

Technische Universität München
Physik-Department E17

**Untersuchung der Relaxationsprozesse photoinduzierter Zwischenzustände von
Häm-Proteinen mit zeitaufgelöster optischer Spektroskopie**

Walter Gutscher

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. Sighart Fischer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Fritz G. Parak (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Alfred Laubereau

Die Dissertation wurde am 14.1.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 11.2.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Symbole, Abkürzungen und physikalische Konstanten.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Proteine.....	1
1.2 Proteindynamik.....	9
2 Theorie.....	16
2.1 Optische Spektroskopie	16
2.1.1 Prinzip.....	16
2.1.2 Proteinspektren.....	18
2.1.3 Einfluß der Ligandierung auf den Spinzustand des Eisens	20
2.2 Ratentheorie.....	25
2.2.1 Theorie des Übergangszustandes – Absolute Ratentheorie.....	25
2.2.2 Kramers' Gesetz	27
2.3 Proteindynamik – Der erweiterte Brownsche Oszillator	28
3 Proben.....	31
3.1 Probenpräparation.....	31
3.1.1 Hämoglobin.....	31
3.1.2 Myoglobin	31
3.1.3 Neuroglobin.....	32
3.2 Photoreduktionsmittel.....	35
3.2.1 Tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(II) - (Ru(bpy) ₃)	35
3.2.2 Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	38
3.2.3 Nicotinsäureamid.....	41
4 Aufbau der Apparatur.....	42
4.1 Zeitaufgelöstes optisches Spektrometer.....	42
4.2 Durchführung einer Messung	45
5 Messungen und Auswertung	47
5.1 Einfache Beispielmessungen zum Test des Aufbaus zur zeitaufgelösten optischen Spektroskopie.....	47
5.1.1 Versuch zur Photoreduktion von Proteinen.....	47
5.1.2 Abblitzversuch mit MbCN	51
5.2 Hämoglobin	53

5.2.1	Zeitaufgelöste optische Spektren von Hämoglobin.....	53
5.2.2	Berechnung der zeitlichen Konzentrationsverläufe von Hämoglobin.....	57
5.2.2.1	Analyse multivaribler Daten.....	57
5.2.2.2	Singulärwertzerlegung.....	58
5.2.2.3	Self-modeling.....	70
5.2.3	Ermittlung der Zerfallsfunktion des Intermediates aus den Konzentrationsverläufen.....	77
5.3	Myoglobin.....	79
5.3.1	Messungen an Myoglobin.....	79
5.3.2	Die zeitlichen Konzentrationsverläufe von Myoglobin bei intermediären Temperaturen.....	82
5.3.3	Die Zerfallsfunktion des Intermediates.....	87
5.4	Neuroglobin.....	88
5.4.1	Messungen an Neuroglobin.....	88
5.4.2	Berechnung der Zeitkonstanten aus den Messungen an Neuroglobin.....	91
6	Diskussion.....	93
6.1	Modellierung der Spektren der Intermediate.....	93
6.2	Interpretation des Zerfalls des Intermediats.....	94
6.2.1	Extrapolation der Tieftemperaturmessungen.....	94
6.2.2	Dissoziation des Liganden im viskosen Medium.....	97
6.2.3	Das Brownsche Oszillatormodell und das Modell von Kramers.....	102
6.3	Das Intermediat des Neuroglobins.....	114
	Literatur.....	116
	Anhang.....	123
Anhang A	Steuerelektronik.....	123
Anhang B	Extinktionskoeffizienten von Myoglobin und Hämoglobin.....	126
Anhang C	Parameter aus den Anpassungen der Zerfallskurven von Myoglobin und Hämoglobin.....	127

Zusammenfassung

Die Relaxation von intermediären Zuständen Liganden bindender Häm-Proteine wurde mit Hilfe der optischen Spektroskopie zeitaufgelöst verfolgt. Der Temperaturbereich erstreckte sich für Myoglobin von 190 K bis 225 K, für Hämoglobin von 200 K bis 245 K und für Neuroglobin von 275 K bis 305 K. Die Dekomposition der gemessenen Spektren in die Anteile der verschiedenen in der Probe vorkommenden Spezies wurde anhand der Singulärwertzerlegung durchgeführt. Die Kinetik des Liganden wurde mit der Strukturfluktuation von Proteinen im aktiven Temperaturbereich in Beziehung gesetzt.

Die Kinetik von Proteinreaktionen ist stark temperaturabhängig. Während die Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen bei Raumtemperatur oft durch ein exponentielles Zeitverhalten angenähert werden können, sind bei sehr tiefen Temperaturen nicht nur die Reaktionsraten bedeutend langsamer, sondern folgen auch die Reaktionen wegen der strukturellen Inhomogenität der Proteine eher einem Potenzgesetz. Der Wechsel von der Tieftemperaturkinetik zur proteinspezifischen Kinetik geschieht im Bereich der für Proteine charakteristischen Übergangstemperatur.

Ausgehend von Met-Myoglobin bzw. Met-Hämoglobin wird durch Photoreduktion des Eisens mit einem kurzen Laserpuls ein metastabiler Zustand (Mb(II, ls, w) bzw. Hb(II, ls, w)) erzeugt, dessen Struktur der des Met-Proteins entspricht, wobei aber das Eisen reduziert vorliegt. Die Relaxation dieses Intermediates in den stabilen Deoxy-Endzustand, bei welcher sich die Struktur des Proteins ändert und das Wasser seinen Bindungsplatz am Eisen verlässt, wurde zeitaufgelöst nach dem Laserblitz verfolgt. Die Aufnahme der optischen Spektren über den gesamten optischen Wellenlängenbereich ermöglicht mit Hilfe der Singulärwertzerlegung die Berechnung der Konzentrationen der verschiedenen in der Probe vorhandenen Spezies und damit der Zerfallsfunktion des Intermediates. Dafür benötigte unbekannte Spektren der Intermediate von Hämoglobin,

eines mit dem wasserligandierten reduzierten Eisen und daneben das Bis-Histidyl-Hämoglobin, wurden durch „self-modeling“ bestimmt.

Da der Übergang vom intermediären Zustand zum Endzustand und die Protein-Strukturfluktuationen miteinander verknüpft sind, geschieht die Interpretation der erhaltenen Zerfallsfunktionen durch eine Kombination der Kramers-Theorie, die aktivierte Übergänge zwischen Zuständen im viskosen Medium beschreibt, und dem Brown'schen Oszillatormodell, welches für die Analyse der Proteinfluktuationen geeignet ist. Der Zerfall des Intermediats über die Kramers-Barriere kann dabei nur aus dem flexiblen Zustand erfolgen und nicht aus den Konformationssubzuständen. Mit diesem Modell läßt sich der Zerfall des Intermediats für alle gemessenen Temperaturen mit einem festen Parametersatz für die Aktivierungsenthalpie und -entropie anpassen.

Bei Neuroglobin kann ein Cyanid-Ion an das dreiwertige Eisen binden, jedoch nicht an das zweiwertige. Die Relaxation des nach Photoreduktion erhaltenen Intermediates in die stabile Bis-Histidyl-Konformation geschieht etwas langsamer als die Relaxation von genauso erzeugtem intermediärem Cyanid ligandiertem Myoglobin in die Deoxy-Konformation.

Symbole, Abkürzungen und physikalische Konstanten

Symbol bzw. Abkürzung	Erläuterung
A	Absorption, Extinktion
A_{int}	Integraler Absorptionskoeffizient
CS	Konformationssubzustand
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	DL-Dithiothreitol
ε	Absorptionskoeffizient
η	Viskosität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fe(II)HS	Eisen(II) „high-spin“
Fe(II)LS	Eisen(II) „low-spin“
FZ	Flexibler Zustand
ΔG_{flex}	Differenz der Gibbsschen Freien Energien im flexiblen Zustand und Konformationssubzustand
Gl.	Gleichung
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Plancksches Wirkungsquantum ($h=6,626 \cdot 10^{-34}$ Js)
ΔH^\ddagger	Aktivierungsenthalpie
Hb	Hämoglobin
Hb(II, ls, w)	Fe(II)LS-Intermediat von Hämoglobin mit Wasser an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens
His	Histidin
I	Intensität
I_0	Intensität der Referenz
IEC	Ionenaustauschchromatographie
k_B	Boltzmannkonstante ($k_B=1,38065 \cdot 10^{-23}$ J/K)
l	Weglänge des Lichts in der Probe
λ	Wellenlänge
Mb	Myoglobin
Mb(II, ls, w)	Fe(II)LS-Intermediat von Myoglobin mit Wasser an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens
MbCO	CO-ligandiertes Myoglobin
N_0	anfänglicher Anteil
$N(t)$	Anteil zum Zeitpunkt t
Ngb	Neuroglobin
OD	optische Dichte
PDA	Photodiodeanordnung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Molare Gaskonstante ($R=8,31$ J/K/mol)
Ru(bpy) ₃	Tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(II)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Symbol bzw. Abkürzung	Erläuterung
T	Temperatur
t	Zeit
v/v	Volumenanteil
$Z(t)$	Zerfallsfunktion eines Intermediats in Abhängigkeit der Zeit t

