei Wochen vor der Messung in deuteriertes Lösungsmittel umgepuffert (pH 7.0).

Die Kristalle müssen zur Messung möglichst präzise auf dem Diffraktometer justiert werden. Da Proteinkristalle sehr empfindlich gegen Austrocknen sind, muss darauf geachtet werden, dass sie sich bei Raumtemperatur im Gleichgewicht mit dem Kristallisationspuffer befinden. Die Kristalle werden für die Messungen bei Raumtemperatur in Kapillaren montiert, die, wie in der folgenden Abbildung gezeigt, Kristallisationspuffer enthalten.

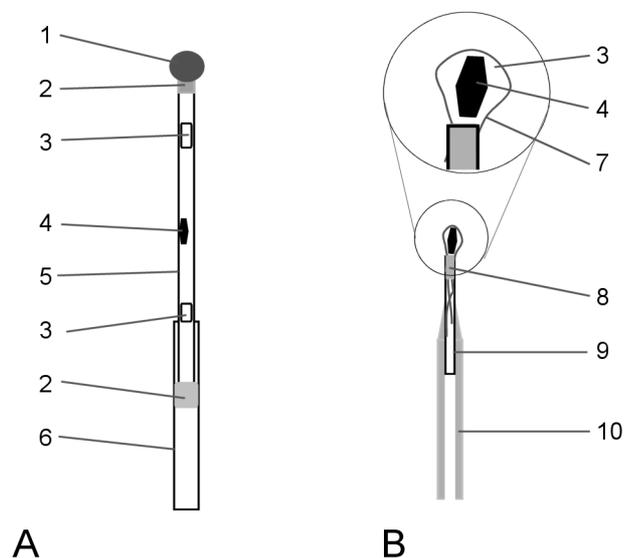


Abb. 3.2: Montage der Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse. A: für die Raumtemperaturmessung, B: für die Tieftemperaturmessung. 1: Wachspfropf, 2: Silikonkautschuk, 3: Kristallisationspuffer, 4: Kristall, 5: Kapillare, 6: Edelstahlhülle, 7: Zahnseidefaser, 8: Sekundenkleber, 9: ausgezogene Glaspipette, 10: Messingrohr.

Für die Messungen bei tiefen Temperaturen wurden die Kristalle in Schlaufen aus Zahnseide gefangen und schnell durch Transfer in einen kalten, gasförmigen Stickstoffstrahl oder flüssigen Stickstoff in der Schlaufe gefroren. Der Aufbau der Schlaufen für die Röntgenkristallographie ist ebenfalls in der nächsten Abbildung dargestellt. Bei der Röntgenstrukturanalyse bei tiefen Temperaturen wird der Kristall durch den kalten Stickstoffstrahl gekühlt. Eine thermische Kopplung an das Diffraktometer ist unerwünscht. Deshalb wird die in Abb. 3.2 dargestellte ausgezogene Glaspipette zur Entkopplung verwendet. Für die Neutronenmessung bei tiefen Temperaturen ist gerade eine Kopplung an die Metallhülse erwünscht, da sich der Kristall im Vakuum befindet (vgl. Beschreibung des Aufbaus in Abschnitt 4.3.1). Die thermische Kopplung findet über die Metallhülse aus Aluminium statt. Die Schlaufe ist also möglichst klein zu halten und der Kristall möglichst nahe an die Metallhülse zu bringen.

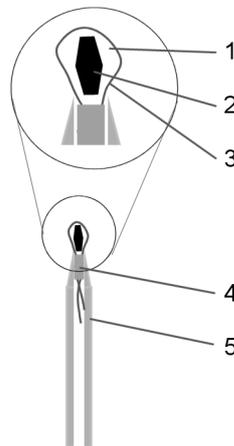


Abb. 3.3: Kristallmontage für die Neutronenstrukturanalyse bei tiefen Temperaturen. 1: Kristallpuffer mit Trehalose, 2: Kristall, 3: Zahnseidefaser, 4: Sekundenkleber, 5: Aluminiumhülse.

Für die Messungen, die von Dr. Ostermann bei Raumtemperatur mit Neutronen durchgeführt wurden, war der Kristall in einer Kapillare montiert.

4 Messapparaturen

4.1 Optische Spektroskopie

4.1.1 Apparatur und Messung

Zur optischen Messung wurde ein Spektrometer von Perkin-Elmer (Lambda 19) verwendet. Es arbeitet in einem Wellenlängen-Bereich von 3200 - 175nm, was $31250 - 57000\text{cm}^{-1}$ entspricht. Durch das Zweistrahl-Prinzip werden Schwankungen der Lampen-Intensität ausgeglichen. Das Spektrometer wird über einen Rechner mit der Software UV-Winlab (Perkin-Elmer) gesteuert und ausgelesen. Der optische Kryostat befindet sich im Probenstrahl. Das Gehäuse des Spektrometers wurde dazu aufgeschnitten. Der Referenzstrahl ist durch eine zusätzliche Abschirmung vor dem einfallenden Laserlicht bei Belichtung der Probe geschützt. Die Spektren wurden zwischen 320 und 750nm mit einer Spaltbreite von 1nm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 120nm/s und einer Mittelung über 2nm gemessen.

Der Kryostat der Firma Leybold vom Typ ROK 10-300 ist speziell für optische Messungen ausgelegt. Der von einem Isoliervakuum umgebene Probenraum ist für den Probenwechsel von oben zugänglich. Er besitzt an allen 4 Seiten Fenster aus Quarzglas (Suprasil I), die den Durchtritt des Messstrahls ermöglichen und außerdem eine seitliche Belichtung durch Drehen der Probe um 90° im Kryostaten zulassen. Die Kühlung erfolgt über thermischen Kontakt mit einem Kaltkopf (Leybold, RGD 210). Das Isoliervakuum für den Kaltkopf ist mit dem des Probenraumes verbunden. Die Kühlung erfolgt über ein zweistufiges System, das Helium aus einem Kompressor (Leybold, RW 2) nach dem Gifford-McMahon-Verfahren entspannt. Am Kaltkopf werden Temperaturen von 10K erreicht. Dies bedeutet aufgrund der nicht idealen Ankopplung der Probe eine Probentemperatur zwischen 17 und 20K. Das Vakuum wird über einen Turbo-Molekular-Pumpstand (Leybold, PT 50) erzeugt. Dabei ist einer Drehschieberpumpe (TRIVAC D1,6 B) eine Turbo-Molekular-Pumpe (TURBOVAC 50) vorgeschaltet, die über einen elektronischen Frequenzwandler (TURBOTRONIK NT 10) betrieben und gesteuert wird. Im Betrieb wird ein Enddruck von ca. $5 \cdot 10^{-6}$ mbar erreicht. Der Druck wird mit einer THERMOVAC-Meßröhre (Leybold, TR 211 DN 16 KF) zwischen Turbo-Molekular-Pumpe und Kryostat gemessen. Außerdem kann der Druck im Kryostaten mit einer Penningröhre (Leybold PENNINGVAC PR 35 DN 40 KF) bestimmt werden. Die beiden Röhren werden über ein gemeinsames Mess- und Steuerungsgerät (Leybold,

COMBIVAC CM 31) bedient und ausgelesen. Die Temperaturmessung und -regelung erfolgt durch einen Temperatur-Controller der Firma Leybold (LTC 60). Die Proben-Temperatur wird durch Heizen eingestellt, wobei der Refrigerator stets mit voller Leistung kühlt. Die Temperaturmessung erfolgt an zwei Orten über Silizium-Dioden (Lake Shore Cryogenics, DT 471, Westerville, Ohio, USA). Die erste Diode befindet sich im Kaltkopf, wo sich auch der Widerstand zum Heizen befindet. Diese Diode liefert auch das Regelungssignal für die Heizung. Die zweite Diode ist oberhalb der Probe im Probenhalter angebracht, so dass die Probentemperatur aufgrund des thermischen Kontaktes am unteren Ende stets zwischen den beiden angezeigten Temperaturen liegt. Die Genauigkeit der Temperaturregelung liegt bei $\pm 1\text{K}$, der Regelbereich reicht von ca. 17K bis 325K, wobei das obere Ende des Regelbereichs durch die Diode bestimmt wird.

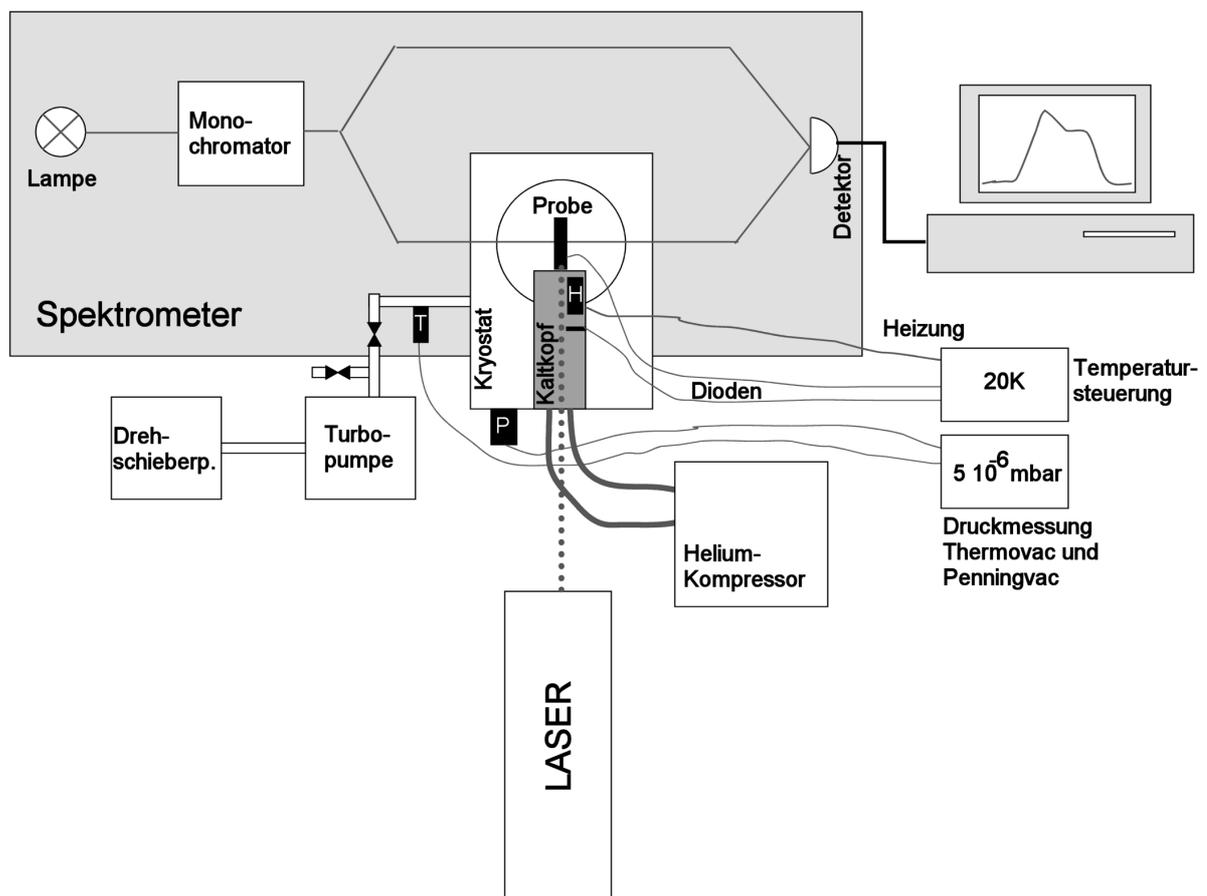


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau des optischen Spektrometers, Kryostaten und Lasers (T: Thermovac, P: Penningvac, H: Heizwiderstand).

Der Probenhalter besteht aus Kupfer. Die flüssige Probe wurde zwischen zwei Quarz-Glas-Scheiben (Suprasil-I, 1mm Dicke, 1cm Durchmesser) pipettiert, wobei die Dicke der Probe durch unterschiedliche Hostaphan-Abstandshalter definiert wird. Die Glasscheiben werden durch eine Verschraubung im Probenhalter fixiert. Die Standard-Dicke beträgt ca. 12 μm und entspricht somit ca. 2 μl Probenmenge. Der betrachtete Probenausschnitt wurde mit einer Maske aus selbstklebender Kupferfolie definiert. Der Probenhalter wird am Ende der Probenstange befestigt. Diese besteht aus einem Edelstahlrohr, das zugleich als Leitung dient, über die der Probenraum mit Helium gespült werden kann. Dies dient zum einen dazu, die thermische Kopplung an den Kaltkopf zu verbessern, und zum anderen die Luft im Probenraum zu ersetzen, die sonst bei Temperaturen unter 77K kondensieren würde. Die Probenstange besitzt am oberen Ende ein Ventil, über das das Probenvolumen mit Helium gespült werden kann. Nach Einbau der Probe wurde der Kryostat vor dem Kühlen stets für fünf Minuten mit Helium gespült. Optische Messungen als Funktion der Temperatur wurden stets beim Aufwärmen durchgeführt. Dazu wurde die Probe erst auf 20K abgekühlt und equilibriert (40 min). Nach der Messung eines Spektrums wurde die Temperatur innerhalb von 10 min um 10K erhöht und für 25 min konstant gehalten, bevor ein Spektrum aufgenommen wurde, was ca. 5 min dauert. Die Messung eines Temperaturspektrums dauert somit 40 min. Alle im Folgenden beschriebenen Temperaturreihen wurden in Schritten von 10K durchgeführt.

Zur Untersuchung der temperaturabhängigen Ligandierung der H64V-Mutante von Myoglobin wurden für die Proben 1 und 2 (im Folgenden bezieht sich die Nummerierung stets auf Tab. 3.1) temperaturabhängige Spektren von 20K bis 300K gemessen.

Zur Untersuchung des metastabilen Zustands nach photoinduziertem Elektronentransfer wurde ein Farbstofflaser (Candela EDL-3, Wayland, Massachusetts, Farbstoff: 2×10^{-4} mM Coumarin 47 in Ethanol) verwendet. Dieser erzeugt Lichtpulse bei 460nm (6nm Breite) mit einer Dauer von 1.2 μs . Die Wellenlänge stimmt mit der Absorption des Ruthenium-Komplexes $(\text{Ru}(\text{bpy})_3)^{2+}$ überein. Der angeregte Zustand von $(\text{Ru}(\text{bpy})_3)^{2+}$ kann ein Elektron auf das Eisen des Proteins übertragen. Als Elektronendonator für den Ruthenium-Komplex dient wiederum EDTA. Proben wurden stets von beiden Seiten belichtet, um eine möglichst vollständige Reduktion des Proteins zu erreichen. Bei 20K war eine vollständige Reduktion dennoch nicht möglich (Lamb et al. 1998a). Mit Probe 3 zur Untersuchung des metastabilen Zustands wurde zunächst eine Temperaturreihe R1 von 20K bis 200K gemessen. Diese dient

der Gewinnung temperaturabhängiger Referenzspektren für die Auswertung (siehe nächster Abschnitt). Anschließend wurde die Probe zur Reduktion auf 20K gekühlt und 60 min mit einer Pulsfrequenz von 1 Hz belichtet (je 30 min von einer Seite). Vor, während und nach der Reduktion wurden Spektren gemessen, um das Fortschreiten der Reduktion beurteilen zu können. Nach der Reduktion wurde die Probe für 15 min auf 100K erwärmt, um photolytierte Liganden zurückzubinden (Lamb et al. 1998b) und gefangene Elektronen zur weiteren Reduktion freizusetzen (Lamb et al. 1998a). Anschließend wurde die Probe wieder auf 20K gekühlt und die eigentliche Messung der Relaxation als Funktion der Temperatur durchgeführt: eine Reihe bis 150K (R2), anschließend wurde die Probe für 320 min auf einer Temperatur von 150K gehalten. Dies ermöglicht die Vergleichbarkeit der Messung mit Raman-Spektroskopie (Engler et al. 2000). Nach anschließendem Kühlen auf 20K wurden Temperatur-Reihen bis 170K (R3), 180K (R4) und 200K (R5) gemessen. Die Proben wurden jeweils direkt nach der Messung bei der höchsten Temperatur einer Reihe wieder auf 20K gekühlt. Nach dem Erreichen von 200K wurde die Probe auf 295K gebracht, mit zwei weiteren Laser-Blitzen vollständig reduziert und anschließend eine Temperaturreihe (R6) von 20K bis 200K zur Auswertung von Referenzspektren des Mbdeoxy-Zustands gemessen. Das gleiche Messprotokoll wurde für Probe 6 durchgeführt, um für jede Temperaturreihe Referenzspektren für den Ruthenium-Komplex zu erhalten (Rru). Mit den Proben 4, 5 und 7 wurde jeweils eine Temperaturreihe von 20K bis 300K gemessen (Rmet, Rdeoxy, Rsol).

4.1.2 Auswertung der optischen Spektren

Die optischen Spektren sind eine lineare Kombination der Spektren der in der Probe enthaltenen Moleküle. Falls die Moleküle sich gegenseitig wenig beeinflussen, ist dies eine gute Näherung. Die bei der Wellenlänge λ und der Temperatur gemessene Absorption $A(\lambda, T)$ lässt sich durch

$$A(\lambda, T) = \sum_i c_i(T) \cdot A_i(\lambda, T) + b_1 + \frac{b_2}{\lambda} + \frac{b_3}{\lambda^2} \quad (50)$$

angeben. Die letzten drei Summanden stellen eine Korrektur für die Streuung an der Probe dar. Diese ist nicht exakt reproduzierbar und wird daher modelliert. Kennt man die Molekülspektren $A_i(\lambda, T)$, so kann man die Konzentration $c_i(T)$ des jeweiligen Moleküls in der Probe durch eine Anpassung des gemessenen Spektrums bestimmen. Von allen Spektren wurde zuvor stets eine Messung des Lösungsmittels abgezogen (Probe 7, Rsol) und das

Spektrum durch Subtraktion eines konstanten Wertes so verschoben, dass die gemittelte Absorption zwischen 700nm und 750nm Null ist.

Die temperaturabhängigen Spektren der H64V-Mutante wurden nach Gl. (50) mit den Spektren von H64V bei 295K und nativem Mbmet bei 20K über den gesamten Temperaturbereich angepasst.

Das Verfahren für die Isolierung des Spektrums des metastabilen Zustands (Mbint) ist aufwändiger. Aufgrund der unvollständigen Reduktion und der Relaxation enthält ein experimentelles Spektrum stets Anteile von Mbmet und Mbint. Bei einsetzender Relaxation ist zudem ein Anteil von Mbdeoxy zu beobachten. Die oben genannte Voraussetzung der Unabhängigkeit der Molekülspektren von der Probenzusammensetzung ist im untersuchten Fall von Myoglobin mit hohen Konzentrationen von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ nicht erfüllt. Das Spektrum von MetMb verschiebt sich um 0.5nm bei der Zugabe von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Die Referenzspektren für MetMb werden daher aus Proben, die $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ enthalten, isoliert. Dazu wurde die Temperaturreihe R1 (Bezeichnungen aus vorigem Abschnitt) mit den Spektren aus der entsprechenden Temperaturreihe der Ruthenium-Proben (Rru) und den Spektren für Mbmet (Rmet) angepasst. Die Referenzspektren für Mbmet erhält man dann aus den experimentellen Spektren (R1) durch Subtrahieren des zuvor bestimmten Ruthenium-Anteiles. Analog wurde mit der Reihe R6 für die Bestimmung der Referenzspektren für Mbdeoxy verfahren. Der Anteil an $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ fiel dabei geringer aus als zuvor bei der Anpassung der Mbmet Spektren, was auf Photobleichen zurückgeführt werden kann. Deshalb wurde der Mittelwert der $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ Konzentration aus R1 und R6 verwendet, um den Anteil aus den Spektren des metastabilen Zustands R2 bis R5 abzuziehen. Zur Isolierung der Spektren des metastabilen Zustands musste nun noch der Anteil an nicht reduziertem Protein (Mbmet) und relaxiertem Protein (Mbdeoxy) abgezogen werden. Der Anteil an Mbmet wird anhand der Absorption der Absorptionsbande bei 630 nm (15870 cm^{-1}) bestimmt. Diese entspricht einem Übergang zwischen den π -Orbitalen des Porphyrins und den d-Orbitalen des Eisens und wird nur im Zustand Mbmet bei dieser Wellenlänge beobachtet (Makinen und Churg 1983). Unter 170K wurde keine weitere Reduktion beobachtet. Der Anteil an Mbmet wurde daher über die Reihen R2 bis R4 von 20K bis 170K gemittelt und abgezogen. Für die Subtraktion von Mbmet vom Spektrum bei 180K in Reihe R4 und den Spektren von R5 wurde der Anteil von Mbmet über R5 von 20K bis 170K gemittelt. Die Relaxation des metastabilen Zustands wird erst oberhalb von 150K beobachtet (Lamb et al. 1998a). Aus den Spektren der Reihen R4

oberhalb 150K, R5 und R6 wurde der Mbdeoxy Anteil durch eine Anpassung nach Gl. (50) bestimmt. Als Referenzspektren wurden die Spektren des metastabilen Zustands von der vorhergehenden Temperaturreihe bei gleicher Temperatur oder, falls nicht vorhanden, von der gleichen Reihe bei der nächstniedrigeren Temperatur sowie die zuvor beschriebenen Referenzspektren für Mbdeoxy verwendet. Die gesamte Proteinkonzentration wurde dabei konstant gehalten.

Die Analyse der Soret-Bande erfolgte mittels der Gleichungen (8), (9) und (10) (siehe Abschnitt 5.2). Das Programm wurde von A. Huenges erstellt (Gaßmann 2000). Durch Raman-Spektroskopie an einer zuvor mit Röntgenstrahlung reduzierten Probe (Probe 8) waren die Frequenzen von stark an die Soret-Bande koppelnden Moden bestimmt worden (Engler et al. 2000). Die vier total symmetrischen Moden bei 372cm^{-1} , 673cm^{-1} , 1362cm^{-1} und 1605cm^{-1} wurden zur Anpassung der optischen Spektren verwendet. Im Raman-Spektrum befinden sich bei 1000cm^{-1} mehrere Moden mittlerer Stärke. Diese werden durch eine Mode bei 1000cm^{-1} erfasst. Es wurden Vibrationsquantenzahlen m_{hj} von 0 bis 2 in Gl. (9) berücksichtigt. Die quadratische Kopplung wurde nicht berücksichtigt und die Kopplungskonstante auf eins gesetzt, wie auch schon in den Untersuchungen von DiPace (DiPace et al. 1992). Die kurzweiligere Anregung der N-Bande (Makinen und Churg 1983) wurde durch eine gaußförmige Bande bei 29000 cm^{-1} mit einer Breite von 2045 cm^{-1} modelliert.

4.2 Röntgenstrukturanalyse

4.2.1 Röntgendiffraktometer und Tieftemperatureinrichtung

Zur Messung der Röntgenstreuung wurde eine Drehanode der Firma ENRAF-NONIUS mit einer Kupfer-Anode verwendet (Typ FR-591). Das Gehäuse der Drehanode dient gleichzeitig als Tisch für das Drei-Kreis-Diffraktometer der Firma SIEMENS. An der Drehanode ist ein Graphit-Monochromator (HUBER) befestigt, der die Kupfer- K_{α} -Linie ($\lambda=1.54\text{ \AA}$) auswählt. Das Diffraktometer trägt auch den Kollimator. Der Kristall befindet sich auf einem Goniometerkopf, der sich zur Orientierung bezüglich des Röntgenstrahls mit einem Mikroskop justieren lässt, das ebenfalls auf dem Diffraktometer montiert ist. Das Diffraktometer ermöglicht das Drehen des Kristalls um die Achsen ω und φ bezüglich des

Röntgenstrahles. Der Detektor befindet sich auf dem dritten Kreis 2ϑ , wie in der folgenden Abbildung veranschaulicht.

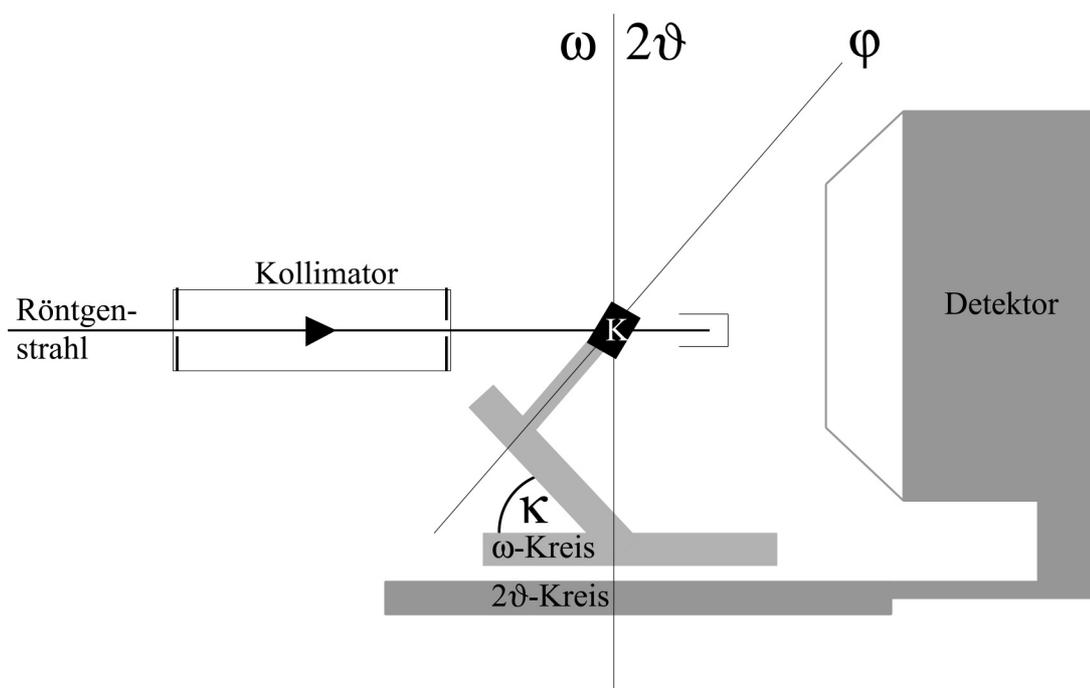


Abb. 4.2: Schema des Drei-Kreis-Diffraktometers. K: Kristall. ($\kappa = 54.7^\circ$)

Die Achsen des 2ϑ - und des ω -Kreises fallen zusammen. Durch die Geometrie des Diffraktometers ist das feste Anbringen einer Tieftemperaturanlage (SIEMENS, LT-2A) möglich, wie in Abb. 4.3 dargestellt. Im großen Stickstofftank, der ein isolierter, offener Behälter ist, befindet sich ein Gefäß, das nach oben abgeschlossen ist. In diesem befinden sich Widerstände, die durch die manuelle Regelung eines Stromflusses an der Kontrolleinheit auf eine gewünschte Temperatur gebracht werden können. Der dadurch verdampfte Stickstoff wird über ein Röhrensystem zum Diffraktometer geleitet. Der Stickstoffbehälter wird aus einem Druckbehälter automatisch nachgefüllt. Die grobe Einstellung der Temperatur erfolgt durch die handgeregelten Widerstände. Die genauere Einstellung der Temperatur kann durch einen weiteren Widerstand im Stickstoffgefäß und die Gasheizung geregelt werden. Als Eingangssignal zur Regelung dient dabei ein Temperaturfühler, der sich kurz oberhalb der Austrittsdüse im gasförmigen Stickstoffstrahl befindet. Zur Verhinderung der Vereisung der Austrittsdüse ist diese beheizt. Zudem wird der Stickstoffstrahl dadurch im äußeren Bereich, wie in Abb. 4.3 angedeutet, erwärmt, was die Vereisung des Kristalls verringert.

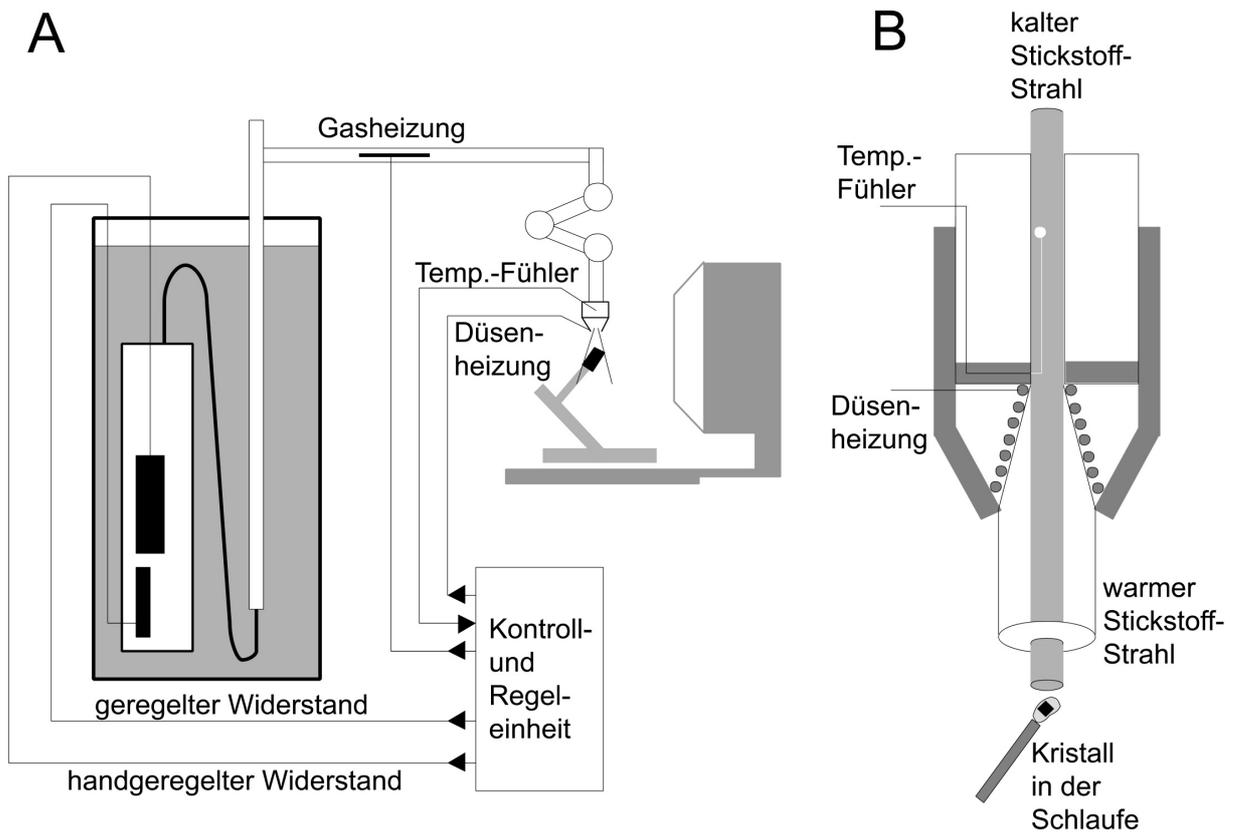


Abb. 4.3: Aufbau der Tieftemperatur-Apparatur. A: Überblick und Anordnung bezüglich des Diffraktometers. B: Ausgangsdüse des Stickstoffstrahls.

Die ganze Anlage befindet sich in einem Plexiglas-Gehäuse. Dieses garantiert eine trockene Umgebungsluft und verhindert damit das unerwünschte Vereisen des Kristalls auch bei langer Messzeit. Das Plexiglas absorbiert durch den erhöhten Anteil an Chlor auch gestreute Röntgenstrahlung und dient dem Schutz vor dem ungewollten Hantieren im Röntgenstrahl. Das Plexiglas-Gehäuse ist deshalb mit Schutzschaltern versehen, die beim Öffnen bei offenem Röntgenstrahl einen Shutter zwischen Drehanode und Monochromator schließen.

Bei dem Detektor handelt es sich um einen Vieldraht-Proportionalzähler der Firma SIEMENS (Modell HISTAR). Dieser wird von einem Rechner mit dem Programm FRAMBO (SIEMENS) ausgelesen, das auch das Diffraktometer steuert. Die Daten werden auf einer Festplatte gespeichert, die sich im Ethernet-Netzwerk an einem Silicon Graphics Rechner befindet. Dort erfolgt die weitere Auswertung.

4.2.2 Messverfahren und Auswertung der Röntgendaten

Zur Messung wird der Kristall bei feststehendem Detektor um eine der Achsen, die in Abb. 4.2 mit φ und ω bezeichnet sind, gedreht. Der Kristall wird dabei bei einer laufenden Aufnahme in Schritten von ca. einem Drittel der Halbwertsbreite des Reflexionsbereiches eines Bragg-Reflexes gedreht. Dies entspricht bei den hier gemessenen Kristallen einem Winkelbereich zwischen 0.10° und 0.15° . Um den gesamten Auflösungsbereich messen zu können, musste der Detektor aufgrund des begrenzten Öffnungswinkels stets in zwei verschiedene Positionen gebracht werden und die Messung somit im Prinzip zweimal durchgeführt werden. Eine Messung bis 1.5\AA besteht nach diesem Verfahren aus ca. 6000 einzelnen Aufnahmen.

Der Hersteller empfiehlt, eine maximale Zählrate für den Detektor von 10^5 Quanten pro Sekunde nicht zu überschreiten. Dies verhindert das Beeinflussen der Messung durch die Totzeit der Elektronik. Für die maximale Zählrate pro Pixel wird von SIEMENS ein Wert von 200 Quanten pro Sekunde empfohlen, was den Einfluss der Totzeit des Zählgases verhindern soll. Bei den Messungen wurde die Drehanode so betrieben, dass ca. die Hälfte der empfohlenen Werte erreicht wurde. Bei einer Spannung von 40kV wurde der Strom dazu entsprechend eingestellt (Werte zwischen 35mA und 60mA abhängig von der Intensität der Reflexe). Die Messzeit pro Aufnahme wurde so eingestellt, dass die Reflexe bei der höchsten auf dem Detektor sichtbaren Auflösung gut vom Untergrund zu trennen waren. Dies entspricht je nach Kristallgröße und Stellung des Detektors auf dem 2ϑ -Kreis Messzeiten zwischen 30 und 100 Sekunden.

Eine erste grobe Orientierungsmatrix des Kristalls wurde mit dem Programm FRAMBO bestimmt. Ausgehend von dieser Orientierung wurde die Integration der Reflexe mit dem Programm SAINT (SIEMENS) durchgeführt. Dieses sucht die Reflexe ausgehend von der Orientierungsmatrix und passt die Reflexe in aufeinanderfolgenden Aufnahmen mit einem dreidimensionalen Gauß-Profil an. Die Schwerpunkte der Reflexe dienen dann wiederum der Anpassung der Orientierung. Ferner kann SAINT Datensätze aus mehrfachen Messungen zusammenfassen und Korrekturfaktoren bezüglich des Rotationswinkels und der Position auf dem Detektor berechnen. Abschließend wurden Reflexe aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen, deren Position oder Profil zu stark vom Mittelwert abwichen. Die Mittelwertbildung der symmetrieäquivalenten und mehrfach gemessenen Reflexe sowie die Korrektur der Standardabweichung der Intensität wurde mit dem Programm „AGROVATA“

Der Neutronenfluss für das Wellenlängenband um 3.5\AA bei $\Delta\lambda/\lambda=20\%$ beträgt am Probenort $3\cdot 10^7$ Neutronen je cm^2 und Sekunde. Vor dem Diffraktometer befindet sich ein Kollimator, der aus zwei Blenden besteht. Der Strahlquerschnitt kann dabei mittels Motorsteuerung auf die Kristallgröße eingestellt werden. Anhand der Zählrate eines starken Reflexes wurde dieser zu Beginn des Experiments optimiert. Das Diffraktometer ist durch Blei und Borcarbid (B_4C) in Richtung des Reaktors abgeschirmt. Der Kristall wird auf einer drehbaren Achse montiert. Diese fällt mit der Achse des zylinderförmigen Detektors zusammen. Der Detektor hat eine Dimension von $800 \times 400\text{mm}^2$ und einen Radius von 159.19 mm . Durch Drehen des Zylinders und eine linear bewegliche Auslese-Einheit kann der Detektor mit einer Auflösung von $200 \times 200\ \mu\text{m}^2$ ausgelesen werden. Die Auslesung erfolgt dabei von der Außenseite, wohingegen die Detektion der Neutronen von der Innenseite erfolgt. Dies führt zu einer geringeren Effizienz. Die Auslesedauer bei 800 Umdrehungen je Minute beträgt ca. 3 Minuten. Die darauf folgende Löschung der Platten mittels weißen Lichts dauert nochmals 3 Minuten. In der folgenden Abbildung ist der Aufbau des Diffraktometers dargestellt:

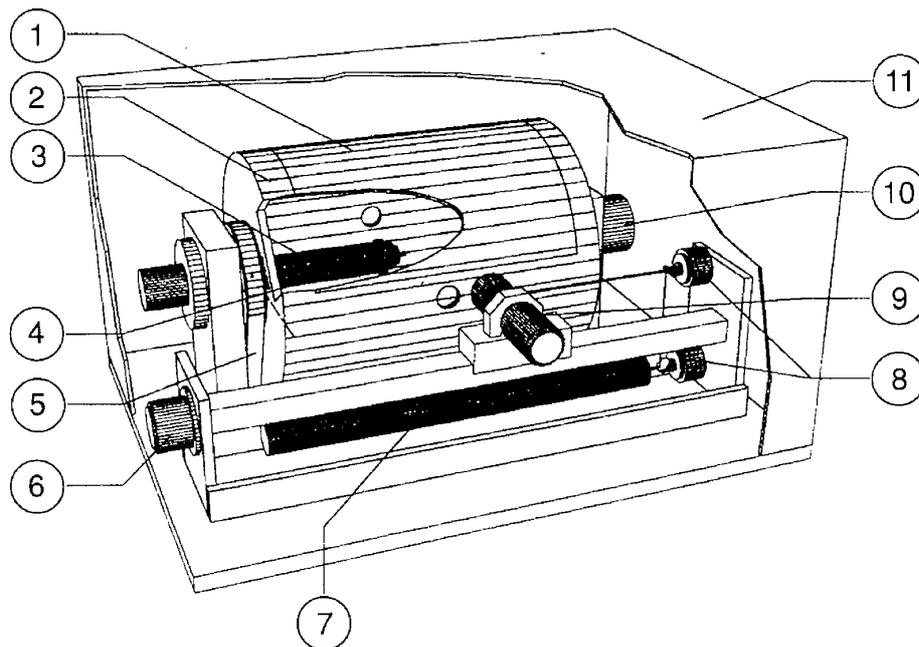


Abb. 4.5: Das Laue-Diffraktometer LADI am ILL in Grenoble (Cipriani et al. 1996). 1: Bild Platte auf Zylinder. 2: Drehbarer Zylinder. 3: Drehachse für Kristall. 4: Kristall. 5: Antriebsriemen für Zylinder. 6: Motor zum Antrieb der Ausleseeinheit. 7: He-Ne Laser. 8: Spiegel, die das Licht zur Ausleseeinheit bringen. 9: Ausleseeinheit mit Photomultiplier. 10: Sensor für Zylinderrotation. 11: Abdeckung.

Die Anlage ist für die Montage eines Kryostaten mit geschlossenem Helium-Kreislauf eingerichtet (Displex). Der Kryostat ersetzt die Drehachse (mit 3 in Abb. 4.5 bezeichnet) und

lässt sich wie diese drehen. Der Kompressor steht neben der Anlage und ist über flexible Schläuche mit dem Kryostaten verbunden. Am Kaltkopf wird eine minimale Temperatur von ca. 12K erreicht. Die Probe koppelt über einen Kupferstab und einen Goniometerkopf aus Kupfer an den Kaltkopf an. Der Kristall befindet sich in einer Schlaufe, die in ein Aluminiumrohr eingeklebt ist, das wiederum in den Goniometerkopf geschraubt wird (vgl. auch die Probenmontage in Abschnitt 3.3). Der Goniometerkopf wird mittels Federn auf den Kupferstab gepresst. Da eine Temperaturmessung am Probenort wegen eines Defektes nicht möglich war, muss von einem Wert ausgegangen werden, der sonst typisch bei 20K liegt. Die Qualität des Vakuums kann dazu als Indiz dienen. Der Kristall befindet sich direkt im Vakuum und der Vakuummantel ist von einem Aluminiumrohr abgeschlossen, das im Bereich der Streuung auf eine dünnstmögliche Dicke heruntergedreht ist. Aufgrund der geringen Wandstärke des Mantels ist das Aluminiumrohr leicht deformierbar und durch Benutzung verbeult. Dies macht sich in den Streubildern bemerkbar und kann zu einer schwierigeren Bestimmung des Untergrundes führen.

4.3.2 Funktionsweise von Neutronen-Bild-Platten (NBP)

Neutronen-Bild-Platten sind im wesentlichen die gleichen Bild-Platten, die auch zur Detektion von Röntgenstrahlung verwendet werden (Sonoda et al. 1983; Amemiya und Miyahara 1988). Um damit Neutronen detektieren zu können, müssen diese in Photonen oder Elektronen umgewandelt werden. Für thermische Neutronen hat sich dabei Gadolinium (Gd) bewährt (Rauch et al. 1967; Bücherl et al. 1993; Niimura et al. 1994). Gd hat den größten bekannten Einfangquerschnitt aller natürlich vorkommenden Materialien für thermische Neutronen. Es liegt als natürliches Gemisch von 7 Isotopen vor. Im natürlich vorkommenden Isotopengemisch werden 81.56% der Neutronen vom Isotop ^{157}Gd und 18.43% vom Isotop ^{155}Gd eingefangen (Werte aus Rausch 1996). Der Rest der Isotope, der 65% aller Atome im natürlichen Isotopengemisch ausmacht, ist praktisch nicht am Einfangprozess beteiligt. Aufgrund der hohen Kernladungszahl ($Z=64$) führen diese aber zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber γ -Strahlung. Hochenergetischen γ -Quanten, die aus den dünnen Bild-Platten eigentlich entweichen würden, erzeugen daher ein Untergrundsignal, da dieses nicht am Ort des eingefangenen Neutrons detektiert wird. Die angeregten Kerne $^{156}\text{Gd}^*$ und $^{158}\text{Gd}^*$ zerfallen wie in der folgenden Abbildung skizziert:

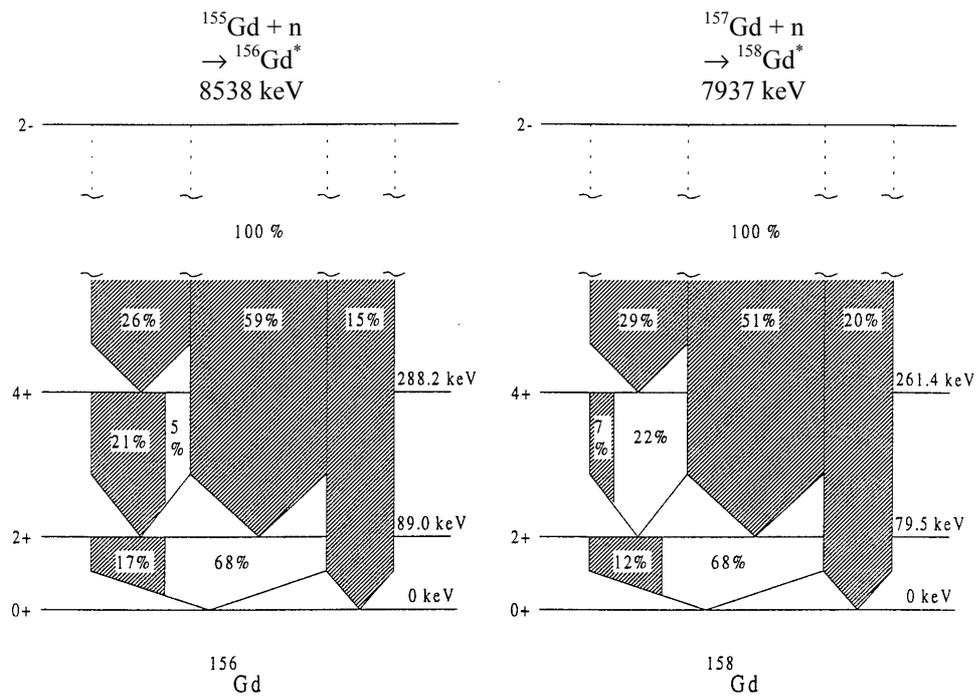


Abb. 4.6: Erzeugung und Zerfall der niedrigsten Zustände von ^{156}Gd und ^{158}Gd nach der (n,γ) Reaktion von ^{155}Gd und ^{157}Gd . Die schraffierten Flächen stellen γ -Emissionen, die weißen Flächen Konversionselektronen dar (aus Rausch 1996).