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Proteine

Die Transformation eindimensionaler Information in dreidimensionale Information ist fast ein neues Gesetz der Physik. Dieser Ausspruch von Max Delbrück bezieht sich auf die Faltung von Proteinen, biologischen Kettenmolekülen, die nicht nur Biochemiker, sondern auch Physiker faszinieren. Die eindimensionale Information ist bei Proteinen durch die in den Genen codierte Reihenfolge ihrer Bausteine, der L-Aminosäuren, gegeben. Die 20 Standard-Aminosäuren unterscheiden sich in den Seitenketten am C_α -Atom (Darnell, J. et al. 1990). Neben diesen Aminosäuren ist beim Menschen noch eine 21ste Aminosäure wichtig, die dem Cystein sehr ähnelt und, da das Schwefelatom durch ein Selenatom ausgetauscht ist, analog Selenocystein heißt. In den Eiweißen sind die Aminosäuren durch Peptidbindungen aneinandergekettet (Abb. 1). Ihre Reihenfolge wird Primärstruktur genannt und ist in den Genen festgelegt. Durch Rotationen um die Bindungen an den C_α -Atomen, als auch durch Verformungen der Proteinseitenketten ist eine Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen möglich, die das Protein annehmen kann.

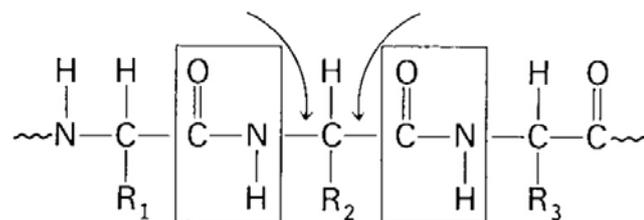


Abb. 1: Verkettung der Aminosäuren durch Ausbildung von Peptidbindungen; Die Peptidgruppen (durch Rechtecke markiert) sind planar und starr. Rotationen sind um die Bindungen (durch Pfeile markiert) an den C_α -Atomen, an denen die Seitenketten hängen, möglich.

Ihre Funktion können Proteine allerdings nur ausführen, wenn die Aminosäurenkette in einer bestimmten dreidimensionalen Struktur vorliegt. Die Transformation von der ungeordneten Kette zum funktionsfähigen Protein wird auch Faltung genannt und geschieht in den meisten Proteinen spontan.

Cyrus Levinthal berechnete 1968 die Anzahl der unterschiedlichen Strukturen, die ein aus 150 Aminosäuren aufgebautes Protein einnehmen kann und kam auf 10^{300} . Selbst ein kleines Protein mit 10^{50} möglichen Konformationen würde 10^{30} Jahre zur Faltung benötigen, wenn es alle verschiedenen strukturellen Zustände nacheinander durchtesten würde, um den energieärmsten zu finden. Dabei hätte es zum Testen eines Zustandes eine Pikosekunde Zeit. Met-Myoglobin faltet sich dagegen in nur ca. 10 s. Dieses Levinthal-Paradoxon ist bis heute nur teilweise verstanden. So genannte Faltungstrichter ebnet dem Protein demnach den Weg in die richtige Tertiärstruktur.

Verantwortlich für die richtige Faltung sind chemische Kräfte wie hydrophobe, elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie Wasserstoff-, Salz- und evtl. Disulfidbrücken zwischen den Aminosäureseitenketten, mit dem Lösungsmittel oder mit Co-Faktoren. Gruppen von Aminosäuren können oft wiederkehrende Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblatt ausbilden. Diese Sekundärstrukturelemente ordnen sich dann räumlich zu einer Tertiärstruktur an. Die richtige Faltung der Polypeptidkette in die 3D-Struktur des funktionierenden Proteins wird durch die genannten Kräfte bestimmt. Das Potential wird dabei möglichst minimiert. Die Stärke der Kräfte ist dabei sehr wichtig.

Die kovalenten Bindungen sind relativ stark (200 bis 400 kJ/mol) und können bei physiologischen Temperaturen nicht gebrochen werden. Sie sind verantwortlich für die Primärstruktur des Proteins und schränken den Konformationsraum für die 3D-Struktur des Proteins ein, da sie Bindungswinkel und -länge einschränken. Besondere Bedeutung besitzt hier die Peptidbindung (Abb. 1) im Proteinrückgrat, da sie partiellen Doppelbindungscharakter hat und deshalb eine planare Struktur, von der nur geringfügig abgewichen werden kann. Drehungen um die Bindungen am C_{α} -Atom sind

jedoch möglich, so dass die Aminosäurenkette flexibel ist. Die möglichen diedrischen Winkel sind dann noch von den Aminosäureresten abhängig und sind in einer Ramachandran-Auftragung eingezeichnet.

In welche 3D-Struktur sich das Protein faltet, wird von schwächeren Bindungen bestimmt. Auch das Lösungsmittel spielt eine große Rolle. Die Wassermoleküle ordnen sich an der Proteinoberfläche durch Wechselwirkung mit hydrophilen Aminosäureresten an, wodurch die Entropie erniedrigt wird. Die hydrophobe Wechselwirkung liefert Beiträge von -2 bis -14 kJ/mol pro Seitenkette. Wasserstoffbrücken, welche zwischen den Amid- und Carbonylgruppen des Rückgrats gebildet werden, sind wichtig für die Sekundärstruktur des Proteins. Aber auch einige Aminosäurereste können als Wasserstoffdonator oder -akzeptor fungieren. Die Bindungsenergie einer Wasserstoffbrücke liegt zwischen -12 und -29 kJ/mol und ist damit von der Größe der Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen (Salzbrücken). Die Stärke der van der Waals-Wechselwirkung liegt betragsmäßig etwas darunter. Zusätzliche kovalente Bindungen zwischen Aminosäureresten können durch Disulfidbrücken gebildet werden. Daran können zwei Cysteinreste oder in seltenen Fällen auch Lysine beteiligt sein. Diese Hierarchie und Menge an unterschiedlichen Bindungen führt zu einer hohen Frustration, d. h. es gibt eine immense Anzahl an Konformationen mit ähnlicher Gesamtenergie.

Daneben können auch physikalische Kräfte entscheidenden Einfluß auf die Faltung eines Proteins haben. Neben den auf mechanische Reize reagierenden mechanosensitiven Ionenkanälen stellt die Umfaltung des für die Blutgerinnung entscheidenden Proteins, des Von-Willebrand-Faktors, ein extremes Beispiel dar (Schneider, S. W. et al. 2007). Bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten des Blutes ballt sich der Von-Willebrand-Faktor zu einer ca. 2 μm großen Kugel zusammen. Bei einem hohen Geschwindigkeitsgradienten im Blutgefäß ändert dieses Eiweiß seine Struktur reversibel und zieht sich in die Länge zu einem 100 μm langen Faden. Dabei werden Andockstellen für die Blutplättchen freigelegt, die bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten im Innern des Proteins verborgen sind.

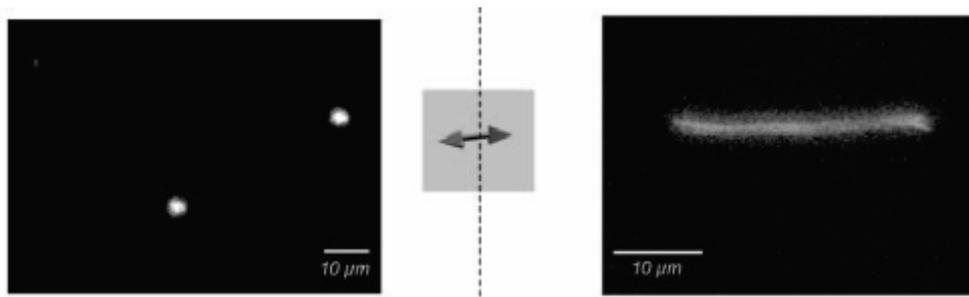


Abb. 2: Konformationsänderung des Von-Willebrand-Faktors unter dem Fluoreszenzmikroskop unterhalb (links) und oberhalb (rechts) des kritischen Schergefälles. Bei einem großen Schergefälle findet sich das Protein in einer elongierten Konformation, die bei unterschreiten des kritischen Schergefälles reversibel in den kompakten Zustand übergeht (Schneider, S. W. et al. 2007). Es befinden sich im kompakten Zustand links zwei Proteine im Fokus.