Bei der Abregung wird die freigewordene Bindungsenergie des Neutrons im jeweiligen Gd-Kern in Form einer Gammakaskade freigesetzt. Da der Konversionskoeffizient mit steigender Kernladungszahl und sinkender Anregungsenergie zunimmt, beobachtet man bei Gd einen hohen Anteil an Konversionselektronen, die sich gut detektieren lassen (Abb. 4.6). Die nahezu nicht beobachtbaren höherenergetischen Übergänge sind deshalb in der Abbildung vernachlässigt. Weitere Elektronen entstehen durch Auger-Prozesse in Folge der emittierten Konversionselektronen. Die Bild-Platten, die an LADI oder auch in BIX-3 in Tokai-Mura (Japan, Tanaka et al. 1999) eingesetzt werden, enthalten das natürlich vorkommende Isotopengemisch in der chemischen Form Gd_2O_3 . Durch die Verwendung von isotopenreinem ^{157}Gd könnte die Dicke der Platte verringert werden. Dies und der bei gleicher Detektionseffizienz geringere Anteil an Gd würde zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber γ -Strahlung führen.

Die Elektronen und niederenergetischen γ -Quanten können nun im Speicherleuchtstoff BaFBr:Eu^{2+} detektiert werden. Die weiteren Vorgänge des Detektionsmechanismus sind analog zur Detektion von Röntgenstrahlung. Es werden Elektron-Loch-Paare erzeugt. Die Löcher bilden Eu^{2+} -Loch-Komplexe. Die Elektronen werden ins Leitungsband gehoben und

in F-Zentren gefangen. Letztere sind Gitterfehlstellen, in denen ein negatives Br^- -Ion fehlt. Dieser Zustand ist metastabil und zerfällt nur sehr langsam. Das Auslesen der Information nach erfolgter Belichtung erfolgt dann mit Licht einer Wellenlänge zwischen 450 und 650nm (He-Ne-Laser: 632.8nm). Dieses hebt die Elektronen wieder ins Leitungsband. An Eu^{2+} -Loch-Komplexen können das Elektron und das Loch rekombinieren und ein angeregter Eu^{2+} -Zustand bleibt übrig. Dieser zerfällt unter Aussendung von Licht mit einer Wellenlänge von 390nm. Dieses kann in einem Photomultiplier detektiert werden. Die Intensität der photostimulierten Lumineszenz ist dabei über einen sehr weiten Bereich linear von der einfallenden Intensität an Quanten und Elektronen abhängig (Amemiya und Miyahara 1988). Nach dem Auslesen kann die Bildplatte durch längere Belichtung mit weißem Licht in den Ausgangszustand zurückversetzt werden.

4.3.3 Aufnahmeverfahren und Auswertung der Neutronendaten

Zur Vorbereitung des Experiments wurden Einfrierversuche mit Kristallen (Volumen größer 1mm^3) im Stickstoffstrahl auf der Röntgenanlage durchgeführt. Zur Qualitätsbeurteilung wurden Aufnahmen vom Reflexionsbereich der Kristalle durchgeführt. Die Kristalle konnten ohne Probleme mit ausreichend schmalen Reflexionsbereich von ca. 0.3 Grad eingefroren werden. Sechs Kristalle wurden anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Bei Aufnahmen an LADI zeigten die Kristalle eine Aufspaltung der Reflexe. Dies kann zum einen an der problematischen Einbau-Prozedur liegen, die weiter unten beschrieben wird, zum anderen ist die Qualitätsbeurteilung der Kristalle auf dem Röntgendiffraktometer nicht ausreichend. Der dort verwendete Kollimator von 0.8mm Durchmesser ermöglicht nicht die Aufnahme des gesamten Kristalles wie es beim Laue-Diffraktometer bei einem Strahl von ca. 3mm mal 3mm der Fall ist. Deshalb wurden Kristalle, die in deuteriertem Puffer nach Grenoble gebracht wurden, eingefroren. Bei den Einfrierversuchen zeigte sich, dass alle Kristalle leicht aufgespaltene Reflexe erzeugten. Aufgrund der Begrenzung der Messzeit wurde schließlich ein Kristall ausgewählt, obwohl er kein idealer Mosaikkristall war.

Um einen Kristall einzubauen, wurde dieser in einer Schlaufe gefangen. Die Schlaufe war dabei schon in den Goniometerkopf montiert. Der Goniometerkopf wurde in einem Stativ fixiert, so dass der Kristall zum Boden zeigt. Anschließend wurde ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff von unten genähert und der Kristall schnell eingetaucht. Das Gefäß wurde mit einer Verschraubung am Goniometerkopf befestigt und der Goniometerkopf dann schnellstmöglich

als Ganzes in flüssigen Stickstoff verbracht. Das Gefäß verhindert, dass der Kristall durch das starke Verdampfen des Stickstoffs beim Einbringen des Goniometerkopfs in den flüssigen Stickstoff Schaden nimmt. Bei dieser Prozedur ist aufgrund der thermischen Kopplung des Kristalles an den Goniometerkopf jedoch mit einem Temperaturgradienten zu rechnen. Der Goniometerkopf mit Kristall und angeschraubtem Gefäß wurde dann in einem Bad aus flüssigem Stickstoff zum Kühlfingerkryostaten gebracht. Dieser war auf 20K vorgekühlt. Das Vakuum des Kryostaten lässt sich per Fernbedienung eines Magnetventiles brechen. Daran anschließend wurde die Kryostatenhülle schnell abgezogen, der Goniometerkopf samt Gefäß mit Stickstoff in die Halterung aufgesteckt, das Gefäß abgeschraubt und die Kryostatenhülle aufgesteckt. Per Fernbedienung wurde das Ventil geschlossen und die Vakuumpumpe, die schon ein Reservoir evakuiert hatte, wieder über ein zweites Ventil angeschlossen. Angesichts dieser aufwändigen Montage ist ein zerstörungsfreies Einfrieren großer Kristalle schwierig.

Die folgenden Abbildungen zeigen eine Aufnahme (Abb. 4.7) und eine Vergrößerung (Abb. 4.8) aus der Messung des schließlich verwendeten Kristalles. Die Aufnahmen erfolgten bei still stehendem Kristall mit einer Belichtungsdauer von 14h. Der Kristall wurde dann um 16 Grad zur nächsten Aufnahme weiter gedreht. Nach einer Drehung um insgesamt 176 Grad wurde der Kristall in die Ausgangsposition gefahren und dann um 8 Grad gedreht. Die weiteren Aufnahmen erfolgten wieder mit Winkeldifferenzen von 16 Grad. Da die Messzeit begrenzt war, konnte die letzte Aufnahme bei 168 Grad nicht mehr durchgeführt werden.

Die Indizierung der Reflexe erfolgte mit dem Programm LAUEGEN (Version 6.0, Campbell et al. 1998) aus der Laue Programm Sammlung aus Daresbury, das für die zylindrische Detektorgeometrie angepasst ist. Jedes Detektorbild wurde einzeln indiziert. Dabei werden zunächst nach Augenmaß intensive Knotenpunkte im ersten Laue-Reflexbild gesucht. LAUEGEN kann unter Verwendung der bei 105K bekannten Gitterkonstanten (Ostermann 2000) mögliche Orientierungen vorschlagen. Aus den Vorschlägen konnte dann eine akzeptable Lösung ausgewählt werden. Anschließend kann durch Auswahl starker Knoten-Reflexe eine Anpassung der Gitterkonstanten und Orientierung erfolgen. Als Startpunkt für die weiteren Aufnahmen wurden die Orientierungswinkel um die Drehung korrigiert, unter der die Aufnahme zur vorhergehenden erfolgte. Auf diese Weise wurden alle Aufnahmen indiziert. Die Integration der Reflexe erfolgte anschließend ebenfalls mit LAUEGEN. Dabei wird jede Aufnahme einzeln integriert. Die Größe der Integrationsfläche für die Reflexe

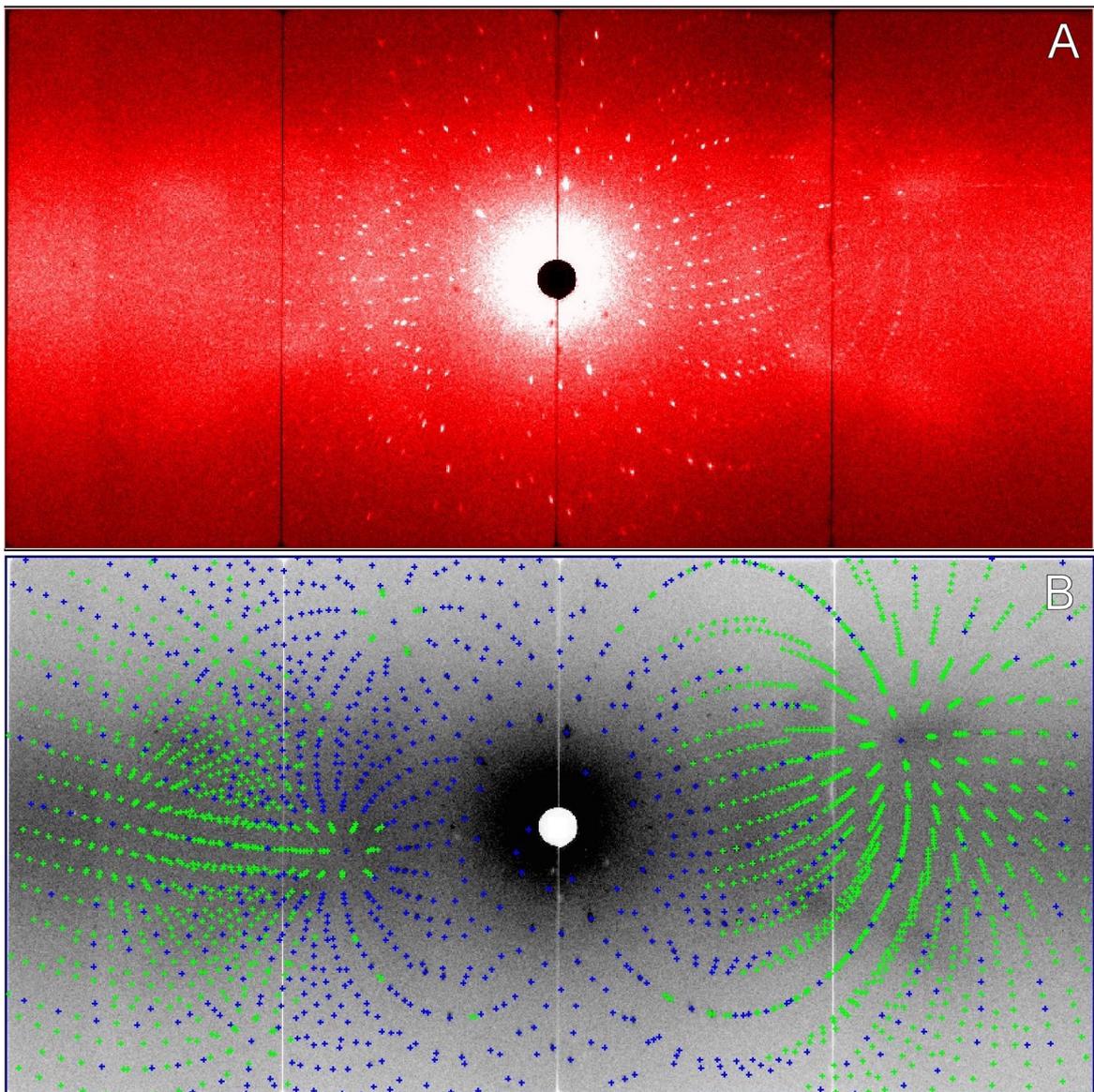


Abb. 4.7: Laue-Aufnahme von Myoglobin bei 20K. A: Messung (Farbskala zunehmender Intensität von schwarz über rot nach weiß). B: +: Indizierte Reflexe bei Auswertung bis 2.1Å. (blau: nicht überlappende Reflexe, grün: überlappende Reflexe).

wurde mittels der automatischen Routine von LAUEGEN bestimmt und die Reflexe anschließend integriert. Eine Inspektion der bei der Integration erstellten Profile ermöglicht eine Beurteilung der Reflexgröße. Die Integrationsfläche wurde gegebenenfalls korrigiert und anschließend die Reflexe erneut integriert. Das zur Integration verwendete Wellenlängenband wurde mit 2.7 bis 3.9 Å ausreichend bemessen, so dass etwaiger harmonischer Überlapp sicher erkannt wurde. Die Reflexe wurden anschließend mit dem Programm LSCALE (Arzt et al. 1999) skaliert und gleichzeitig auf die Wellenlängenabhängigkeit normiert. Dabei wurden die Aufnahmen durch einen Skalierungsfaktor für jede Aufnahme eine winkelabhängige Skalierung und eine globale Absorptionskorrektur angepasst. In diesem Schritt findet auch die

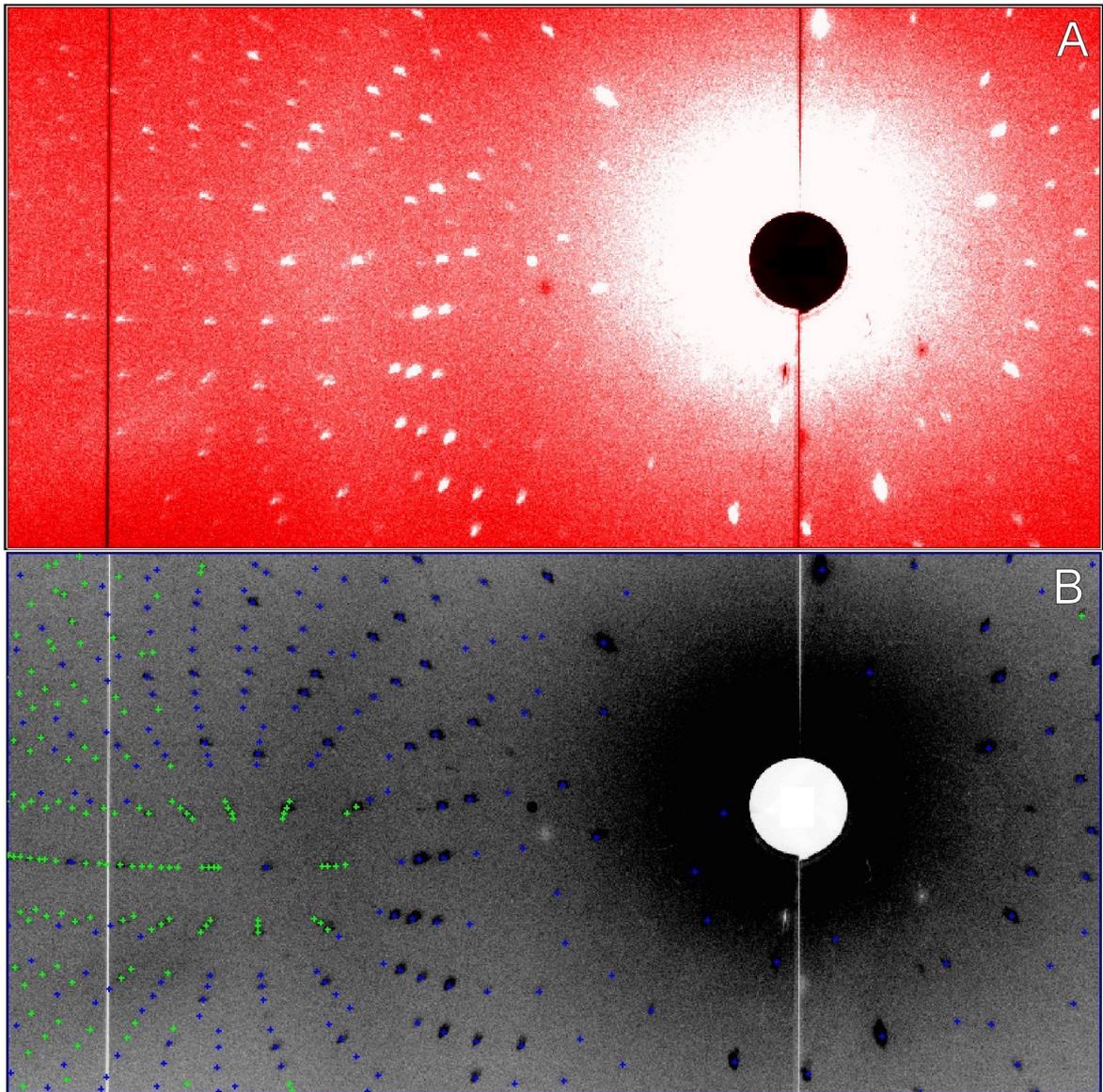


Abb. 4.8: Laue-Aufnahme von Myoglobin bei 20K. Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 4.7. A: Messung (Farbskala zunehmender Intensität von schwarz über rot nach weiß). B: +: Indizierte Reflexe bei Auswertung bis 2.1Å. (blau: nicht überlappende Reflexe, grün: überlappende Reflexe).

Aufteilung der harmonisch überlappenden Reflexe statt. Die weitere Verarbeitung erfolgte mit den Programmen aus der CCP4 Programm-Bibliothek (Version 4.1.2, Bailey 1994). Nach einer Sortierung der Reflexe mit SORT erfolgte das Zusammenfassen symmetrieäquivalenter und mehrfach gemessener Reflexe mit dem Programm SCALA. In einem ersten Durchgang wurde auch die Standardabweichung aufgrund der Gesamtheit aller Reflexe angepasst. In einem zweiten Durchgang wurde dann mit festgehaltenen Parametern zur Korrektur der Standardabweichung nur eine Mittelung für Reflexe vorgenommen, die nicht zu weit vom Mittelwert abwichen. In einem abschließenden Durchgang wurden die Intensitäten mittels des Programmes TRUNCATE von Intensitäten zu Amplituden umgerechnet.

5 Untersuchungen zur Proteindynamik an Myoglobin und einer Mutante

5.1 Untersuchung der H64V-Mutante von Myoglobin

Bei der Mutation des distalen Histidines 64 zu Valin ist im Met-Zustand bei Raumtemperatur kein Wasser gebunden (Abb. 5.1). Das Eisen ist damit nur fünffach koordiniert.

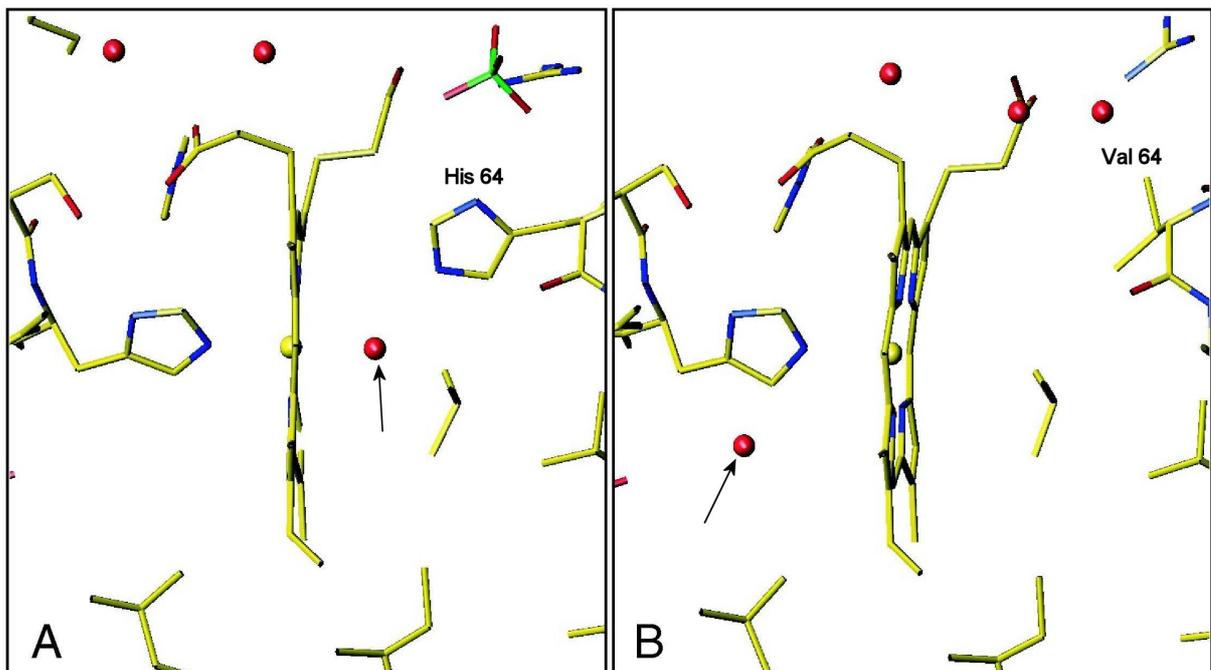


Abb. 5.1: Vergleich der Struktur von nativem Met-Myoglobin bei 300K und H64V-Met-Myoglobin. A: Auflösung 1.5Å aus Ostermann (2000). Der Pfeil zeigt auf das ligandierende Wasser. B: Auflösung 2.0Å aus Quillin et al. (1993). Der Pfeil zeigt auf ein Wasser im proximalen Xe-Loch. Zur Darstellung wurden die C_{α} -Atome aufeinander angepasst. Rote Kugeln stellen die Sauerstoffatome von Wassermolekülen dar.

Die Wasserstoffbrücke des ligandierenden Wassers zum distalen Histidin geht bei der Mutation verloren. Dadurch entfällt deren stabilisierender Beitrag. In ersten spektroskopischen Untersuchungen wurde eine temperaturabhängige Ligandierung der Mutante festgestellt (Engler 1998). Eine genauere Untersuchung zur Erklärung des Mechanismus wurde daher unternommen.

5.1.1 Temperaturabhängige Ligandierung von H64V-Met-Myoglobin

Bei Raumtemperatur zeigt das optische Spektrum von H64V-Mbmet ein breites Maximum bei 394nm. Die temperaturabhängige Messung zeigt eine Verlagerung der Intensität in eine zweite Spezies mit einem Absorptionsmaximum bei 410nm. Ein isosbestischer Punkt bei 399nm ist sichtbar.

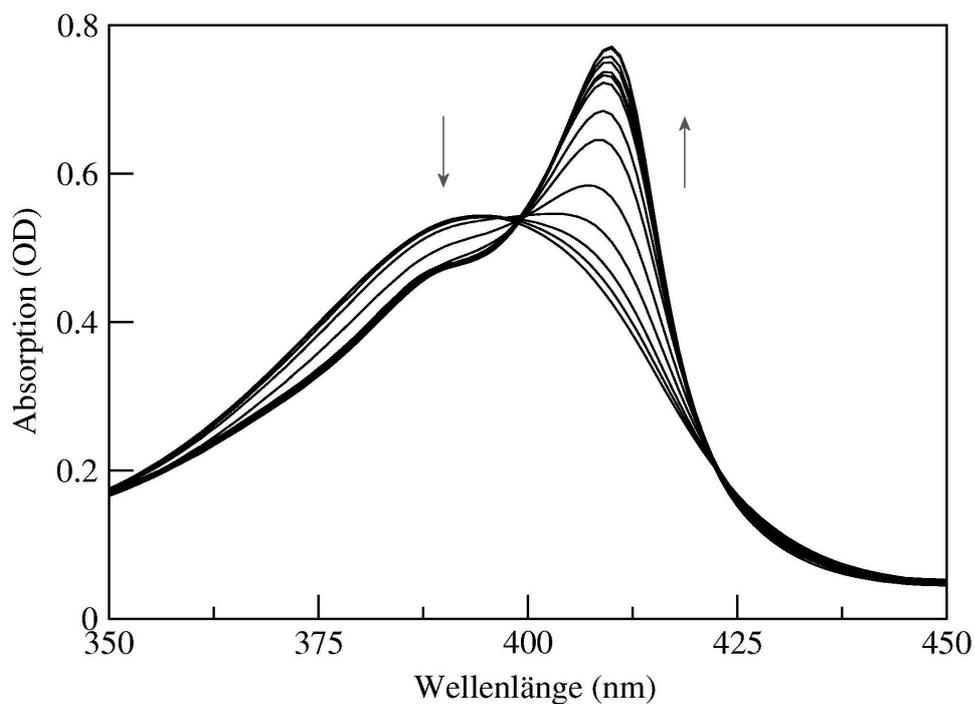


Abb. 5.2: Temperaturabhängige Absorptionsspektren von H64V-Mbmet zwischen 295K und 20K (20K bis 280K in Schritten von 20K und Spektrum bei 295K). Die Pfeile geben an, wie die Spektren sich bei Verringerung der Temperatur verändern.

Der Übergang zwischen den beiden Spezies kann durch eine Anpassung der Spektren quantifiziert werden. Zur Anpassung aller temperaturabhängigen Spektren wurden die Spektren von H64V-Mbmet bei 295K und von nativem Myoglobin bei 20K verwendet. Letzteres besitzt ein Soret-Banden-Absorptionsmaximum bei 410nm. Bei Verwendung des H64V-Spektrums bei 295K wurde davon ausgegangen, dass der Anteil der Spezies mit dem Absorptionsmaximum bei 410nm vernachlässigt werden kann. Das Spektrum von nativem Mbmet bei 20K wurde verwendet, da diese Soret-Bande schmal genug ist, um diese Spezies befriedigend zu beschreiben. Aus der Anpassung nach Gl. (50) erhält man somit die Konzentrationen der beiden Zustände c_{394} und c_{410} . Die Indizes bezeichnen dabei das Maximum der Soret-Bande. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Anpassung bei 180K.

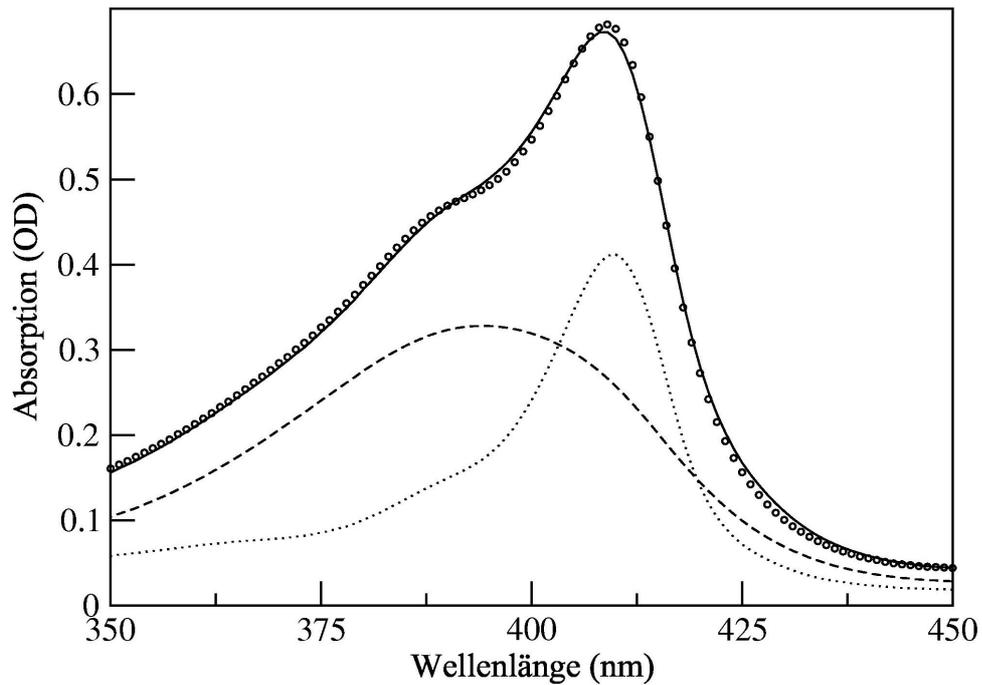


Abb. 5.3: Absorptionsspektrum von H64V-Mbmet (Kreise) bei 180K und Anpassung (durchgezogene Linie) mit dem Spektrum von H64V-Mbmet bei 295K (gestrichelte Linie) und von nativem Myoglobin bei 20K (gepunktete Linie).

Die Anpassung zeigt Abweichungen, die durch Unterschiede in der Linienform zwischen den zur Anpassung verwendeten Spektren und dem H64V-Spektrum erklärbar sind. Die Differenzen resultieren auch aus der fehlenden Information über die Temperaturabhängigkeit der Spektren, die zur Anpassung verwendet wurden.

Da der Absorptionskoeffizient der Spezies mit dem Soret-Banden-Maximum bei 410nm nicht bekannt ist, muss man für diese einen Skalierungsfaktor c_{sc} einführen. Dieser muss temperaturunabhängig sein:

$$c_{410}(T) = c_{410}^*(T) \cdot c_{sc} \quad (51)$$

Man erhält so die korrigierte Konzentration $c_{410}^*(T)$. Da die Proteinkonzentration über den Temperaturverlauf konstant sein muss, kann man den Skalierungsfaktor so bestimmen, dass die Summe der beiden Anteile konstant bleibt:

$$c_{tot} = c_{394}(T) + c_{410}^*(T) \equiv \text{const.} \quad (52)$$

Die über die Temperatur gemittelte Konzentration c_{tot} ergibt einen Wert von 1.013 mit einer Standardabweichung von 0.010. Der prozentuale Anteil der Spezies mit einem Absorptionsmaximum bei 394nm ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

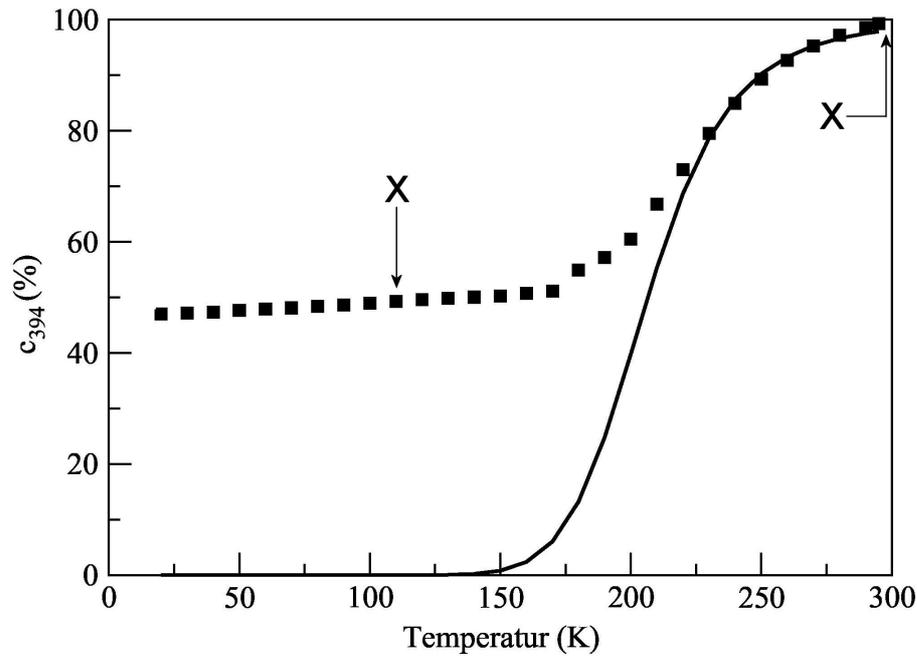


Abb. 5.4: Prozentualer Anteil der Spezies mit Soret-Banden-Maximum bei 394nm als Funktion der Temperatur aus der Anpassung der Spektren (gefüllte Quadrate) und Anpassung nach Gl. (55) von 300K bis 230K (durchgezogene Linie). X: Temperaturen, bei denen eine Röntgenstruktur bestimmt wurde.

Das thermodynamische Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen



wurde mit der Gleichgewichtskonstanten K analysiert:

$$K = \frac{c_{394}}{c_{410}^*} \quad (54)$$

Die Gleichgewichtskonstante wird durch die Differenz der Gibbsschen freien Enthalpie ΔG beschrieben:

$$K = e^{-\Delta G / R \cdot T} = e^{-(\Delta H - \Delta S \cdot T) / R \cdot T} \quad (55)$$

Unterhalb von 180K ist das Gleichgewicht zwischen den beiden Spezies nahezu nicht mehr temperaturabhängig. Eine Anpassung nach Gl. (55) kann daher nur im Bereich von 300K bis 230K durchgeführt werden (durchgezogene Linie in Abb. 5.4). Man erhält für die Enthalpiedifferenz ΔH einen Wert von 22 kJ/mol und für die Entropiedifferenz ΔS einen Wert von 106 J/(mol K).

Um den Einfluss der Proteinumgebung auf den Übergang zu untersuchen, wurde eine Probe in Trehalose getrocknet und temperaturabhängige Spektren gemessen.

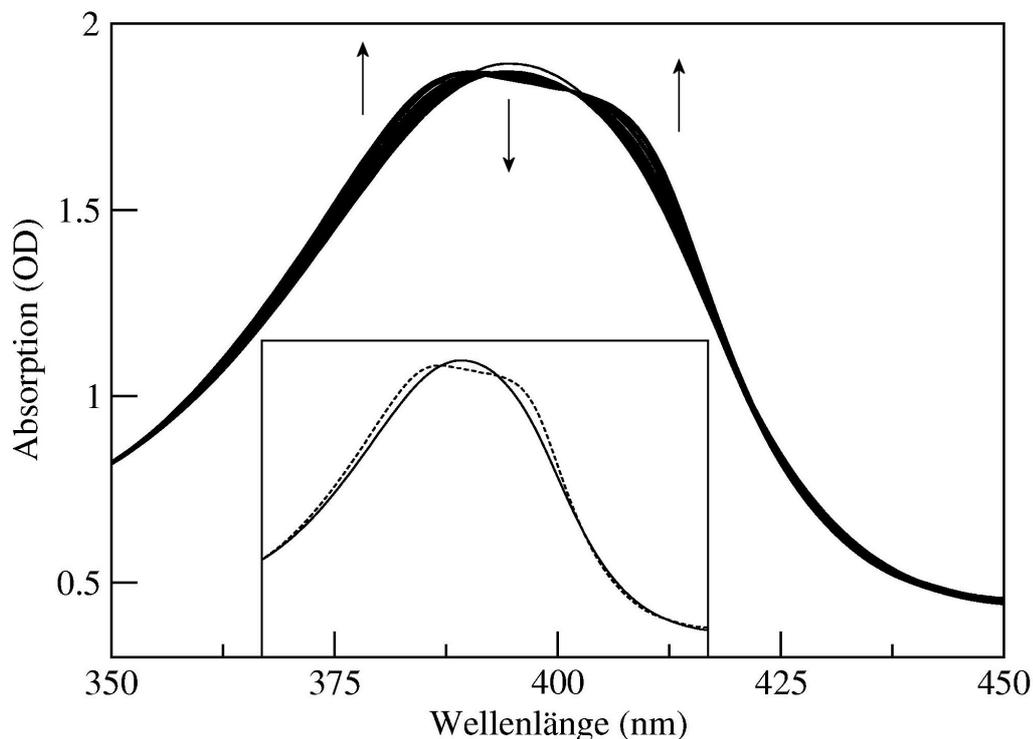


Abb. 5.5: Optische Spektren von H64V-Mbmet in Trehalose. Temperaturbereich von 20K bis 320K im Abstand von 20K. Pfeile geben die Veränderung der Spektren mit sinkender Temperatur an. Kleines Bild: Spektrum bei 320K (durchgezogene Linie) und bei 20K (gestrichelte Linie, die Wellenlängensachse gilt nicht für das kleine Bild).

Die Probe in Trehalose weist eine geringe Temperaturabhängigkeit der Spektren auf. Eine Umwandlung zwischen zwei Zuständen ist nicht ersichtlich. Eine Aufspaltung im Bereich der Soret-Bande ist beim Abkühlen durch eine Verringerung der Linienbreite sichtbar, wie im kleinen Bild in Abb. 5.5 deutlich wird. Eine aussagekräftige Änderung der Verteilung zwischen den beiden Spezies kann aus diesen Messungen jedoch nicht extrahiert werden.

5.1.2 Struktur der unterschiedlichen Ligandierungszustände

Um die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Zuständen aus Gl. (53) im Detail zu untersuchen, wurden Röntgenstrukturen bei 110K und bei 300K bestimmt (vgl. ‚X‘ in Abb. 5.4). Die Kristalle hatten eine Größe von $0.4 \times 0.7 \times 0.7 \text{ mm}^3$ (110K) und $0.4 \times 1.0 \times 1.0 \text{ mm}^3$ (300K). Der Kristall für die Messung bei 110K wurde in einer Schlaufe im Stickstoffstrahl auf der Röntgenanlage eingefroren. Der Kristall für die Messung bei Raumtemperatur wurde

in einer Kapillare montiert. Jeder Datensatz konnte an jeweils einem Kristall gemessen werden, ohne dass Strahlenschäden über den Verlauf der Messung beobachtet wurden. Die Messungen konnten bis 1.3Å (110K) bzw. 1.5Å (300K) Auflösung durchgeführt werden. Die statistischen Daten zur Messung sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Als Startmodell zur Verfeinerung wurden die Strukturen von nativem Met-Myoglobin bei 105K bzw. 300K verwendet (aus Ostermann 2000). Das distale Histidin wurde durch ein Valin ersetzt. Alle Wasser und Sulfate wurden aus der Struktur entfernt. Zunächst wurde ein simuliertes Härten der Strukturen mit anschließender Positions- und B-Faktor-Verfeinerung durchgeführt. Die Kontrolle des Ergebnisses mit $2F^o-F^c$ - und F^o-F^c -Elektronendichtemappen zeigte mehrere Doppellagen für Aminosäureseitengruppen. Eine Wassersuche in F^o-F^c -Elektronendichtemappen wurde durchgeführt und die Wasser dem Modell hinzugefügt, falls deren B-Faktor einen Wert von 50 \AA^2 in der anschließenden B-Faktor-Verfeinerung nicht überstieg. Doppellagen wurden durch das Berechnen von „simulated annealing omit maps“ kontrolliert, gegebenenfalls dem Modell hinzugefügt und korrigiert. Nach mehreren Zyklen von Wassersuche, Modellierung von Doppellagen, Positions- und B-Faktor-Verfeinerung, wurden schließlich 18 Doppellagen bei 110K bzw. 6 Doppellagen bei 300K in das jeweilige Modell übernommen (vgl. Tab. 5.2). Wassermoleküle, die sich an der Position des Ligandenwassers und des Histidines im nativen Protein befinden, wurden ohne Wechselwirkungsterme mit dem Rest des Moleküls verfeinert. In Tab. 5.1 sind die statistischen Daten zur Verfeinerung zusammengefasst.

Im Bereich der Aminosäuren 20-22 (AB-Loop) kann man sowohl bei 110K als auch bei 300K eine Elektronendichte beobachten, die einem Zuckerring von Trehalose ähnelt. Eine Modellierung ergibt B-Faktoren für den sichtbaren der zwei Ringe von 50 \AA^2 , der zweite Ring ist bei einem Konturniveau von 1.5σ nicht sichtbar. Das Trehalose-Molekül wurde daher nicht in das letzte Modell übernommen. Die Elektronendichte in dieser Gegend wurde mit Wassermolekülen modelliert.

	110K	300K		
Datensammlung				
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁		
Einheitszelle (Å) (°)	a=63.91 b=30.63 c=34.32	a=64.89 b=30.87 c=34.86		
	β=105.6	β=105.8		
Auflösung (Å)	1.3	1.5		
Gemessene Reflexe	107379	68990		
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	11.7	12.4		
Unabhängige Reflexe	29970	20771		
Vollständigkeit (%)	94.5 % (83.4 %)	96.6 % (92.0 %)		
R _{merge} (%)	3.5 %	3.6 %		
Verfeinerung				
Auflösungsbereich (Å)	7.0 – 1.3	7.0 – 1.5		
Zahl der Reflexe	29963	20766		
Verfeinerung / Test	26965/2998	18724/2042		
R _{cryst} (%)	18.5	17.5		
R _{free} (%)	21.7	21.0		
Standardabweichung				
Bindungslänge (Å)	0.009	0.006		
Bindungswinkel (°)	1.104	1.018		
Koordinatenfehler (Å)	0.13	0.13		
Geometrie	H64V Mbmet	natives Mbmet	H64V Mbmet	natives Mbmet
	110K	105K	300K	300K
Fe-H ₂ O (Å)	2.38	2.15	-	2.17
Fe-His93 (Å)	2.11	2.11	2.11	2.17
Fe - <Häm-Ebene> (Å)	0.25	0.14	0.33	0.12
Fe – N _{ebene} (Å)	0.18	0.08	0.23	0.06

Tab. 5.1: Statistik der Datensammlung und der Verfeinerung von H64V-Mbmet bei verschiedenen Temperaturen. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale (1.55 – 1.5 Å bei 300K und 1.35 – 1.3 Å bei 110K). Der Koordinatenfehler wurde durch einen σ_A -Plot bestimmt (Read 1986). Die Werte Fe-<Häm-Ebene> und Fe-<N_{ebene}> wurden als Abstand des Eisens von der an die 20 zentralen C-Atome der Häm-Ebene bzw. die vier N-Atome angepassten Ebene bestimmt. Die Geometrie des nativen Mbmet bei verschiedenen Temperaturen wurde aus Ostermann (2000) entnommen.

Aminosäure Nr.	Typ	Bei 300K
4	Glu	
8	Gln	✓
26	Gln	
31	Arg	
62	Lys	
63	Lys	✓
83	Glu	
89	Leu	✓
91	Gln	
109	Glu	✓
117	Ser	
118	Arg	
128	Gln	✓
132	Asn	
139	Arg	
140	Lys	
145	Lys	
151	Tyr	✓

Tab. 5.2: Aminosäuren für die in der Röntgenstruktur bei 110K Doppellagen angepasst wurden. Doppellagen bei 300K sind in der letzten Spalte mit ✓ gekennzeichnet.

Die Ergebnisse für das aktive Zentrum sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Bei 300K ist das Fe-Atom der Häm-Gruppe 5-fach ligandiert. Bei einem Konturniveau von 1.5σ sieht man keine Elektronendichte an der Wasserposition, die im nativen Myoglobin beobachtet wird. Das Valin ist in beiden Strukturen wohlgeordnet.

Bei tiefen Temperaturen werden drei Wassermoleküle in der Häm-Tasche sichtbar, die man bei Raumtemperatur nicht beobachtet. Da der Wert für die Besetzungswahrscheinlichkeit und der Debye-Waller-Faktor eine starke Korrelation aufweisen (vgl. z. B. Carugo 1999), wurde für diese Wasser eine Besetzungswahrscheinlichkeit von 50% festgehalten und der B-Faktor verfeinert.

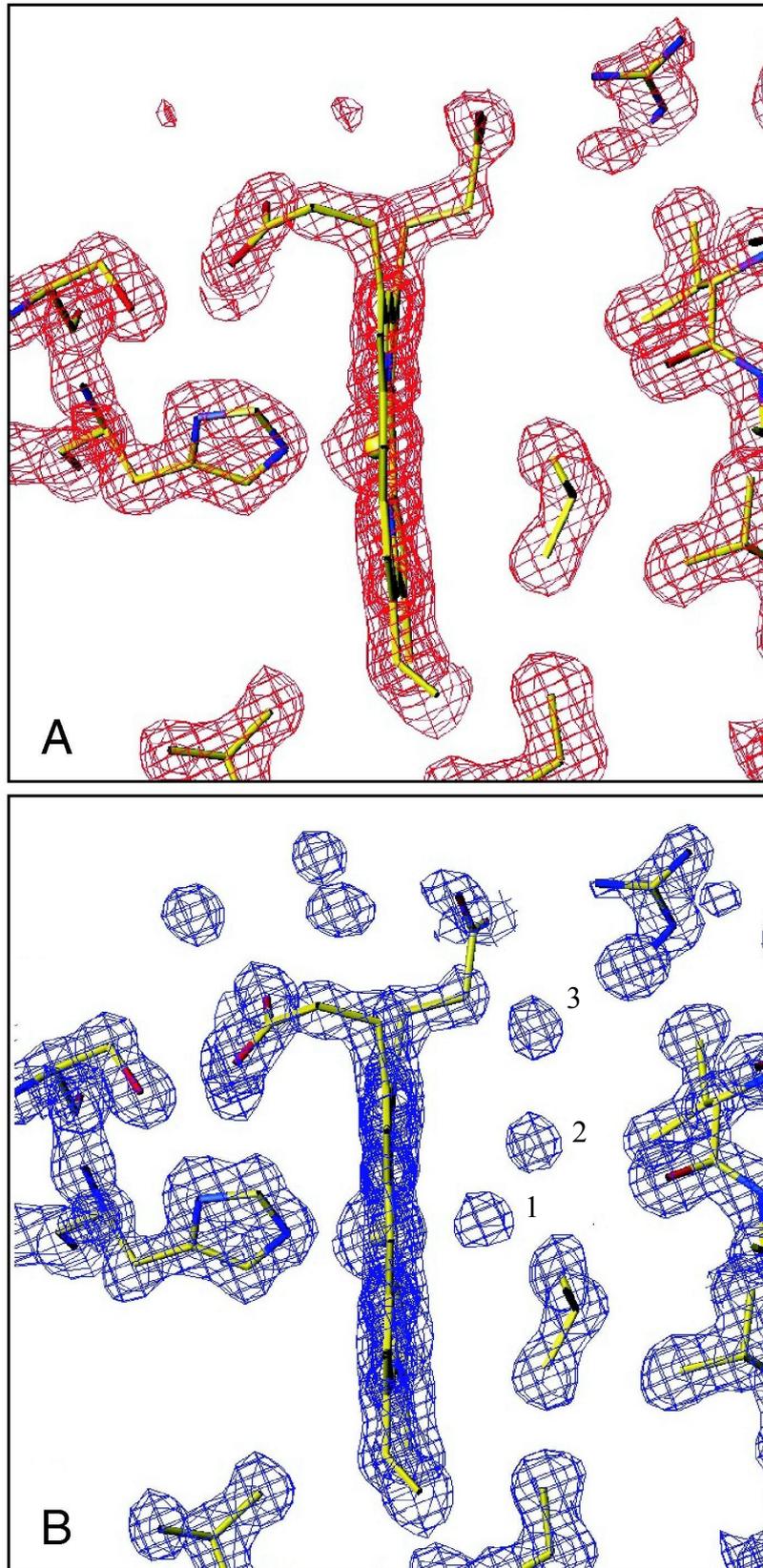


Abb. 5.6: Strukturmodelle und Elektronendichten der Umgebung der Häm-Gruppe. A: 300K, B: 110K. $2F^o - F^c$ -Elektronendichte mit einem Konturniveau von 1.5σ , 300K: rot, 110K: blau. Wasser sind im Modell nicht dargestellt. Die Elektronendichte der Wassermoleküle ist in der Reihenfolge zunehmenden Abstands vom ligandierenden Wasser (Nummer 1) nummeriert.

Für das ligandierende Wasser (Nummer 1 in Abb. 5.6) erhält man einen Wert von 0.09\AA^2 für $\langle x^2 \rangle$, im Vergleich zu 0.12\AA^2 für das Eisenatom. Für die beiden weiteren Wasser erhält man $\langle x^2 \rangle$ -Werte von 0.08\AA^2 und 0.16\AA^2 in der Reihenfolge steigenden Abstands. Passt man bei 300K ein Wasser an der Ligandenposition mit dem gleichen $\langle x^2 \rangle$ -Wert wie das Eisenatom (0.15\AA^2) an, so erhält man eine Besetzungswahrscheinlichkeit von 36%. Setzt man Wassermoleküle an beliebige Stellen an der Proteinoberfläche, die keine Elektronendichte bei einer Konturierung von 1.5σ zeigen, so erhält man Werte zwischen 0% und 10%. Der Wert von 36% zeigt an, dass teilweise ein Wasser bei 300K gebunden ist. Bei einer Konturierung von 1.5σ wie in Abb. 5.6A ist keine Elektronendichte sichtbar. In der proximalen Tasche konnte weder bei 300K noch bei 110K Elektronendichte beobachtet werden (vgl. Abb. 5.1b).

In Abb. 5.7 ist die Häm-Gruppe mit $2F^o-F^c$ - und F^o-F^c -Elektronendichtemappen dargestellt. Bei 110K zeigt die $2F^o-F^c$ -Dichtemappe für das Eisen ein längliches Dichtemaximum. In der F^o-F^c -Dichte-Differenzmappe sieht man bei 110K am Eisen Dichtemerkmale, die eine Doppellage der Häm-Gruppe anzeigen. Eine Modellierung der Doppellage wurde durchgeführt. Die Differenzen sind jedoch zu klein, um bei 1.3\AA Auflösung eine sinnvolle Verfeinerung durchführen zu können. Im letzten Modell ist daher nur eine Lage für die Häm-Gruppe berücksichtigt.

Ein Vergleich der beiden Strukturen mit den Strukturen des nativen Myoglobins bei 105K und 300K zeigt, dass außerhalb des aktiven Zentrums keine weiteren großen Differenzen auftreten. Differenz-Abstands-Matrizen für natives Mb bei 300K und 105K und H64V-Mb bei 300K und 110K sind sich sehr ähnlich. Für jede Aminosäure wurde dazu der Schwerpunkt der Rückgratatome N,C,O, C_α berechnet. Aus den Relativ-Abständen innerhalb einer Struktur wurde dann eine symmetrische Abstands-Matrix berechnet. Durch Differenzbildung zweier Abstands-Matrizen erhält man dann eine Differenz-Abstands-Matrix (vgl. z.B. Frauenfelder et al. 1987). Die Kontraktion des mutierten Proteins beim Abkühlen ist sowohl vom Umfang als auch von der Lokalisierung in der Struktur dem nativen Protein vergleichbar.

Die mittlere quadratische Auslenkung der Rückgratatome für H64V-Myoglobin zeigt sowohl bei 300K als auch bei 110K keine signifikanten Abweichungen vom nativen Myoglobin (Strukturen bei 300K und 105K).

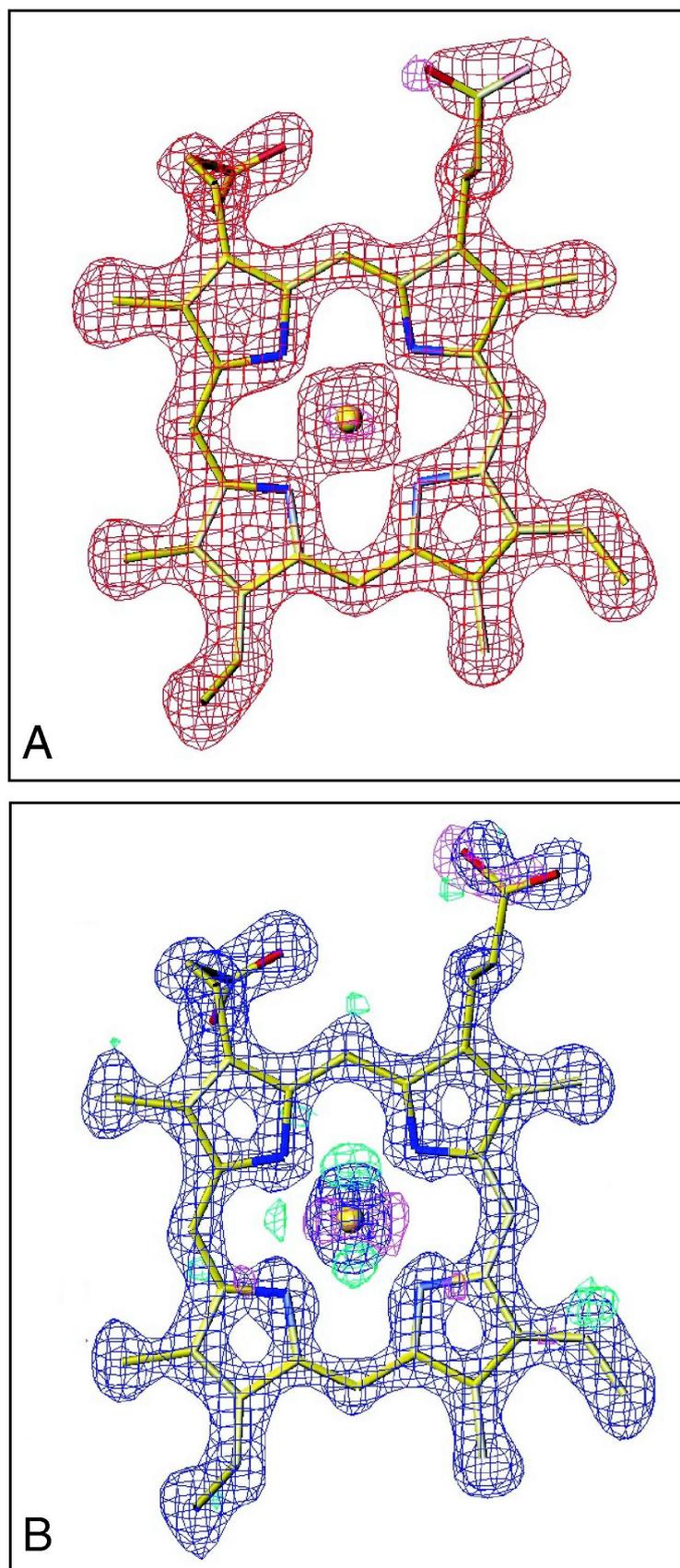


Abb. 5.7: Strukturmodelle und Elektronendichten der Häm-Gruppe: A 300K, B: 110K. $2F^o-F^c$ -Dichtemappen mit Konturniveau von 1.5σ , 300K: rot, 110K: blau. F^o-F^c -Dichtemappen sind bei 3σ (grün) und -3σ (violett) konturiert.

5.2 Auswertung der Temperaturabhängigkeit optischer Spektren mit einem Normal-Moden-Spektrum

Da im Falle von Myoglobin das Normal-Moden-Spektrum aus einer Normal-Moden-Analyse zur Verfügung steht (aus Melchers et al. 1996), kann man versuchen, dieses zur Auswertung der Temperaturabhängigkeit der Gauß-Verbreiterung optischer Spektren zu verwenden (vgl. Abschnitt 2.1). Da bei Gültigkeit der Näherung für kurze Zeiten das Spektrum durch die Faltung von einer Lorentz- mit einer Gauß-Linie nach Gl.en (8), (9) und (10) gegeben ist, kann auf der Analyse von Cordone und Mitarbeitern aufgebaut werden. Im Folgenden wird daher ein Modell betrachtet, mit dem man die von Cordone und Mitarbeitern bestimmte Gauß-Verbreiterung unter Verwendung des Normal-Moden-Spektrums und einer temperaturunabhängigen Inhomogenitätsverbreiterung erklären kann.

5.2.1 Das Modell

Um die Normal-Moden, die bei einer gegebenen Temperatur zur Gauß-Verbreiterung beitragen, auszuwählen, wird die Bedingung für die Gültigkeit der Näherung für kurze Zeiten nach Gl. (5) durch eine temperaturabhängige Schaltfunktion eingebunden. In Frage kommt zum Beispiel die aus der Festkörperphysik bekannte Fermi-Funktion. Hier dient sie lediglich zur mathematischen Modellierung der Bedingung aus Gl. (5) und hat keine physikalische Interpretation analog zu ihrer ursprünglichen Verwendung. Die verwendete Funktion lautet:

$$f(\nu, T^*) = \frac{1}{\exp\left(\left(\nu - \frac{k_B T^*}{hc}\right) / \Delta\nu\right) + 1} \quad (56)$$

Dabei sind die Frequenzen in Einheiten von cm^{-1} einzusetzen. Die Funktion $f(\nu, T^*)$ ist für $\nu < k_B T^* / hc$ gleich eins und darüber gleich Null. Im Prinzip ließe sich die Breite des Abfalles $\Delta\nu$ auch parametrisieren, davon wurde jedoch abgesehen und ein Wert von $\Delta\nu = 1 \text{cm}^{-1}$ verwendet. Die Temperatur T^* ist die Temperatur, ab der eine Mode als ausreichend angeregt betrachtet werden kann und zur Gauß-Verbreiterung beiträgt. Die Summe zur Darstellung der Gauß-Verbreiterung lässt sich dann zu

$$\sigma^2(T) = \sigma_{\text{inh}}^2 + \sum_j \langle S \rangle \cdot \nu_j^2 \cdot \coth\left(\frac{h\nu_j}{2k_B T}\right) \cdot f(\nu_j, T^*) \quad (57)$$

schreiben. Dabei sind zwei Parameter eingeführt worden: σ_{inh} und $\langle S \rangle$. Die Kopplung der Moden wird durch die mittlere Kopplungskonstante $\langle S \rangle$ beschrieben. Dies ist in Anbetracht der großen Zahl an Parametern, die eine Verwendung von individuellen Kopplungskonstanten einführen würde, sinnvoll. Die inhomogene Verbreiterung durch die Existenz von Konformationszuständen ist durch σ_{inh} gegeben.

Mit der Temperatur T^* wird bestimmt, welche Moden bei einer gegebenen Temperatur T zur Gauß-Breite beitragen. Betrachtet man die Bedingung, unter der die Näherung für kurze Zeiten gilt, und die Definition der Gauß-Breite der niederfrequenten Moden (vgl. Gl. (5) und (7)), so sieht man, dass Moden, deren Frequenz kleiner als die Gauß-Breite ist, als niederfrequent betrachtet werden können. Anschaulich kann man das mit Abb. 8.3 verstehen: eine Mode, deren Periode größer ist als der Abfall, den die niederfrequenten Moden verursachen, wird als niederfrequent betrachtet. Umgekehrt sind Moden, deren Frequenz größer als dieser Abfall ist, als Modulation im Zeitkorrelator sichtbar. Im Absorptionsspektrum treten sie dann als Seitenbanden auf. Man kann damit aus der experimentell bestimmten Gauß-Breite ein Kriterium entwickeln, ob eine Mode als niederfrequent zu betrachten ist. Dazu zieht man von den experimentell erhaltenen Werten für $\sigma(T)$ den Wert bei der kleinsten Temperatur ab.

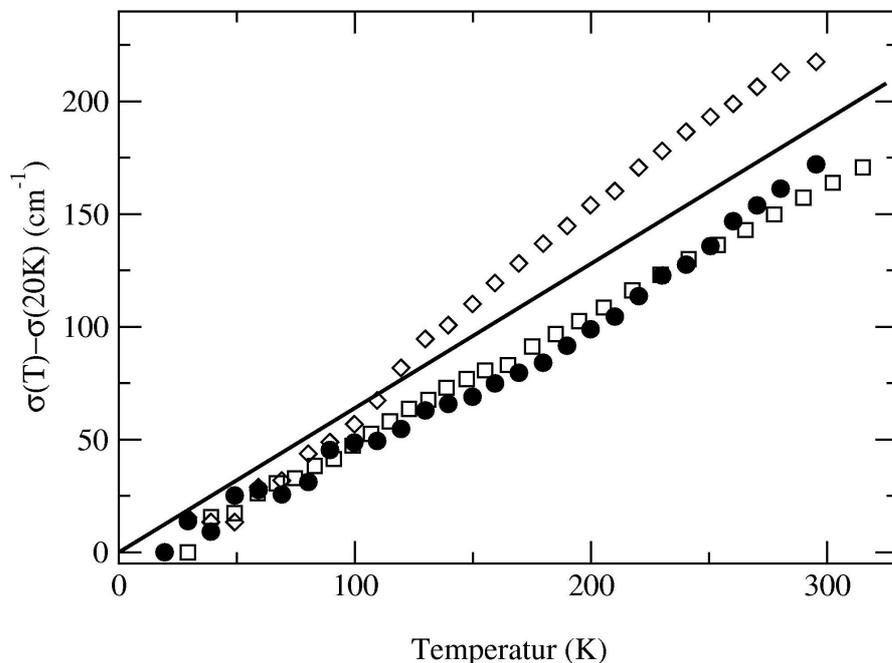


Abb. 5.8: Verlauf von $\sigma(T) - \sigma(T=20K)$: MbCO (gefüllte Kreise), und Mbdeoxy (offene Rauten) in 65% Glycerin/Wasser Puffer, MbCO in Trehalose (offene Quadrate). Daten aus Cupane et al. (1995) bzw. Cordone et al. (1998). Durchgezogene Linie: Temperatur in cm^{-1} .

Die Temperatur T^* erhält man, indem man die Gauß-Breite in eine Temperatur umrechnet. Damit lässt sich der Temperaturverlauf der Gauß-Verbreiterung nach Gl. (57) anpassen. Zunächst sei jedoch eine Darstellung zur Erläuterung dieser Anpassung betrachtet. In der folgenden Abbildung ist exemplarisch eine Anpassung der Daten aus Cupane et al. (1995) mit vier Moden bei den Frequenzen 14cm^{-1} , 70cm^{-1} , 125cm^{-1} , und 174cm^{-1} durchgeführt. Die Frequenzen entsprechen Temperaturen T^* von 20K, 100K, 180K und 250K. Durch die Zunahme von Moden ab der jeweiligen Temperatur T^* steigt die Verbreiterung an. Die Anpassung zeigt deutliche Stufen bei den Temperaturen, die den vier Frequenzen entsprechen. Mit der Vielzahl an Moden, die das Normal-Moden-Spektrum beinhaltet, wird ein sanfter Temperaturanstieg erzielt (siehe Abb. 5.10).

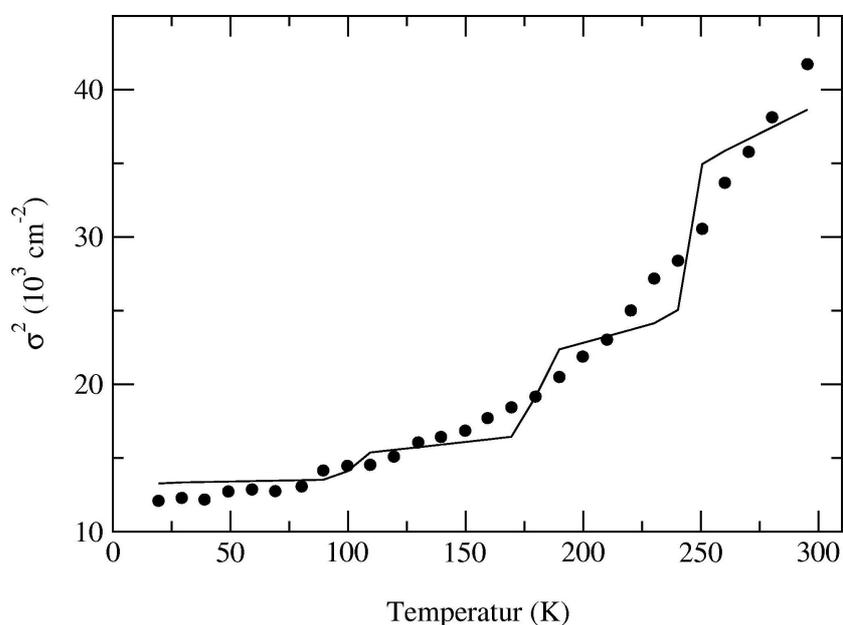


Abb. 5.9 Anpassung der temperaturabhängigen Gauß-Verbreiterung nach Gl. (57) mit vier Moden ($T^* = 20\text{K}, 100\text{K}, 180\text{K}, 250\text{K}$).

5.2.2 Anpassung der temperaturabhängigen Gauß-Verbreiterung in verschiedenen Ligandierungszuständen und Lösungsmitteln.

Die Daten wurden den Veröffentlichungen von Cordone und Mitarbeitern entnommen. Die Werte für MbCO und Mbdeoxy stammen aus Cupane et al. (1995). Die zugrunde liegenden Messungen waren in einem Lösungsmittel aus Wasser mit einem Anteil von 65% Glycerin durchgeführt worden. Die Werte für MbCO in Trehalose wurden aus Cordone et al. (1998) übernommen. Die Werte für die Anpassung sind in der folgenden Tabelle angegeben.

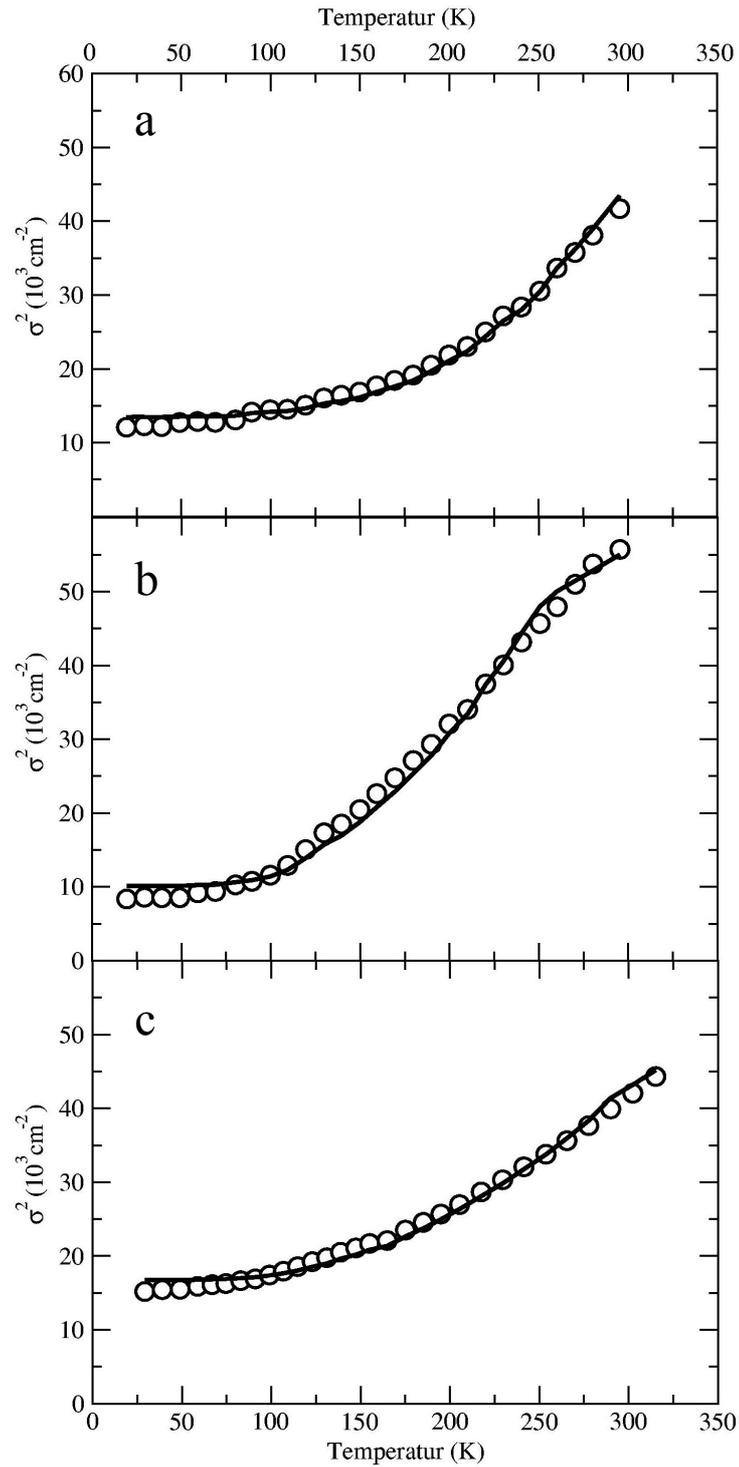


Abb. 5.10 Anpassung der Gauß-Verbreiterung der Soret-Bande im Normal-Moden Modell. a: MbCO in Wasser mit 65% Glycerin. b: Mbdeoxy in Wasser mit 65% Glycerin. c: MbCO in Trehalose getrocknet. Werte in a und b aus Cupane et al. (1995), Werte in c aus Cordone et al. (1998).

Parameter	MbCO (65% gly/wat)	Mbdeoxy(65% gly/wat)	MbCO (Trehalose)
σ_{inh} (cm ⁻¹)	116	101	125
$\langle S \rangle$ (10 ⁻⁴)	6.5	7.8	6.3

Tab. 5.3: Parameter für die Anpassung der Gauß-Breite der Soret-Bande nach Gl. (57).

5.3 Relaxation eines Zwischenzustands nach photoinduzierter Reduktion von Met-Myoglobin

Nach Photoreduktion bei 20K wurde das Spektrum des entstandenen metastabilen Zustands als Funktion der Temperatur untersucht. Die Zerlegung des gemessenen Spektrums (Abschnitt 4.1.2) ermöglicht die Isolierung des Spektrums des metastabilen Zustands Fe(II)MbH₂O. Die Anteile der verschiedenen absorbierenden Anteile in der Probe zeigt die folgende Abbildung.

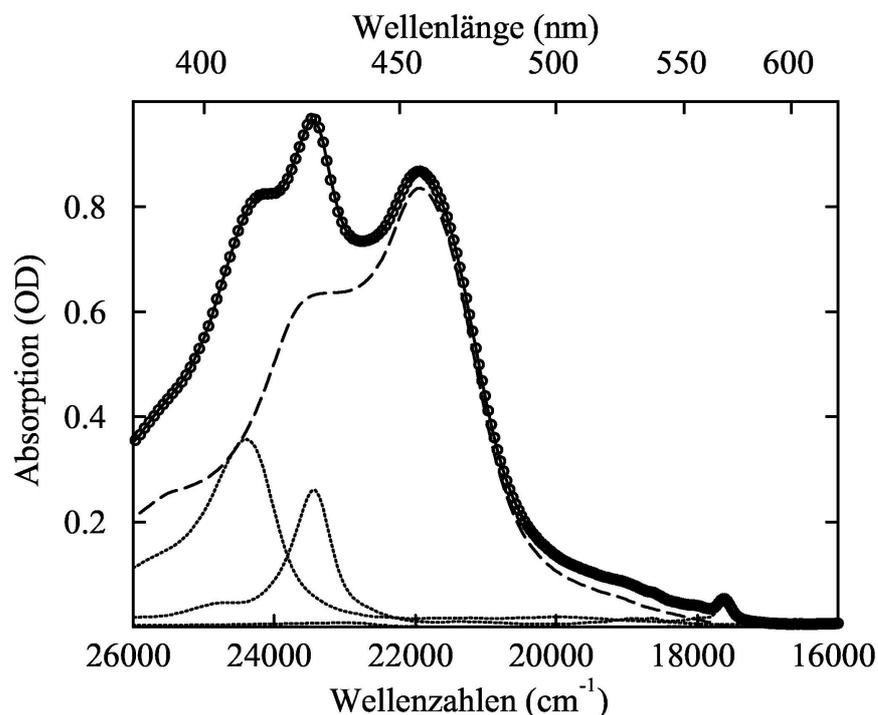


Abb. 5.11: Spektren der dritten Temperaturreihe nach photoinduzierter Reduktion von Mbmet bei 150K: gemessenes Spektrum (Kreise) und Anpassung (durchgezogene Linie) mit Ru(bpy)₃²⁺ (gestrichelte Linie) und den Myoglobinspezies (gepunktete Linien) Mbmet (linkes Maximum), Fe(II)MbH₂O (rechtes Maximum) und Mbdeoxy (kaum sichtbar).

Der größte Anteil der Absorption resultiert vom Ruthenium-Komplex $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Der Anteil an reduziertem Protein beträgt nur 42%. Der Rest verbleibt im Zustand Mbmet. Die Isolierung des Absorptionsspektrums des metastabilen Zustands ist trotz des geringen Anteils an der Gesamtabsorption gut möglich. Abb. 5.12 zeigt das aus der zuvor dargestellten Messung erhaltene Spektrum. Die Soret-Bande ähnelt der von MbCO. Die Anpassung mit dem Formalismus für einen sechsfach ligandierten Komplex ist daher sinnvoll. Deutlich ist die Aufspaltung der Q-Banden im Bereich von ca. 560nm (ca. 18000cm^{-1}) sichtbar. Die zwei Banden, die sonst in sechsfach koordinierten Fe^{2+} -Zuständen beobachtet werden (Makinen und Churg 1983), sind nochmals aufgespalten.

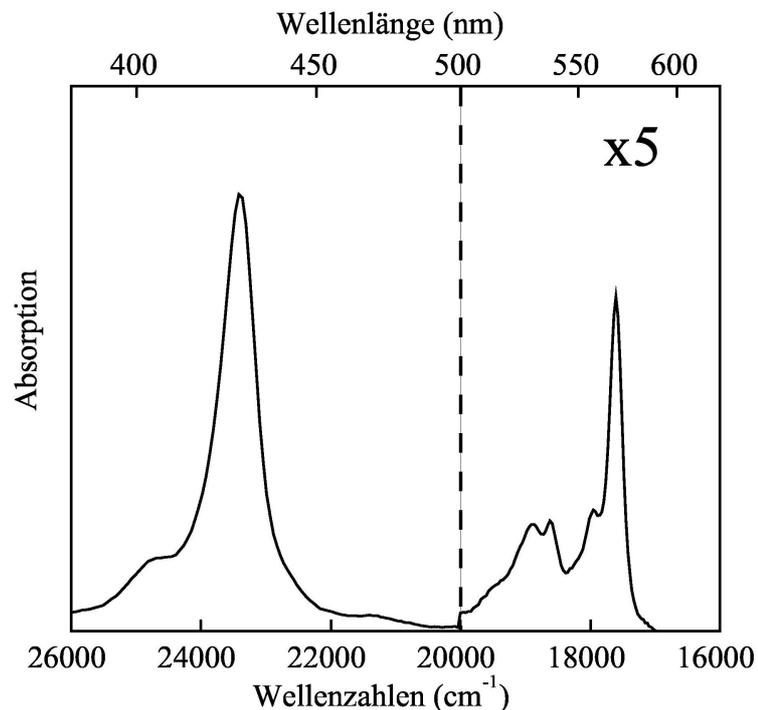


Abb. 5.12: Das Spektrum des metastabilen Zustands $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$. Die Q-Banden sind um den Faktor fünf vergrößert dargestellt.

Die Anpassung der Absorptionsspektren des metastabilen Zustands $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ mit dem Formalismus von Cordone und Mitarbeitern nach Gl. (8), (9) und (10) ermöglicht die Bestimmung folgender Parameter: der Skalierungsparameter M , die elektronische Übergangsfrequenz ν_0 , die Lebensdauer des angeregten Zustands Γ , die linearen Kopplungskonstanten der hochfrequenten Moden S_{hj} und die Gauß-Verbreiterung σ . Das zur Anpassung verwendete Programm wurde von A. Huenges erstellt (Gaßmann 2000). Die Verwendung von freien Parametern für die Anpassung der Soret-Bande ist kritisch zu beobachten, um physikalisch sinnvolle Ergebnisse zu erhalten. Bei der Anpassung mit Voigt-Linien ist insbesondere die „rote“ Seite der Bande zur korrekten Bestimmung der Lorentz-

Verbreiterung wichtig (DiPace et al. 1992). Bei höheren Temperaturen ist in diesem Bereich die Absorption von Mbdeoxy zu beobachten. Die Bande von Mbdeoxy verschiebt sich dabei im Laufe der Relaxation. Zur Auswertung der experimentellen Spektren wurde auch ein konstanter Anteil an $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ angenommen. Photochemisches Bleichen dieses Komplexes führt bei höheren Temperaturen zu einer Verringerung der Absorption. Bei höheren Temperaturen ist die „rote“ Flanke der Soret-Bande somit schlechter definiert. Die Lorentz-Breite wurde daher auf den Wert $\Gamma=195\text{cm}^{-1}$, der bei 20K erhalten wurde, für die weiteren Anpassungen festgehalten. In Abb. 5.13 sind die Abweichungen im Spektrum bei 150K der dritten Temperaturreihe sichtbar.

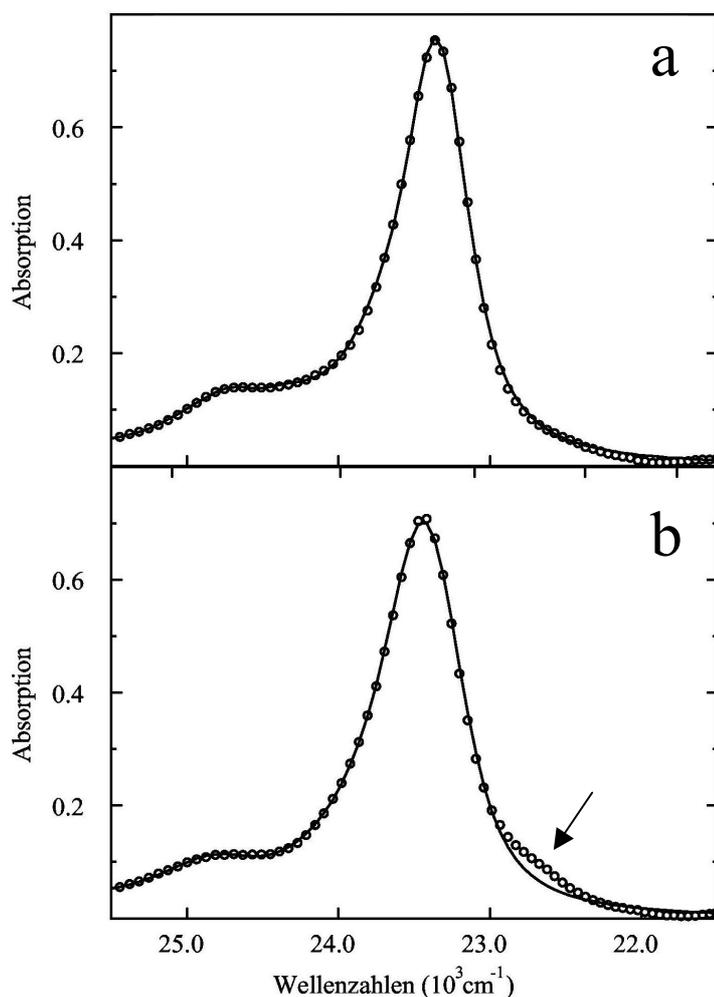


Abb. 5.13: Spektren (offene Kreise) und Anpassung (durchgezogene Linie) des metastabilen Zustands nach Gl. (8), (9) und (10). a: Spektrum bei 20K der ersten Temperaturreihe. b: Spektrum bei 150K der dritten Temperaturreihe. Der Pfeil markiert die Abweichungen an der roten Flanke des Spektrums.

Der Temperatur-Verlauf der elektronischen Übergangsfrequenz ν_0 und der Gauß-Breite σ^2 ist in Abb. 5.14 dargestellt. Die Übergangsfrequenz ändert sich über die vier Temperaturreihen

irreversibel. Die Gauß-Breite ist dagegen für die vier Temperaturreihen gleich und wurde daher im Bereich von 20K bis 150K für die jeweilige Temperatur über alle Reihen gemittelt.

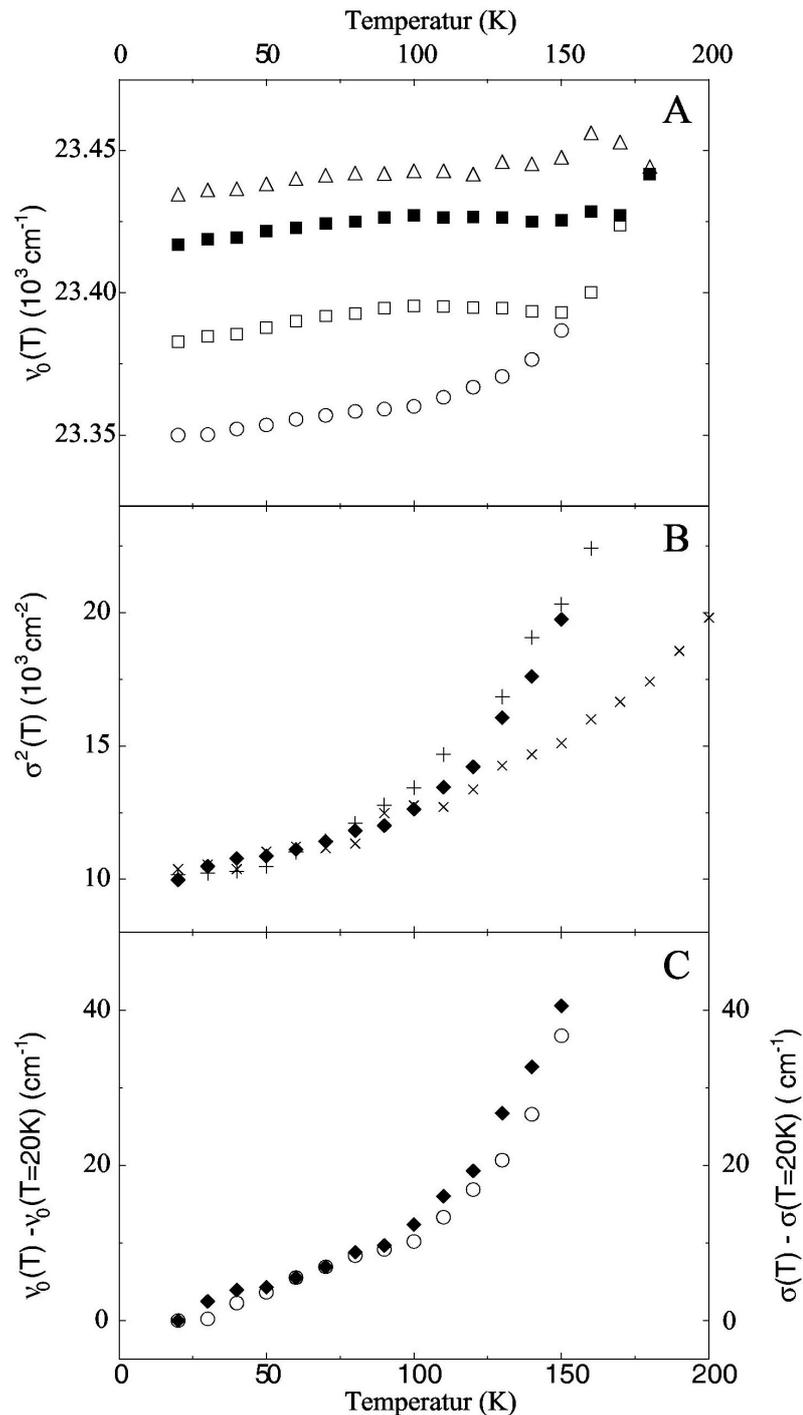


Abb. 5.14: Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands. A: elektronische Übergangsfrequenz ν_0 als Funktion der Temperatur (1.Serie: O, 2.Serie: □, 3. Serie: ■, 4. Serie: Δ). B: Gauß-Breite σ^2 als Funktion der Temperatur (◆) im Vergleich mit den Gleichgewichtszuständen Mbdeoxy (+) und MbCO (×) aus Cupane et al. (1995). C: Vergleich von ν_0 (O) und σ (◆).

Der Temperaturverlauf der Gauß-Breite liegt nahe an dem von Mbdeoxy (vgl. Abb. 5.14B). Die Übergangsfrequenz und die Gauß-Breite des metastabilen Zustands zeigen einen ähnlichen Verlauf (Abb. 5.14C). Auf eine Analyse der Temperaturabhängigkeit mit einer repräsentativen niederfrequenten Mode nach Gl. (12) wurde verzichtet.

Die Ergebnisse für die übrigen Parameter aus der Anpassung der Spektren sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst und mit den Werten aus Resonanz-Raman-Experimenten an Fe(II)MbH₂O und aus Absorptionsspektren von MbCO und Mbdeoxy verglichen.