Für die grundlegenden Experimente an Proteinen wird oft auf Myoglobin als Untersuchungsobjekt zurückgegriffen. Myoglobin (Abb. 3) ist das Standarduntersuchungsobjekt in der Biophysik und damit eines der bestuntersuchten Proteine. Die erste Röntgenstrukturbestimmung wurde an diesem Protein erfolgreich durchgeführt (Kendrew, J. C. et al. 1960). Es ist ein Protein mit einer Masse von 17 kD. Es besteht aus 153 Aminosäuren und einer prosthetischen Gruppe: der Hämgruppe (Abb. 4). Myoglobin ist ein überwiegend helikales Protein aus 8 Helices. Im Zentrum der Hämgruppe befindet sich ein Eisenatom. Wichtig ist nun, dass dieses Eisen sechsfach ligandiert sein kann, wobei fünf Liganden (vier Stickstoffe der Hämgruppe und das proximale Histidin) fest gebunden sind.



Abb. 3: Modelldarstellung von Myoglobin mit der eingebetteten Hämgruppe

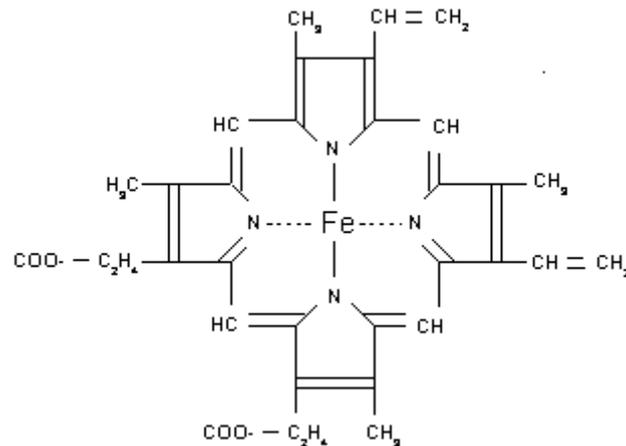


Abb. 4: Struktur der zuerst von Hans Fischer synthetisierten Hämgruppe (Nobelpreis dafür 1930). Das Eisen im Zentrum des planaren Moleküls wird komplexiert durch 4 Stickstoffatome der 4 Pyrrole des Porphyrins.

Seine biologische Funktion besteht in der Speicherung von Sauerstoff im Muskelgewebe und dessen Transport innerhalb der Zelle. Beim sauerstoffbeladenen sog. Oxy-Myoglobin ist an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens Sauerstoff gebunden. Auch andere Liganden können anstatt Sauerstoff gebunden werden. Im Falle von Kohlenmonoxid (CO) ist diese Bindung so stark, dass der Sauerstoff verdrängt wird, und das Protein seine Funktion nicht mehr ausüben kann, worauf die toxische Wirkung von CO beruht. Normalerweise ist im Körper, wenn kein Sauerstoff gebunden ist, eine Vakanz an dieser Bindungsstelle. Man spricht dann von Deoxy-Myoglobin. Hier ist das Eisen-Atom aus der Hämebene um 0,4 Å in Richtung der proximalen Seite ausgelenkt. Allerdings kann nur das reduzierte Protein, bei welchem das Häm-Eisen 2-fach positiv geladen ist, Sauerstoff speichern, während Myoglobin in der oxidierten Form (bekannt als Met-Myoglobin¹) mit einem Wassermolekül ligandiert ist. Dieses kommt auch im Körper vor, da es durch Autooxidation von Oxy-Myoglobin entsteht, und muß durch ein Enzym wieder reduziert werden.

¹ Met-Myoglobin ist die Bezeichnung für die oxidierte Form von Myoglobin mit einem Wasserliganden an der sechsten Koordinationsstelle des 3-fach positiv geladenen Häm-Eisens und darf nicht mit der später genannten metastabilen Form von Myoglobin, dem Fe(II)LS, verwechselt werden.

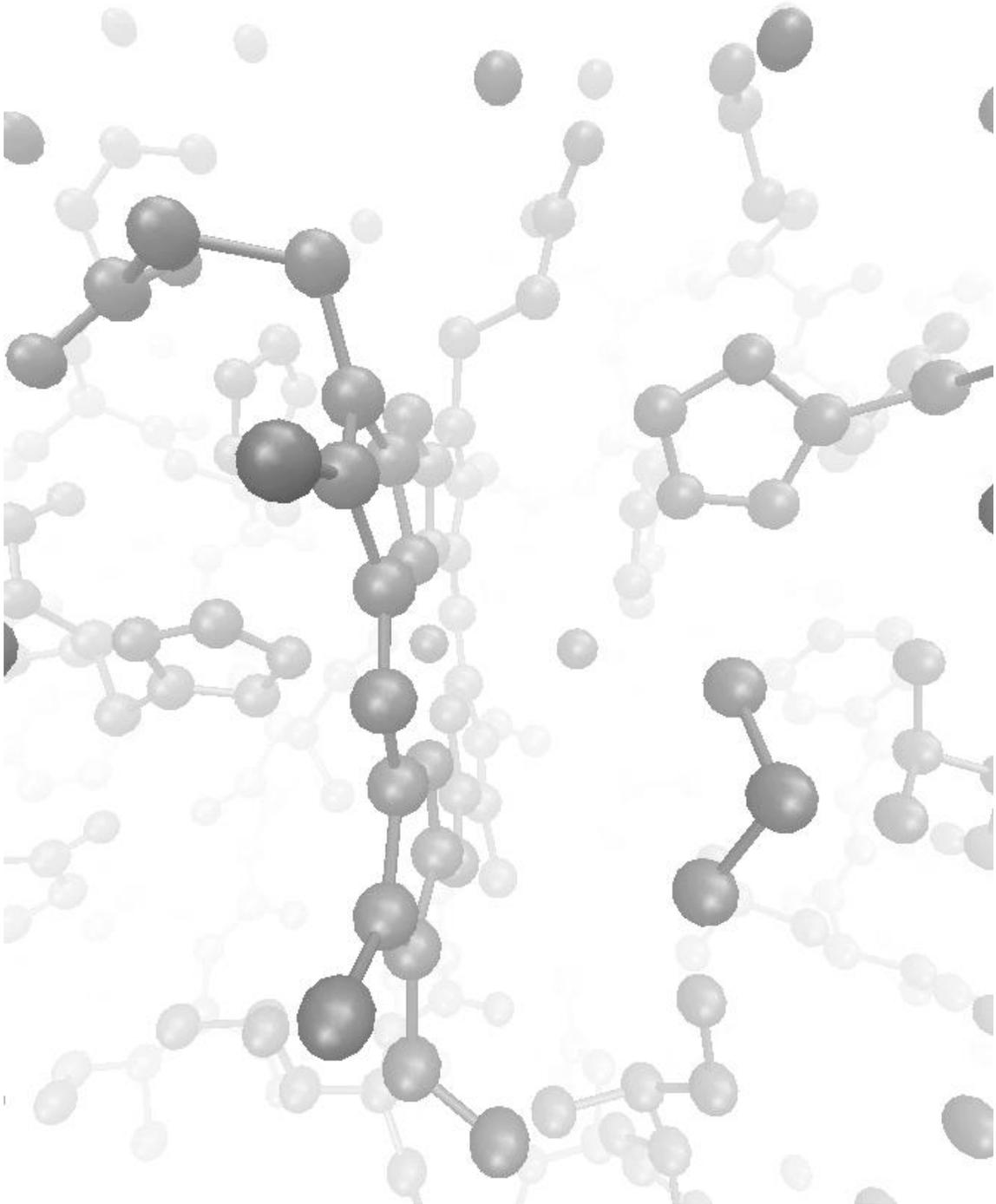


Abb. 5: Ansicht der lokalen Häm-Umgebung in Met-Myoglobin erzeugt mit VMD (Humphrey, W. et al. 1996). Das an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens koordinierte Wasser ist rechts der Hämgruppe zu sehen (dargestellt ist nur das Sauerstoffatom des Wassermoleküls).

Des Weiteren kann es die Oxidation des einerseits giftigen, die Zellatmung inhibierenden, andererseits aber auch als wichtiger Neurotransmitter fungierenden NO zu Nitrat katalysieren (Brunori, M. 2001) und hat damit auch enzymatische Funktion:



Hämoglobin, ein Tetramer aus vier sehr ähnlichen Untereinheiten (zwei jeweils identischen α - und β -Ketten) mit jeweils einer Hämgruppe, übernimmt den Transport des Sauerstoffs im Blut von der Lunge zu den Körperzellen. Die Hüfner-Zahl von normalerweise 1,34 ml O₂ pro g Hb gibt die Sauerstoffbindungskapazität in vivo an und weicht vom theoretischen Wert 1,39 geringfügig ab, da eine kleine Menge Hämoglobin auch in der Met-Form bzw. CO-ligandiert vorliegt. Bei Sauerstoffbindung ändert sich die räumliche Anordnung der 4 Untereinheiten zueinander (Quartärstruktur). Dadurch kommt es zum kooperativen Effekt, so dass in der Lunge bei hohem Sauerstoffpartialdruck dieser gebunden wird und im Körpergewebe an Orten niedrigen Sauerstoffpartialdrucks wieder abgegeben wird. Hämoglobin verleiht den roten Blutkörperchen, den Erythrozyten, welche oben und unten eingedellten Scheibchen von 7,5 μm Durchmesser ähneln, ihre blutrote Färbung.