Mode	ν_{h1}	ν_{h2}	ν_{h3}	ν_{h4}	ν_{h5}
Raman Bezeichnung	ν_8	ν_7	ν_5	ν_4	ν_2
Fe(II)MbH ₂ O					
Frequenz (cm ⁻¹)	372	673	1000	1362	1605
Kopplungskonstante					
S_{hj} (opt) *	0.143±0.026 (0.029)	0.047±0.015 (0.015)	wechselnd	0.075±0.006 (0.013)	0.026±0.003 (0.013)
Kopplungskonstante					
S_{hj} (Raman)	0.14±0.02	0.10±0.03	-	0.073±0.03	0.013±0.005
MbCO					
Frequenz (cm ⁻¹)	350	676	1100	1374	-
Kopplungskonstante					
S_{hj} (opt)	0.12±0.02	0.06±0.01	0.02±0.008	0.09±0.01	-
Mbdeoxy					
Frequenz (cm ⁻¹)	370	674	1100	1357	-
Kopplungskonstante					
S_{hj} (opt)	0.32±0.02	0.24±0.02	<0.01	0.10±0.01	-

Tab. 5.4: Mittlere Kopplungskonstanten für die verschiedenen hochfrequenten Moden (außer der Mode bei 1000 cm⁻¹) des metastabilen Zustands im Vergleich zur Raman-Spektroskopie, MbCO und Mbdeoxy (Werte aus Cupane et al. 1995). Raman-Bezeichnungen wie in Engler et al. (2000). *Werte in dieser Zeile sind Mittelwerte ± Standardabweichung für die Temperaturreihen. Die Werte in Klammern geben den Fehler für die Anpassung des Spektrums bei 20K an.

Die Mode bei 1000cm⁻¹ repräsentiert mehrere schwach koppelnde Moden in diesem Frequenzbereich. Die aus der Anpassung bestimmte Kopplungskonstante ist klein und nimmt mit steigender Temperatur im Verlauf der ersten Reihe von 0.065 auf 0.02 ab. Bei den weiteren Temperaturreihen bleibt sie nahezu konstant.

Für die Resonanz-Raman-Experimente wurde eine mit Röntgenstrahlung reduzierte Probe verwendet. Die Probe wurde nach der Reduktion für 10 Stunden auf 150K gewärmt, um störende Absorption durch die bei der Reduktion entstandenen Farbzentren zu verringern. Anschließend wurde sie bei 77K gemessen. Die Auswertung der Raman-Spektren ist in Engler et al. (2000) beschrieben. Die in Tab. 5.4 angegebenen Kopplungskonstanten gelten für die Anregung im Bereich der Soret-Bande mit einer Wellenlänge von 413nm.

6 Wasserstoffatome in Proteinen

6.1 Neutronenstruktur von Met-Myoglobin bei 20K und 300K

Die Neutronenstruktur bei 20K wurde am Laue-Diffraktometer LADI am Institut Laue Langevin in Grenoble gemessen. Die Qualität der Streudaten ermöglichte nur eine Auswertung bis 2.1Å Auflösung. Die Neutronenstruktur von Met-Myoglobin bei 300K wurde von A. Ostermann an der monochromatischen Messstation BIX-3 am Reaktor JRR-3M in Tokai-Mura (Japan) bis zu einer Auflösung von 1.5Å gemessen und verfeinert. Die Messung und Verfeinerung wird in Ostermann et al. (2002) beschrieben. Die folgende Tabelle gibt die Art und Zahl der Atome in der Struktur bei 300K an.

Atomtyp	Anzahl
² H-Atome	194
¹ H-Atome	1143 (30 in der Häm-Gruppe)
davon ¹ H in Methylgruppen	282
Alle Wasserstoffatome	1337 (30 in der Häm-Gruppe)
Nicht-Wasserstoffatome (C, N, O, S und Fe)	1247
Alle Atome	2584

Tab. 6.1: Überblick über Art und Zahl der Atome der Neutronenstruktur bei 300K. Aufgrund der Verfeinerung der alternativen Besetzung der Amidprotonen mit ¹H und ²H-Atomen sind diese doppelt gezählt. Lösungsmittelmoleküle sind nicht berücksichtigt.

Die Zahl der Parameter (Koordinaten und ev. individuelle B-Faktoren) steigt von der Röntgen- zur Neutronenstruktur auf das Doppelte. Eine hohe Auflösung, also eine große Anzahl von gemessenen, unabhängigen Reflexen, ist für die Verfeinerung aller Parameter unerlässlich (vgl. Tab. 2.3). Bei der Messung bei 20K ist die Verfeinerung wegen der geringeren Auflösung auf die Protonierungen und die Wasserstruktur beschränkt.

Die folgende Tabelle zeigt die Datenqualität der ausgewerteten Reflexe im Vergleich für die Neutronenstrukturanalyse von Myoglobin bei 300K (Ostermann et al. 2002) und bei 20K. Die Werte sind in Auflösungsschalen angegeben. Dies ermöglicht einen detaillierten Vergleich der Datenqualität.

300K				
Auflösung (Å)	$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	Vollständigkeit(%)	Redundanz	R_{merge} (%)
3.23	16.4	97.6	4.1	6.6
2.57	11.1	98.5	3.9	11.3
2.24	8.1	97.1	3.3	11.3
2.04	5.6	95.7	3.0	13.6
1.89	4.5	91.9	2.7	15.8
1.78	4.0	87.7	2.5	16.5
1.69	3.5	85.2	2.4	20.1
1.62	3.2	80.3	2.3	21.6
1.55	2.8	77.5	2.1	24.2
1.50	2.7	67.0	2.1	24.9
Gesamt	6.3	87.9	2.9	10.3
20K				
Auflösung (Å)	$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	Vollständigkeit(%)	Redundanz	R_{merge} (%)
6.64	5.6	81.0	2.0	9.0
4.70	5.6	95.6	3.0	9.4
3.83	5.2	97.7	3.4	11.5
3.32	5.0	95.8	3.3	12.1
2.97	4.2	91.8	3.2	13.9
2.71	3.7	84.3	3.3	16.8
2.51	3.2	79.7	3.5	20.9
2.35	2.6	76.1	3.8	24.8
2.21	2.1	71.8	4.4	31.7
2.10	1.7	69.1	4.8	39.9
Gesamt	3.5	82.0	3.6	16.9

Tab. 6.2: Statistische Daten für die Qualität der Messung in Auflösungsschalen für die Neutronenstruktur bei 300K (Ostermann et al. 2002) und 20K.

Die Werte für die Messung bei 300K sind insbesondere für die Werte von $\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$ deutlich besser. Damit hängen auch die niedrigeren Werte für R_{merge} zusammen. Neben der Kristallqualität (vgl. Streubilder in Abschnitt 4.3.3) ist dies auch durch die monochromatische Messmethode bedingt (Abschnitt 2.2.3). Bei der Messung bei 20K konnten Reflexe bis ca. 1.7Å gemessen werden. Die Werte für $\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$ und R_{merge} sind nur bis 2.1Å Auflösung größer als 1.5 bzw kleiner als 40%. Eine Auswertung der Daten wurde daher nur bis 2.1Å Auflösung vorgenommen. Die Werte für die Messung bei 20K sind der Messung von Habash

et al. (2000) an Concanavalin vergleichbar, welche bis zu einer Auflösung von 2.4Å am Laue-Diffraktometer LADI durchgeführt wurde.

Im Folgenden wird die Verfeinerung der Neutronenstruktur bei 20K besprochen. Als Ausgangspunkt diente die Röntgenstruktur von Myoglobin bei 105K ohne Wasserpositionen (aus Ostermann 2000). Die Wasserstoffatome wurden mit der Routine „hbuild“ (Brünger und Karplus 1988) des Programms X-Plor hinzugefügt (Version 3.851, Brünger 1992a). Bei Aminosäuren mit protonierbaren Gruppen wurde zuerst auf das Ergebnis aus der Neutronenstrukturanalyse bei 300K zurückgegriffen. Amidprotonen des Proteinerückgrates wurden entweder als ganz oder gar nicht ausgetauscht ins Modell übernommen. Im Anschluss wurde eine Energieminimierung der Wasserstoffatompositionen mit dem Programm CNS durchgeführt (Brünger et al. 1998a). Dieses Programm wurde auch für die weiteren Schritte der Strukturverfeinerung verwendet. Die B-Faktoren der Wasserstoffatome wurden auf die Werte des Atoms gesetzt, an das das jeweilige Wasserstoffatom gebunden ist. Zur Bestimmung der Einheitszellengröße wurde eine Ausgleichsgerade für die Werte aus der Röntgenstrukturanalyse von Myoglobin bei 105K, 140K und 180K bestimmt. Durch Extrapolation dieser Geraden wurden die Werte bei 20K berechnet.

Einer ersten Verfeinerung, in der das Proteinmolekül als starrer Körper behandelt wurde, folgte eine Verfeinerung der Wasserstoffatompositionen. In weiteren Schritten wurden Wasserpositionen in F^o-F^c -Streudichtemappen auf einem Konturniveau von 3σ gesucht und entweder als einzelne Sauerstoffatome oder als D_2O -Moleküle modelliert. Nach einer Verfeinerung der B-Faktoren der Wassermoleküle wurden $2F^o-F^c$ -Streudichtemappen berechnet, um die Positionen der Wassermoleküle zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren. Insgesamt wurden 98 Wassermoleküle vollständig als D_2O und 110 als einzelnes O-Atom modelliert. Davon stimmen ca. 80% mit den 171 Wassermolekülen der Röntgenstrukturanalyse bei 105K überein (Ostermann 2000). Von den 87 Wassermolekülen, die in der Röntgenstrukturanalyse bei 300K sichtbar sind, konnte für 84 Wassermoleküle die Orientierung der D-Atome bestimmt werden. Diese konnten als ganze D_2O Moleküle ins Modell übernommen werden.

Abschließend wurde der Austausch der Amidprotonen und die Protonierung von Aminosäureseitengruppen durch die Betrachtung von Streudichtemappen kontrolliert und gegebenenfalls angepasst. Für die Amidprotonen wurde die Streudichte in drei Stufen

interpretiert: positiv, nicht sichtbar, negativ. Aus den Streulängen für ^1H und ^2H lässt sich berechnen, dass ein nicht sichtbares Amidproton einer Besetzungswahrscheinlichkeit von 0.36 (0.64) für ein ^2H -Atom (^1H -Atom) entspricht. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 6.5 mit denen aus der Strukturanalyse bei 300K dargestellt (Abb. 6.6).

Messung	20K	300K
Quelle, Instrument	ILL, LADI	JRR-3M, BIX-3
Wellenlänge (Å)	2.8 – 3.6	2.35
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
a, b, c, beta	63.47, 30.63, 34.31, 105.6	64.53, 30.87, 34.87, 105.7
Auflösung (Å)	27.4 – 2.1 (2.21 – 2.10)	22.0 – 1.5 (1.55 - 1.50)
Unabhängige Reflexe	6362	19135
Redundanz	3.6 (4.8)	2.9 (2.1)
R _{merge} (%)	16.9 (39.9)	10.3 (24.9)
Vollständigkeit (%)	82.0 (69.1)	87.9 (67.0)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	3.5 (1.7)	6.3 (2.7)
<hr/>		
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	27.4 – 2.1	22.0 – 1.5
Reflexe, Gesamtzahl	6208	19063
Verfeinerung	5895	17755
Test	313 (5%)	1308 (7%)
R _{cryst} (%)	24.4	20.1
R _{free} (%)	27.8	23.8

Tab. 6.3: Vergleich der statistischen Daten für die Neutronenstrukturanalyse von Myoglobin bei 20K und bei 300K. Bei den Daten für die Messung sind die Werte für die höchste Auflösungsschale in Klammern angegeben. Bei der Verfeinerung ist in Klammern der Prozentsatz an Reflexen für den Testdatensatz angegeben.

Im Gegensatz zur Neutronenstrukturanalyse bei 300K sind die B-Faktoren der Strukturanalyse bei 20K nicht individuell in die Verfeinerung einzubeziehen. Die zu geringe Anzahl von unabhängigen Reflexen führt bei einer Verfeinerung zu einem starken Anstieg des freien R-Wertes, was ein deutliches Anzeichen für eine überzogene Verfeinerung ist. Die Anzahl an freien Parametern ist zu groß. Es wurde deshalb eine globale anisotrope Verfeinerung der B-Faktoren durchgeführt, dabei werden im Falle der Raumgruppe P2₁ vier Parameter zur Korrektur aller B-Faktoren eingeführt (Brünger 1992a). Die mittlere

quadratische Auslenkung beträgt für alle Atome der Struktur bei 20K gemittelt 0.35\AA^2 . Dieser Wert ist, verglichen mit der Röntgenstrukturanalyse von H64V bei 110K von 0.10\AA^2 , sehr hoch. Eine Ursache ist die Untergrundkorrektur. Aufgrund des hohen Untergrundsignals ist die Bestimmung der Reflexintensität problematisch. Die niedrigen Werte von $\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ zeigen dies an (vgl. Tab. 6.2).

Aminosäure	Protonierung an	20K	300K	1CQ2	pK _a
12	N ϵ	p	p	0.70	6.29
	N δ	-	-	0.49	6.26
24	N ϵ	p	p	0	-
	N δ	p	p	1	-
36	N ϵ	p	p	0.76	8.06
	N δ	p	p	1	7.91
48	N ϵ	p	p	0.73	5.25
	N δ	-	p	0.96	5.30
64	N ϵ	-	-	0	<5
	N δ	p	p	0.94	<5
81	N ϵ	-	-	0.88	6.68
	N δ	-	-	0.45	6.53
82	N ϵ	p	p	0.95	<5
	N δ	-	-	0.25	<5
93	N ϵ	FE	FE	0.43	<5
	N δ	p	p	0.86	<5
97	N ϵ	p	p	1	5.63
	N δ	p	-	0.29	-
113	N ϵ	-	-	0.26	5.44
	N δ	p	-	1	5.36
116	N ϵ	p	-	0.06	6.49
	N δ	p	-	1	6.50
119	N ϵ	p	p	0.64	6.13
	N δ	p	-	0.84	6.13

Tab. 6.4: Protonierung von Histidin-Seitengruppen aus der Neutronenstrukturanalyse bei 20K und 300K (p :protoniert, - :deprotoniert) und von Shu et al. 2000 (pH 6.2, PDB-Eintrag 1CQ2, Werte aus Besetzungs-Verfeinerung). Die pK_a-Werte stammen aus Bashford et al. 1993 (MbCO bei 300K). His 24 (N ϵ) teilt sich ein Proton mit His 119 (N δ). His 93 ist an N ϵ an das Eisenatom der Häm-Gruppe gebunden.

Nach einer abschließenden Positionsverfeinerung aller Atome mit einem harmonischen Potential zur Begrenzung der Abweichungen erhält man $R_{\text{cryst}} = 24.4\%$ und $R_{\text{free}} = 27.8\%$. Die Zusammenfassung der Datensammlung und der Verfeinerung für die Neutronenstruktur bei 20K und 300K zeigt Tab. 6.3.

Die Protonierungen der Histidin-Seitengruppen für die Struktur bei 20K und 300K sind in Tab. 6.4 zusammengetragen. Bei der Interpretation der Protonierungen in den Dichtemappen ist der Vergleich mit der Röntgenstruktur von MetMb bei 1.1Å (Vojtechovsky et al. 1999) sehr hilfreich. Etwaige Doppellagen können leicht zu Fehlinterpretationen führen. Die in Tab. 6.4 aufgeführten Histidin-Seitengruppen weisen in der hochaufgelösten Röntgenstruktur keine Doppellagen auf.

6.2 Röntgenstruktur von Met-Myoglobin in schwerem Wasser

Zum Vergleich mit der Neutronenstrukturanalyse wurde eine Röntgenstrukturanalyse bei 300K in schwerem Wasser durchgeführt. Dazu wurde ein Kristall aus demselben Ansatz, aus dem der Kristall für die Neutronenstrukturanalyse bei 300K stammte, verwendet. Für die Messung wurde der Kristall in einer Kapillare montiert (vgl. Kapitel 3.3). Die Messung konnte bis 1.5Å ausgewertet werden. Die statistischen Daten sind in Tab. 6.5 zusammengefasst.

Datensammlung		Verfeinerung	
Raumgruppe	P2 ₁	Auflösungsbereich	7.0 – 1.5
Einheitszelle (Å) (°)	a=64.53 b=30.87 c=34.87 β=105.7	Zahl der Reflexe	20326
Auflösung (Å)	1.5	Verfeinerung / Test	18324/2002
Gemessene Reflexe	73933	R _{cryst} (%)	18.1
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	10.2	R _{free} (%)	18.4
Unabhängige Reflexe	20343	Standardabweichung	
Vollständigkeit (%)	94.9 % (86.7 %)	Bindungslänge (Å)	0.008
R _{merge} (%)	4.7 %	Bindungswinkel (°)	1.1
		Koordinatenfehler (Å)	0.13

Tab. 6.5: Statistische Daten zur Röntgenstrukturanalyse von Mbmet in D₂O. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale (1.55 – 1.5). Der Koordinatenfehler wurde durch einen σ_A Plot bestimmt (Read 1986).

Zur Verfeinerung wurde das Programm CNS verwendet (Brünger et al. 1998a). Ausgehend von der Startstruktur von Met-Myoglobin in H₂O bei 300K (aus Ostermann 2000) wurde eine Verfeinerung der Atompositionen und der B-Faktoren vorgenommen. Der kristallographische R-Wert sinkt dabei von 18.7% auf 18.4%, der freie R-Wert steigt von 18.6% auf 20.4% (vgl. Struktur in H₂O (Ostermann 2000); $R_{\text{cryst}} = 17.9\%$ und $R_{\text{free}} = 22.0\%$). Da die kleine Verbesserung des kristallographischen R-Wertes mit einem größeren Anstieg des freien R-Wertes einhergeht, wurde die Verfeinerung nicht übernommen. Unter Verwendung eines Modells einer einheitlichen Elektronendichte für das Lösungsmittel außerhalb des Strukturmodells („bulk solvent correction“ von CNS) erhält man $R_{\text{cryst}} = 18.1\%$ und $R_{\text{free}} = 18.4\%$ (vgl. Tab. 6.5). Die Struktur von Myoglobin ist in H₂O und in D₂O, im Rahmen der Genauigkeit dieser Messung, identisch.

6.3 Korrektur von Streudichtemappen zur besseren Visualisierung von ¹H-Atomen

In Neutronen-Streudichtemappen beobachtet man neben der erwarteten negativen Streudichte an den Positionen der ¹H-Atome noch weitere negative Dichtemaxima. Die folgende Abbildung stellt dies für eine 2F^o-F^c-Streudichtemappe für die Häm-Gruppe von Met-Myoglobin bei 300K dar. Die Streudichtemappe ist absolut skaliert. Dazu wurde der berechnete Wert von F₀₀₀ zur berechneten Mappe addiert. Die Konturierung für die negative Streudichte entspricht -1.5σ . Die Konturierung der positiven Streudichtemappe wurde so gewählt, dass das Verhältnis der beiden Konturierungen dem Verhältnis der mittleren positiven Streudichte (über alle Atome des Proteins mit positiver Streulänge gemittelt) zur Streudichte von ¹H-Atomen entspricht. Für die positiven Mappen erhält man dann ein Konturniveau von 1.8σ .

Die positive 2F^o-F^c-Streudichte (blaue Streudichte in Abb. 6.1) entspricht im wesentlichen der Darstellung, die man von Elektronendichtemappen (vgl. z. B. Abb. 5.7) kennt. Negative 2F^o-F^c-Streudichte beobachtet man an den Positionen der ¹H-Atome, aber auch an Orten, an denen man eigentlich keine negative Streudichte erwartet (rote Streudichte in Abb. 6.1). Unter anderem im Zentrum der Pyrrol-Ringe der Häm-Gruppe. Um Einflüsse, die aus der begrenzten Qualität der Daten resultieren, auszuschließen, wurden F^c-Streudichtemappen aus dem Modell berechnet.

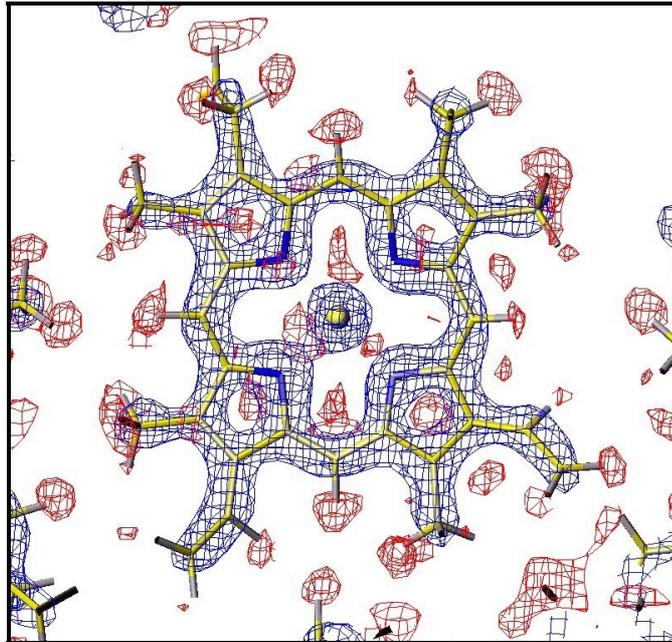


Abb. 6.1: $2F^0$ - F^c -Streudichtemappe und Strukturmodell (1H-Atome: grau) für die Häm-Gruppe in Met-Myoglobin bei 300K. Die Streudichtemappen sind absolut skaliert. blau: Konturierung bei $0.27 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{Å}^3$ (1.8σ), rot: $-0.13 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{Å}^3$ (-1.5σ)

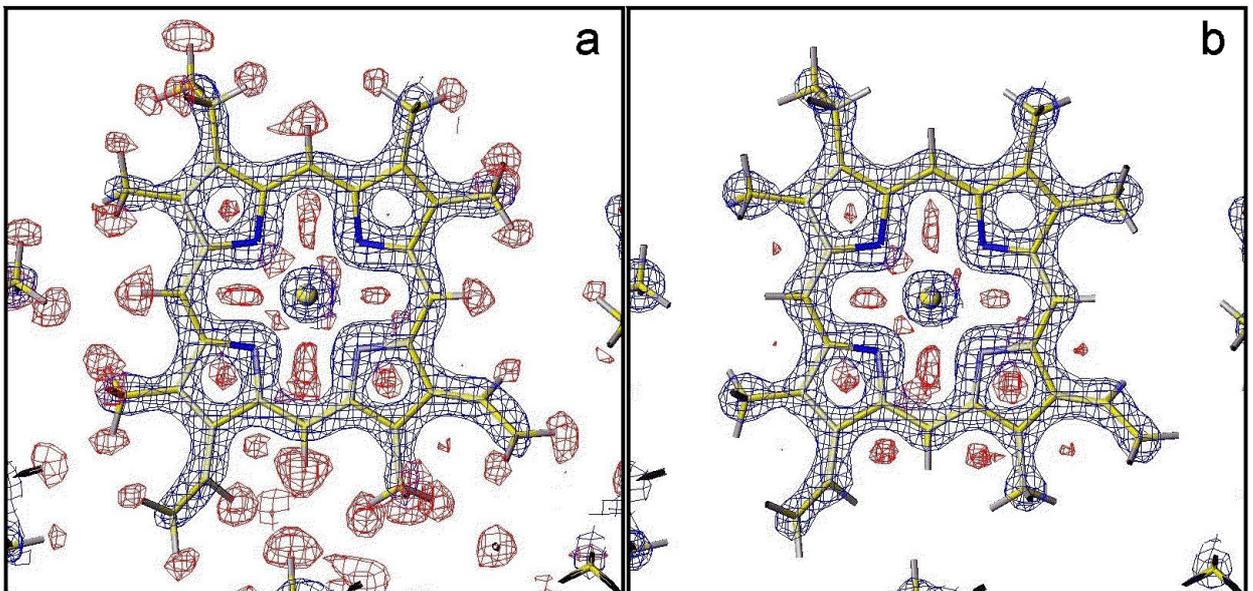


Abb. 6.2: F^c -Streudichtemappe und Strukturmodell (1H-Atome: grau) für die Häm-Gruppe in Met-Myoglobin bei 300K. Die Streudichtemappen sind absolut skaliert. blau: Konturierung bei $0.27 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{Å}^3$ (1.8σ), rot: $-0.13 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{Å}^3$ (-1.5σ). a: Alle Atome wurden berücksichtigt. b: Nur die Atome positiver Streulänge wurden berücksichtigt.

Die negative F^c -Streudichtemappe zeigt wie die $2F^0$ - F^c -Streudichtemappe unerwartete negative Dichtemaxima (Abb. 6.2a). Zum Vergleich wurde eine F^c -Streudichtemappe berechnet, bei der nur Atome mit positiver Streulänge berücksichtigt wurden (Abb. 6.2b).

Trotzdem beobachtet man auch in dieser Mappe negative Dichtemaxima. Da sich die unerwarteten, negativen Dichtemaxima in den beiden Streudichtemappen sehr ähneln, kann man durch Subtraktion der F^c -Streudichtemappe ohne ^1H -Atome von der F^c -Streudichtemappe mit allen Atomen eine korrigierte Mappe erhalten. Das Resultat ist in der folgenden Abbildung für die F^c - und die $2F^0-F^c$ -Streudichtemappe dargestellt. Die F^c -Streudichtemappe weist keine unerwarteten negativen Dichten mehr auf. Die Streudichte an den ^1H -Atomen ist deutlicher geworden. Gleiches gilt für die $2F^0-F^c$ -Streudichtemappe.

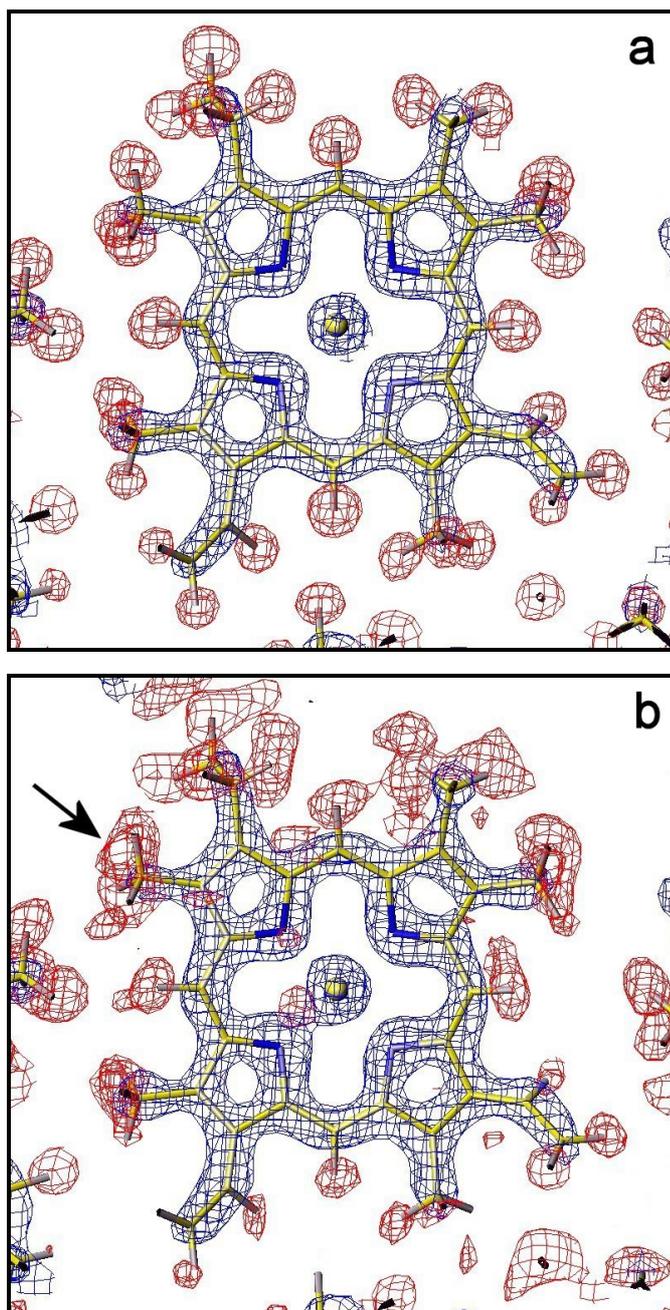


Abb. 6.3: korrigierte Streudichtemappen. a: F^c -Streudichtemappe. b: $2F^0-F^c$ -Streudichtemappe. Die Streudichtemappen sind absolut skaliert. blau: Konturierung bei $0.27 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{\AA}^3$ (1.8σ), rot: $-0.13 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{\AA}^3$ (-1.5σ). Der Pfeil kennzeichnet eine Methylgruppe der Häm-Gruppe, die in Kapitel 7.2.1 betrachtet wird.

6.4 Vergleich der gemessenen Wasserstoffatombestimmungen mit der molekular-mechanischen Berechnung

Zur Vorhersage von Wasserstoffpositionen wurden die Programme X-Plor (Version 3.851, Brünger 1992a) und CNS (Brünger et al. 1998a) verwendet. Mit X-Plor wurde die Routine „hbuild“ verwendet, die von Brünger und Karplus (1988) entwickelt wurde. Die Wasserstoffatome werden dabei aufgrund der bekannten Geometrie der Aminosäuren hinzugefügt. Ein großer Teil der Koordinaten ist somit schon festgelegt. Bei Methylgruppen, die einen Rotations-Freiheitsgrad aufweisen, wird aus der Startposition in wählbaren Schritten die Energie der Gruppe unter Berücksichtigung der Wechselwirkung mit dem Rest des Proteins berechnet und die Position ausgewählt, die minimale Energie aufweist. Anschließend wurde eine Energieminimierung mit dem Programm CNS durchgeführt. Die Koordinaten der Nicht-Wasserstoffatome wurden dabei festgehalten.

Um die Vorhersage mit der aus dem Experiment ermittelten Struktur zu vergleichen, wurden zunächst die Wasserstoffatome (^1H und D) entfernt und anschließend mit dem zuvor beschriebenen Verfahren erzeugt und energieminiert. Bei der Energieminimierung wurden elektrostatische und van der Waals Wechselwirkung mit den Standard-Potentialen für Wasserstoffatome berücksichtigt. Eine Dielektrizitätszahl von 1 und eine Schaltfunktion zum Abschneiden der langreichweitigen Wechselwirkungen, die bei 11\AA beginnt und bei 12\AA auf Null abgefallen ist, wurden verwendet (Smith 1991).

Um die Übereinstimmung zwischen vorhergesagten und aus dem Experiment bestimmten Positionen darzustellen, wurde aus der vorhergesagten und für die experimentelle Struktur je eine Streudichtemappe berechnet. Die Strukturfaktoren wurden aus den jeweiligen Koordinaten und den experimentellen B-Faktoren nach Gl. (33) für Reflexe bis zur Auflösung von 1.5\AA berechnet. Die Dichtemappen erhält man durch die Fouriertransformation der berechneten Strukturfaktoren nach Gl. (34). Durch Subtraktion der Dichtemappe der vorhergesagten von der experimentellen Struktur erhält man einen Überblick über die Koordinatenunterschiede. Durch die Verwendung der B-Faktoren aus der experimentellen Struktur erhält man in der Darstellung eine Gewichtung: Bei kleinem B-Faktor sind kleinere Differenzen in der Streudichtemappe sichtbar, bei großem B-Faktor entsprechend nur größere Differenzen. In Abb. 6.4 sind zwei Beispiele gezeigt. Die folgende Abb. 6.5 zeigt die Differenzdichtemappe dazu.

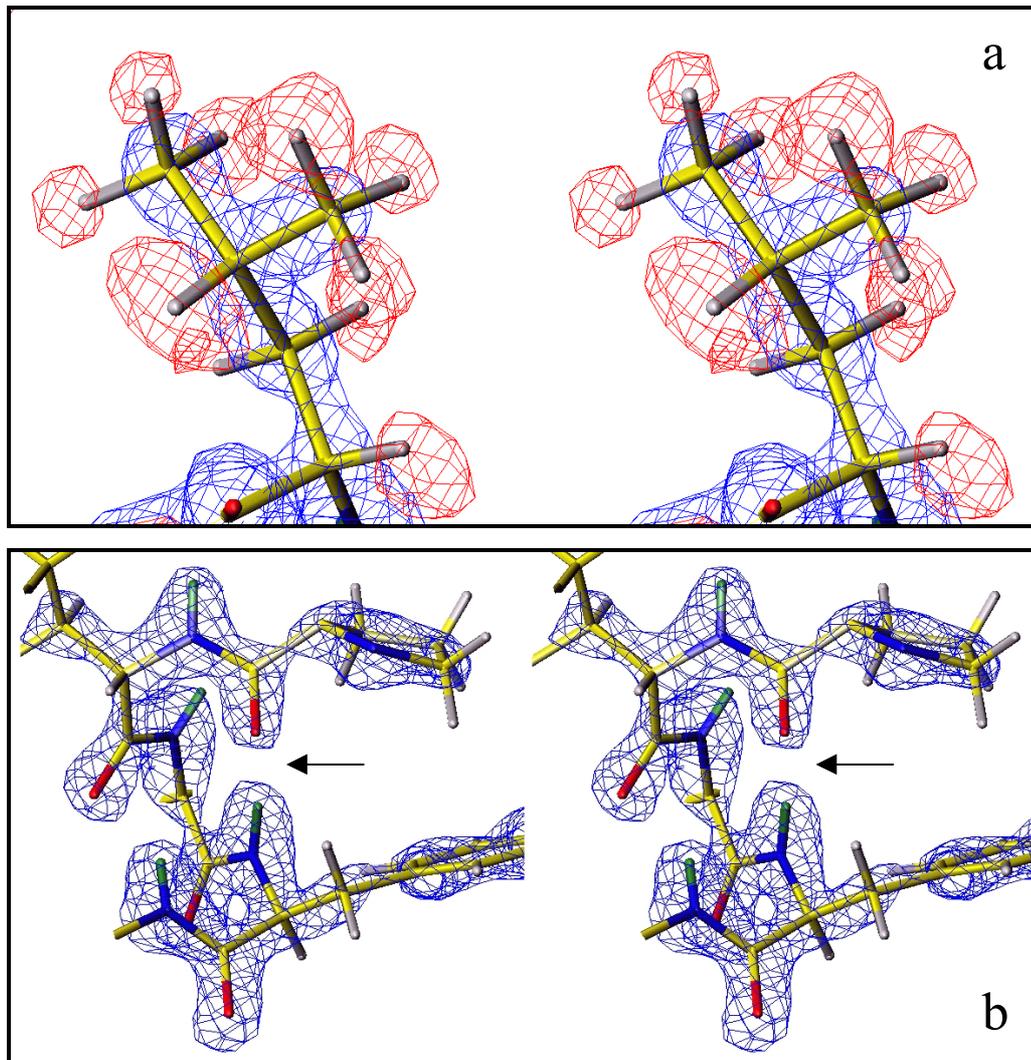


Abb. 6.4: $2F^o - F^c$ Streudichtemappe aus dem Experiment für Leucin 32 (a) und Wasserstoffbrücke zwischen Prolin 100 und Tyrosin 103 (b) und verfeinertes Strukturmodell in Stereodarstellung. Konturniveau: $+1.5\sigma$ (blau) und -1.5σ (rot, wie in Kapitel 6.3 beschrieben korrigiert). Pfeil in b zeigt auf die Wasserstoffbrücke. ^1H -Atome: grau, D-Atome: grün.

Die Differenzdichtemappe muss, je nachdem ob man ein ^1H -Atom oder ein D-Atom betrachtet, unterschiedlich interpretiert werden. Wegen der negativen Streulänge ist bei einem ^1H -Atom negative Differenzdichte der experimentellen und positive Differenzdichte der vorhergesagten Position zuzuordnen (Abb. 6.5a). Für D-Atome kehrt sich die Betrachtung aufgrund der positiven Streulänge um (Abb. 6.5b).

Die Koordinatendifferenzen betragen im Falle der Methyl-Gruppe 0.76\AA und 0.2\AA für das D-Atom in der Wasserstoffbrücke.

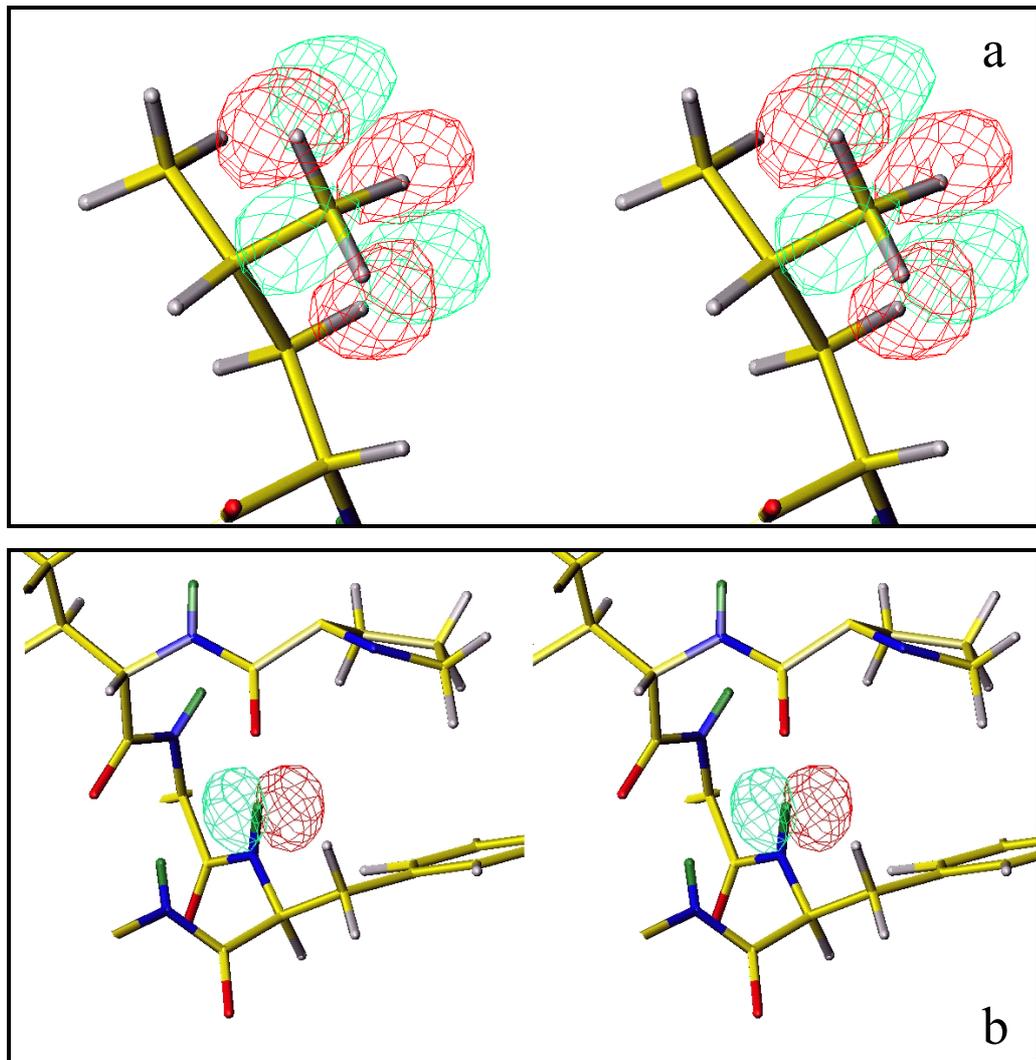


Abb. 6.5: Differenz der Streudichtemappen, die aus dem gemessenen und dem vorhergesagten Strukturmodell berechnet wurden, für Leucin 32 (a) und Wasserstoffbrücke zwischen Prolin 100 und Tyrosin 103 (b) in Stereodarstellung. ^1H -Atome: grau, D-Atome: grün. a: rote Differenzdichte für ^1H verschwindet beim Übergang von der experimentellen zur vorhergesagten Struktur und taucht als grüne Differenz auf. b: grüne Differenzdichte für D verschwindet und taucht als rote Streudichte wieder auf. Koordinatendifferenz 0.76\AA (in a) und 0.2\AA (in b).

6.5 Mittlere quadratische Auslenkungen und Austausch der Wasserstoffatome

Die Verfeinerung der mittleren quadratischen Auslenkungen der Wasserstoffatome ist in der Kristallographie nur bei ausreichender Auflösung möglich. Das Verhältnis von Observablen- zu Parameterzahl ist ansonsten zu niedrig, um verlässliche Werte zu erhalten (vgl. Tab. 2.3). Die Neutronenstrukturanalyse bei 20K kann daher nicht zur Bestimmung von mittleren quadratischen Auslenkungen verwendet werden. Im Folgenden ist bei der Betrachtung von B-Faktoren und mittleren quadratischen Auslenkungen stets die Struktur bei 300K gemeint. Die Besetzungswahrscheinlichkeit der Amidprotonen wurde in der Struktur bei 300K ebenfalls verfeinert. Man erhält dadurch Informationen über den Austausch der Wasserstoffatome von ^1H zu ^2H als Funktion des Ortes innerhalb des Proteins. In Abb. 6.6 ist das Ergebnis für die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die ausgetauschten Amidprotonen im Vergleich für die Neutronenstrukturanalyse bei 300K und 20K dargestellt.

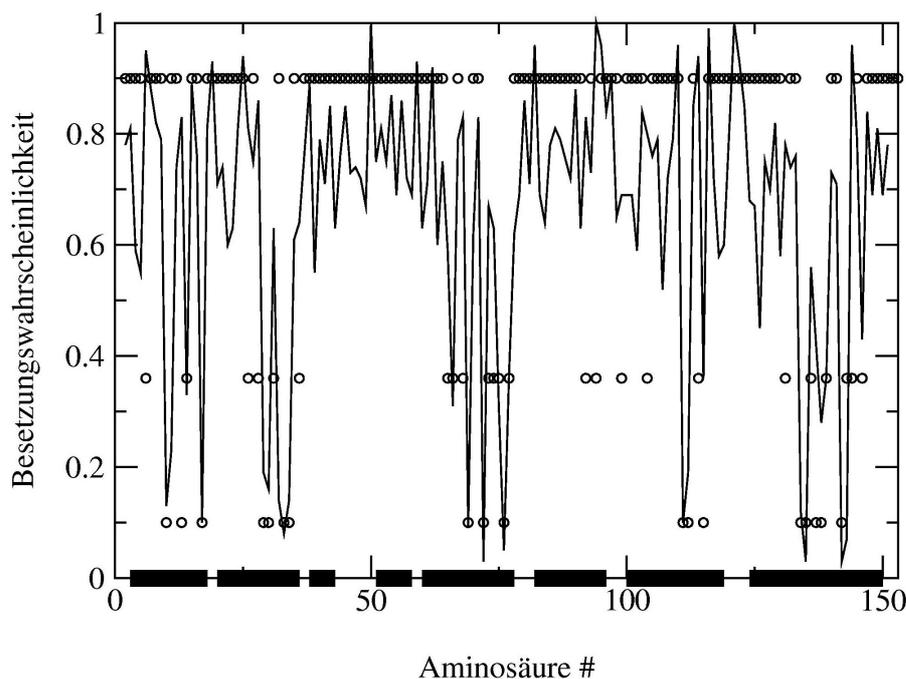


Abb. 6.6: Besetzungswahrscheinlichkeit für die ausgetauschten Amidprotonen (^2H -Atome) durchgezogene Linie 300K und offene Kreise 20K (nur 3 Werte: 0, 0.36 oder 1, Werte 0 auf 0.1 und 1 auf 0.9 verschoben, um diese von den Achsen zu trennen).

Zur Verfeinerung der Besetzungswahrscheinlichkeit in der Neutronenstrukturanalyse bei 300K (Ostermann et al. 2002) wurde für die Amidprotonen je ein ^1H -Atom und ein ^2H -Atom erzeugt. Die Summe der Besetzungen wurde nicht auf 1 festgehalten. Die Verfeinerung ergab

eine mittlere Besetzung von 1.09 mit einer Standardabweichung von 0.125. Anschließend wurden die Besetzungswahrscheinlichkeiten auf 1 normiert. Für die Struktur bei 20K wurde der Austausch der Amidprotonen anhand von Streudichtemappen beurteilt, da die Datenqualität für eine Verfeinerung der Besetzung nicht ausreicht.

Vergleicht man die mittlere quadratische Auslenkung der Rückgratatome (gemittelt über C_{α} , N, C, O) aus der Neutronenstrukturanalyse mit den aus der Röntgenstrukturanalyse erhaltenen Werten, so beobachtet man eine Abweichung der Werte voneinander: die Messung mit Neutronen ergibt kleinere Werte als mit Röntgenstrahlung. Um die Abweichung beurteilen zu können, wurde eine Anpassung der mittleren quadratischen Auslenkung aus der Neutronenstrukturanalyse $\langle x^2 \rangle^n$ an die Werte aus der Röntgenstrukturanalyse $\langle x^2 \rangle^x$ für die Rückgratatome C, N, C_{α} und O durchgeführt. Man erhält so auf $\langle x^2 \rangle^x$ normierte mittlere quadratische Auslenkung für die Neutronenstreuung $\langle x^2 \rangle_{\text{norm}}^n$:

$$\langle x^2 \rangle_{\text{norm}}^n = s \cdot \langle x^2 \rangle^n + t \quad (58)$$

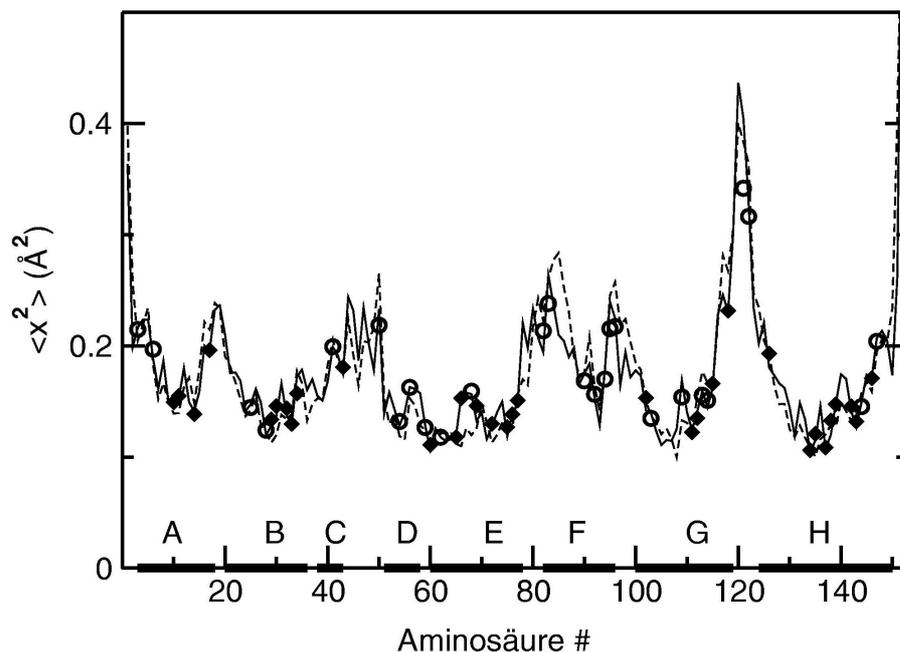


Abb. 6.7: Mittlere quadratische Auslenkung für die Rückgratatome (gemittelt über C_{α} , N, C und O) aus der Röntgenstrukturanalyse (gestrichelte Linie) und auf diese korrigierte Werte aus der Neutronenstrukturanalyse bei 300K (durchgezogene Linie). Offene Kreise: Amid-Wasserstoffatome die zu über 90% von ^1H zu ^2H ausgetauscht sind, gefüllte Rauten: weniger als 50% von ^1H zu ^2H ausgetauscht (aus der Neutronenstrukturanalyse bei 300K). Auf der Abszisse sind die helikalen Bereiche in Myoglobin gekennzeichnet.

Für die Anpassung von Gl. (58) mit der Methode der kleinsten Quadrate erhält man $s = 1.21$ und $t = 0.044\text{\AA}^2$. Eine Anpassung, bei der $s = 1.0$ festgehalten wird, ergibt $t = 0.067\text{\AA}^2$, wobei χ^2 nur unwesentlich größer wird. Abb. 6.7 zeigt einen Vergleich von $\langle x^2 \rangle^x$ und $\langle x^2 \rangle_{\text{norm}}^n$. Die lineare Verschiebung ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Die im Folgenden betrachteten Werte für die mittlere quadratische Auslenkung sind stets durch die Addition von 0.067\AA^2 auf die Werte aus der Röntgenstrukturanalyse korrigiert.

Abb. 6.8 zeigt Histogramme der mittleren quadratischen Auslenkungen für die ^1H -Atome in Myoglobin. Diese machen die Mehrzahl aus: 997 im Vergleich zu 194 ^2H -Atomen (vgl. Tab. 6.1, die 146 Amidprotonen des Rückgrates werden hier als ausgetauscht, also als ^2H -Atome betrachtet und somit nicht berücksichtigt). Die in Abb. 6.8a und b dargestellten Verteilungen lassen sich gleichzeitig mit drei Gauß-Kurven unterschiedlicher Flächen anpassen. Die Anpassung für alle ^1H -Atome ist in Abb. 6.8c dargestellt. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Anpassung zusammen.

	Zahl in der Struktur	Gauß-Kurve 1	Gauß-Kurve 2	Gauß-Kurve 3	Summe der Gauß-Kurven
Position (\AA^2)	-	0.182	0.246	0.333	-
Breite (\AA^2)	-	0.034	0.033	0.092	-
Alle ^1H	997 (194)	292	380	334	1006
Rückgrat	161 (146)	122	26	11	159
Seitengruppen	836 (48)	170	354	323	847
Methylgruppen	282	21	226	40	287
Lysingruppen	152	0	4	140	144

Tab. 6.6: Ergebnisse der Anpassung der Histogramme der mittleren quadratischen Auslenkungen für ^1H -Atome. Die ersten beiden Zeilen zeigen die Parameter der Gauß-Kurven. Folgende Zeilen: Die erste Spalte gibt an, wieviele Atome welcher strukturellen Gruppe zugeordnet werden können (Die Amidprotonen sind hier als ^2H -Atome betrachtet). Die folgenden drei Spalten geben die Flächen der Gauß-Kurven an, die letzte Spalte die Summe der Gauß-Kurven. Die ^1H -Atome der Häm-Gruppe sind in der Gruppe aller ^1H -Atome berücksichtigt. Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der ^2H -Atome an.

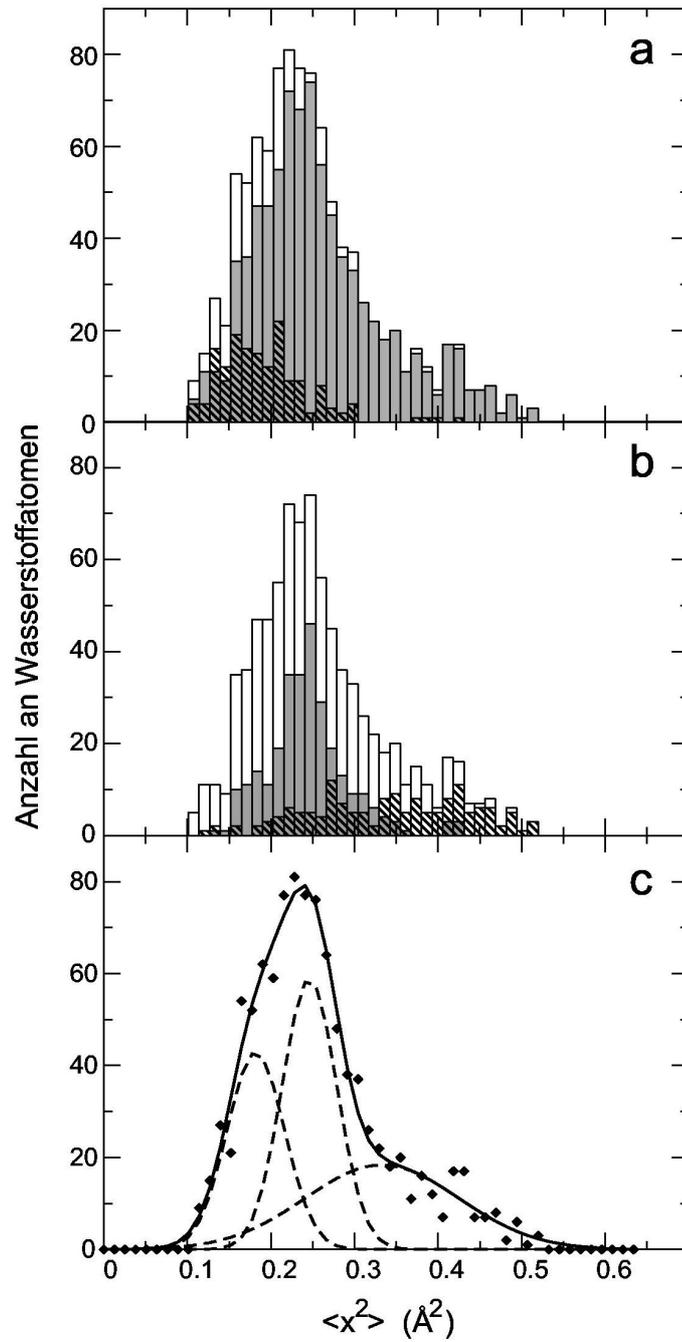


Abb. 6.8: Histogramme der mittleren Auslenkungsquadrate von ^1H -Atomen in Myoglobin. a: alle ^1H -Atome (weiß), im Proteinrückgrat (schraffiert), in Seitenketten (grau). b: ^1H -Atome in Seitenketten (weiß), in Methylgruppen (grau), Lysinseitenketten (schraffiert). c: Anpassung (durchgezogene Linie) des Histogramms für alle ^1H -Atome (gefüllte Rauten) mit drei Gauß-Kurven (gestrichelte Linien).

7 Diskussion

7.1 Struktur und Dynamik von Myoglobin aus optischer Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse

7.1.1 Proteindynamik und temperaturabhängige Struktur von H64V-Mbmet

Bei Raumtemperatur ist H64V-Met-Myoglobin fünffach ligandiert. Dies wurde mit Röntgenstrukturanalyse (Quillin et al. 1993), Raman-Spektroskopie (Morikis et al. 1990) und $^1\text{H-NMR}$ (Rajarithnam et al. 1991) gezeigt. Die Absorptions-Spektren von H64V-Mbmet zeigen einen Übergang zwischen zwei Zuständen als Funktion der Temperatur. Bei 300K ist das Spektrum für einen fünffach koordinierten Zustand kennzeichnend. Die Anpassung der temperaturabhängigen Spektren mit dem Spektrum von nativem Mbmet lässt vermuten, dass es sich bei der zweiten Spezies mit dem Maximum bei 410nm um sechsfach ligandiertes Myoglobin handelt. Dies wird durch die Röntgenstrukturanalyse bei 300K und 110K bewiesen. Aufgrund der Probenzusammensetzung und der Elektronendichte kommt dazu nur ein Wassermolekül in Frage. Bei Raumtemperatur ist in der Röntgenstruktur ein Anteil an ligandiertem Zustand von $36\% \pm 10\%$ vorhanden (vgl. Abschnitt 5.1.2). Aus der Analyse der optischen Spektren kann man nicht ausschließen, dass bei Raumtemperatur ein kleiner Anteil an ligandierter Form vorliegt. Der in der Röntgenstruktur gefundene Anteil kann außerdem durch die kristalline Form beeinflusst sein.

Die Strukturanalyse von H64V-Mbmet bei 300K und 110K klärt den Mechanismus der Wasserbindung. Die Wasserligandierung des Eisens erfordert eine stabilisierende Wasserstoffbrücke (vgl. Abb. 5.6A). Die Röntgenstruktur zeigt, dass das Wasser am Eisen durch ein Netzwerk von Wassermolekülen stabilisiert wird. Dieses Netzwerk erstreckt sich von der Proteinoberfläche in die „distale Tasche“ des Proteins. Die folgende Abbildung zeigt das Strukturmodell für H64V-Mbmet bei 110K. Fünf Wasser in der Häm-Tasche sind dargestellt. Wasser 1, 2 und 3 sind nur bei 110K, Wasser 4 und 5 sind auch bei Raumtemperatur sichtbar. Das Wasser, das das Eisen ligandiert, wird durch eine sehr kurze Wasserstoffbrücke von 2.6Å (Abstand O – O) von einem weiteren Wasser stabilisiert. Dieses wird wiederum durch eine sehr kurze Wasserstoffbrücke (2.6Å) mit einem weiteren Wasser und eine längere (3.3Å) mit dem Rückgrat-Sauerstoffatom von Valin 64 stabilisiert. Wasser 4 stabilisiert Wasser 3 und wird selbst durch das Sauerstoffatom der Seitenkette von Threonin

67 stabilisiert. Wasser 5 hat ein relativ hohes mittleres Auslenkungsquadrat von 0.63\AA^2 im Vergleich zu Werten von $0.08\text{-}0.21\text{\AA}^2$ für die anderen vier Wasser. Wasser 5 bildet eine Wasserstoffbrücke zu Arginin 45 und zu Lysin 63, das mit einer Doppellage modelliert ist.

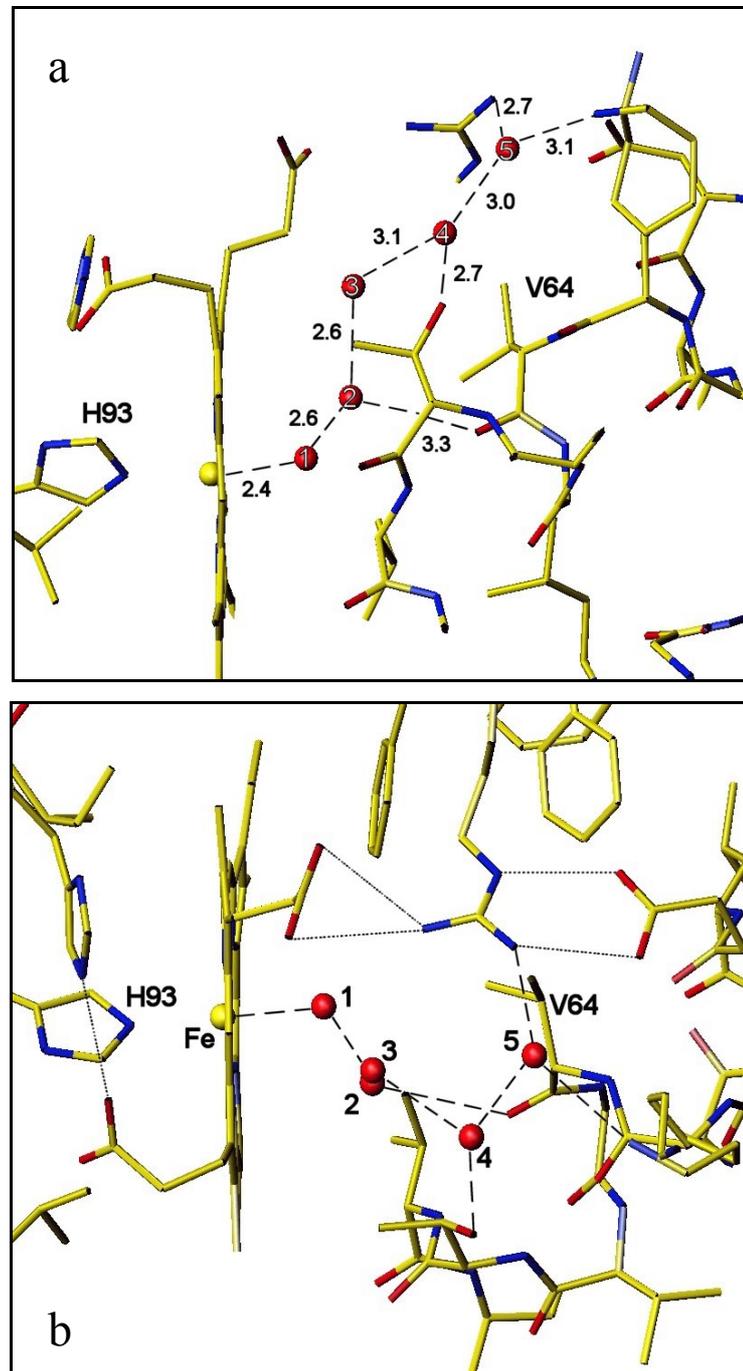


Abb. 7.1: Wasser-Netzwerk in H64V aus der Röntgenstrukturanalyse bei 110K aus verschiedenen Perspektiven: a: Ansicht wie in Abb. 5.6. b: Ansicht aus a 90° um die Normale zur Häm-Ebene gedreht. Dies entspricht einer Aufsicht auf das aktive Zentrum vom Lösungsmittel her. Abstände in a sind in Ångström gegeben. Wasserstoffbrücken zwischen Proteinseitengruppen und Häm-Gruppe sind gepunktet (Abstände zw. 2.8\AA und 3.3\AA , nur in b).

Aus der genaueren Betrachtung der Häm-Gruppe in Abb. 5.7 sieht man, dass bei 110K eine Doppellage der Häm-Gruppe vorliegt. In Abb. 7.2 ist eine Doppellage für das Eisenatom skizziert. Die in einer F^0 - F^c -Elektronendichtemappe dargestellte Dichte ergibt sich in diesem Fall aus der Subtraktion einer einzelnen mittleren Lage des Eisenatoms im Modell. Die in Abb. 5.7 dargestellte F^0 - F^c -Elektronendichtemappe aus dem Experiment lässt sich somit durch eine Doppellage des Eisenatoms erklären. Im Prinzip tritt dies für jedes Atom in der Häm-Ebene auf. Da das Eisen mit Abstand am stärksten streut sind die Differenzen dort am deutlichsten sichtbar.

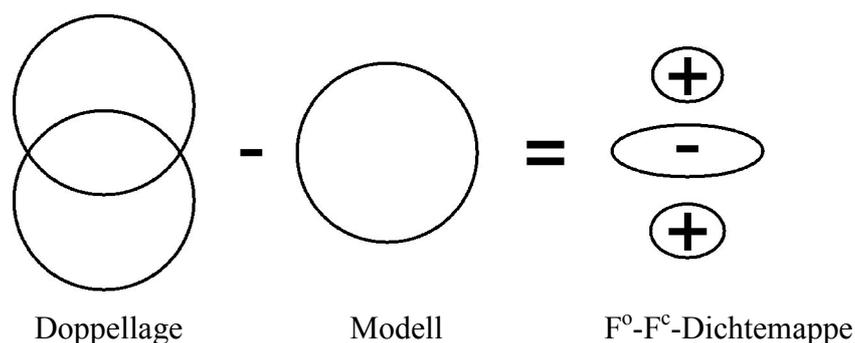


Abb. 7.2: Skizze der Elektronendichte zur Erläuterung der F^0 - F^c Mappe in H64V-Mbmet für das Eisen bei 110K.

Man kann annehmen, dass die unligandierte Form sich in der Position der Häm-Gruppe relativ zum Protein von der ligandierten Form unterscheidet. Die Differenzen sind sehr klein und nahe der Nachweisgrenze der Röntgenstrukturanalyse selbst bei einer Auflösung von 1.3Å. Es ist daher wichtig, die Ergebnisse mit Röntgenstrukturanalyse bei nahezu atomarer Auflösung von nativem Myoglobin (Kachalova et al. 1999; Vojtechovsky et al. 1999) zu vergleichen (zw. 1.0Å und 1.2Å Auflösung). Ein Ergebnis der Untersuchung von Vojtechovsky et al. (1999) ist eine Verschiebung der Häm-Gruppe der ligandierten Zustände MbO₂, MbCO und Mbmet im Vergleich zum unligandierten Mbdeoxy-Zustand in der durch die Häm-Gruppe definierten Ebene. Auch die Geometrie der Ligandierung des Eisenatoms durch das Wasser in H64V-Mbmet bei 110K (vgl. Tab. 5.1) weist auf eine Doppellage des Eisenatoms senkrecht zur Häm-Ebene hin. Die Auslenkung des Eisens aus der Häm-Ebene in der Struktur bei 110K (0.25Å) liegt zwischen den Werten, die ligandiertes Mbmet (0.14Å und 0.12Å bei 105K und 300K) und unligandiertes H64V-Mbmet bei Raumtemperatur (0.33Å) zeigen. Der Abstand des Wasserliganden in H64V-Mbmet bei 110K (2.38Å) ist größer als in nativem Mbmet (2.15Å bei 105K bzw 2.17Å bei 300K). Im Rahmen des Koordinatenfehlers

von ca. 0.13Å (Tab. 5.1) kann man bei der Annahme einer Doppellage davon ausgehen, dass der ligandiertere Zustand in H64V-Mbmet einen Abstand zwischen Eisenatom und Wasser ähnlich dem im nativen Mbmet hat.

Die beobachteten Doppellagen für Aminosäureseitenketten (Tab. 5.2) stimmen mit den hochaufgelösten Strukturen von Vojtechovsky et al. (1999) und Kachalova et al. (1999) überein. Die Zahl der gefundenen Doppellagen bei 110K und 300K ist aufgrund der unterschiedlichen Auflösungen schwer vergleichbar (1.3Å bei 110K, 1.5Å bei 300K). Eine Aussage, ob die Zahl der Doppellagen von der Temperatur abhängt, kann nicht gemacht werden.

Die Qualität der Strukturanalyse mit den hier untersuchten Kristallen in der Raumgruppe $P2_1$ ist bedeutend besser als die Untersuchungen von Quillin et al. (1993), die an Kristallen der Raumgruppe $P6$ durchgeführt wurden. Bei dieser Untersuchung wurden mehrere Kristalle vermessen, um eine Strukturanalyse bis 2.0Å durchführen zu können. Kristalle in der Raumgruppe $P6$ sind wesentlich empfindlicher gegenüber Röntgenstrahlung als Kristalle der Raumgruppe $P2_1$. Das Wasser im so genannten proximalen Xe-Loch (Nr. 1 in Abb. 7.11) in der Struktur von Quillin et al. (1993) hat einen B-Faktor von 50Å^2 . Dies ist an der Nachweisgrenze unter der Berücksichtigung der Qualität der Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Elektronendichte in der proximalen Tasche gefunden.

Für den Ligandierungswechsel erhält man eine Enthalpiedifferenz ΔH von 22kJ/mol und eine Entropiedifferenz ΔS von 106J/(mol·K) (vgl. Kapitel 5.1.1). Tada et al. (1998) haben die Koordination von Elefanten-Myoglobin nahe Raumtemperatur untersucht. Dabei ist das distale Histidin 64 durch ein Glutamin ersetzt. Die Spektren wurden ebenfalls durch ein fünffach und ein sechsfach ligandiertes Häm-Eisenatom modelliert. Die Temperaturabhängigkeit zwischen 0°C und 50°C ergab für das Gleichgewicht der beiden Spezies Werte für ΔH von 17.7kJ/mol und ΔS von 63.7J/(mol·K). Die Stabilisierung des Liganden erfolgt dabei durch das Glutamin 64 (aus der Röntgenstrukturanalyse an der entsprechenden Mutante von Pottwal-Myoglobin von Quillin et al. (1993)). Whittaker und Whittaker (1996) haben für den Ligandierungswechsel einer Mangan-Superoxiddismutase Werte von 21kJ/mol und 92J/(mol·K) erhalten. Dabei wurde nur eine Absorptionsdifferenz bei einer Wellenlänge zur Konzentrationsbestimmung der Spezies verwendet. Ob eine vollständige Umwandlung zwischen den beiden Spezies stattfindet, kann daher nicht geklärt

werden. Eine Strukturanalyse dieses Zustands bei 100K zeigt die Stabilisierung des Liganden durch ein Wassermolekül (Borgstahl et al. 2000). Die Enthalpiedifferenz ΔH ist in allen drei Fällen recht ähnlich. Die Entropiedifferenz ΔS ist im Falle der Stabilisation durch Wassermoleküle größer. Dies spiegelt den höheren Ordnungsgrad durch das stabilisierende Wassernetzwerk wieder.

Die nahezu konstante Verteilung zwischen den beiden Spezies unterhalb von 180K könnte man auch auf einen Anteil in der Probe zurückführen, der nicht zur Ligandierung fähig ist. Es gibt jedoch keine Hinweise auf einen solchen Mechanismus. Das Auftreten der konstanten Verteilung zwischen ligandierter und unligandierter Form ab 180K lässt sich dagegen durch die Dynamik des Proteins erklären: Das Gleichgewicht der ligandierten mit der unligandierten Form in H64V-Mbmet korreliert mit den Fluktuationen zwischen Konformations-subzuständen in einem Zustand, wie man sie mit der Mößbauerspektroskopie (Parak und Formanek 1971; Parak et al. 1982; Parak et al. 1999) oder inkohärenter Neutronenstreuung (Doster et al. 1989) beobachten kann. Die Mößbauer-Spektroskopie zeigt, dass es zwei verschiedene Bereiche der Proteindynamik gibt. Bei tiefen Temperaturen sind die Proteine in Konformationssubzuständen eingefroren. Die Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung des Eisenatoms ist linear, wie man es für harmonische Schwingungen beobachtet. Erst ab einer Temperatur von 180K werden Übergänge zwischen den Konformationssubzuständen beobachtet. Der Ligandierungswechsel von H64V ist nur bei Temperaturen möglich, bei denen das Protein zwischen Konformationssubzuständen fluktuieren kann.

Messungen der dielektrischen Relaxationsraten für Wasser in Met-Myoglobin-Kristallen zeigen einen Zusammenhang zwischen den Relaxationsraten und den Übergangsraten zwischen Konformationssubzuständen, die aus der Mößbauer-Spektroskopie bestimmt wurden (Singh et al. 1981). Die Autoren heben die Bedeutung der dielektrischen Relaxation für die Übergänge zwischen Konformationssubzuständen hervor: Durch die Fluktuation der Dipole der Wassermoleküle kann die Barriere für Übergänge zwischen Konformationssubzuständen durch Wechselwirkung mit den polaren Gruppen an der Proteinoberfläche abgesenkt werden. Dies kann auch das Einfrieren des Ligandierungswechsels in H64V erklären. Bei hohen Temperaturen fluktuieren die Wassermoleküle, und das thermodynamische Gleichgewicht der Ligandierung ist gegeben.

Beim Abkühlen sinkt die Rate der Fluktuationen des Wassers und die Rate der Übergänge zwischen Konformationssubzuständen. Die Übergänge zwischen Konformationssubzuständen

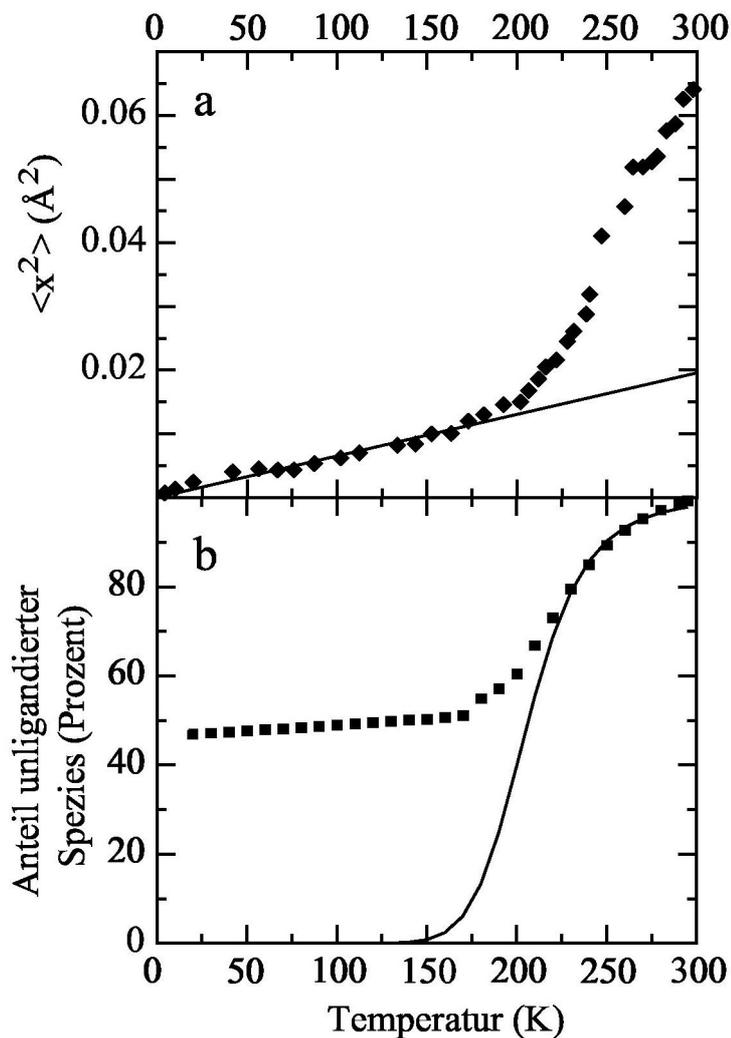


Abb. 7.3: Vergleich der mittleren quadratischen Auslenkung des Eisen-Atoms in Mbdeoxy (a) aus der Mößbauer-Spektroskopie (Parak et al. 1982) mit der temperaturabhängigen Ligandierung in H64V-Mbmet (b).

werden so selten, dass das thermodynamische Gleichgewicht für die Ligandierung nicht mehr erreicht wird. Unterhalb von 230K weicht die Ligandierung zusehends vom erwarteten Modell ab (durchgezogene Linie in Abb. 7.3b). Bei Temperaturen von weniger als 180K findet keine Änderung der Ligandierung mehr statt. Die Teilnahme polarer Gruppen am Übergang zwischen der fünffach und sechsfach ligandierten Form von H64V-Mbmet wird durch die Wasserstoffbrücken zwischen den Propionsäuregruppen der Häm-Gruppe und Aminosäureseitenketten an der Proteinoberfläche in Abb. 7.1b verdeutlicht.

Der Einfluss der Mobilität des Wassers auf die Fluktuationen des Proteins wurde in Molekulardynamik-Simulationen von Vitkup et al. (2000) untersucht. Durch getrennte Kontrolle der Temperatur des Lösungsmittels und des Proteins konnte gezeigt werden, dass das Lösungsmittel in der Simulation die Proteinfluktuationen kontrolliert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Verhalten der H64V-Mutante. Die Struktur des Proteins zeigt keine großen Unterschiede als Funktion der Temperatur. Temperaturabhängige Änderungen sind hauptsächlich im umgebenden Lösungsmittel zu beobachten. Der Einfluss der Temperatur auf die Wasserstoffbrücken wurde mittels IR-Spektroskopie von Doster et al. (1986) und Demmel et al. (1997) untersucht. Die O-D-Streckschwingung von Wasser korreliert danach ebenfalls mit der Dynamik des Proteins.

Ist die Proteindynamik durch das umgebende Lösungsmittel (wie z.B. glasförmige Trehalose) unterbunden, so verhält sich das Protein über einen größeren Temperaturbereich festkörperähnlich (Cordone et al. 1998; Cordone et al. 1999; Gaßmann 2000; Cottone et al. 2001). Dies spiegelt sich in den optischen Absorptionsspektren von H64V-Mbmet in Trehalose wider. Es sind Linienbreitenänderungen als Funktion der Temperatur zu beobachten (Abb. 5.5). Bei tiefen Temperaturen erkennt man eine Aufteilung der Soret-Bande in zwei Spezies, die bei hohen Temperaturen aufgrund der großen Breite der Banden nicht sichtbar ist. Ein Ligandierungswechsel ist hier nicht nachzuweisen. Die Unterdrückung von Konformationswechseln kann auch für die konservierenden Eigenschaften von Trehalose verantwortlich sein: Bettet man Proteine in Trehalose ein, so kann man Denaturierung bei hohen Temperaturen oder durch Dehydrieren verhindern (Crowe und Crowe 1984; Crowe et al. 1996).

7.1.2 Interpretation der Gauß-Breite der Soret-Bande

Das Modell von Cordone und Mitarbeitern zur Beschreibung der Gauß-Breite der Soret-Bande, das nur eine Mode berücksichtigt, ist in mehreren Punkten unzureichend. Die Einstein-Näherung mit *einer* repräsentativen Mode ist nicht sinnvoll, wie ein Vergleich mit der Zustandsdichte aus der Normal-Moden-Analyse zeigt (siehe Abb. 2.3). Eine Temperatur von 300K entspricht einer Wellenzahl von ca. 215 cm^{-1} . Eine Vielzahl von Moden befindet sich daher in höher angeregten Zuständen und trägt daher zu der gaußschen Verbreiterung bei. Die Mittelung von Gl. (11) über alle Moden führt auch nicht zu einer Temperaturabhängigkeit in Form eines Cotangens hyperbolicus wie in Gl. (12) angenommen. Daher ist diese zur

Auswertung der Temperaturabhängigkeit der Gauß-Verbreiterung nicht geeignet. Eine repräsentative Mode $\langle v \rangle$ ist insbesondere für den gesamten Temperaturlauf von 20K bis 300K nicht sinnvoll. Eine Abweichung der gemessenen Werte von der Anpassung nach Gl. (12) ist daher zu erwarten (vgl. Abb. 2.4).

Aus experimenteller Sicht sind ebenfalls Zweifel an der Auswertung mit einer Mode geboten. Mit der Anpassung eines einfachen Cotangens hyperbolicus wurde für MbCO in einer Glycerin/Wasser-Mischung und in Trehalose getrocknet ein unterschiedliches Verhalten gefunden (Cordone et al. 1998). Betrachtet man die von Cordone und Mitarbeitern publizierten Daten wie in Abb. 7.4, so kann man dieses Ergebnis nicht bestätigen. Die Gauß-Breite unterscheidet sich für MbCO in Trehalose oder Glycerin/Wasser nur wenig. Die Mößbauer-Spektroskopie (Cordone et al. 1998; Gaßmann 2000) und inkohärente Neutronenstreuung (Cordone et al. 1999) zeigen jedoch ganz klar ein unterschiedliches dynamisches Verhalten.

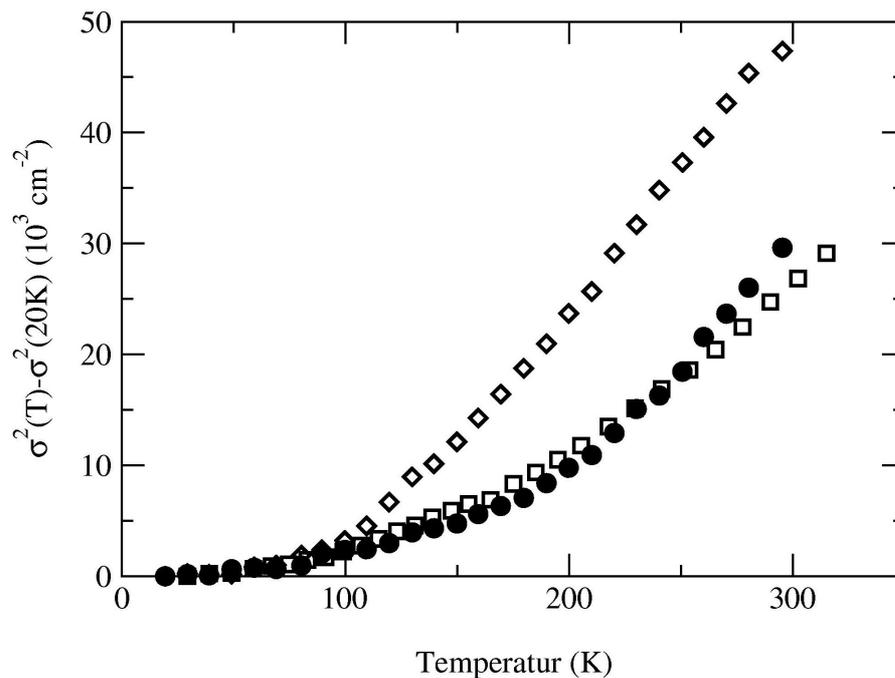


Abb. 7.4: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Gauß-Breite für MbCO(●) und Mbdeoxy (◇) in 65% Glycerin/Wasser und MbCO in Trehalose (□) (Daten aus Cupane et al. 1995; Cordone et al. 1998). Der Wert bei 20K (Trehalose 30K) wurde dazu abgezogen.

Einen Hinweis auf die Ursache der Temperaturabhängigkeit der Gauß-Breite der Soret-Bande kann eine Untersuchung von Cytochrom-c liefern. Bei der Analyse konnte keine Kopplung des optischen Übergangs an niederfrequente Moden beobachtet werden (Schomacker und

Champion 1986). Dies wurde mit der sechsfachen Koordination des Eisenatoms unter Beteiligung zweier Proteinliganden erklärt. Die Mößbauer-Spektroskopie zeigt jedoch, dass sich das $\langle x^2 \rangle$ für Cytochrom-c ähnlich wie bei Myoglobin verhält (Frolov et al. 1997). Die Temperaturabhängigkeit der Gauß-Breite von MbCO und Mbdeoxy unterscheidet sich deutlich. Die Unterschiede in der Mößbauer-Spektroskopie sind wesentlich geringer (Gaßmann 2000). Strukturell unterscheiden sich die beiden Zustände hauptsächlich in der Ligandierung des Häm-Eisenatoms.

Fasst man die experimentellen Beobachtungen zusammen, so scheint die lokale Struktur um die Häm-Gruppe von großer Bedeutung für die Gauß-Breite der Soret-Bande. In der Reihenfolge Cytochrom-c, MbCO, Mbdeoxy nimmt die Temperaturabhängigkeit der Gauß-Breite zu. Damit einher gehend nimmt die Fixierung der Häm-Gruppe an das Protein von Cytochrom-c über MbCO nach Mbdeoxy ab. Sind es in Cytochrom-c zwei Proteinliganden, in MbCO ein Proteinliganden und ein CO-Ligand, so ist es in Mbdeoxy nur noch ein Proteinligand.

Das Modell, welches das gesamte Normal-Moden-Spektrum verwendet, kann die Gauß-Breite der Soret-Bande über den Temperaturbereich von 20K bis 300K beschreiben (Abb. 5.10), ohne anharmonische Effekte hinzuzunehmen. Der Anstieg wird mit der zunehmenden thermischen Anregung niederfrequenter Moden erklärt. Die Schwäche des Modells ist sicher die etwas willkürliche Implementierung der Auswahl der Moden für die Gauß-Breite durch die Fermi-Funktion in Gl. (56). Ein korrekter Weg, den Einfluss aller Moden aus der Normal-Moden-Analyse zu untersuchen, ist die Auswertung der optischen Spektren mit dem Zeitkorrelatorformalismus in Gl. (2), (3) und (4). Dies könnte auch Aufschluss über einen Beitrag der Nullpunktschwingungen zur Gauß-Breite geben. Das Modell nach Gl. (57) führt die Gauß-Breite im Grenzfall für T gegen 0K allein auf eine inhomogene Verbreiterung zurück. Eine Anpassung der optischen Spektren unter Berücksichtigung aller Moden könnte auch zu einer Reduktion der Gauß-Verbreiterung führen. Ein Problem der Analyse wird immer die Vielzahl an unbekanntem Kopplungskonstanten sein und eine Interpretation der Ergebnisse stets erschweren, wenn nicht gar unmöglich machen. Dennoch zeigt das Modell, welches das gesamte Normal-Moden-Spektrum verwendet, dass eine Anharmonizität niederfrequenter Moden zur Erklärung der Temperaturabhängigkeit der Gauß-Breite der Soret-Bande nicht notwendig ist. Eine Erweiterung des in Abschnitt 5.2.1. vorgestellten

Modells wurde von Cordone und Mitarbeitern vorgeschlagen und berücksichtigt die Moden aus dem Normal-Modenspektrum auch als hochfrequente Moden.

Für die Anpassung der Gauß-Breite wurde neben einer inhomogenen Verbreiterung nur eine mittlere Kopplungskonstante verwendet. Die Kopplungskonstante S_j für eine Mode j (Frequenz ν_j) ist von der Verschiebung Δ_j des Potentials entlang der Normalkoordinate q_j vom elektronischen Grund- zum Anregungszustand (Cupane et al. 1995) abhängig:

$$S_j = \frac{h}{2} \nu_j \Delta_j^2 \quad (59)$$

Abb. 7.5 stellt dies für eine Mode mit schwacher und starker Kopplung dar. Nach dem Franck-Condon-Prinzip koppelt eine Mode, bei der sich das Potential bei der Anregung verschiebt, stärker an den elektronischen Übergang. Die Werte der Kopplungskonstanten für Moden, die als hochfrequente Moden in die Auswertung von Spektren nach Gl. (9) eingehen, liegen um drei Größenordnungen höher als die Kopplung an das dichte, niederfrequente Modenspektrum (vgl. Tab. 5.4). Letztere sind im Absorptionsspektrum daher nicht sichtbar.

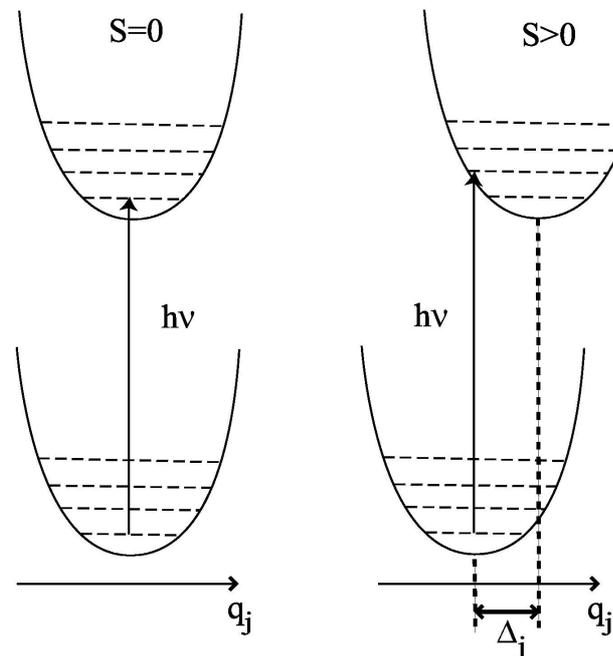


Abb. 7.5: Schwache ($S\approx 0$) und starke ($S>0$) Kopplung einer Mode an einen optischen Übergang $h\nu$. Erst durch die Verschiebung Δ_j entlang der Normalkoordinate q_j wird die Absorption unter Änderung der Vibrationsquantenzahl ermöglicht.