Neuroglobin, ein Myoglobin ähnliches Protein mit 151 Aminosäuren, findet sich im Gehirn (Burmester, T. et al. 2000) und besonders konzentriert in der Netzhaut der Augen (ca. 100 μM) (Schmidt, M. et al. 2003). Es spielt im Gehirn eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Schäden durch Sauerstoffmangel an neuronalen Zellen (Sun, Y. et al. 2001). Obwohl es Liganden wie Sauerstoff, Stickstoffmonoxid, Kohlenstoffmonoxid oder Cyanid reversibel binden kann, wird vermutet, dass seine Aufgabe nicht in der Bindung von Sauerstoff zu dessen Speicherung und Transport liegt, sondern dass es als Sensor für Sauerstoffmangel dient (Brunori, M. und Vallone, B. 2006). Im Unterschied zu Hämoglobin und Myoglobin liegt das Häm-Eisen bei diesem Protein nicht fünffach ligandiert vor, wenn kein exogener Ligand vorhanden ist, sondern das distale Histidin, welches auch im oxidierten Protein anstatt Wasser den sechsten Liganden darstellt, lagert sich am Eisen an.

Es ist zwar oft möglich die dreidimensionale Form von Proteinen aufzuklären, es bleiben aber trotzdem Fragen, wie sie ihre Funktion erfüllen können. In röntgenkristallographischen Aufnahmen von Myoglobin, einem Sauerstoffspeicherprotein im Muskel, bzw. Hämoglobin, einem Sauerstoffspeicherprotein im Blut, sieht man keinen Pfad, der groß genug wäre, so dass der Sauerstoff von außen an seine Bindungsstelle im Proteininneren gelangen könnte (Nobbs, C. L. et al. 1966; Perutz, M. F. und Mathews, F. S. 1966). Will man die Funktionsweise von Proteinen erklären, ist nicht nur die Kenntnis ihrer dreidimensionalen Struktur wichtig, sondern auch ein Verständnis ihrer Dynamik von größter Bedeutung.

1.2 Proteindynamik

Die dynamischen Vorgänge in Proteinen sind sehr komplex. Mit vielen verschiedenen Methoden, welche jeweils spezifische Aspekte der Dynamik beleuchten, wird versucht, ein tiefgreifendes Verständnis der ablaufenden Prozesse und deren Zusammenspiel zu erlangen.

Mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie läßt sich aus dem Lamb-Mößbauer-Faktor, der aus der Absorptionsintensität eines bestimmten resonant angeregten Kernübergangs in ^{57}Fe gewonnen wird, die Amplitude der Bewegung des Eisens der Hämgruppe des Proteins berechnen (Huenges, A. et al. 2002). Da das Eisen als Bestandteil des Proteins an seinen Bewegungen teilnimmt, lassen sich so Rückschlüsse auf die Bewegungsmodi des Proteins ziehen. Zum Verständnis der Proteindynamik sind dabei auch Messungen bei tiefen nicht physiologischen Temperaturen wichtig. Dabei zeigt sich, dass sich diese bei einer Temperatur von ca. 180 K grundlegend ändert (vgl. die gefüllten Kreise in Abb. 7). Während die Bewegung des Eisens bei äußerst tiefen Temperaturen nur sehr klein ist, nimmt sie ab der *charakteristischen* bzw. *dynamischen Übergangstemperatur* dramatisch zu. Dort setzen die *proteinspezifischen Bewegungen* ein.

Die genannten proteinspezifischen Bewegungen werden durch Betrachtungen auf molekularer Ebene verständlich. Proteine besitzen auch in ihren funktionellen Konformationen keine völlig eindeutige Struktur. Die im vorhergehenden Abschnitt genannte Vielzahl an unterschiedlichen Bindungstypen in Proteinen führt zu einer reichhaltigen Potentiallandschaft. Die schwachen Bindungen können im Gegensatz zu den kovalenten Bindungen bei physiologischen Temperaturen gebrochen werden, so dass sich Aminosäurenreste oder Sekundärstrukturelemente räumlich umordnen können. Das Protein befindet sich dann im flexiblen Zustand.

Damit wird auch verständlich, wie ein Sauerstoffmolekül an seinen Bindungsplatz im Inneren des Myoglobins kommt. Die in Abb. 3 gezeigte Struktur von Met-Myoglobin ist eine über alle Proteine des Kristalls gemittelte. Es besitzt sogenannte Konformationssubzustände, deren Strukturen sich leicht unterscheiden (Frauenfelder, H. et al. 1988). Übergänge zwischen den verschiedenen Konformationssubzuständen sind möglich (Ansari, A. et al. 1994). Durch thermische Anregungen kann das Protein zwischen den Subzuständen hüpfen. Von dem einen Zustand zum anderen muß es allerdings einen oder mehrere Wege geben. Dieser führt im Modell des Brownschen Oszillators, über den flexiblen Zustand. In diesem sind schwache Bindungen gebrochen und das Protein kann seine Form verändern (Parak, F. et al. 1982; Parak, F. und Knapp, E. W. 1984; Huenges, A. et al. 2002; Parak, F. G. 2004). Nur durch großräumige Bewegungen, die das Protein im flexiblen Zustand ausführt, kann sich zeitweise ein Kanal öffnen, der groß genug für Sauerstoff ist.

Unterhalb der charakteristischen Übergangstemperatur können selbst die schwachen Bindungen im Protein nicht gebrochen werden und die Proteinmoleküle sind in ihren Konformationssubzuständen eingefroren. Sie können nur noch relativ kleine Festkörperschwingungen ausführen.

Die dynamische Übergangstemperatur (gekennzeichnet durch die gepunkteten Linien parallel zur $\langle x^2 \rangle$ -Achse in Abb. 6) wird von der Lösungsumgebung nur in überraschend geringem Maße beeinflusst. So verschiebt sie sich für MbCO in Abb. 6 nur um 20 K während sich die Viskosität des Lösungsmittels um 7 Zehnerpotenzen ändert.

Auch zwischen verschiedenen Proteinen variiert sie nur wenig und wird bei vielen unterschiedlichen experimentellen Methoden sichtbar (Ringe, D. und Petsko, G. A. 2003).

Eine andere Methode zur Untersuchung der Proteindynamik ist die Röntgenstrukturuntersuchung. Wie der Lamb-Mößbauer-Faktor in der Mößbauerspektroskopie gibt hier der Debye-Waller-Faktor die mittlere quadratische Auslenkung der Atome an. Im Gegensatz zur Mößbauerspektroskopie werden hier allerdings auch statische Auslenkungen berücksichtigt (Abb. 7). Die Inhomogenität der Probe aufgrund der leichten strukturellen Unterschiedlichkeit der Moleküle im Proteinkristall erzeugt ein relativ großes $\langle x^2 \rangle$ selbst in der Nähe des Absoluten Nullpunktes der Temperatur.

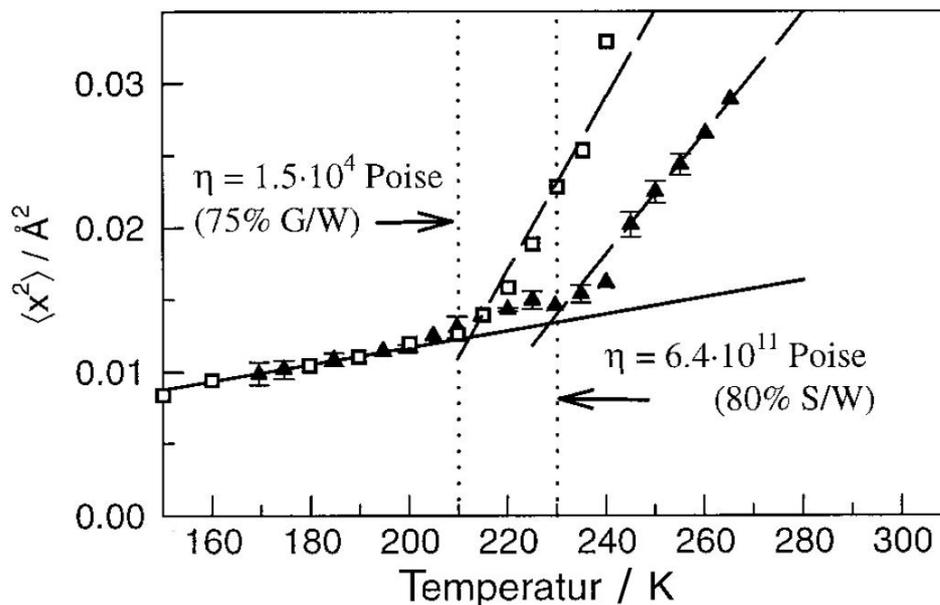


Abb. 6: mittlere quadratische Auslenkung des Eisenatoms $\langle x^2 \rangle$ aus Mößbauermessungen an MbCO in 75 % (v/v) Glycerin/Wasser (G/W) und 80 % (v/v) Sucrose/Wasser ;S/W); das Eisen dient als Sonde für die Proteindynamik; die Variierung der Viskosität η des Lösungsmittels um über 7 Größenordnungen spiegelt sich nicht in diesem Ausmaß in der Proteindynamik wider; jedenfalls nicht in der Übergangstemperatur oder der mittleren quadratischen Auslenkung des Eisens (Lichtenegger, H. et al. 1999).