Die Kopplungskonstante für MbCO ist in Glycerin/Wasser fast gleich der von MbCO in Trehalose. Die mittlere Kopplungskonstante aus dem Modell, das das gesamte Normal-

Moden-Spektrum verwendet, ist für Mbdeoxy größer als die von MbCO. Strukturell kann man die unterschiedliche Kopplung durch die unterschiedliche Fixierung der Häm-Gruppe und damit verbunden insbesondere des Häm-Eisens in MbCO und Mbdeoxy erklären. Einen wesentlichen Beitrag zur Kopplung der niederfrequenten Moden an den Übergang der Soret-Bande liefern Bewegungen des Eisens gegenüber der Häm-Ebene (Melchers et al. 1996). Es ist zu vermuten, dass im Falle des Mbdeoxy, bei dem das Eisen nur einfach ligandiert ist, die Koordinatenänderung beim optischen Übergang größer ausfällt als in MbCO. Dies entspricht einer stärkeren Kopplung der niederfrequenten Moden an den Übergang (vgl. Abb. 7.5). Das Cytochrom-c ist in dieser Interpretation ein Extremfall, bei dem die Kopplung der niederfrequenten Moden durch die zweifache Ligandierung durch das Protein stark unterdrückt ist.

Zusammenfassend kann man die Temperaturabhängigkeit der Gauß-Breite der Soret-Bande folgendermaßen interpretieren: Die im Rahmen der harmonischen Theorie erklärable Gauß-Breite ist ein Maß für die thermische Anregung der niederfrequenten Moden. Der Temperaturverlauf ermöglicht einen Vergleich des strukturellen Freiraums des Chromophors im Protein.

7.1.3 Relaxation des photoinduzierten metastabilen Zustands

Der metastabile Zustand $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ kann durch die Analyse der optischen Spektren im Einklang mit den Ergebnissen aus der Röntgenstrukturanalyse (Ostermann 2000) und Raman-Spektroskopie (Engler et al. 2000) charakterisiert werden: Neben der Form des Spektrums, die charakteristisch für ein sechsfach koordiniertes Häm-Eisen ist (vgl. Abb. 5.12), sind auch die Kopplungskonstanten ein klares Indiz dafür (Tab. 5.4). Die Kopplungskonstanten für die hochfrequenten Moden ergeben Werte ähnlich denen des sechsfach ligandierten MbCO-Zustands und weichen von denen des fünffach ligandierten Mbdeoxy-Zustands ab (vgl. Tab. 5.4). Die Kopplungskonstanten stimmen fast alle gut mit den Werten aus der Raman-Spektroskopie überein. Lediglich die Kopplungskonstanten der Moden bei 673cm^{-1} , 1000cm^{-1} und 1605cm^{-1} benötigen eine nähere Betrachtung. Die Kopplungskonstante der Mode bei 673cm^{-1} aus der Resonanz-Raman-Spektroskopie ist doppelt so groß, wie die aus den optischen Spektren bestimmte. In der mit Raman-Spektroskopie untersuchten Probe ist ein beträchtlicher Anteil an Mbdeoxy beobachtet worden. Die stärkere Kopplung kann man durch die Anregung des Mbdeoxy-Anteils erklären. Die Mode bei 1000cm^{-1} ändert ihre

Kopplungskonstante während der Relaxation. Sie repräsentiert mehrere Schwingungsmoden der Vinyl-Gruppen des Häms, die mit dem Protein in Kontakt sind. Alle anderen Kopplungskonstanten sind durch die Relaxation nahezu unbeeinflusst. Die strukturelle Interpretation der Relaxation hat dies zu berücksichtigen. Die Kopplungskonstante der Mode bei 1605cm^{-1} aus der Raman-Spektroskopie ist nur halb so groß wie die aus der Analyse der Absorptionsspektren. In der Analyse der Raman-Daten wurde nur diese eine Bande berücksichtigt, während andere schwach koppelnde Moden in einem weiteren Bereich im optischen Spektrum zusammen die etwas höhere Kopplungskonstante erklären können.

Die Temperaturabhängigkeit der elektronischen Übergangsfrequenz (Abb. 5.14A) zeigt einen irreversiblen Verlauf. Der metastabile Zustand kann mit steigender Temperatur zunehmend größere Energiebarrieren überwinden und somit in Richtung des Gleichgewichts relaxieren. Eine analoge Verschiebung beobachtet man im photolysierten Mb*CO. Als mögliche Ursache für diese Relaxation wurde die elektrostatische Wechselwirkung mit der Umgebung der Häm-Gruppe diskutiert (Franzen und Boxer 1997). Kleine Strukturänderungen in der Häm-Tasche können dabei über das π -Elektronensystem der Häm-Gruppe die Übergangsfrequenz ändern (Kushkuley und Stavrov 1996). Da dies nicht notwendigerweise die Vibrations-Moden beeinflusst, können die Kopplungskonstanten unbeeinflusst sein. Eine mögliche strukturelle Erklärung wäre die Verschiebung der Häm-Gruppe relativ zum Protein. Dies ist der hauptsächliche Strukturunterschied zwischen den ligandierten und unligandierten Formen von Myoglobin (Vojtechovsky et al. 1999). Die Verschiebung der Häm-Ebene wurde auch für den Ligandierungswechsel in H64V-Met-Myoglobin gefunden (Abschnitt 7.1.1).

Die Kopplung an niederfrequente Moden führt zu einer Gauß-Verbreiterung der Spektren. Interessanterweise ist die Gauß-Breite nicht durch die Relaxation beeinflusst, sondern ist für alle Temperaturreihen gleich. Man würde nun erwarten, dass die Temperaturabhängigkeit der für MbCO beobachteten gleich ist. Überraschenderweise ist der Verlauf dem des unligandierten Zustands Mbdeoxy ähnlich. Vergleicht man die Temperaturabhängigkeit der elektronischen Übergangsfrequenz mit der Gauß-Breite (Abb. 5.14), so sieht man eine Übereinstimmung der beiden Verläufe. Der Anstieg der Gauß-Breite mit steigender Temperatur kann durch die thermische Anregung niederfrequenter Moden erklärt werden (Abschnitt 7.1.2). Die Korrelation der beiden Kurven legt nahe, dass durch die thermische Aktivierung niederfrequenter Moden die Relaxation erfolgen kann.

Aus der Temperaturabhängigkeit der elektronischen Übergangsfrequenz kann man eine Relaxationsfunktion berechnen (Lamb et al. 1998a):

$$\Phi(T) = \frac{v_{0,1}(T) - v_{0,4}(T)}{v_{0,1}(20\text{K}) - v_{0,4}(20\text{K})} \quad (60)$$

Dabei steht $v_{0,1}(T)$ bzw. $v_{0,4}(T)$ für die elektronische Übergangsfrequenz der ersten, bzw. vierten Temperaturreihe. In der folgenden Abbildung sind Relaxationsfunktionen aus Messungen am photosynthetischen Reaktionszentrum (*Rhodobacter sphaeroides*, McMahon et al. 1998) zum Vergleich dargestellt. Diese Relaxationsfunktionen wurden aus der Elektronen-Transfer-Kinetik bestimmt. Dabei wurde der Elektronen-Transfer vom primären Chinon zurück zum Spezialpaar bei entferntem sekundären Chinon als Funktion der Temperatur, Belichtung beim Kühlen und Aufwärmrate gemessen. Durch Beleuchten des Reaktionszentrums beim Abkühlen wird das Protein in einer licht-adaptierten Konformation eingefroren. Beim Aufwärmen kann es dann relaxieren, was als Änderung der Elektronen-Transfer-Kinetik messbar ist.

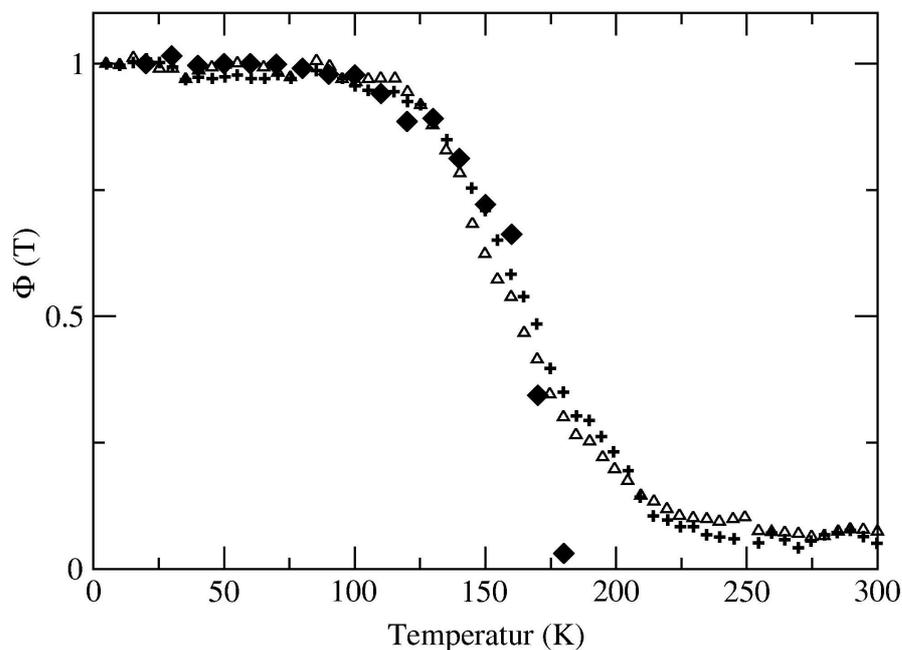


Abb. 7.6: Relaxationsfunktion des metastabilen Zustands Fe(II)MbH₂O (◆) im Vergleich zu Messungen am Photosystem (McMahon et al. 1998, Aufwärmraten 1.3mK/s (△) und 13mK/s(+)).

Die Relaxationsfunktionen wurden von McMahon et al. (1998) mit einer Summe von vier Gauß-Verteilungen für Relaxationsbarrieren angepasst. Die vier Gauß-Verteilungen wurden als vier Hierarchie-Ebenen von Konformationssubzuständen, die durch die Temperatur

separiert sind, interpretiert. Die Übereinstimmung der Relaxationsfunktionen im Temperaturbereich bis 170K legt nahe, dass dieser Temperaturbereich für den metastabilen Zustand Fe(II)MbH₂O durch die zwei niedrigen Hierarchie-Ebenen beschrieben werden kann. Die Relaxation in den beiden Hierarchieebenen mit höheren Energiebarrieren werden bei der Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands nicht beobachtet. Diese entsprechen auch vom Temperaturbereich ($T > 160\text{K}$, bzw. $T > 250\text{K}$) eher der Relaxation vom metastabilen Zustand zum Gleich-gewichtszustand Mbdeoxy ($T > 160\text{K}$). Wie die Autoren der Studie am Reaktionszentrum (McMahon et al. 1998) bemerken, kann eine Relaxationsfunktion wie in Abb. 7.6 aus Messungen an MbCO nicht bestimmt werden, da die Rückbindung des Liganden der möglichen Protein-Relaxation überlagert ist. Die Autoren vermuten dennoch eine allgemeine Bedeutung der vier Relaxationsprozesse in Proteinen. Die Methode der Erzeugung eines Nicht-Gleichgewichtszustands durch Reduktion des aktiven Zentrums, wie hier für das Beispiel Myoglobin gezeigt, schließt diese Lücke.

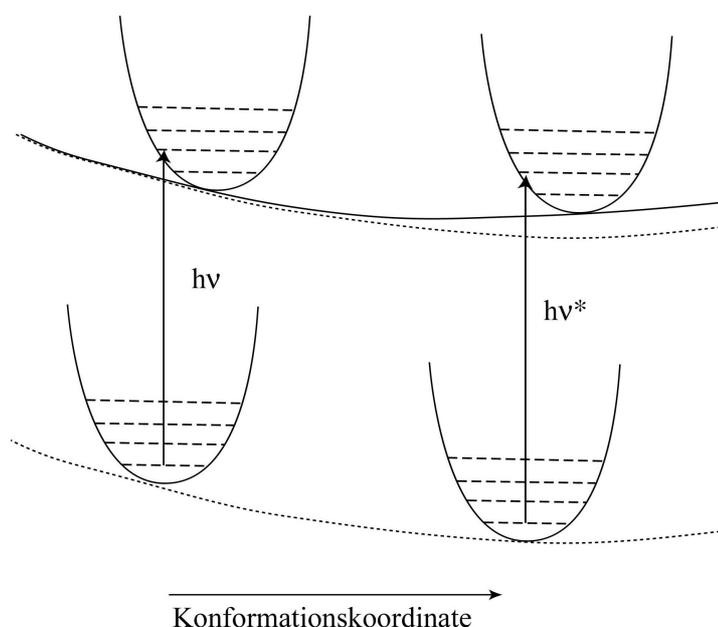


Abb. 7.7: Schematische Darstellung der Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands. Senkrechte Pfeile bezeichnen die optischen Übergänge ($h\nu$: Übergang direkt nach der Reduktion, $h\nu^*$: nach Relaxation). Das Potential entlang der Konformationskoordinate ist für den angeregten Zustand (durchgezogen) und den Grundzustand (gestrichelt) dargestellt. Man beachte, dass sich die Normal-Koordinaten der in der Parabel dargestellten Normal-Moden von der Konformationskoordinate unterscheiden.

Die Relaxation des metastabilen Zustands entlang einer verallgemeinerten Konformationskoordinate lässt sich durch Abb. 7.7 darstellen. Eine mögliche Konformations-Koordinate wäre zum Beispiel die Position des Häms relativ zum Protein. Die Energielandschaft für den angeregten und den Grundzustand müssen sich entlang der

Konformations-Koordinate unterscheiden, sonst wäre keine Änderung der Übergangsfrequenz zu beobachten. Die Form des Potentials entlang der Normal-Koordinaten (in Abb. 7.7 durch die kleinen Parabeln dargestellt) bestimmt die Modenfrequenz. Die Verschiebung der Parabeln zwischen Grund- und Anregungszustand entlang der Normal-Koordinaten bestimmt die Kopplungskonstanten. Die Ergebnisse der optischen Spektroskopie zeigen, dass beide während der Relaxation als konstant betrachtet werden können.

Mit diesen Ergebnissen lässt sich das Bild der Relaxation von Myoglobin nach photoinduzierter Reduktion folgendermaßen zusammenfassen: Der sechsfach ligandierter, metastabiler Zustand $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ befindet sich direkt nach Reduktion in einer Struktur, die Mbmet gleicht (Ostermann 2000) und MbCO ähnelt, nicht im Gleichgewicht. Die strukturelle Fixierung der Häm-Gruppe im Protein ist allerdings weniger stark und ähnelt der von Mbdeoxy. Eine Relaxation innerhalb des Zustands ist mit steigender Temperatur zu beobachten. Vermutlich handelt es sich dabei um die Akkomodation des Häms innerhalb der Proteinhülle, die durch die thermische Anregung niederfrequenter Moden ermöglicht wird. Diese Relaxation geht der Relaxation des metastabilen Zustands zu Mbdeoxy ab 160K voraus. Bei der letzteren geht der Ligand irreversibel verloren. Das Wasser kann dann wahrscheinlich eine Position in der Häm-Tasche einnehmen, die auch im Gleichgewichtszustand Mbdeoxy besetzt ist (Ostermann 2000).

Die enzymatische Funktion von Myoglobin als NO-Fänger (vgl. Einleitung) verlangt das effiziente Zusammenführen der Reaktanden NO und O_2 . Brunori (2001a) und Frauenfelder et al. (2001) vermuten, dass die Hohlräume in Myoglobin dabei eine wichtige Rolle spielen (vgl. Abb. 7.11). Für den Reaktionsmechanismus von MbO_2 mit NO wird vermutet, dass bei am Eisen gebundenem O_2 das NO in Hohlraum 1 gespeichert wird und die beiden Moleküle zur Reaktion zusammentreffen. Um von Hohlraum 1 nach Hohlraum 4 zu gelangen, ist eine Verschiebung der Häm-Gruppe als Mechanismus möglich.

7.2 Wasserstoffatome: Positionen und Dynamik aus Neutronenstreuung

Die herausragende Eigenschaft der Kristallographie mit Neutronen ist die Lokalisierung von Wasserstoffatomen. In Proteinen gibt es zwei Hauptgruppen von Wasserstoffatomen. Zum einen sind dies die in vorwiegend kovalenten Bindungen befindlichen Wasserstoffatome, die

nicht ausgetauscht werden können. Ist das Protein nicht gentechnisch volldeutert, so liegen diese als ^1H Isotop vor. Zum anderen sind es die Wasserstoffatome, die sich in vorwiegend polaren Bindungen befinden und mit dem Lösungsmittel von ^1H zu ^2H ausgetauscht werden können. Neben den Amidprotonen des Protein-Rückgrates sind dies Wasserstoffatome in den Seitenketten (vgl. Anhang 8.1). Die Verteilung der Wasserstoffatome des Proteins ist aus Tab. 6.1 und Tab. 6.6 ersichtlich.

7.2.1 Verbesserung der Sichtbarkeit von ^1H -Atomen

Wie in Abschnitt 6.3 gezeigt, können Streudichtemappen korrigiert werden, so dass die Positionen der ^1H -Atome deutlicher sichtbar werden. Dabei sind im wesentlichen zwei Effekte zu betrachten, die eine gemeinsame Ursache haben. Zum einen führt die positive Streulänge, z.B. für ein Kohlenstoffatom und ein benachbartes Wasserstoffatom mit negativer Streulänge, zu einer teilweisen Auslöschung der Dichte. Dies wurde schon von Kossiakoff und Spencer (1981) diskutiert. Der geringe Abstand der beiden Atome von ca. 1Å und die Auflösung der Messung von 1.5Å führen zu einer Interpolation der Dichte. Die Maxima der negativen Streudichte liegen dadurch nicht am Ort des Wasserstoffatoms, sondern, entlang der Bindung verschoben, weiter weg. Mit sinkender Auflösung der Messung und steigendem B-Faktor der Atome verstärkt sich dieser Effekt. Damit lassen sich aber die unerwarteten, negativen Dichten in den rein synthetischen Dichtemappen, bei denen nur Atome mit positiver Streuung berücksichtigt wurden, nicht erklären (vgl. Abb. 6.2). Diese sind „Fourier-Artefakte“, die durch das Abschneiden der Fouriertransformation bei der maximalen gemessenen Auflösung verursacht werden. Die Begrenzung der Auflösung ist also die zugrunde liegende gemeinsame Ursache.

Die Entstehung der „Fourier-Artefakte“ kann man schon für ein einzelnes C-Atom verstehen. Abb. 7.8 zeigt die Streuung eines Atoms im Vergleich für die Streuung von Röntgenstrahlung und Neutronen für verschiedene B-Faktoren. Bei einem B-Faktor von 10Å^2 ist die Streuung für Neutronen bei einer Auflösung von 1.5Å noch nicht auf Null abgefallen. Die Betrachtung der Fouriertransformation bei einer negativen Konturierung der Streudichtemappen zeigt dann die Artefakte. Bei größerem B-Faktor ist dieses Problem nicht mehr zu beobachten. Betrachtet man Elektronendichtemappen aus der Röntgenstrukturanalyse bei einem negativen Konturniveau, so ist ebenfalls negative Streudichte zu beobachten. Allerdings ist dies schon bei einem B-Faktor von 10Å^2 weniger ausgeprägt, da der Atomformfaktor für

Röntgenstreuung im Gegensatz zur Streulänge für Neutronenstreuung winkelabhängig ist. Bei größerem B-Faktor ist der Unterschied zwischen Neutronen- und Röntgenstreuung nur noch klein.

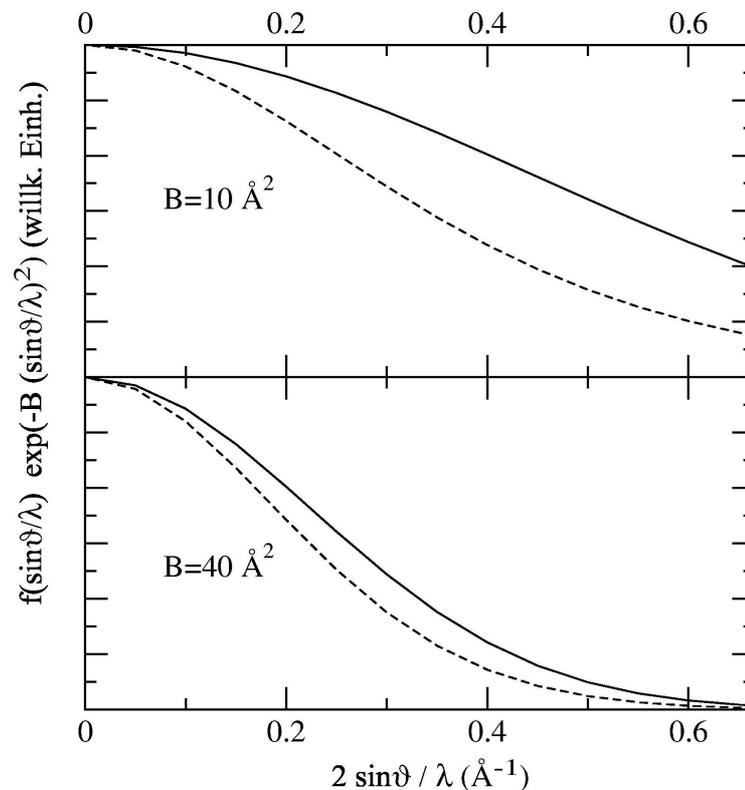


Abb. 7.8: Vergleich der Streuung eines C-Atomes für Neutronen- (durchgezogene Linie) und Röntgenstrahlung für verschiedene B-Faktoren ($B = 10 \text{ \AA}^2$ entspricht $\langle x^2 \rangle = 0.13 \text{ \AA}^2$). Der rechte Rand der Abbildung entspricht einer Auflösung von 1.5 \AA .

Die Messung der Strukturformfaktoren entspricht einer Fourieranalyse der zugrundeliegenden Streudichte. Die Auflösung der Struktur entspricht der kürzesten Wellenlänge bzw. der höchsten Frequenz der Fourieranalyse. Durch die Begrenzung der Auflösung werden höhere Frequenzen der Fourieranalyse nicht berücksichtigt. Dies ist die Interpolation der Streudichte in Abständen, die der Auflösung entsprechen, äquivalent (Weaver 1989). Ändert sich die Streudichte nun in Abständen, die kleiner als die gemessene Auflösung sind, so weicht die Fouriersynthese, also die berechnete Streudichtemappe, davon ab. Dabei können diese Änderungen einfach verloren gehen, was dem „Auslöschen“ von Streudichte entspricht, oder es treten die oben erwähnten „Fourier-Artefakte“ auf. Diese würden bei einer vollständigen Fouriersynthese durch die Strukturformfaktoren mit Frequenzen, die größer sind als die Auflösung, ausgeglichen werden.

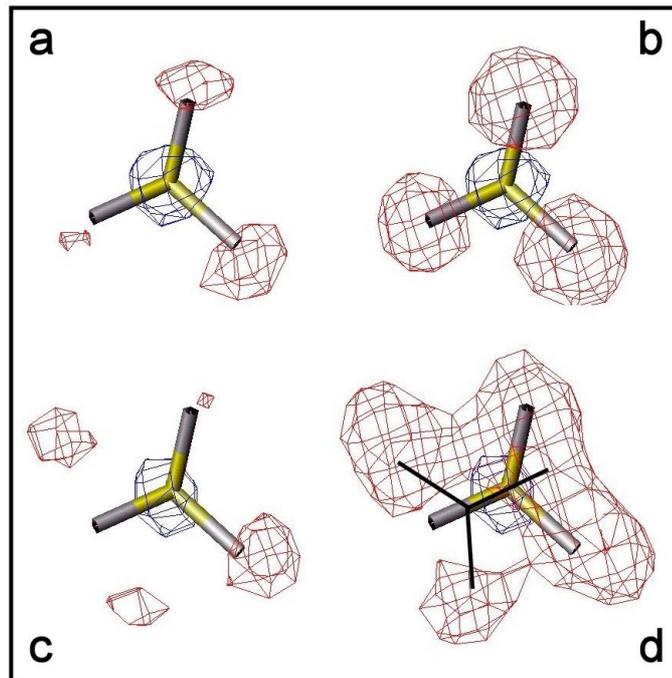


Abb. 7.9: Korrektur von Dichtemappen und Sichtbarkeit von ^1H -Atomen am Beispiel einer Methyl-Gruppe des Häms (Pfeil in Abb. 6.3). Unkorrigierte (a) und korrigierte (b) F^c -Streudichtemappe. Unkorrigierte (c) und korrigierte (d) $2F^o-F^c$ -Streudichtemappe und mögliche Doppellage (d: schwarze Linien). blau: Konturierung bei $0.27 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{\AA}^3$ (absolut skaliert, entspricht 1.8σ), rot: $-0.13 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{\AA}^3$ (entspricht -1.5σ).

Die Subtraktion der Dichtemappen der positiven Streuer ist wegen der Linearität der Fouriertransformation zulässig. Die Dichtemappen, die aus Atomen mit positiver Streuung berechnet werden, bestehen zum größten Teil aus dem mit hoher Präzision bekannten Röntgenstrukturmodell. Sie sind daher weitgehend fehlerfrei. Die korrigierten Streudichtemappen dienen aber nicht nur dazu „schönere Bilder“ zu berechnen. Sie ermöglichen auch eine Beurteilung der aus der Verfeinerung erhaltenen Struktur. Als Beispiel zeigt Abb. 7.9 eine Methylgruppe, die in Abb. 6.3b mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Die Verbesserung der Sichtbarkeit der ^1H -Atome für eine synthetische Dichtemappe ist in der ersten Zeile gezeigt. Führt man die Korrektur für die $2F^o-F^c$ -Dichtemappe durch, so erkennt man eine Doppellage der Methylgruppe. Die zweite Lage ist in Abb. 7.9d skizziert. Aufgrund der unkorrigierten Dichtemappe in Abb. 7.9c ist eine Interpretation schwer möglich.

Shu et al. 2000 führen die zum Teil schlecht interpretierbaren negativen Streudichtemappen als ein wichtiges Argument für die Verwendung von volldeuterten Proteinen zur Neutronenstrukturanalyse an. Bei einer Auflösung von 2.0\AA diskutieren die Autoren dieser Studie Streudichtemappen von Phenylalanin 43. Zum Vergleich sind in der folgenden

Abbildung die unkorrigierte und korrigierte 2F^o-F^c-Dichtemappe bei einer Auflösung von 1.5Å dargestellt.

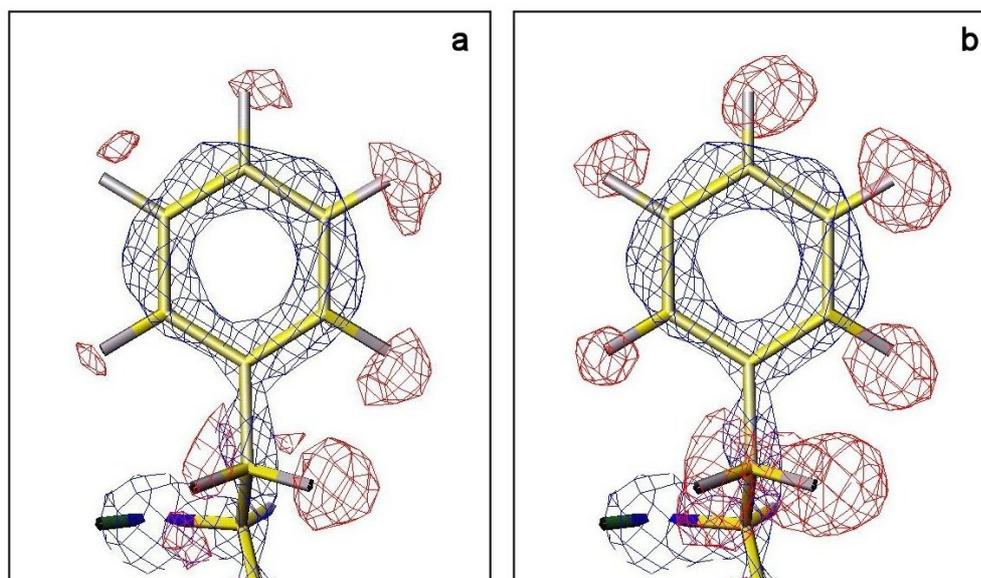


Abb. 7.10: Unkorrigierte (a) und korrigierte (b) 2F^o-F^c-Streudichtemappe für Phenylalanin 43. blau: Konturierung bei $0.27 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{Å}^3$ (absolut skaliert, entspricht 1.8σ), rot: $-0.13 \times 10^{-12} \text{cm}/\text{Å}^3$ (-1.5σ).

In der Diskussion der Ergebnisse von Shu et al. 2000 wird aber auch eine Lösung des Problems angedeutet: eine höhere Auflösung der Messung. Die Autoren sind aber der Meinung, dass eine Auflösung, die das Problem löse, für Proteine normalerweise nicht erreichbar sei. Die Kombination der höheren Auflösung von 1.5Å und der Korrektur von Dichtemappen widerlegt dies eindrucksvoll. Das Hauptargument für eine vollständige Deuterierung, die Reduktion des Untergrunds durch die inkohärente Streuung von ¹H-Atomen und eine damit verbundene Verbesserung des Verhältnisses von Reflexintensität zu Untergrund, gilt natürlich nach wie vor (Abschnitt 2.2.3).

7.2.2 Wassermoleküle und Protonierung der Histidine in der Neutronenstruktur bei 20K im Vergleich zu 300K

Die Zahl und Position der in Neutronen- (20K) und Röntgenstruktur (105K, Ostermann 2000) gefundenen Wasser stimmen sehr gut überein (Kapitel 6.1). Fast alle Wasser, die bei Raumtemperatur in der Röntgenstruktur gefunden wurden, konnten in der Neutronenstruktur bei 20K selbst bei 2.1Å als vollständige Wassermoleküle modelliert werden. Dabei ist die

Betrachtung der Streudichte aus der Messung bei 20K aufgrund der großen B-Faktoren nicht immer eindeutig. Es sind mehrfache Lagen zu beobachten. Geordnete Wassermolekül-Netzwerke an der Proteinoberfläche bedürfen daher einer Interpretation unter Berücksichtigung der bevorzugten Geometrie für Wasserstoffbrücken. Die beiden Neutronenstrukturen von Myoglobin können als ein Startpunkt für weitergehende Analysen verwendet werden. Im Folgenden werden einige wenige, dafür aber umso bedeutsamere Wassermoleküle in Protein-Hohlräumen betrachtet. Die folgende Abbildung zeigt das Myoglobin-Molekül einmal als Bänder-Modell und einmal als Stäbchenmodell. In beiden Fällen sind Hohlräume im Protein als grüne Volumina dargestellt. Zur Berechnung des Volumens wird eine Probekugel verwendet, durch deren Radius man festlegt, welche Hohlräume gefunden werden.

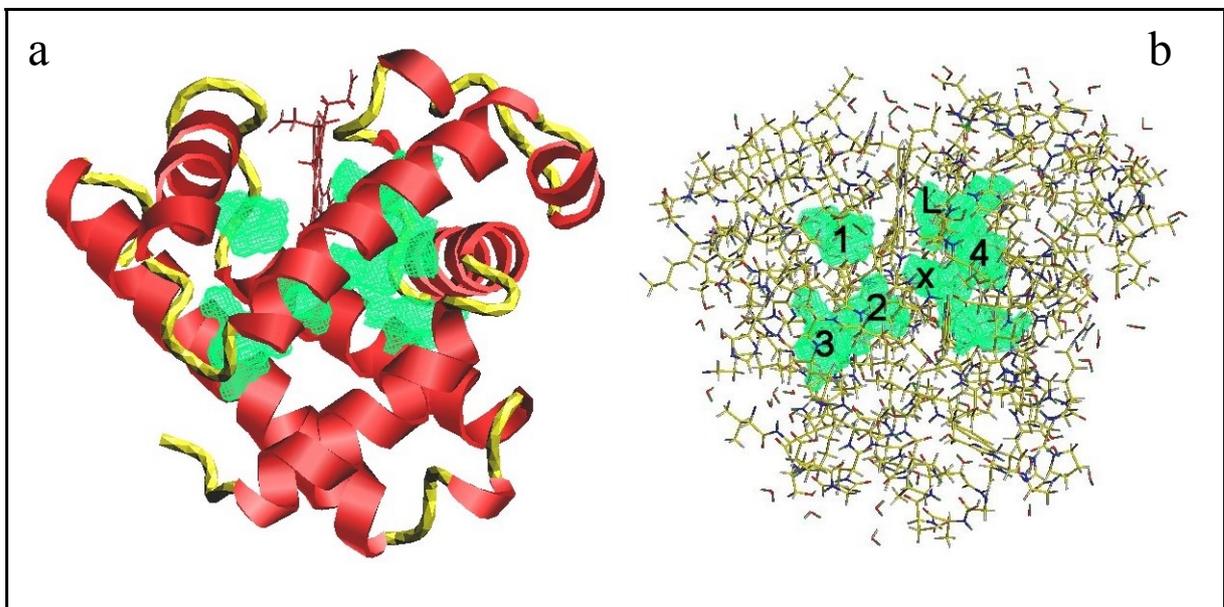


Abb. 7.11: Myoglobin und die Hohlräume (grün). a: Bändermodell und Häm-Gruppe. b: Stäbchenmodell mit Wasserstoffatomen. Nummern der Hohlräume entsprechen den Orten an denen ein Xenon-Atom untergebracht werden kann (nach Tilton et al. 1984). L: Hohlraum in dem sich der Ligand befindet. X: hier wurde bei 20K ein Wassermolekül gefunden. Die Hohlräume wurden mit dem Programm „Voidoo“ berechnet (Kleywegt und Jones 1994).

Die getrennten Hohlräume 1, 2 und 3 wurden mit einer Probekugel von 0.8\AA , der Hohlraum 4, der auch die Positionen „L“ und „X“ umfasst, wurde mit einer Probekugel von 0.6\AA berechnet. Hohlraum 4 wurde auch mit einem Probenradius von 0.8\AA gefunden, er endet dann unterhalb der Position „X“ und ist rechts von „L“ weniger ausgedehnt (bzgl. Abb. 7.11). Die Verwendung des kleineren Probenradius zeigt die Zugänglichkeit weiterer Hohlräume, die für den Austausch der Amidprotonen von Bedeutung ist. Die dargestellten Hohlräume, sowie

weitere wurden bereits von Lee und Richards (1971) gefunden. Schon in der Arbeitsgruppe von Kendrew wurde erkannt, dass in Myoglobin Xenon-Atome untergebracht werden können (Schoenborn et al. 1965) und später genauer analysiert (Tilton et al. 1984). Die vier Orte, an denen ein Xenon-Atom in der Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden konnte, sind in Abb. 7.11 nummeriert. Zu besonderer Bedeutung kamen diese so genannten Xenon-Löcher durch den Nachweis von Intermediaten nach der Blitzlicht-Photolyse von MbCO (Brunori et al. 2000; Chu et al. 2000; Ostermann et al. 2000). Eine Frage, die sich somit unmittelbar bei der Strukturaufklärung mit Neutronen aufdrängt, gilt der möglichen Besetzung der Hohlräume mit Wassermolekülen. In Hohlraum 3 beobachtet man auch in der Röntgenstrukturanalyse bei 1.5Å zwei Wassermoleküle. Die folgende Abbildung zeigt diese in der Neutronenstruktur bei 20K und bei 300K.

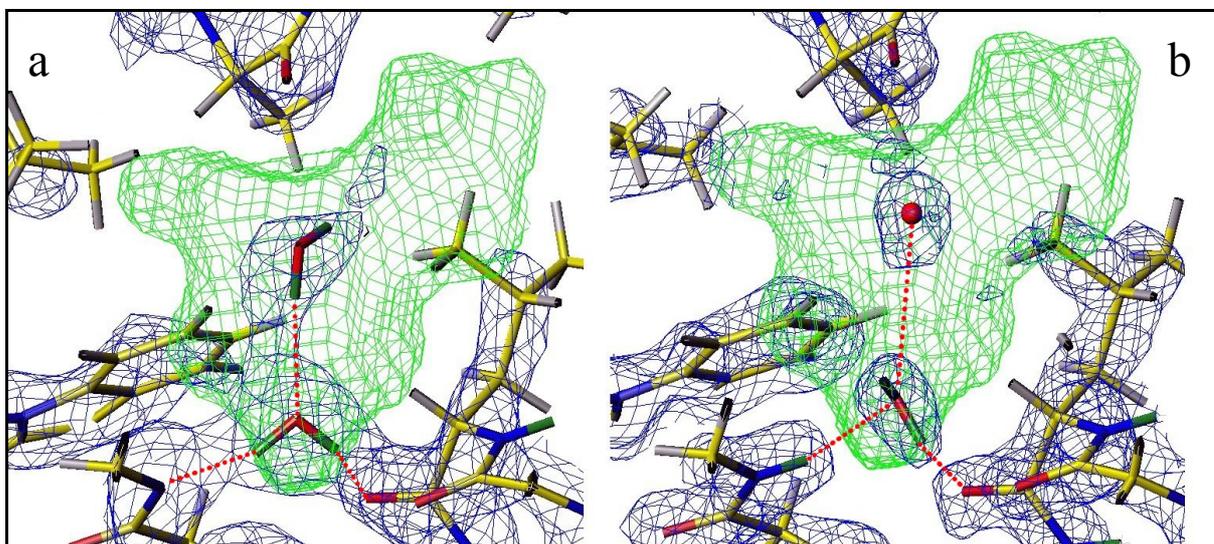


Abb. 7.12: Wasser (rote Kugel und rot-grüne D₂O-Moleküle) und 2F^o-F^c-Streudichte (blau, Konturniveau 1.5σ) in Hohlraum 3 (grün, Nummerierung nach Abb. 7.11) bei 20K (a) und 300K (b). Wasserstoffbrücken sind rot gepunktet.

Bei 20K ist die Streudichte für beide Wassermoleküle als vollständiges D₂O-Molekül interpretierbar. Bei 300K ist das in Abb. 7.12 als rote Kugel (im Folgenden als Nr. 1 bezeichnet) dargestellte Wassermolekül nicht eindeutig orientiert. Die Orientierung des anderen Wassermoleküls (im Folgenden als Nr. 2 bezeichnet) unterscheidet sich in der Ausrichtung eines D-Atoms. Bei 20K zeigt dieses D-Atom auf das Stickstoffatom des Proteinrückgrats von Aminosäure 80, bei 300K auf das N_δ-Atom des Histidin 82 (siehe Abb. 7.13). Das andere D-Atom zeigt in beiden Fällen auf das Sauerstoffatom des Rückgrats von Aminosäure 75. Die Position des O-Atoms des D₂O-Moleküls ist ähnlich. Zur Verdeutlichung ist die Struktur bei 300K in Abb. 7.13 in einer anderen Orientierung dargestellt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die jeweils andere Konformation zu einem Teil vorliegt.

Wahrscheinlich kann das Wasser zwischen beiden Konformationen wechseln, und man beobachtet bei der jeweiligen Temperatur eine bevorzugte Lage. Wasser 1 bildet eine Wasserstoffbrücke zum O-Atom von Wasser 2 aus. Damit ist ein D-Atom in seiner Position zwischen den beiden O-Atomen festgelegt. Das andere D-Atom ist bei 20K ausgerichtet. Für dieses ist keine Wasserstoffbrücke identifizierbar. Vermutlich führen die van-der-Waals und elektrostatische Wechselwirkungen zu der Orientierung. Bei Raumtemperatur sind diese zu schwach um eine eindeutige Orientierung des Wassermoleküls zu beobachten.

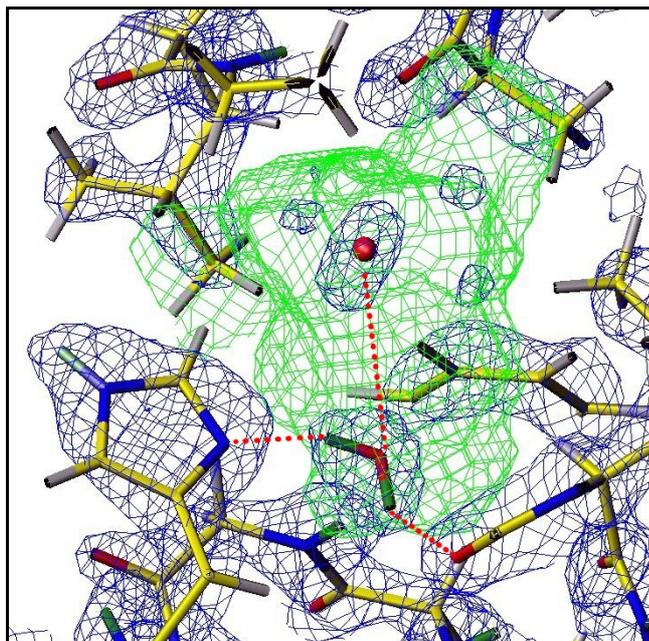


Abb. 7.13: Wasser (rote Kugel und rot-grüne D₂O-Moleküle) und 2F^o-F^c-Streudichte (blau, Konturniveau 1.5 σ) in Hohlraum 3 (grün, Nummerierung nach Abb. 7.11) bei 300K. Die Darstellung aus Abb. 7.12 ist hier um ca. 45° um die Achse durch die Sauerstoffatome der Wassermoleküle gedreht. Wasserstoffbrücken sind rot gepunktet.

In den anderen Hohlräumen beobachtet man bei 300K keine Streudichte, die man als Wassermolekül interpretieren kann. Bei 20K kann man dagegen Streudichte in Hohlraum Nr. 1 und dem mit „X“ bezeichneten Hohlraum beobachten. In Abb. 7.14 sind diese durch rote Kugeln markiert. In Hohlraum Nr. 1 beobachtet man ein CO-Molekül in einem Intermediat nach der Blitzlichtphotolyse von MbCO (Chu et al. 2000; Ostermann et al. 2000). Die Position von „X“ liegt in der Nähe von Position 4, an der ebenfalls bei einem Intermediat nach Photolyse ein CO-Molekül gefunden wurde (Brunori et al. 2000; Ostermann et al. 2000). In den anderen Hohlräumen beobachtet man keine Streudichte. Die möglichen Wassermoleküle aus Abb. 7.14 könnten einen Einfluß auf die Rückbindung des CO-Moleküles nach Blitzlicht-Photolyse (Brunori 2000) sowie auf die Reaktion von O₂ mit NO in Myoglobin (Brunori 2001a; Frauenfelder et al. 2001) haben.

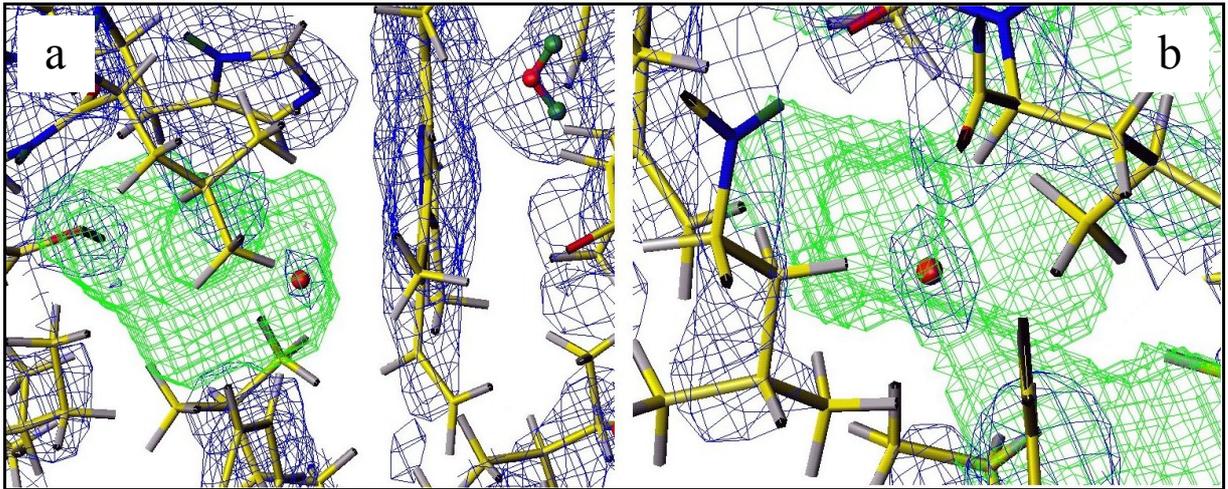


Abb. 7.14: Als Wasser (rote Kugel) interpretierte $2F^0-F^c$ -Streudichte (blau) in Hohlraum 1 (a, Konturniveau 1.2σ) und der mit „X“ bezeichneten Stelle in Hohlraum 4 (b, Konturniveau 1.5σ). Zur Bezeichnung der Hohlräume siehe Abb. 7.11.

Neben der Wasserstruktur sind bei der Struktur bei 20K Unterschiede in der Protonierung der Histidin-Seitengruppen zu beobachten. In Tab. 6.4 sind diese im Vergleich mit der Neutronenstrukturanalyse von volldeutertem Myoglobin (Shu et al. 2000) und Messungen mit magnetischer Kernresonanz (Bashford et al. 1993) zusammengefasst. Die pH-Werte für die Neutronenstrukturen sind leicht unterschiedlich. Der Puffer für die Messung bei 300K wurde auf einen Wert von 7.2 eingestellt, der für 20K auf einen Wert von 7.0. Die Messung von Shu et al. (2000) wurde bei pH 6.2 durchgeführt. Untersuchungen von Glasoe und Long (1960) zeigen, dass der mit einer pH-Elektrode gemessene Wert für den äquivalenten pD-Wert um 0.4 Einheiten nach oben zu korrigieren ist. Der Vergleich mit den pK-Werten aus der magnetischen Kernresonanz-Spektroskopie zeigt, dass in der Neutronenstrukturanalyse stets ein höherer Anteil an Protonierung der Histidine zu beobachten ist (Tab. 6.4). Eine Besonderheit stellen Histidin 24 und 119 dar. Diese teilen sich ein Deuteron, wie in Abb. 7.15 gezeigt. Bei 20K ist das Histidin 119 zusätzlich am N_δ -Atom protoniert. Die Abweichungen von 300K gegenüber 20K sind zusätzliche Protonierungen an den Histidinen 97, 113, 116, 119 bei tiefen Temperaturen und die Deprotonierung von Histidin 48. Die unterschiedlichen Protonierungen kann man mit der lokalen Wasserstruktur erklären. Die zusätzlichen Protonierungen bei 20K sind stets durch ein Wassermolekül stabilisiert. Bei Histidin 48 kann man vermuten, dass die Protonierung durch die Nähe eines Wassermoleküls ersetzt wird.

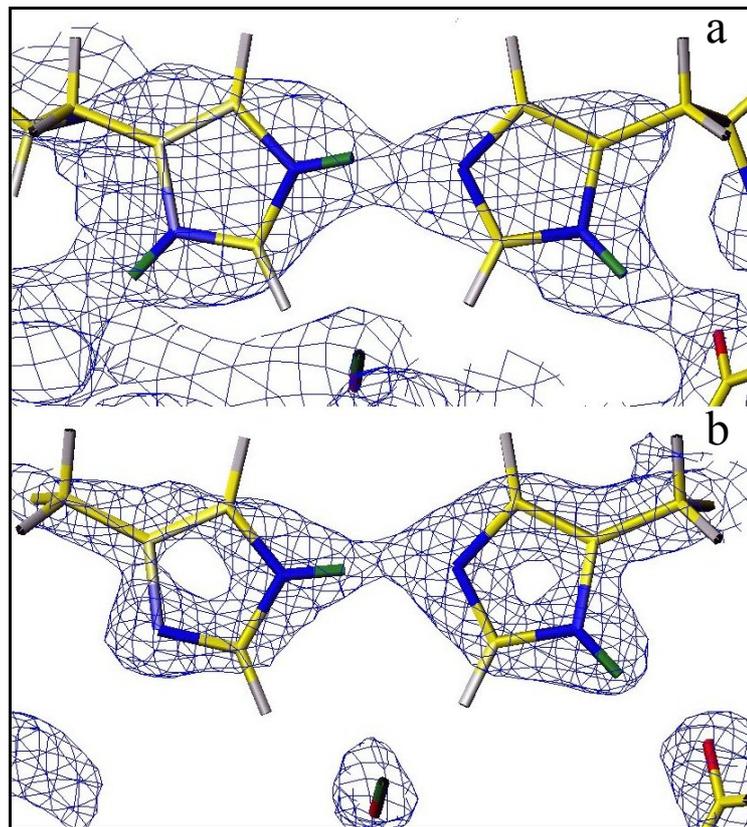


Abb. 7.15: Histidin 119 (links) und Histidin 24 teilen sich ein Deuteron. a: 20K. b: 300K. Konturniveau der blauen Streudichte: $+1.5\sigma$.

Die lokale Lösungsmittelstruktur bestimmt damit die Protonierung der Histidine. Der Einfluss der Temperatur auf die Protonierung ist damit durch den höheren Ordnungsgrad der Wassermoleküle zu erklären. Dies kann auch die Differenzen zur magnetischen Kernresonanz erklären. Kristallkontakte (Histidine 48, 119) können Wasser zusätzlich stabilisieren, was dann wiederum zu Protonierung führen kann. Eine Beurteilung der Protonierung insbesondere von Aminosäuren an der Proteinoberfläche muss daher unter Berücksichtigung der lokalen Struktur durchgeführt werden.

7.2.3 Vergleich der Wasserstoffatompositionen mit molekularmechanisch berechneten Positionen

Durch die Berechnung von Differenz-Dichtemappen, die in Kapitel 6.4 beschrieben wurde, kann man die Differenzen zwischen der molekularmechanischen Vorhersage und den experimentell bestimmten Wasserstoffatompositionen im Überblick für das ganze Protein betrachten. Um eine bessere Übersicht zu bieten, ist in der folgenden Abbildung die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche des Proteins dargestellt.

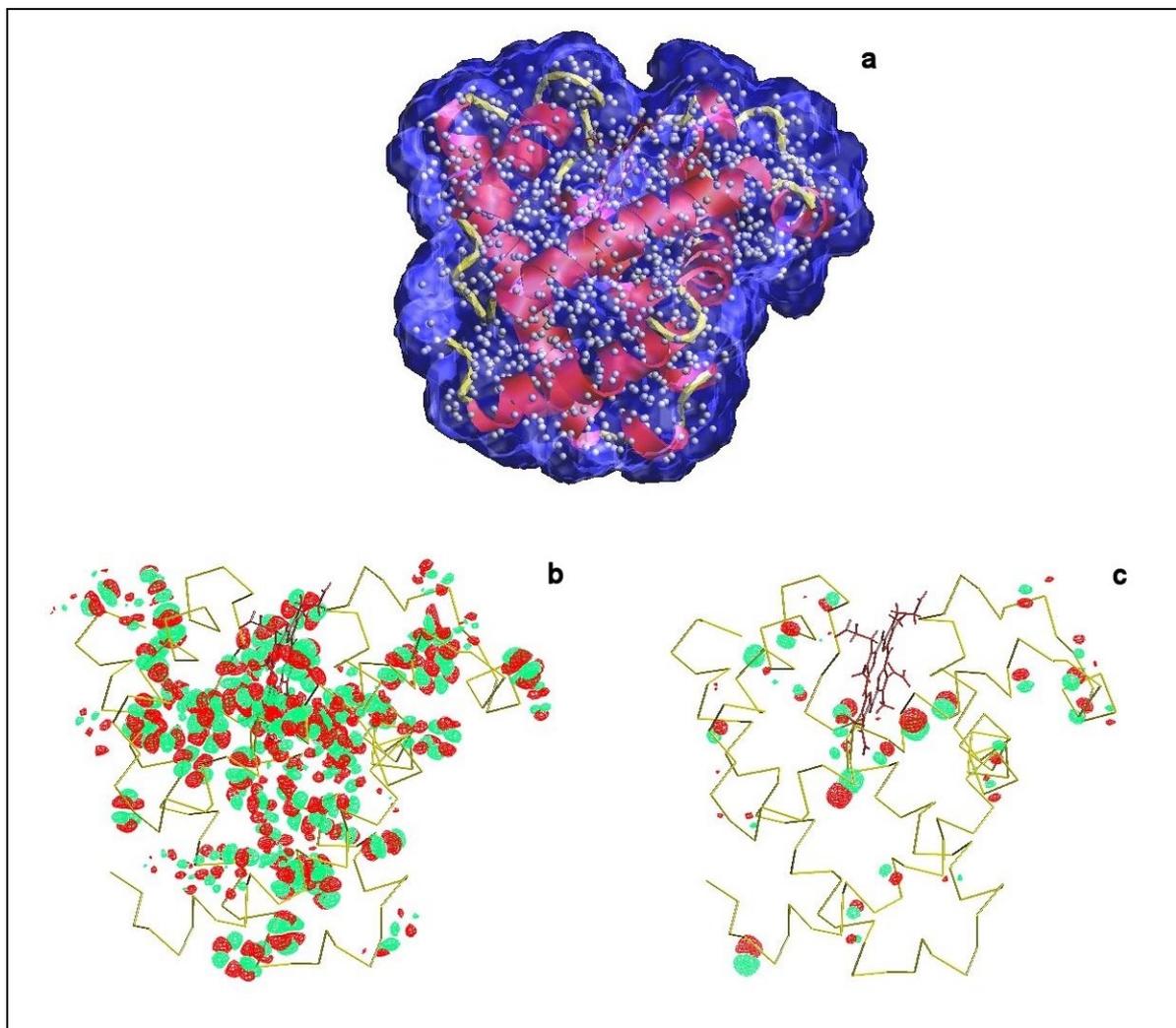


Abb. 7.16: Differenz-Dichtemappen im Überblick für das ganze Protein. a: Bänder-Modell von Myoglobin, die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (blau, mit dem Programm Voidoo berechnet, Kleywegt und Jones 1994) und Wasserstoffatome (graue Kugeln). b: Differenzdichtemappe für ^1H -Atome. Beim Übergang von experimenteller Struktur zur molekularmechanischen Vorhersage geht die Streudichte von roter zu grüner Streudichte über. c: Differenzdichtemappe für ^2H -Atome. Beim Übergang von experimenteller Struktur

zur molekularmechanischen Vorhersage geht die Streudichte von grüner zu roter Streudichte über. Sichtbare Differenzen entsprechen 0.1\AA und größer.

Die in Abb. 7.16 sichtbaren Differenzen entsprechen Koordinatendifferenzen von 0.1\AA und mehr. Die Differenzen sind für ^1H - und ^2H -Atome getrennt dargestellt. Bei den ^2H -Atomen sind die größten Differenzen für die Wasserstoffatome in den OH-Gruppen von Serinen und Threoninen zu beobachten. Dies wurde schon von Brünger und Karplus (1988) diskutiert. Diese Gruppen besitzen mehrere bevorzugte Lagen bezüglich der Rotation um die Achse O-C. Die Energieminimierung kann die experimentell bestimmte Lage nur unzureichend vorhersagen. Das Experiment zeigt, dass es in diesen Fällen jedoch eine eindeutig bevorzugte Lage gibt, die man auch in den Streudichtemappen beobachtet. McDowell und Kossiakoff (1995) konnten diese in einem Vergleich der Neutronenstruktur von Trypsin mit Positionen aus einer Molekular-Dynamik-Simulationen gut wiedergeben. Einige Beiträge liefern auch die ^2H -Atome an den Stickstoffatomen des Proteinrückgrates. Je nach lokaler Wasserstoffbrücken-Geometrie beobachtet man Abweichungen von der vorhergesagten Struktur. Die meisten Abweichungen treten an der Proteinoberfläche auf. Dort können Wassermoleküle als zusätzliche Wasserstoffbrücken-Partner konkurrieren.

Die Differenzen für die ^1H -Atome sind wesentlich stärker ausgeprägt. Um diese zu verstehen ist es sinnvoll, die Aminosäuren mit allen Wasserstoffatomen zu betrachten (im Anhang 8.1). Von den ca. 1000 ^1H -Atomen sind ca. 700 bei bekannten Atompositionen aus der Röntgenstrukturanalyse festgelegt, da sie keinen Freiheitsgrad besitzen. Die Differenzen rühren von der Rotationsfreiheit der Methylgruppen her und sind hauptsächlich im Proteininneren zu beobachten. Schon Kossiakoff und Spencer (1981), Wlodawer et al. (1984) und Kossiakoff und Shteyn (1984) stellten fest, dass die Mehrzahl der Methylgruppen in Proteinen eine eindeutige Orientierung aufweisen. Das bedeutet nicht, dass die Methylgruppen fixiert sind. Sie springen sehr schnell zwischen den um 120° gedrehten Positionen. Allerdings erfolgen die Sprünge so schnell, dass im Mittel in der Strukturanalyse eine Orientierung beobachtet wird (Kossiakoff und Shteyn 1984).

Die folgende Abbildung zeigt Histogramme für die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Koordinaten zwischen experimentellem und berechnetem Modell für die Methylgruppen und die ^2H -Atome im Proteinrückgrat. Letztere weisen eine schmale Verteilung mit wenigen Werten größer 0.2\AA auf. Die Methylgruppen hingegen weisen sehr

große Abweichungen auf: über 70% der Wasserstoffatome sind in der molekularmechanischen Vorhersage um mehr als 0.2\AA falsch positioniert.

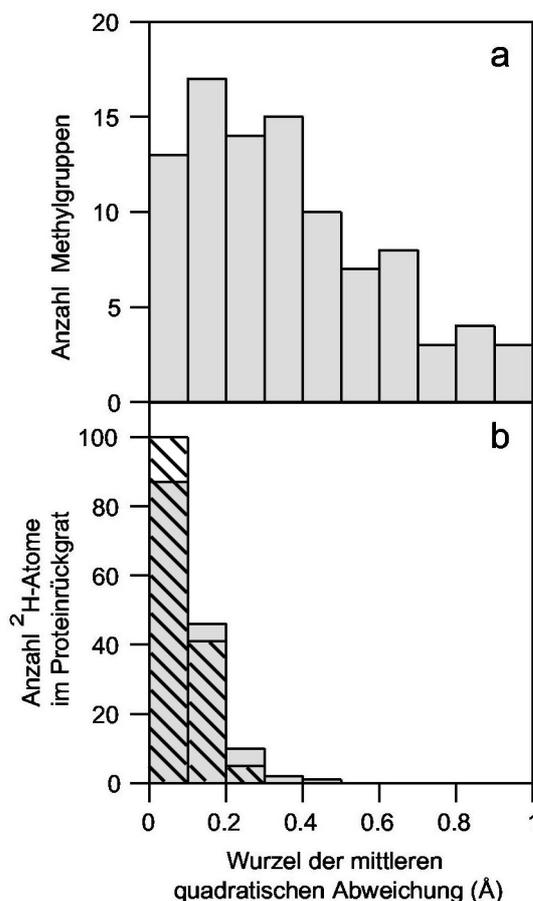


Abb. 7.17: Histogramme für die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung zwischen experimentellem Modell und molekularmechanischer Vorhersage. a: Methylgruppen b: ^2H -Atome im Proteinrückgrat für verschiedene Parameter der Planarität des 2H -Atoms in der Ebene der Peptidbindung: geringe Planarität (grau), starke Planarität (schraffiert).

Man halte sich vor Augen, dass der hier durchgeführte Test ein relativ einfaches Problem darstellt, da die überwiegende Mehrzahl der Koordinaten festgehalten ist (vgl. Tab. 6.1). Will man atomare Modelle zur Simulation der Dynamik oder gar der Faltung von Proteinen verwenden (Allen et al. 2001), so sollten die Methoden diesen einfachen Test bestehen. Die unzureichenden Potentialfunktionen sind auch nach Meinung von Baker und Sali (2001) ein Hindernis für die Weiterentwicklung der Strukturvorhersage für Proteine. Der hohe Wert der Neutronenstrukturanalyse liegt in der Bereitstellung der Daten, die zur Fortentwicklung der Modelle unter Einschluss der Wasserstoffatome verwendet werden können.

7.2.4 Dynamik der Wasserstoffatome

Bei kohärenter Streuung zur Strukturanalyse kann keine Unterscheidung zwischen statischen und dynamischen Auslenkungen der Atome getroffen werden. Dennoch kann man Informationen über das dynamische Verhalten von Proteinen erhalten. Die mittleren Auslenkungsquadrate sind in helikalen Bereichen des Proteins systematisch niedriger als in den Bereichen dazwischen (vgl. Abb. 6.7). In Abb. 6.6 ist aufgetragen, in welchen Aminosäuren die Wasserstoffe am Stickstoffatom des Proteinrückgrats (vgl. Abb. 1.4) von ^1H zu ^2H ausgetauscht sind. Die Aminosäuren, die nur einen geringen Austausch aufweisen, befinden sich in den Helices. Dies ist einfach einzusehen: Das Wasserstoffbrücken-Netzwerk in Helices ist geordnet (vgl. Abb. 1.4), was den Austausch behindert. Eine interessante Ausnahme bildet die F-Helix, die das proximale Histidin 93 enthält und dort die Häm-Gruppe bindet. Diese weist einen fast vollständigen Austausch auf. Im Gegensatz dazu zeigt die E-Helix, die das distale Histidin enthält, sehr unterschiedliche Austauschgrade.

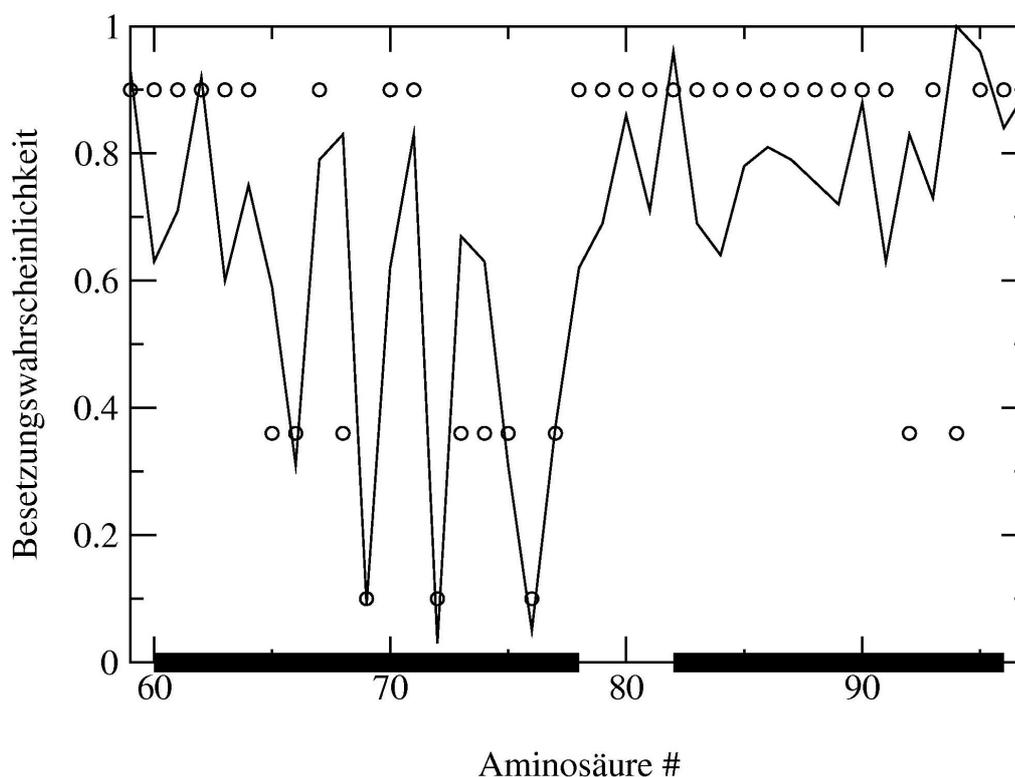


Abb. 7.18: Austausch der Amidprotonen für die E- und F-Helix (Balken auf der Abszisse). Ausgetauschte Protonen (^2H -Atome), durchgezogene Linien: 300K, offene Kreise: 20K (nur 3 Werte: 0, 0.36 oder 1, Werte von 0 auf 0.1 und von 1 auf 0.9 verschoben, um diese von den Achsen zu trennen).

Abb. 7.18 zeigt die Werte für die Strukturanalyse bei 20K und 300K. Die Werte für die Struktur bei 20K wurden aus der Betrachtung von $2F^o - F^c$ -Streudichtemappen ermittelt und es wurden nur drei mögliche Werte zugelassen: negative Dichte, gegenseitige Auslöschung oder positive Streudichte (vgl. Abschnitt 6.1). Im Rahmen der Qualität der Strukturanalyse bei 20K stimmen die Werte gut überein (vgl. auch Abb. 6.6). Die Kristalle für die Strukturanalyse bei 300K waren 10 Jahre, die für die Messung bei 20K hingegen 2 Wochen in deuteriertem Puffer gelagert worden. Der Austausch der Amidprotonen ist im Kristall, im Rahmen der Vergleichsmöglichkeit bei der unterschiedlichen Genauigkeit der Bestimmung in den beiden Strukturanalysen, nach zwei Wochen nahezu abgeschlossen (vgl. auch Abb. 6.6).

Im Folgenden werden die detaillierteren Werte aus der Neutronenstrukturanalyse bei 300K betrachtet. Die Aminosäuren Valin 66, Leucin 69, Leucin 72 und Leucin 76 weisen nur sehr geringen Austausch auf. Das Amidproton von Valin 66 befindet sich in gabelförmigen Wasserstoffbrücken mit den O-Atomen von Lysin 63 und Lysin 62. Die restlichen drei Aminosäuren zeigen sehr kurze Wasserstoffbrücken zu ihren in der Helix üblichen Partnern vier Aminosäuren in der Sequenz davor (Pauling et al. 1951). Die Wasserstoffbrücken befinden sich alle auf der von Hohlräumen abgewandten Seite (vgl. Abb. 7.11).

Li und Woodward (1999) beschreiben Mechanismen für den Austausch von Amidprotonen in Proteinen im nativen Zustand. Zum einen können Wassermoleküle in das Protein eindringen und somit einen Austausch ermöglichen. Zum anderen kann eine lokale Entfaltung von Sekundärstrukturelementen den Kontakt mit Wassermolekülen herbeiführen. Schliesslich ist eine Kombination dieser Mechanismen möglich.

Vojtechovsky et al. (1999) haben die anisotropen Debye-Waller-Faktoren von Myoglobin für die Häm-Gruppe, die E-Helix, die das distale Histidin enthält und die F-Helix analysiert. Dazu wurden die Helices und die Häm-Gruppe jeweils als starre Körper betrachtet und die Debye-Waller-Faktoren jeweils mit einem TLS-Modell angepasst (Translations-Librations-Schrauben-Modell, Schomaker und Trueblood 1968). So wurde von Vojtechovsky et al. (1999) festgestellt, dass sich die F-Helix vorwiegend wie ein starrer Körper bewegt, für die E-Helix hingegen werden aufgrund der Abweichungen zwischen den Debye-Waller-Faktoren aus der Strukturanalyse und den Werten aus dem TLS-Modell Bewegungen ähnlich einer Entfaltung vermutet. Die Häm-Gruppe ließ sich mit dem TLS-Modell gut beschreiben und die Translations-Bewegungen verliefen vorzüglich in der Häm-Ebene sowohl in der Richtung aus

dem Protein heraus als auch senkrecht dazu. Das mittlere Auslenkungsquadrat ist für die F-Helix größer (ca. 0.16\AA^2) als für die E-Helix und die Häm-Gruppe (ca. 0.10\AA^2 bzw. 0.12\AA^2). Die von Vojtechovsky et al. (1999) vermuteten Entfaltungsbewegungen der E-Helix stehen im Widerspruch zu dem geringen Austausch der Wasserstoffatome. Die F-Helix, die sich starr verhalten sollte, zeigt mehr ausgetauschte Protonen. Die Analyse im Rahmen des TLS-Modelles für einzelne Helices widerspricht damit dem experimentellen Befund für den Austausch der Amidprotonen. Chong et al. (2001) haben gezeigt, dass sich mit einem TLS-Modell für Myoglobin als Ganzes die mittleren Auslenkungsquadrate der Rückgratome beschreiben lassen. Im Rahmen der detaillierten Analyse der Normal-Moden-Verfeinerung konnte jedoch gezeigt werden, dass die Vernachlässigung der internen Bewegungen im TLS-Modell falsch ist (Chong et al. 2001). Die Analyse von Vojtechovsky et al. (1999) vernachlässigt damit die internen Bewegungen, auch die Korrelation von Bewegungen des Moleküls, die nicht die Helices als Ganzes betreffen.

Eine Erklärung für den unterschiedlichen Austausch der Amidprotonen könnte eine erhöhte Zugänglichkeit der proximalen Seite für Wassermoleküle durch Bewegungen der Häm-Gruppe sein. Nicht zuletzt ist ein Beitrag durch die Kavitäten in der Myoglobin-Struktur zu erwarten (vgl. Abb. 7.11). Wasser kann durch diese in das Protein eindringen und den Austausch ermöglichen. Da der Seite der E-Helix, an der sich die Aminosäuren 66, 69, 72 und 76 befinden, keine Kavität benachbart ist, ist der Austausch dort erschwert. Vergleicht man dies mit den von Li und Woodward (1999) beschriebenen Modellen, so liegt hier wohl der Mechanismus durch Eindringen von Wassermolekülen vor. Kossiakoff (1982) stellte bei der Untersuchung des Austausches in der Neutronenstrukturanalyse von Trypsin (223 Aminosäuren, 1.8\AA Auflösung) fest, dass die Lösungsmittelzugänglichkeit alleine nicht ausreicht: selbst einem Amidproton benachbarte Wassermoleküle konnten in einzelnen Fällen keinen Austausch bewirken. Eine geringe lokale Beweglichkeit muss demnach hinzukommen, um einen Austausch zu verhindern. Auch dies ist für die Aminosäuren 66, 69, 72 und 76 der Fall. Sie befinden sich in Minima der mittleren quadratischen Auslenkung aus der hochaufgelösten Röntgenstrukturanalyse von Vojtechovsky et al. (1999). Nimmt man dies zusammen, so lässt sich die Dynamik der E-Helix so verstehen: Die eine Seite hat sehr fixe Wasserstoffbrücken, bei denen kein Austausch der Amidprotonen beobachtet werden kann, während die andere Seite größere Fluktuationen aufweist und einen Austausch ermöglicht. Die Zugänglichkeit für Wassermoleküle und die lokale Beweglichkeit stimmen überein. Man kann vermuten, dass dies sich gegenseitig bedingt.

Die mittleren quadratischen Auslenkungen für die Rückgrat-Atome aus der Neutronenstrukturanalyse und der Röntgenstrukturanalyse unterscheiden sich im wesentlichen um einen konstanten Wert $t = 0.067\text{\AA}^2$ (vgl. Abschnitt 6.5). Zwischen einem deuterierten und einem nicht-deuterierten Lösungsmittel ist im Rahmen der Auflösung der Röntgenstrukturanalyse bei 1.5\AA kein Unterschied zu erkennen (Abschnitt 6.2). Die Verschiebung um einen konstanten Wert kann durch eine systematisch falsche Bestimmung des Untergrundes der Neutronendaten erklärt werden. Die Intensität schwacher Reflexe kann dadurch um den Faktor $\exp(+8\pi^2 \cdot t \cdot \sin^2\vartheta/\lambda^2)$ zu groß werden. Die im Folgenden diskutierten mittleren quadratischen Auslenkungen der Neutronenstrukturanalyse wurden um den Wert 0.067\AA^2 nach oben korrigiert.

Die Analyse der B-Faktoren in Abschnitt 6.5 (Abb. 6.8 a und b) zeigt, dass man die Wasserstoffatome in drei Klassen von Beweglichkeit einordnen kann: (i) solche mit Rückgrat-Charakter, (ii) solche mit Methyl-Charakter und (iii) solche mit Lysin-Charakter. Das Ergebnis der Anpassung der Histogramme mit drei Gauß-Kurven (Abb. 6.8 c und Tab. 6.6) zeigt, dass die strukturelle Einteilung wohl definiert ist: 77% der Rückgrat-Atome, 79% der Methyl-Atome und 97% der Lysin-Wasserstoffatome werden durch die zugehörigen Gauß-Kurven erfasst. Die Gesamtzahl verteilt sich nach der Anpassung zu 29%, 38% und 33% auf die Klassen in der oben angegebenen Reihenfolge.

In einer Untersuchung der Dynamik von Seitenketten, die Methylgruppen enthalten, mit NMR-Spektroskopie (Lee und Wand 2001) wurden ebenfalls drei Klassen von Beweglichkeiten gefunden. Die Wasserstoffatome in Methylgruppen sind aus Sicht der Neutronenstrukturanalyse relativ homogen (Abb. 6.8b). Die Anpassung mit Gauß-Kurven (Tab. 6.6) zeigt, dass 79% der Klasse mittlerer, 7% der Klasse geringster und 14% der Klasse größter Beweglichkeit angehören. Eine qualitative Übereinstimmung ist also zu beobachten.

Die Verteilung der Wasserstoffatome kann man nun zur Interpretation der Ergebnisse aus inkohärenter elastischer Neutronenstreuung verwenden (Doster et al. 1989). Dabei ist zu beachten, dass die inkohärente Neutronenstreuung nur Bewegungen misst, die schneller als eine für die Messapparatur charakteristische Zeit sind. Die Energieauflösung der Messapparatur bestimmt die Auflösung der elastischen Linie und somit die Intensität derselben. Analoges gilt für den Mößbauer-Effekt. Die natürliche Linienbreite des Zerfalls

des angeregten Zustands ergibt in diesem Fall für ^{57}Fe eine Grenze für die Bewegungen, die erfasst werden können: Nur Bewegungen die auf einer Zeitskala von ca. 140ns und schneller ablaufen. Im Falle der hier betrachteten Daten aus der Neutronenstreuung von Doster et al. (1989) werden nur Bewegungen erfasst, die schneller als ca. 80ps sind. Die kohärente elastische Streuung erfasst alle dynamischen Auslenkungen sowie die statische Verteilung aufgrund der Konformationssubzustände in Proteinen (Parak et al. 1987; Chong et al. 2001). Man muss daher die mittleren quadratischen Auslenkungen in einen Teil $\langle x^2 \rangle_{\text{fast}}^n$, den die inkohärente Neutronenstreuung erfassen kann, und einen Teil $\langle x^2 \rangle_{\text{slow}}^n$, der in der inkohärenten Streuung nicht beobachtet wird, aufteilen. Für die aus der Kristallstrukturanalyse erhaltenen Werte $\langle x^2 \rangle_{\text{cryst}}^n$ gilt dann:

$$\langle x_j^2 \rangle_{\text{cyst}}^n = \langle x_j^2 \rangle_{\text{fast}}^n + \langle x_j^2 \rangle_{\text{slow}}^n \quad (61)$$

Man kann die Werte aus der Strukturanalyse nicht direkt verwenden, um die inkohärente elastische Streuung zu erklären, da die Aufteilung in den langsamen und schnellen Anteil nicht bekannt ist. Eine Anpassung der $S(q,0)$ Kurven für die vier Temperaturen aus Doster et al. (1989) wurde daher mit den Parametern $\langle x_j^2 \rangle_{\text{fast}}^n$ durchgeführt:

$$S(q,0) = \sum_{j=1}^3 c_j \cdot \exp(-q^2 \langle x_j^2 \rangle_{\text{fast}}^n) \quad (62)$$

Als Startwerte wurden die Werte $\langle x_j^2 \rangle_{\text{crist}}^n$ verwendet. Die relativen Konzentrationen c_j wurden aus der Fläche der Gauß-Kurven entnommen (Tab. 6.6). Aus der Steigung von $\ln S(q,0)/q^2$ für $q=0$ kann man einen Mittelwert für die mittlere quadratische Auslenkung aller Wasserstoffatome $\langle x^2 \rangle_{\text{fast}}^n$ erhalten. Die Anpassung von $S(q,0)$ wurde daher zugleich mit einer Anpassung für das mittlere Auslenkungsquadrat durchgeführt:

$$\langle x^2 \rangle_{\text{fast}}^n = \sum_{j=1}^3 c_j \cdot \langle x_j^2 \rangle_{\text{fast}}^n \quad (63)$$

Die Anpassung von Gl. (62) und (63) an die Daten aus Doster et al. (1989) wurde gleich gewichtet. Das Ergebnis ist in Abb. 7.19 dargestellt.

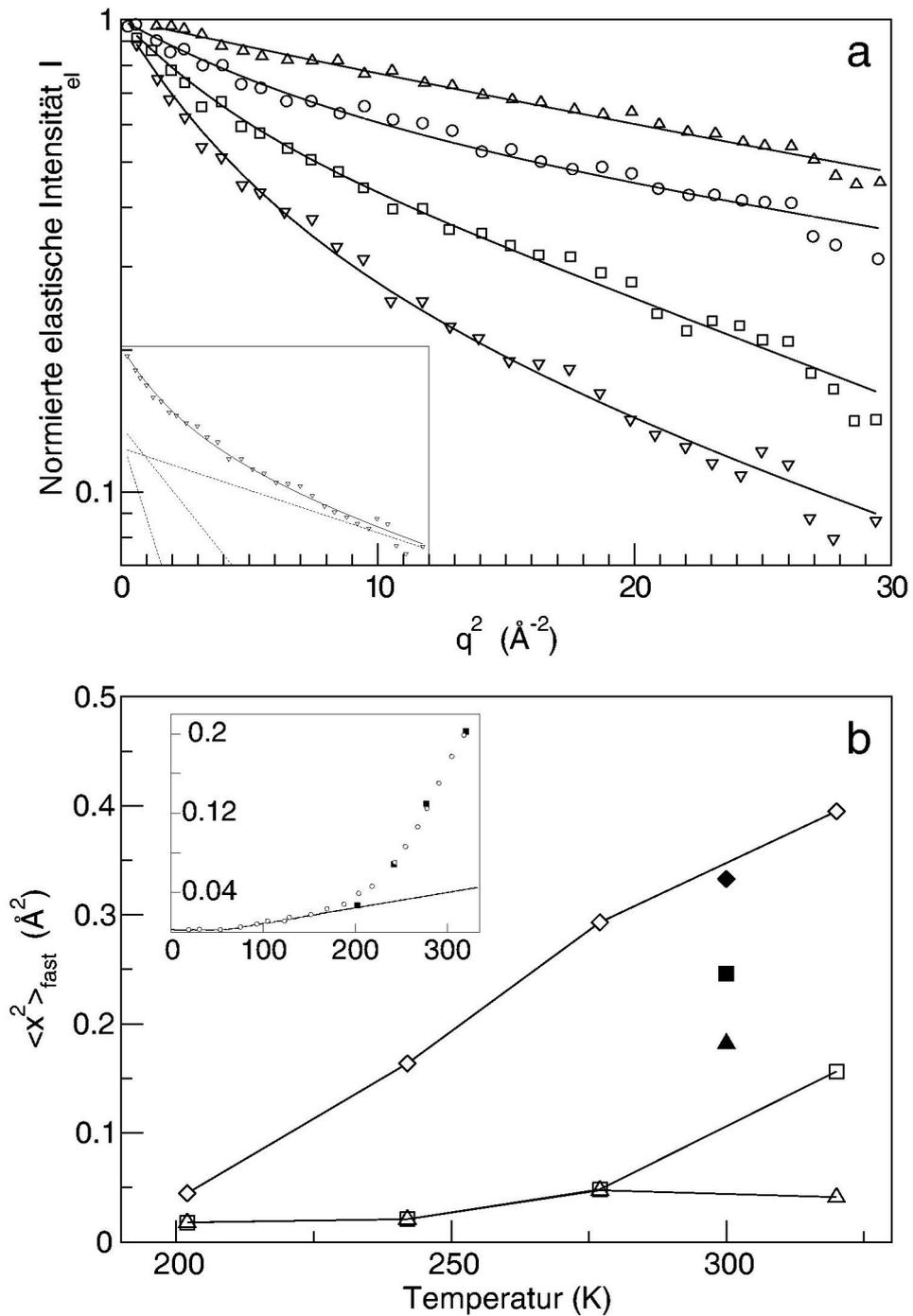


Abb. 7.19: Ergebnis der Anpassung von $S(q,0)$ und $\langle x_j^2 \rangle_{fast}^n$. a: $S(q,0)$ (aus Doster et al. 1989) bei 202K (Δ), 242K (O), 277K (\square) und 320K (∇) und die Anpassung nach Gl. (62) (durchgezogene Linien). Das kleine Bild zeigt die Anpassung bei 320K mit drei Klassen von Wasserstoffatomen (gestrichelte Linien). b: $\langle x_j^2 \rangle_{fast}^n$ aus der Anpassung (offene Symbole), und $\langle x_j^2 \rangle_{cryst}^n$ aus der Strukturanalyse (gefüllte Symbole). Das kleine Bild zeigt die gemittelten Werte $\langle x_j^2 \rangle_{fast}^n$, den harmonischen Anteil (offene Kreise und durchgezogene Linie, aus Doster et al. 1989) und die angepassten Werte (gefüllte Quadrate).

Auch wenn die kristallographische Untersuchung bei 300K stattgefunden hat, kann man qualitative Aussagen über die langsamen bzw. statischen Anteile der mittleren quadratischen Auslenkungen für die drei Klassen machen. Die Klasse mit den größten Auslenkungsquadraten zeigt demnach fast ausschließlich schnelle Dynamik, die von der inkohärenten Neutronenstreuung erfasst wird. Die Klasse mittlerer Auslenkungsquadrate zeigt neben dem schnellen Anteil einen langsamen Anteil, der für die inkohärente Neutronenstreuung nicht messbar ist. Die Klasse geringster Auslenkungsquadrate hingegen zeigt nur wenig schnellen Anteil. Für die inkohärente Neutronenstruktur scheinen diese Wasserstoffatome statisch.

Smith et al. (1990) haben aus einer Analyse von Molekulardynamik-Simulationen qualitativ ähnliche Ergebnisse für $S(q,0)$ berechnet. Doster et al. (1989) können die elastische Streuung in einem Zwei-Zustands-Modell erklären, das für alle Wasserstoffatome gilt. Die Winkelabhängigkeit der elastischen inkohärenten Streuung alleine kann kein eindeutiges Bewegungsmodell bestimmen. Aus den in Abb. 7.19 zusammengefassten Ergebnissen scheint es sinnvoll, das für alle Wasserstoffatome verwendete Zwei-Zustands-Modell zu erweitern. Die gefundenen drei Klassen von Wasserstoffatomen sollten durch unterschiedliche Modelle beschrieben werden. Die quasielastische Streuung muss dabei berücksichtigt werden (Doster et al. 1989; Doster et al. 1990).

8 Anhang

8.1 Die 20 α -L-Aminosäuren der Proteine

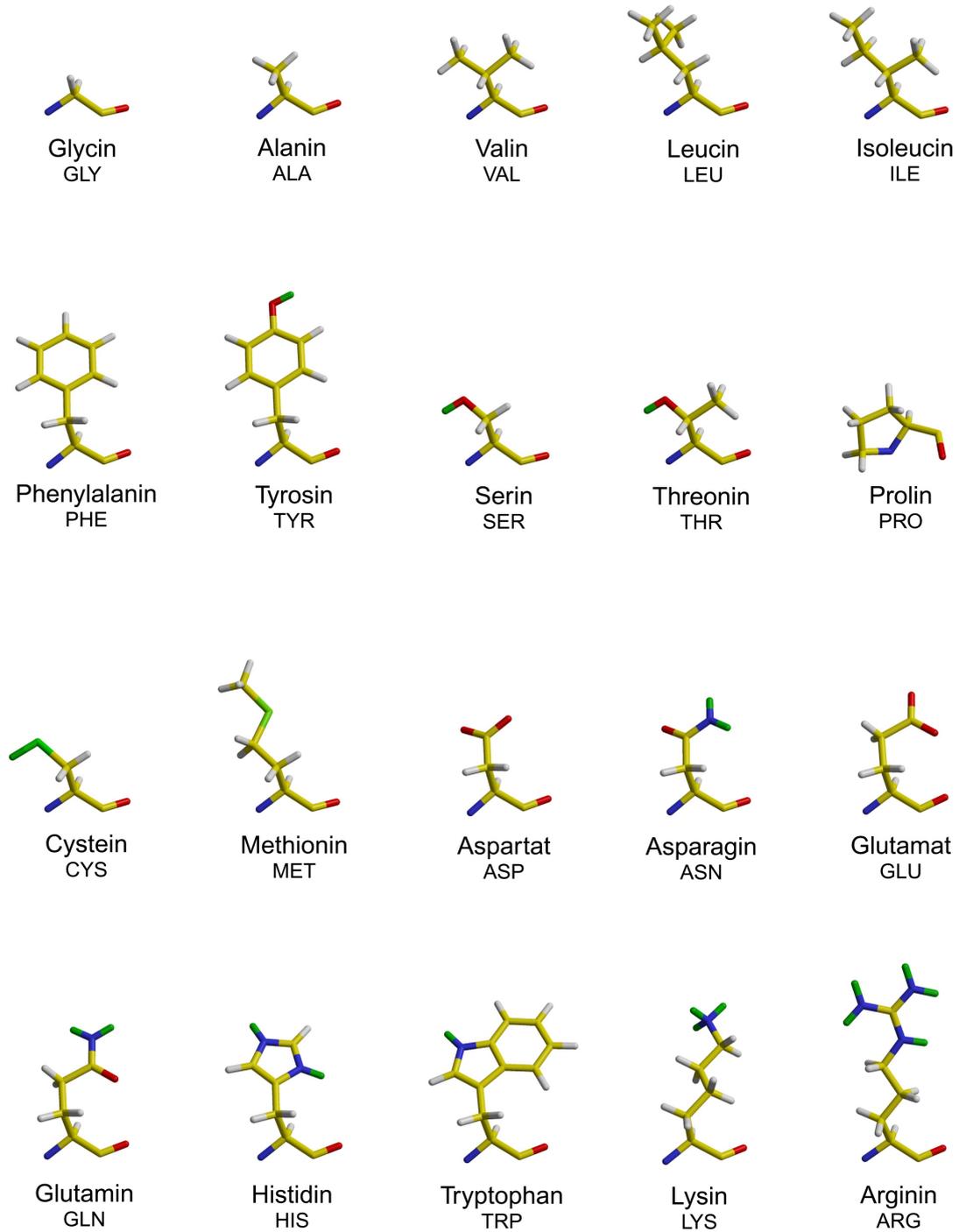


Abb. 8.1: Die 20 α -L-Aminosäuren bei pH 7: Kohlenstoff (gelb), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot), Schwefel (hellgrün), ^1H -Atome (grau), Deuterium (dunkelgrün).