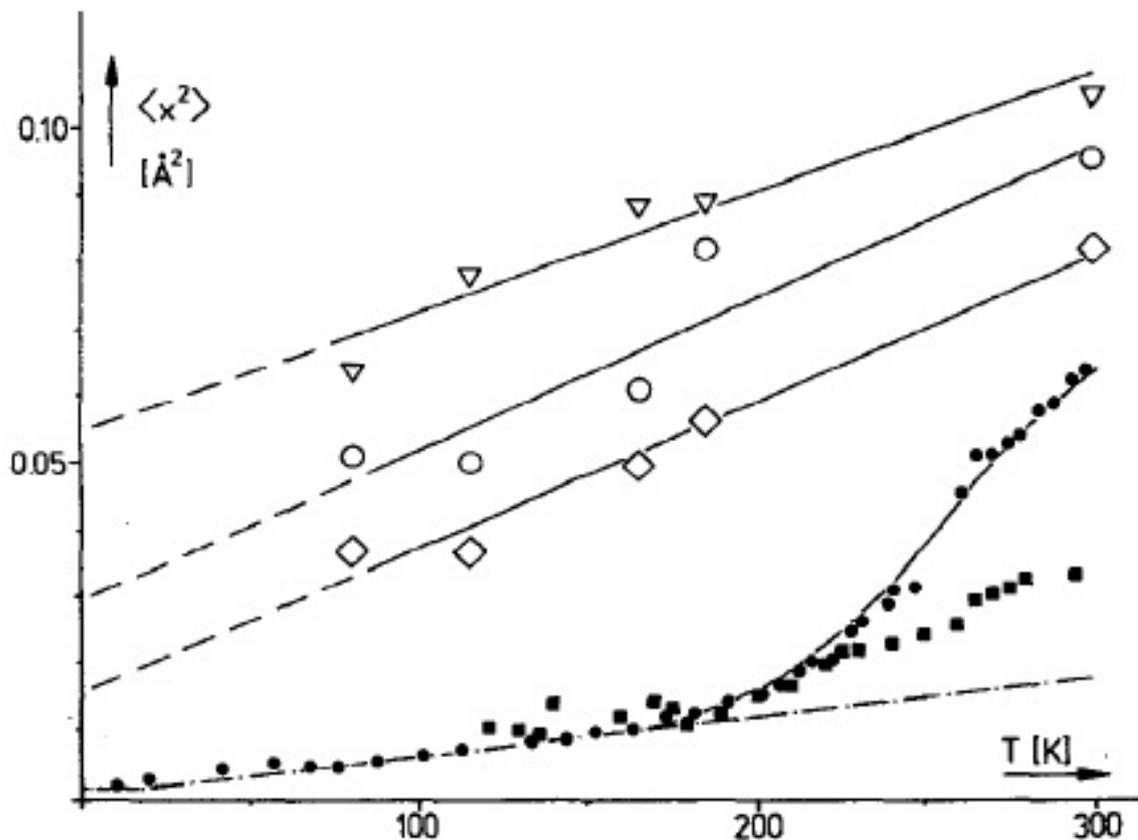


Abb. 7: mittlere quadratische Auslenkung von Atomen in Myoglobin: Mit Mößbauer-Spektroskopie gemessen wurde die Bewegung des Eisens in Deoxy-Myoglobin-Kristallen (gefüllte Kreise) und in gefriergetrocknetem Met-Myoglobin (gefüllte Quadrate). Mit Röntgenstrukturuntersuchung gefundene Auslenkungen sind gezeigt für Eisen (offene Kreise), das Mittel für die Rückgratotope von His93 (offene Dreiecke) und von His64 (offene Rauten) (Frauenfelder, H. et al. 1988).

Ein anderer Teilaspekt der Proteindynamik kann durch Kinetikuntersuchungen der Bewegung kleiner Moleküle durch das Innere eines Proteins beleuchtet werden. Dazu ist es nötig, zunächst einen Ungleichgewichtszustand durch einen Laserpuls oder die Verwendung einer „Stopped-flow“-Apparatur zu erzeugen. Beispielhaft hierfür sind z. B. die Blitzlichtphotolyseexperimente an CO-ligandierten Proteinen (Austin, R. H. et al. 1975; Steinbach, P. J. et al. 1991). Hierbei wird die Rückbindung des Liganden an seinen Bindungsplatz zeitaufgelöst nach einem kurzen Abblitzpuls des Lasers beobachtet. Dazu wird die Absorptionsänderung bei einer bestimmten Wellenlänge, die

eine besonders große Variation zeigt (z. B. bei der Wellenlänge der Soret-Bande von Deoxy-Myoglobin), aufgenommen und proportional zur Zahl der noch nicht rückgebundenen Moleküle gesetzt. Da sich der Ligand durch die Proteinmatrix bewegt, wird dadurch die Rückbinderate des Liganden beeinflusst und es lassen sich hiermit Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Proteins ziehen. Mit Hilfe von Reaktionsmodellen lassen sich im Weiteren die beobachteten Ratenkoeffizienten erklären.

Eines der derzeit meistdiskutierten Schemata ist in Abb. 8 dargestellt. Der Zustand, in welchem das CO-Molekül an das Eisen der Hämgruppe gebunden ist, wird A genannt. Durch den Abblitzpuls des Lasers wird Zustand B erzeugt. Dieser Zustand B entspricht einer Struktur, in welcher das CO an einer anderen Stelle im Inneren des Proteins sitzt. Die Proteinmatrix ist hierbei noch weitgehend unverändert. Aus diesem Zustand kann das CO direkt rückbinden (es handelt sich dann wieder um Zustand A) oder es bildet sich Zustand C, in welchem die Proteinmatrix strukturell relaxiert ist. Aus Zustand C kann das CO entweder an das Eisen zurückbinden oder in das Lösungsmittel entkommen (S). Eine Rückbindung aus dem Lösungsmittel geschieht nur über C.

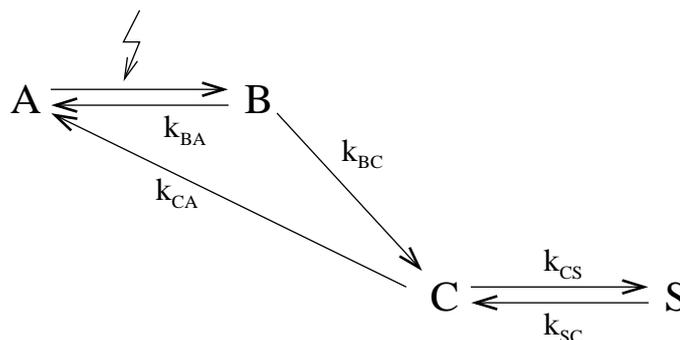


Abb. 8: Reaktionsmodell zur Beschreibung der Rückbindung des CO nach seiner Dissoziation durch einen Laserblitz in CO-ligandiertem Myoglobin (Kleinert, T. et al. 1998).

Für die Bewegung eines Liganden im Inneren eines Proteins sind dabei mehrere Temperaturbereiche zu unterscheiden. Bei ganz tiefen Temperaturen bis hinauf zu 150 K ist das Protein in Konformationssubzuständen eingefroren. Der Ligand bewegt sich dann in einer festen zeitlich konstanten Potentiallandschaft, die jedoch von Molekül zu Molekül in der Probe verschieden sein kann. Deshalb gibt es eine Verteilung von Potentialbarrieren. Die Relaxation von Intermediaten kann dann für verschiedene Temperaturen in diesem Tieftemperaturbereich durch eine einzige feste Barrierenhöhenverteilung angepaßt werden. Im Falle der CO-Rückbindung geschieht diese vollständig aus Zustand B. Die Zustände C oder S werden nicht bevölkert. Oberhalb einer Temperatur von 160 K fangen die Proteine allerdings an, proteinspezifische Bewegungen auszuführen. Damit ist die Potentiallandschaft, in der sich der Ligand bewegt, nicht mehr konstant. Im Falle der CO-Rückbindungsexperimente müssen nun Übergänge von Zustand B nach C und dann auch nach S eingeführt werden. Der Zerfall intermediärer Zustände kann nicht mehr durch eine einzelne feste Barrierenhöhenverteilung beschrieben werden. Die Barriere für die Rückbindung des CO erhöht sich (Nienhaus, G. U. et al. 1992). Physikalisch entspricht Zustand C also einer Struktur, bei der die Proteinmatrix relaxiert ist, während in S das CO aufgrund der erhöhten Flexibilität des Proteins ins Lösungsmittel entkommen konnte. Die sehr schnelle Proteindynamik bei Raumtemperatur führt dazu, dass der Ligand nur ein mittleres Potential sieht. Intermediate zeigen annähernd exponentielles Zeitverhalten, so als ob alle Moleküle in der Probe identisch wären und es keine Verteilung an Barrierenhöhen gäbe.