8.2 Erläuterungen zum Zeitkorrelator

Ein wichtiger Aspekt der Näherung für kurze Zeiten ist die Dämpfung, die vom Auseinanderlaufen der Schwingungen herrührt. Um dies zu veranschaulichen, sind im Folgenden ein paar einfache Beispiele analog zu Chan und Page (1984) berechnet. In den folgenden Abbildungen wird der Teil des Zeitkorrelators $\eta(t)$ (Gl. (4)) betrachtet, der in der Exponentialfunktion nur einen Realteil hat. Für die einzelnen Moden j wird dieser im Folgenden als Amplitude $D_j(t)$ bezeichnet:

$$D_j(t) = \exp(-S_j(2\langle n_j \rangle + 1)(1 - \cos(\omega_j t))) \quad (64)$$

Der Zeitkorrelator ist dann das Produkt dieser Amplituden und dem imaginären Anteil der Exponentialfunktion:

$$\eta(t) = \prod_j D_j(t) e^{-i(\omega_0 t + \sum_j S_j \sin \omega_j t)} \quad (65)$$

Das Absorptionsspektrum ist nach Gl. (2) und (3) durch die Fouriertransformation des Zeitkorrelators mit einem exponentiellen Zerfall gegeben. Die Übergangsfrequenz in den Beispielen entspricht der Absorption der Soret-Bande in CO-ligandiertem Myoglobin ($23 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Um den Einfluss der niederfrequenten Moden besser sichtbar zu machen, wurde ein Wert von 15 cm^{-1} für die Breite des angeregten Zustands Γ verwendet. Der Übersichtlichkeit wegen wurde nur eine hochfrequente Mode bei 800 cm^{-1} mit einer Kopplungskonstanten von 0.5 betrachtet. Im ersten Beispiel (Abb. 8.2) sind die niederfrequenten Moden durch eine Mode bei $\omega_E = 50 \text{ cm}^{-1}$ repräsentiert, die mit $NS_E = 2.15$ koppelt. Der Subskript E steht dabei für „Einstein-Modell“. Für die niederfrequenten Moden wird S_i durch NS_E ersetzt.

In Abb. 8.2a und b ist das periodische Wiederkehren der hohen und der niederfrequenten Mode zu sehen. Die dargestellten Funktionen D_i verschwinden bei langen Zeiten nicht. Zugleich ist die Näherung für kurze Zeiten gezeigt. Der Gaußsche Abfall zeigt nicht das periodische Verhalten der Moden. Nimmt man in c und d den exponentiellen Zerfall des angeregten Zustands hinzu, so werden die Schwingungen der niederfrequenten Mode stark „gedämpft“. Dennoch sind sie im Absorptionsspektrum in e und f, das mit dem vollen Zeitkorrelator berechnet wurde, deutlich sichtbar: sowohl bei tiefen als auch bei hohen Temperaturen. Die Sichtbarkeit der niederfrequenten Schwingungen bei tiefen Temperaturen ist physikalisch sinnvoll. Bei Raumtemperatur erwartet man jedoch ein Spektrum wie es die

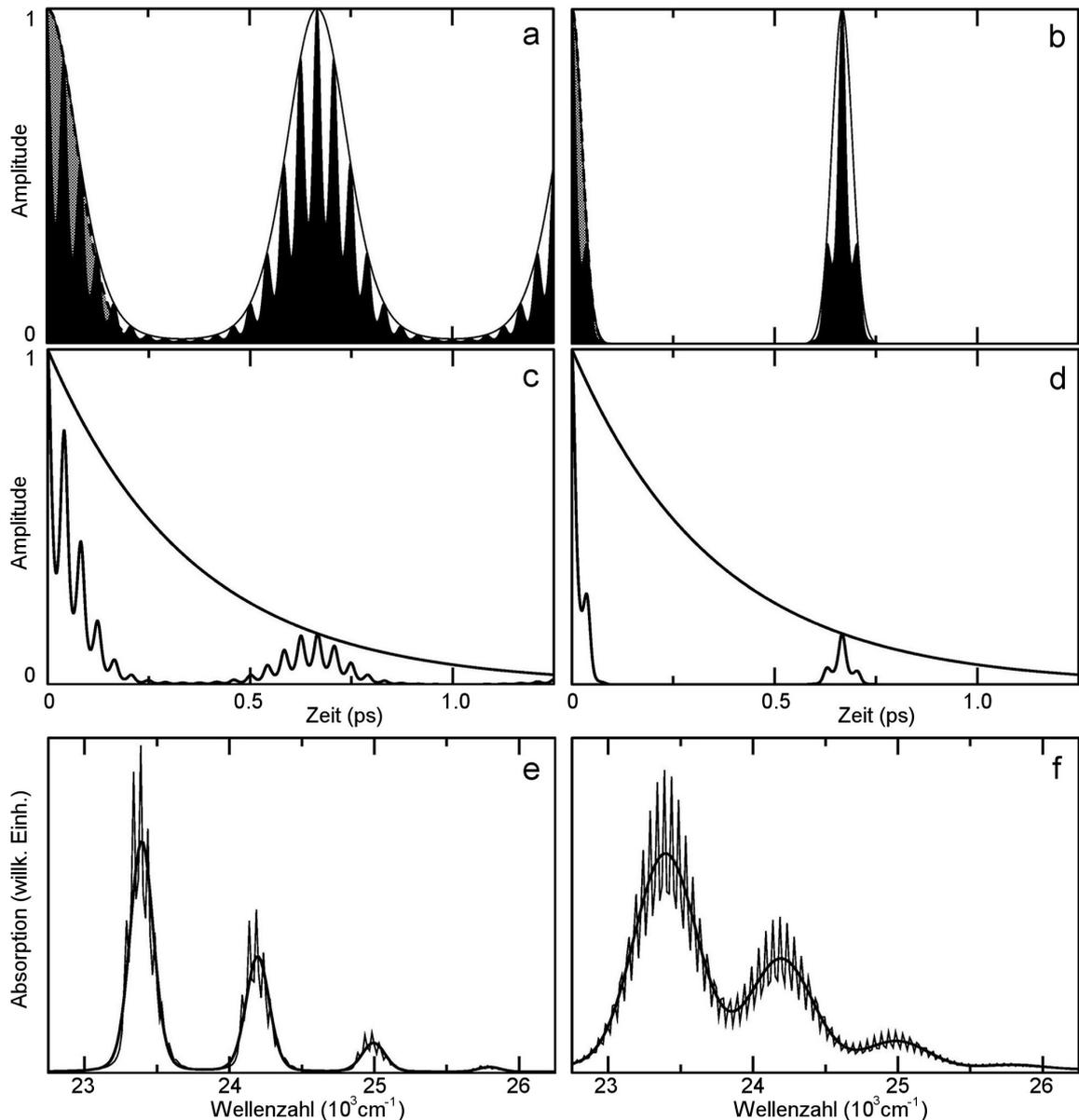


Abb. 8.2: Zeitkorrelator mit einer niederfrequenten Mode. Linke Seite $T=1\text{K}$ (a,c,e) rechte Seite $T=300\text{K}$ (b,d,f). a und b: dünne Linie: D_E , schwarz ausgefüllt $D_h D_E$, gestrichelte Linie und grau ausgefüllt Gauß-Näherung für kurze Zeiten. c und d: exponentieller Abfall $e^{-\Gamma t}$ und $D_h D_E e^{-\Gamma t}$. e und f: dünne Linie: mittels vollem Zeitkorrelator berechnete Absorption $\mu(\omega)/(C \omega)$, dicke Linie: mittels der Näherung für kurze Zeiten berechnete Absorption.

Näherung für kurze Zeiten ergibt, was umgekehrt bei tiefen Temperaturen nicht physikalisch sinnvoll ist. An Hand von Abb. 8.2 wird bereits ersichtlich, dass die niederfrequenten Moden zu einer gaußförmigen Verbreiterung führen. Der schnelle Abfall bei kurzen Zeiten kann durch eine Gauß-Kurve genähert werden. Da bei späteren Zeiten jedoch ein nicht-verschwindendes Signal auftritt, ist die Näherung für kurze Zeiten mit einer Mode bei sehr tiefen Temperaturen falsch.

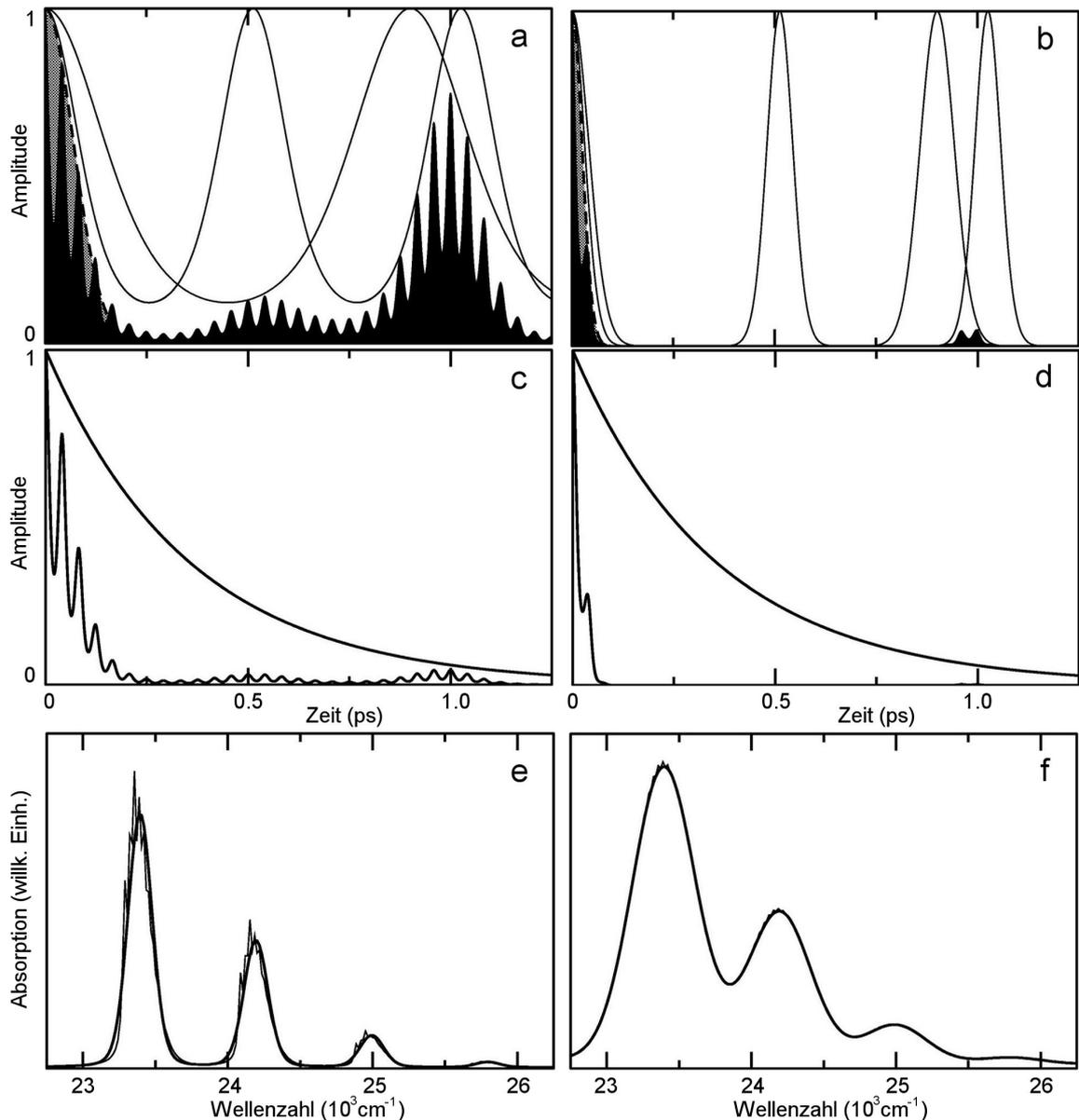


Abb. 8.3: Zeitkorrelator mit zwei niederfrequenten Moden. Linke Seite $T=1\text{K}$ (a,c,e) rechte Seite $T=300\text{K}$ (b,d,f). a und b: dünne Linien: D_{E1} und D_{E2} , schwarz ausgefüllt $D_h D_{E1} D_{E2}$, gestrichelte Linie und grau ausgefüllt Gauß-Näherung für kurze Zeiten. c und d: exponentieller Abfall $e^{-\Gamma t}$ und $D_h D_{E1} D_{E2} e^{-\Gamma t}$. e und f: dünne Linie: mittels vollem Zeitkorrelator berechnete Absorption $\mu(\omega)/(C \omega)$, dicke Linie: mittels der Näherung für kurze Zeiten berechnete Absorption.

Im zweiten Beispiel (Abb. 8.3) werden statt einer zwei niederfrequente Einsteinmoden betrachtet. Diese haben die Frequenzen 37 cm^{-1} und 65 cm^{-1} . Damit die Linien die gleiche Breite wie in der ersten Rechnung haben, wurden die Kopplungskonstanten $NS_{E1} = NS_{E2} = 1.05$ verwendet. Die zwei Moden schwächen sich gegenseitig. Nur wenn sie zusammentreffen bleibt ein Anteil des Zeitkorrelators bei späteren Zeiten sichtbar (Abb. 8.3a und b). Bei 300K sind die niederfrequenten Moden im Zeitkorrelator kaum noch sichtbar. Das

Absorptionsspektrum ist entsprechend sehr nahe am Spektrum, das mit der Näherung für kurze Zeiten berechnet wurde (Abb. 8.3e und f). Bei tiefen Temperaturen sind alle Moden im Spektrum sichtbar. Die Näherung für kurze Zeiten ist nicht korrekt.

Das letzte Beispiel illustriert den Einfluss von 10 Moden die zufällig zwischen 10 und 70cm^{-1} ausgewählt wurden bei $T=20\text{K}$ und $T=300\text{K}$ (Abb. 8.4a und b). Die Kopplung wurde für jede Mode zu 0.1 gesetzt. Da die zwei höchsten Moden zufällig relativ nahe beieinanderliegen, ist bei 20K bei 0.5 ps noch eine Schulter zu sehen. Bei 300K ist der Abfall jedoch annähernd gaußförmig.

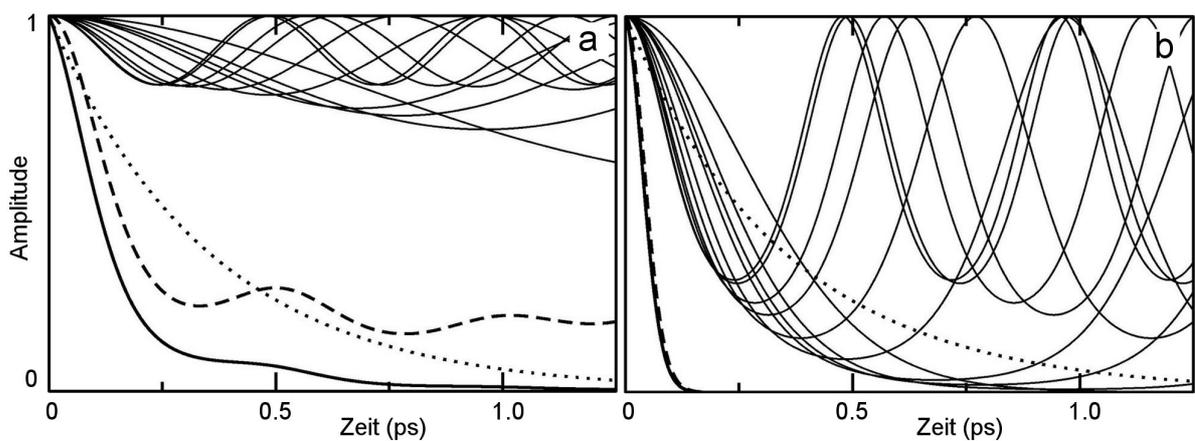


Abb. 8.4: Zeitkorrelator mit 10 niederfrequenten Moden. a $T=20\text{K}$. b $T=300\text{K}$. dünne Linien: D_i , gepunktete Linie: exponentieller Abfall $e^{-\Gamma t}$, gestrichelte Linie: Produkt aller niederfrequenten Moden $\prod D_i$, durchgezogene dicke Linie: Produkt aller niederfrequenten Moden mit exponentiellem Abfall multipliziert: $\prod D_i e^{-\Gamma t}$.

9 Literaturverzeichnis

- Adams PD, Pannu NS, Read RJ, Brünger AT (1997) Cross-validated maximum likelihood enhances crystallographic simulated annealing refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5018-5023
- Allen F, et al. (2001) Blue Gene: A vision for protein science using a petaflop supercomputer. *IBM Systems Journal* 40:310-327
- Amemiya Y, Miyahara J (1988) Imaging plate illuminates many fields. *Nature* 336:89-90
- Anfinsen (1973) Principles that Govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230
- Arzt S, Campbell JW, Harding MM, Hao Q, Helliwell JR (1999) LSCALE - the new normalization and absorption correction program in the Daresbury Laue software suite. *J. Appl. Cryst.* 32:554-564
- Austin RH, Beeson KW, Eisenstein L, Frauenfelder H, Gunsalus IC (1975) Dynamics of Ligand Binding to Myoglobin. *Biochemistry* 14:5355-5373
- Bailey S (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D* 50:760-763
- Baker D (2000) A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405:39-42
- Baker D, Sali A (2001) Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science* 294:93-96
- Baltimore D (2001) Our genome unveiled. *Nature* 409:814-816
- Bashford D, Case DA, Dalvit C, Tennant L, E. WP (1993) Electrostatic Calculations of Side-Chain pKa VALUES in Myoglobin and Comparison with NMR Data for Histidines. *Biochemistry* 32:8045-8056
- Bée M (1988) Quasielastic Neutron Scattering. Adam Hilger, Bristol Philadelphia
- Bon C, Lehmann MS, Wilkinson C (1999) Quasi-Laue neutron-diffraction study of the water arrangement in crystals of triclinic hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallographica Section D* 55:978-987
- Borgstahl GEO, Pokross M, Chehab R, Sekher A, Snell EH (2000) Cryo-trapping the Six-coordinate, Distorted-octahedral Active Site of Manganese Superoxide Dismutase. *J. Mol. Biol.* 296:951-959
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* 4:187-217
- Brünger AT, Karplus M (1988) Polar hydrogen positions in proteins: Empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins Struct Funct Genet* 4:148-156
- Brünger AT (1992a) X-Plor Version 3.1. Yale University Press, New Haven, CT
- Brünger AT (1992b) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355:472-475

- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang J-S, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998a) Crystallography and NMR System: A software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst. D* 54:905-921
- Brünger AT, Adams PD, Rice LM (1998b) Recent developments for the efficient crystallographic refinement of macromolecular structures. *Current Opinion in Structural Biology* 8:606-611
- Brünger AT, Adams PD, Rice LM (1999) Annealing in Crystallography: a powerful optimization tool. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72:135-155
- Brunori M (2000) Structural dynamics of myoglobin. *Biophys. Chem.* 86:221-230
- Brunori M, Vallone B, Cutruzzolà F, Travaglini-Allocatelli C, Berendzen J, Chu K, Sweet RM, Schlichting I (2000) The role of cavities in protein dynamics: Crystal structure of a photolytic intermediate of a mutant myoglobin. *Proceedings of the National Academy of Science* 97:2058-2063
- Brunori M (2001a) Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26:209-210
- Brunori M (2001b) Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26:21-23
- Bücherl T, Rausch C, von Seggern H (1993) Quantitative measurements on thermal neutron detectors based on storage phosphors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 333:502-506
- Byron O, Bilbert JC (2000) Neutron scattering: good news for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11:72-80
- Campbell JW, Hao Q (1993) Evaluation of reflection intensities for the components of multiple Laue diffraction spots. II. Using the wavelength-normalization curve. *Acta Cryst. A* 49:889-893
- Campbell JW, Hao Q, Harding MM, Nguti ND, Wilkinson C (1998) LAUEGEN version 6.0 and INTLDM. *J. Appl. Cryst.* 31:496-502
- Carugo O (1999) Correlation between occupancy and B factor of water molecules in protein crystal structures. *Protein Engineering* 12:1021-1024
- Chan CK, Page JB (1984) T \neq 0K Multimode Modeling of Optical Absorption Spectra and Resonance Raman Profiles. *Chem. Phys. Letters* 104:609-614
- Chong S-H, Joti Y, Kidera A, Go N, Ostermann A, Gassmann A, Parak F (2001) Dynamical transition of myoglobin in a crystal: comparative studies of X-ray crystallography and Mössbauer spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 30:319-329
- Chu K, Vojtechovský J, McMahon BH, Sweet RM, Berendzen J, Schlichting I (2000) Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin. *Nature* 403:921-923
- Cipriani F, Dauvergne F, Gabriel A, Wilkinson C, Lehmann MS (1994) Image Plate detectors for macromolecular neutron diffraction. *Biophys. Chem.* 53:5-14

- Cipriani F, Castagna J-C, Wilkinson C, Oleinik P, Lehmann MS (1996) Cold Neutron Protein Crystallography using a Large Position-Sensitive Detector based on Image-Plate Technology. *Journal of Neutron Research* 4:79-85
- Cordone L, Galajda E, Vitrano E, Gassmann A, Ostermann A, Parak F (1998) A reduction of protein specific motions in co-ligated myoglobin embedded in a trehalose glass. *Eur. Biophys. J.* 27:173-176
- Cordone L, Ferrand M, Vitrano E, Zaccai G (1999) Harmonic Behaviour of Trehalose-Coated Carbon-Monoxo-Myoglobin at High Temperature. *Biophys. J.* 76:1043-1047
- Cottone G, Cordone L, Ciccotti G (2001) Molecular Dynamics Simulation of Carboxy-Myoglobin Embedded in a Trehalose-Water Matrix. *Biophys. J.* 80:931-938
- Cowtan K (1994) Kevin Cowtans Book of Fourier Transforms. <http://www.yesbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html>
- Crowe JH, Crowe LM (1984) Preservation of Membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701-703
- Crowe LM, Reid DS, Crowe JH (1996) Is Trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71:2087-2093
- Cruikshank DWJ, Helliwell JR, Moffat K (1987) Multiplicity Distribution of Reflections in Laue Diffraction. *Acta Cryst. A* 43:656-674
- Cupane A, Leone M, Vitrano E, Cordone L (1995) Low temperature optical absorption spectroscopy: an approach to the study of stereodynamic properties of heme proteins. *Eur. Biophys. J.* 23:385-398
- Demmel F, Doster W, Petry W, Schulte A (1997) Vibrational frequency shifts as a probe of hydrogen bonds: thermal expansion and glass transition of myoglobin in mixed solvents. *Eur. Biophys. J.* 26
- DiPace A, Cupane A, Leone M, Vitrano E, Cordone L (1992) Vibrational Coupling, spectral broadening mechanisms, and anharmonicity effects in carbonmonoxy heme proteins studied by the temperature dependence of the Soret band lineshape. *Biophys. J.* 63:475-484
- Doster W, Bachleitner A, Dunau R, Hiebl M, Lüscher E (1986) Low temperature properties of water in myoglobin crystals and solutions. *Biophys. J.* 50:213-219
- Doster W, Cusack S, Petry W (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature* 337:754-756
- Doster W, Cusack S, Petry W (1990) Dynamic Instability of Liquidlike Motions in a Globular Protein Observed by Inelastic Neutron Scattering. *Phys. Rev. Lett.* 65:1080-1083
- Drenth J (1994) Principles of protein X-ray crystallography. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg
- Engh RA, Huber R (1991) Accurate Bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallographica Section A* 47:392-400

- Engler N (1998) Untersuchung metastabiler Konformationen von Proteinen. Diplomarbeit. Fakultät für Physik. TU München
- Engler N, Ostermann A, Gassmann A, Lamb DC, Prusakov VE, Schott J, Schweitzer-Stenner R, Parak FG (2000) Protein Dynamics in an Intermediate State of Myoglobin: Absorption, Resonance Raman Spectroscopy, and X-Ray Structure Analysis. *Biophys. J.* 78:2081-2092
- Fändrich M, Fletcher MA, Dobson CM (2001) Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410:165-166
- Franzen S, Boxer SG (1997) On the origin of heme absorption band shifts and associated protein structural relaxation in myoglobin following flash photolysis. *J. Biol. Chem.* 272:9655-9660
- Frauenfelder H, Petsko GA, Tsenoglou D (1979) Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature* 280:558-563
- Frauenfelder H, Hartmann H, Karplus M, Kuntz IDJ, Kuriyan J, Parak F, Petsko GA, Ringe D, Tilton RFJ, Connolly ML, Max N (1987) Thermal Expansion of a Protein. *Biochemistry* 26:254-261
- Frauenfelder H, Wolynes PG, Austin RH (1999) Biological Physics. *Reviews of Modern Physics* 71:419-430
- Frauenfelder H, McMahon BH, Austin RH, Chu K, Groves JT (2001) The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2370-2374
- Friedrich J (1995) Hole burning spectroscopy and physics of proteins. *Methods in Enzymology* 246:226-259
- Frolov EN, Gvosdev R, Goldanskii VI, Parak FG (1997) Differences in the dynamics of oxidized and reduced cytochrome c measured by Moessbauer spectroscopy. *JBIC* 2:710-713
- Garbers A, Reifarth F, Kurrek J, Renger G, Parak F (1998) Correlation between protein flexibility and electron transfer from Qa to QB in PSII membrane fragments from spinach. *Biochemistry* 37:11399-11404
- Gaßmann A (2000) Proteinspezifische Dynamik und Relaxation in Myoglobin. Fakultät für Physik. Technische Universität München
- Glasoe PK, Long FA (1960) Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide. *J. Phys. Chem.* 64:188-190
- Gouterman M (1978) Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings. In: Dolphin D (ed) *The Porphyrins Vol. III.* Academic Press, New York, pp 1-165
- Habash J, Raftery J, Nuttall R, Price HJ, Wilkinson C, Kalb (Gilboa) AJ, Helliwell JR (2000) Direct determination of the positions of the deuterium atoms of the bound water in concanavalin A by neutron Laue crystallography. *Acta Crystallographica Section D* 56:541-550
- Hartmann H, Parak F, Steigemann W, Petsko GA, Ringe Ponzi D, Frauenfelder H (1982) Conformational substates in a protein: Structure and dynamics of metmyoglobin at 80 K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4967-4971

- Helliwell JR (1992) *Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Hizhnyakov VV, Tehver I (1967) On the Separation of Resonance Secondary Radiation by Impurity Centers of Crystals. *Phys. Stat. Sol.* 21:755
- Hodel A, Kim S-H, Brünger AT (1992) Model Bias in Macromolecular Crystal Structures. *Acta Cryst. A* 48:851-858
- Jones A, Zou JY, Couran SW, Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A* 47:110-119
- Kachalova GS, Popov AN, Bartunik HD (1999) A Steric Mechanism for Inhibition of CO Binding to Heme Proteins. *Science* 284:473-476
- Kalb (Gilboa) AJ, Myles DAA, Habash J, Raftery J, Helliwell JR (2001) Neutron Laue Diffraction experiments on a large unit cell: concanavalin A complexed with methyl- α -D-glucopyranoside. *Journal of Applied Crystallography* 34:454-457
- Karplus M, Petsko GA (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631-639
- Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, Hart RG, Davies DR, Phillips DC, Shore VC (1960) Structure of Myoglobin. A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. *Nature* 185:422-427
- Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP (1982) Optimization by simulated annealing. *Science* 220:671-680
- Kleywegt GJ, Jones TA (1994) Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallographica Section D* 50:178-185
- Kossiakoff AA, Spencer SA (1981) Direct Determination of the Protonation States of Aspartic Acid-102 and Histidine-57 in the Tetrahedral Intermediate of the Serine Proteases: Neutron Structure of Trypsin. *Biochemistry* 20:6462-6474
- Kossiakoff AA (1982) Protein dynamics investigated by the neutron diffraction-hydrogen exchange technique. *Nature* 296:713-721
- Kossiakoff AA, Shteyn S (1984) Effect of protein packing structure on side chain methyl rotor conformations. *Nature* 311:582-583
- Kushkuley B, Stavrov SS (1996) Theoretical Study of the Distal-Side Steric and Electrostatic Effects on the Vibrational Characteristics of the FeCO Unit of the Carbonylheme Proteins and Their Models. *Biophys. J.* 70:1214-1229
- Lamb DC, Ostermann A, Prusakov VE, Parak FG (1998a) From metmyoglobin to deoxy myoglobin: relaxations of an intermediate state. *Eur. Biophys. J.* 27:113-125
- Lamb DC, Prusakov VE, Engler N, Ostermann A, Schellenberg P, Parak FG, Nienhaus GU (1998b) Photodissociation and Rebinding of H₂O to Ferrous Sperm Whale Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 120:2981-2982

- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291
- Lee AL, Wand J (2001) Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins. *Nature* 411:501-504
- Lee B, Richards FM (1971) The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 55:379-400
- Li R, Woodward C (1999) The hydrogen exchange core and protein folding. *Protein Science* 8:1571-1591
- Liao D-I, Karpusas M, Remington S (1991) Crystal Structure of an open conformation of citrate synthase from chicken heart at 2.8Å resolution. *Biochemistry* 30:6031-6036
- Loudon R (1973) *The quantum theory of light*. Clarendon Press, Oxford
- Lovesey SW (1984) *Theory of Neutron Scattering from Condensed Matter, vol 1: Nuclear Scattering*. Oxford University Press, Oxford
- Luzzati V (1952) Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst.* 5:802-810
- MacGillavry CH, Rieck GD (1985) Physical and Chemical Tables. In: Lonsdale K (ed) *International Tables for X-Ray Crystallography, vol III*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland
- Makinen MW, Churg AK (1983) Structural and Analytical Aspects of the Electronic Spectra of Hemeproteins. In: Lever AB, Gray HB (eds) *Iron Porphyrins, Part One*. Addison-Wesley
- McDowell RS, Kossiakoff AA (1995) A Comparison of Neutron Diffraction and Molecular Dynamics Structures: Hydroxyl Group and Water Molecule Orientations in Trypsin. *J. Mol. Biol.* 250:553-570
- McMahon BH, Müller JD, Wraight CA, Nienhaus GU (1998) Electron Transfer and Protein Dynamics in the Photosynthetic Reaction Center. *Biophys. J.* 74:2567-2587
- McRee D (1999) *Practical Protein Crystallography*. Academic Press, San Diego
- Melchers B, Knapp EW, Parak F, Cordone L, Cupane A, Leone M (1996) Structural Fluctuations of Myoglobin from Normal-Modes, Mössbauer, Raman, and Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.* 70:2092-2099
- Morikis D, Champion PM, Springer BA, Egeberg KD, Sligar SG (1990) Resonance Raman studies of iron spin and axial coordination in distal pocket mutants of ferric myoglobin. *J. Biol. Chem.* 265:12143-12145
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum Likelihood Method. *Acta Cryst.* D53:240-255
- Myles DAA, Bon C, Langan P, Cipriani F, Castagna J-C, Lehmann MS, Wilkinson C (1998) Neutron Laue diffraction in macromolecular crystallography. *Physica B* 241-243:1122-1130

- Niimura N, Karasawa Y, Tanaka I, Miyahara J, Takahashi K, Saito H, Koizumi S, Hidaka M (1994) An imaging plate neutron detector. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 349:521-525
- Oleinik P (1995) Aufbau und Test einer Neutronen-Lauekamera mit Bildplatten und erste Strukturuntersuchungen. Diplomarbeit. Fakultät für Physik, Institut E13. Technische Universität München
- Onuchic J, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG (1997) Theory of Protein Folding: The Energy Landscape Perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48:545-600
- Ostermann A (2000) Untersuchung der Proteindynamik und metastabiler Proteinzustände mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse. Dissertation. Fakultät für Physik. Technische Universität München
- Ostermann A, Waschipky R, Parak F, Nienhaus GU (2000) Ligand binding and conformational motions in myoglobin. *Nature* 404:205-208
- Ostermann A, Tanaka I, Engler N, Niimura N, Parak FG (2002) Hydrogen and Deuterium as seen by a neutron structure determination at 1.5Å resolution. *Biophys. Chem.* 95:183-193
- Page JB, Tonks DL (1981) On the separation of resonance Raman scattering into orders in the time correlator theory. *J. Chem. Phys.* 75:5694-5708
- Page JB (1991) Many-Body Approach to the Theory of Resonance Raman Scattering by Vibronic Systems. In: Cardona M, Güntherodt G (eds) *Light Scattering in Solids VI*. Springer-Verlag, Berlin
- Pannu NS, Read RJ (1996) Improved Structure Refinement Through Maximum Likelihood. *Acta Cryst.* A52:659-668
- Parak F, Formanek H (1971) Untersuchung des Schwingungsanteils und des Kristallgitterfehleranteils des Temperaturfaktors in Myoglobin durch Vergleich von Mössbauerabsorptionsmessungen mit Röntgenstrukturdaten. *Acta Cryst. A* 27:573-578
- Parak F, Knapp EW, Kucheida D (1982) Protein Dynamics - Mössbauer Spectroscopy on Deoxymyoglobin Crystals. *J. Mol. Biol.* 161:177-194
- Parak F, Hartmann H, Aumann KD, Reuscher H, Rennekamp G, Bartunik H, Steigemann W (1987) Low temperature X-ray investigation of structural distributions in myoglobin. *Eur. Biophys. J.* 15:237-249
- Parak F, Ostermann A, Gassmann A, Scherk C, Chong S-H, Kidera A, Go N (1999) Biomolecules: Fluctuations and Relaxations. In: Frauenfelder H, Hummer G, Garcia R (eds) *Biological Physics: Third International Symposium*, vol 487, AIP, pp 117-127
- Pauling L, Corey RB, Branson HR (1951) The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:205-211
- Prusakov VE, Steyer J, Parak FG (1995) Mössbauer Spectroscopy on Nonequilibrium States of Myoglobin: A study of τ -t Relaxation. *Biophys. J.* 68:2524-2530

- Quillin ML, Arduini RM, Olson JS, Phillips GN (1993) High resolution crystal structures of distal histidine mutants of sperm whale myoglobin. *J. Mol. Biol.* 234:140-155
- Rajaratnam K, La Mar GN, Chiu ML, Sligar SG, Singh JP, Smith KM (1991) ^1H NMR hyperfine shift pattern as a probe for ligation state in high-spin ferric hemoproteins: water binding in metmyoglobin mutants. *J. Am. Chem. Soc.* 113:7886-7892
- Rauch H, Grass F, Feigl B (1967) Ein neuartiger Detektor für langsame Neutronen. *Nuclear Instruments and Methods* 46:153-156
- Rausch C (1996) Detektoren für thermische Neutronen mit hoher Ortsauflösung. Dissertation. Physik Department, Institut E21. Technische Universität München
- Read RJ (1986) Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors. *Acta Crystallographica Section A* 42:140-149
- Ren Z, Bourgeois D, Helliwell JR, Moffat K, Srajer V, Stoddard BL (1999) Laue Crystallography: coming of age. *J. Synchrotron Rad.* 6:891-917
- Schoenborn BP, Watson HC, Kendrew JC (1965) Binding of Xenon to Sperm Whale Myoglobin. *Nature* 207:28-30
- Schomacker KT, Champion PM (1986) Investigations of spectral broadening mechanisms in biomolecules: Cytochrome-c. *J. Chem. Phys.* 84:5314-5325
- Schomaker V, Trueblood KN (1968) On the Rigid-Body Motion of Molecules in Crystals. *Acta Cryst. B* 24:63-76
- Schwabl F (1993) *Quantenmechanik*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Shu F, Ramakrishnan V, Schönborn BP (2000) Enhanced visibility of hydrogen atoms by neutron crystallography on fully deuterated myoglobin. *Proceedings of the National Academy of Science* 97:3872-3877
- Singh JP, Parak F, Hunklinger S, Dransfeld K (1981) Role of adsorbed Water in the Dynamics of Metmyoglobin. *Phys. Rev. Lett.* 47:685-688
- Skolnick J, Fetrow JS, Kolinski A (2000) Structural Genomics and its importance for gene function and analysis. *Nature Biotechnology* 18:283-287
- Smith J, Kuczera K, Karplus M (1990) Dynamics of myoglobin: Comparison of simulation results with neutron scattering spectra. *Proceedings of the National Academy of Science* 87:1601-1605
- Smith J (1991) Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Quarterly Reviews of Biophysics* 24:227-291
- Sonoda M, Takano M, Miyahara J, Kato M (1983) Computed Radiography Utilizing Scanning Laser Stimulated Luminescence. *Radiology* 148:833-838
- Springer BA, Sligar SG (1987) High-level expression of sperm whale myoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8961-8965

- Srajer V, Schomacker KT, Champion PM (1986) Spectral Broadening in Biomolecules. *Phys. Rev. Letters* 57:1267-1270
- Srajer V, Ren Z, Teng TY, Schmidt M, Ursby T, Bourgeois D, Pradervand C, Schildkamp W, Wulff M, Moffat K (2001) Protein Conformational Relaxation and Ligand Migration in Myoglobin: A Nanosecond to Millisecond Molecular Movie from Time-Resolved Laue X-ray Diffraction. *Biochemistry* 40:13802-13815
- Stryer L (1995) *Biochemistry*, Fourth Edition edn. W. H. Freeman and Company, New York
- Tada T, Watanabe Y, Matsuoka A, Ikeda-Saito M, Imai K, Ni-hei Y, Shikama K (1998) African elephant myoglobin with an unusual autooxidation behavior: comparison with the H64Q mutant of sperm whale myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 1387:165-176
- Tanaka I, Kurihara K, Haga Y, Minezaki Y, Fujiwara S, Kumazawa S, Niimura N (1999) An upgraded neutron diffractometer (BIX-I_M) for macromolecules with a neutron imaging plate. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 60:1623-1626
- Tilton RF, Kuntz ID, Jr., Petsko GA (1984) Cavities in Proteins: Structure of a Metmyoglobin-Xenon Complex Solved to 1.9 Å. *Biochemistry* 23:2849-2857
- Vitkup D, Ringe D, Petsko GA, Karplus M (2000) Solvent mobility and the protein 'glass' transition. *Nature Struct. Biol.* 7:34-38
- Vojtechovsky J, Chu K, Berendzen J, Sweet RM, Schlichting I (1999) Crystal Structures of Myoglobin-Ligand Complexes at Near-Atomic Resolution. *Biophys. J.* 77:2153-2174
- Weaver HJ (1989) *Theory of Discrete and Continuous Fourier Analysis*. Wiley, New York
- Whittaker MM, Whittaker JW (1996) Low-Temperature Thermochromism Marks a Change in Coordination for the Metal Ion in Manganese Superoxide Dismutase. *Biochemistry* 35:6762-6770
- Wilkinson C, Lehmann MS (1991) Quasi-Laue neutron diffractometer. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 310:411-415
- Wilson AJC (1949) The probability Distribution of X-ray Intensities. *Acta Cryst.* 2:318-321
- Wlodawer A, Walter J, Huber R, Sjölin L (1984) Structure of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor: Results of Joint Neutron and X-ray Refinement of Crystal Form II. *J. Mol. Biol.* 180:301-329
- Wölfel ER (1987) *Theorie und Praxis der Röntgenstrukturanalyse*. Vieweg-Verlag
- Zaccai G (2000) How Soft Is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering. *Science* 288:1604-1607
- Zach C (2001) *Dynamik des Myoglobins - Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung und nukleare Vorwärtsstreuung von Synchrotron-Strahlung*. Dissertation. Fakultät für Physik. Technische Universität München

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Parak herzlich für die Unterstützung. Die vielen Diskussionen und die daraus entwickelten Anregungen waren stets von großem Wert. Trotz der vielen Verpflichtungen, die er als Hochschullehrer zu erfüllen hat, kann man jederzeit mit seinem offenen Ohr rechnen, insbesondere wenn es um interessante Physik geht.

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis der guten Zusammenarbeit mit vielen anderen engagierten Wissenschaftlern. Don Lamb hat die optische Spektroskopie in unserer Arbeitsgruppe eingeführt und ich habe von ihm so einiges gelernt. Herr Prof. Nienhaus hat mir den Bakterien-Stamm für die Herstellung der Mutante überlassen. Alexandra Huenges hat das Programm zur Analyse der Gaußbreite der Soret-Bande geschrieben, daß wir zur gemeinsamen Auswertung der Spektren eingesetzt haben. In der Arbeitsgruppe von Prof. Schweitzer-Stenner in Bremen wurden die Raman-Experimente durchgeführt. Die Messung der Neutronenstruktur von Met-Myoglobin erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Niimura (Tokai-mura). Dean Myles betreut das Instrument LADI am ILL und war eine große Hilfe bei der Durchführung der Messungen. Ihnen allen sei für die gute Zusammenarbeit herzlich gedankt.

Andreas Ostermann hat mir vieles über Proteine und die Biochemie nahe gebracht. Seine Einführung in die Strukturanalyse von Proteinen, insbesondere was die Vielzahl an Programmen betrifft, war mir eine große Hilfe. Darüber hinaus waren die Diskussionen mit ihm eine große Bereicherung. Vielen Dank! Mit Klaus Achterhold konnte ich unzähligen kleine und große Diskussionen über physikalische und manchmal auch andere Themen führen. Diese waren stets ein großer Quell an Freude und Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und den Spaß.

Meine Eltern verdienen eine besondere Erwähnung. Ich danke Ihnen für die Unterstützung, die sie mir in jeder Hinsicht zukommen ließen. Ich hoffe ich kann es später einmal genauso gut machen wie sie. Ich danke Daniela für Ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Wir sind ein sehr gutes Team und ich freue mich auf die nächsten Herausforderungen, die wir zusammen bestreiten und bestehen werden.