Eine weitere Möglichkeit zur Forschung an dynamischen Vorgängen in Proteinen, ist die Relaxation metastabiler Zustände bei tiefen Temperaturen zeitaufgelöst zu untersuchen (Prusakov, V. E. et al. 1990; Prusakov, V. E. et al. 1995; Prusakov, V. Y. et al. 1996; Prusakov, V. E. et al. 1999; Croci, S. et al. 2002; Croci, S. 2006). Hierbei wird durch Bestrahlung der Probe, die Met-Myoglobin bzw. Met-Hämoglobin enthält, das Eisen reduziert. Die umgebende Proteinmatrix bleibt zunächst noch in der Konformation der Met-Form, und auch das Wassermolekül an der sechsten Bindungsstelle des Eisens ist noch vorhanden (Engler, N. et al. 2000; Ostermann, A.

2000). In dieser metastabilen Form koppeln die 3d-Elektronen des Eisens zu einer „low-spin“-Konfiguration. Dieser Zustand relaxiert in das Endprodukt (Deoxy-Myoglobin). Gemessen wird der Wechsel von „low-spin“ nach „high-spin“ in Abhängigkeit der Zeit. Aus der gemessenen Kinetik lassen sich wiederum Rückschlüsse auf die Bewegungen des Proteins anstellen, da beide Prozesse miteinander verknüpft sind.

Dieser Vorgang wurde auch schon mit Hilfe der optischen Spektroskopie untersucht (Lamb, D. C. et al. 1998a; Engler, N. et al. 2000). Der zeitliche Zerfall des Intermediates ist daher zwischen 160 und 190 K bekannt (Abb. 52).

Engler (2002) zeigte, dass sich die Absorptionsbande des bei tiefen Temperaturen (20 K) erzeugten und dort stabilen Intermediates beim Aufwärmen auf 180 K in der Frequenz irreversibel verschiebt.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit erweitert die Tieftemperaturmessungen bzgl. der Kinetik des Intermediates zu höheren Temperaturen und kürzeren Zeiten hin. Dies ist nötig, da man bei Raumtemperatur ein annähernd exponentielles Zeitverhalten erwartet, bei sehr tiefen Temperaturen wie beschrieben aber nicht. Der Übergang von tiefen zu hohen Temperaturen, der Bereich in dem also die Proteindynamik einsetzt, ist dabei noch nicht vollständig verstanden und ein allumfassendes Bild fehlt, welches sowohl das Verhalten bei tiefen, als auch bei intermediären und hohen Temperaturen beschreiben kann.

2 Theorie

2.1 Optische Spektroskopie

2.1.1 Prinzip

Die optische Spektroskopie beschäftigt sich mit der Absorption von Licht im infraroten, sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Der Anwendungsbereich der optischen Absorptionsspektroskopie erstreckt sich sowohl auf die Identifikation der Bestandteile einer Lösung, als auch auf die Konzentrationsbestimmung einer gelösten Substanz. Dabei wird gemessen, wie stark Licht beim Durchtritt durch die Probe in Abhängigkeit seiner Wellenlänge λ abgeschwächt wird. Je nach Energie regt das einfallende Licht in der Probe elektronische Übergänge an. Entsprechend dem Franck-Condon-Prinzip koppeln diese Übergänge auch an Vibrationen. Dadurch werden die Übergänge energetisch aufgespalten. In Lösung sind diese Schwingungsbanden allerdings durch Kollisionen verbreitert, so dass nur eine einzige breite Absorptionsbande sichtbar ist.

Bei Molekülen, die einander nicht beeinflussen, ist die geschwächte Intensität hinter der Probe durch das Lambert-Beersche-Gesetz gegeben (Haken, H. und Wolf, H. C. 1991):

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda)cx} \quad (2)$$

$I(\lambda)$ ist die im Detektor registrierte Lichtintensität bei eingebauter Probe und $I_0(\lambda)$ die Lichtintensität mit einer nicht absorbierenden Referenzlösung im Strahlengang. Mit $\varepsilon(\lambda)$ ist der molare dekadische Absorptionskoeffizient oder Extinktionskoeffizient bezeichnet. Er wird üblicherweise in $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oder $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oder auch $\text{cm}^2\text{mmol}^{-1}$ ($1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \hat{=} 1 \text{ cm}^2\text{mmol}^{-1}$) angegeben und ist charakteristisch für die jeweilige Substanz. $I(\lambda)$, $I_0(\lambda)$, und $\varepsilon(\lambda)$ sind von der Wellenlänge abhängig. Die Konzentration der Substanz in der Probe wird durch den Buchstaben c bezeichnet. x ist die Weglänge des Lichts in der Probe.

Das Produkt im Exponenten von (2), in welchem sich neben $\varepsilon(\lambda)$ noch die Konzentration c und die Weglänge x des Lichts befinden, wird oft als „*Optische Dichte*“ (OD) bezeichnet. Des öfteren wird für besagten Exponenten auch die Bezeichnung Extinktion oder zunehmend – wie auch in diesem Dokument – Absorption (Abkürzung A) verwendet.

$$OD = A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Die Gesamtintensität eines elektronischen Übergangs ist durch den integralen Absorptionskoeffizienten A_{int} gegeben:

$$A_{int} = \int \varepsilon(\nu) d\nu \quad (4)$$

ν ist die Frequenz des Lichts.

Mit A_{int} hängt die (dimensionslose) Oszillatorenstärke f zusammen:

$$f = \frac{4m_0 c \varepsilon_0 \ln 10}{N_A e^2} A_{int} = 1,44 \cdot 10^{-19} \text{ M cm s} \cdot A_{int} \quad (5)$$

m_0 ist die Elektronenmasse mit $9,1 \cdot 10^{-31}$ kg, c die Lichtgeschwindigkeit mit $3,00 \cdot 10^8$ m·s⁻¹, ε_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums mit $8,85 \cdot 10^{-12}$ AsV⁻¹m⁻¹, N_A die Avogadrokonstante mit $6,022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹ und e die Elementarladung mit $1,602 \cdot 10^{-19}$ C.

f ist gegeben durch:

$$f = \frac{8\pi^2 m_0 \nu}{3he^2} |\Theta_{21}|^2 \quad (6)$$

Hier geht mit h zusätzlich das Plancksche Wirkungsquantum mit $6,6261 \cdot 10^{-34}$ Js ein.

Das Übergangsdipolmoment Θ_{21} ist definiert zu:

$$\Theta_{21} = \int \Psi_2^* e\vec{r} \Psi_1 dV \quad (7)$$

Ψ_1 und Ψ_2 sind die Wellenfunktionen der am Übergang beteiligten Elektronenzustände, \vec{r} ist der Ortsvektor und dV das Volumenelement. Der integrale Absorptionskoeffizient kann also bei Kenntnis der Wellenfunktionen berechnet werden, und es ergibt sich ein Wert von nahezu 1 für die Oszillatorstärke von sehr starken elektronischen Übergängen.

Sie ist im Spektrum auf eine mehr oder weniger große Zahl von vibronischen und rotatorischen Übergängen verteilt. Diese lassen sich in Lösung allerdings wegen Faktoren wie Inhomogenitätsverbreiterung und oben genannter Kollisionsverbreiterung nur schwer voneinander trennen. Deshalb ist oft nur eine breite Absorptionsbande mit Schultern zu sehen. Diese Verkomplizierungen erlauben es nicht, ausgehend von der Struktur das optische Spektrum eines komplexeren Moleküls (z. B. eines Proteins) genau vorherzusagen.

2.1.2 Proteinspektren

Die Absorption elektromagnetischer Strahlung im optischen Spektralbereich durch Proteine lässt sich in drei Bereiche aufteilen:

- 1) Absorption der Peptidgruppe zwischen 175 nm und 240 nm mit einem Maximum bei 190 nm

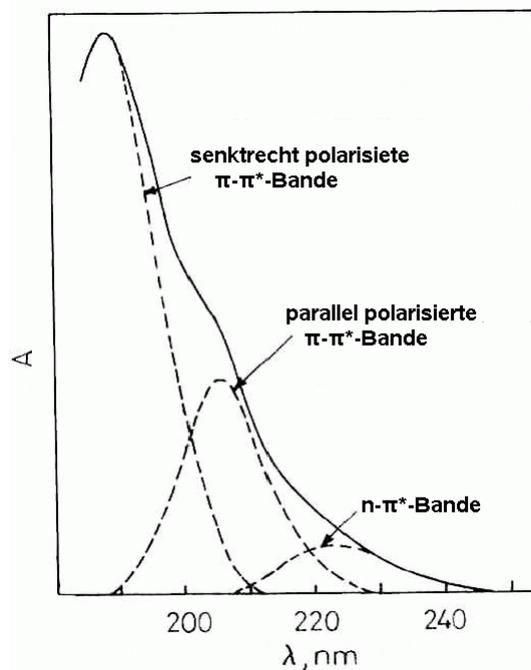


Abb. 9: Absorption der Peptidgruppe.

- 2) Absorption von Aminosäureresten, insbesondere von aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin (zeigt gegenüber den anderen aromatischen Aminosäuren nur eine geringe Absorption) (vgl. Abb. 10). Disulfidbrücken tragen auch zu einem geringen Anteil zur Absorption im Wellenlängenbereich um 280 nm bei.

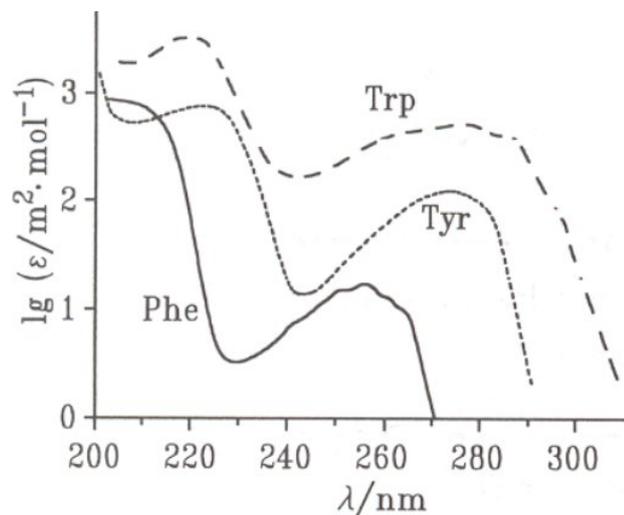


Abb. 10: Absorptionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe)

- 3) Absorption von prosthetischen Gruppen (Chromophore)

Zu 3) gehören bei den Häm-Proteinen die starken Übergänge in der Hämgruppe, deren Energie im Bereich des sichtbaren Lichtes liegt. Je nach Art der beteiligten Orbitale unterscheidet man $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge des Porphyrin-Systems, Ladungs-Transferübergänge zwischen einem Liganden und Eisen oder zwischen dem Porphyrinring und Eisen, sowie Übergänge im 3d-Elektronensystem des Eisens. Die auffälligsten Charakteristika des sichtbaren Absorptionsspektrums des Myoglobins (vgl. Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16), die Soret- oder B-Bande (benannt nach ihrem Entdecker (Soret, J. L. 1883); überaus starker optischer Absorptionsübergang im blauen Spektralbereich), die Q-Bande (absorbiert zwischen 500 und 600 nm) und die N-Bande

(schließt im UV-Bereich an die Soret-Bande an) sind $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge im Porphyrinringsystem.

Durch ihre Lage und Form geben die Absorptionslinien in optischen Spektren Auskunft über den Ladungs- und den Spinzustand des Eisens. Auf den Spin hat der Ligand an der sechsten Koordinationsstelle großen Einfluß.

2.1.3 Einfluß der Ligandierung auf den Spinzustand des Eisens

Der Einfluß des Liganden auf den Spinzustand des Eisens der Hämgruppe wird mit dem Modell des Kristallfeldes beschrieben. Besonders wichtig ist hier die nur teilweise besetzte 3d-Schale. Je nach Oxidationszustand befinden sich in dieser entweder 5 (Fe^{3+}) oder 6 Elektronen (Fe^{2+}). Maximal können dort 10 Elektronen Platz finden. Im freien Eisen-Ion sind die 3d-Orbitale entartet. Für gebundene Ionen erhält man je nach Symmetrie der Umgebung energetisch aufgespaltene Orbitale. Zur Bindung tragen diese Orbitale jedoch nicht wesentlich bei, sondern die Orbitale mit Hauptquantenzahl 4. Diese sind im ionisierten Eisen eigentlich unbesetzt, können aber mit den besetzten Orbitalen der ligandierenden Stickstoffe Molekülorbitale bilden und so zur Bindung beitragen.

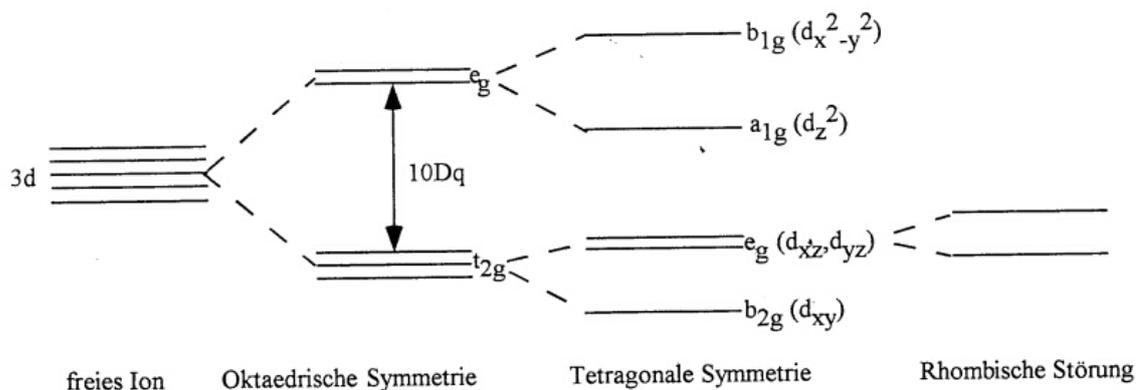


Abb. 11: Zusammenhang zwischen Symmetrie und Kristallfeldaufspaltung ($10 Dq$) der Eisen 3d-Elektronen

Die Aufspaltung der 3d-Orbitale ist in Abb. 11 für Kristallfelder mit absteigender Symmetrie aufgezeichnet. Zunächst werden bei oktaedrischer Symmetrie die Orbitale, die zwischen die Liganden zeigen (e_g -Orbitale), von denjenigen, die in die Richtung der Liganden reichen (t_{2g} -Orbitale), getrennt. Bei tetragonaler Symmetrie (d. h. eine der Rotationsachsen ist noch eine vierfache) spalten alle Orbitale bis auf die symmetrie-äquivalenten d_{xz} - und d_{yz} -Orbitale auf, deren Entartung dann bei rhombischer Störung ebenfalls aufgehoben wird. Der für den Spinzustand entscheidende Parameter ist $10 Dq$. Dieser gibt den energetischen Unterschied an, der zwischen den Orbitalen mit maximaler Elektronendichte in Richtung der Liganden und denjenigen, bei welchen die Elektronen entlang der Winkelhalbierenden der Koordinatenachsen die größte Aufenthaltswahrscheinlichkeit haben (Eaton, W. A. und Hofrichter, J. 1981), besteht. In Abb. 12 wird dies dargestellt.

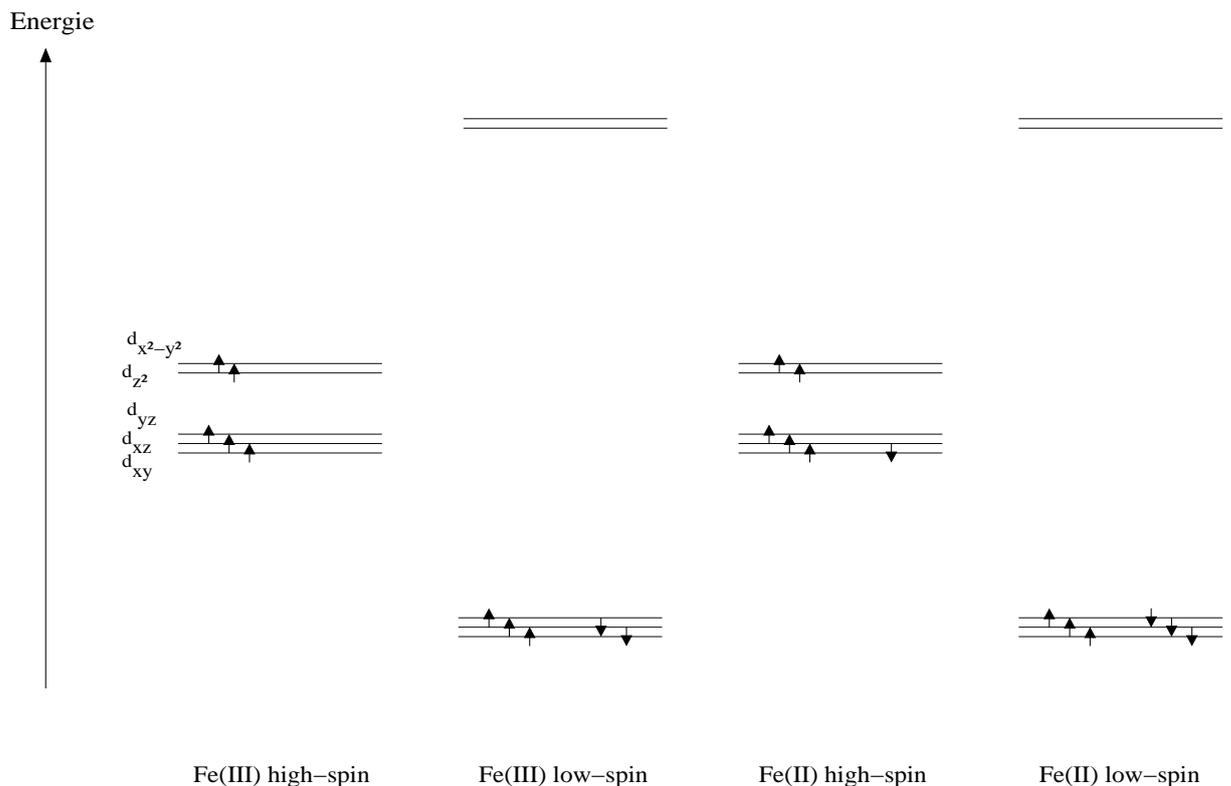


Abb. 12: Abhängigkeit des Spinzustandes von der Kristallfeldaufspaltung: aufgezeichnet ist die energetische Lage der Eisen-3d-Orbitale und ihre Besetzung durch Elektronen.

Der Ligand hat also über die Spinkonfiguration großen Einfluß auf das Aussehen der optischen Spektren: Die Liganden O_2 und CO , deren Bindung an Fe^{2+} teilweise kovalenten Charakter hat, bewirken einen „low-spin“-Komplex mit einer für sechsfach koordiniertes Fe^{2+} typischen Aufspaltung der Q-Bande (Makinen, M. W. und Churg, A. K. 1983) (vgl. Spektrum in Abb. 13).

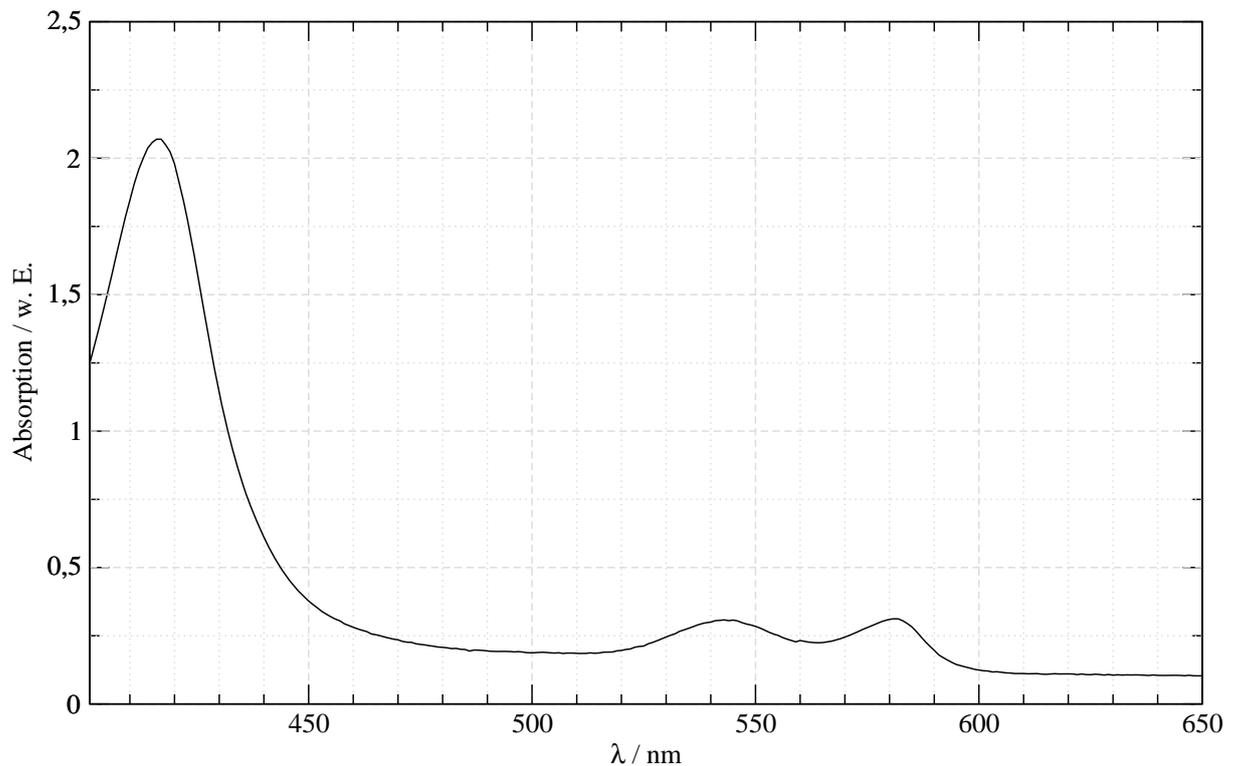


Abb. 13: Spektrum eines „low-spin“-Globins am Beispiel von Oxy-Myoglobin. Die Q-Bande ist vibronisch aufgespalten.

In Deoxy-Myoglobin ist das Eisen nur fünffach koordiniert und die sechste Ligandenposition ist frei. Dies führt zu einem „high-spin“-Komplex (Abb. 14). Verbunden hiermit ist eine Verrückung des Eisen-Atoms aus der Häm-Ebene heraus. Denn die Energie des $3d_{x^2-y^2}$ -Orbitals, dessen maximale Aufenthaltswahrscheinlichkeit in die Richtung der vier das Eisen ligandierenden Stickstoffatome des

Porphyrinringssystem zeigt und das im „high-spin“-Komplex mit einem Elektron besetzt ist, wird dadurch abgesenkt.

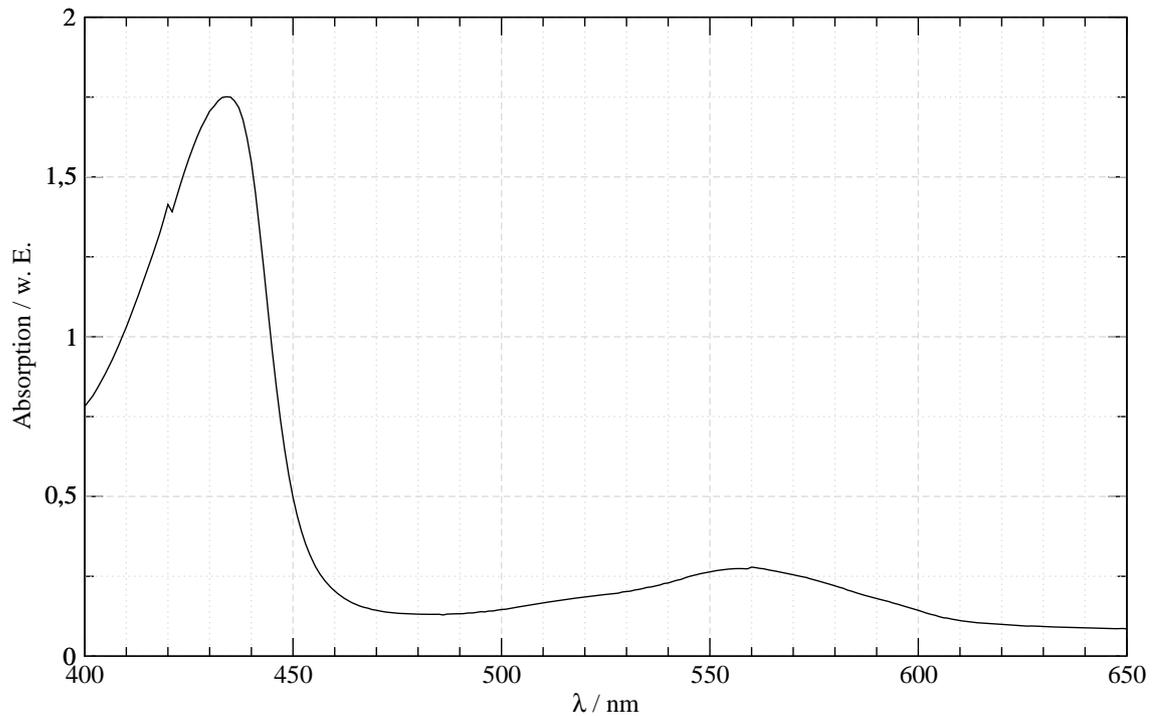


Abb. 14: Spektrum eines „high-spin“-Globins am Beispiel von Deoxy-Myoglobin. Die Q-Bande ist eine sehr breite Bande.

Wasser als Ligand in Met-Myoglobin bewirkt nur eine schwache Kristallfeldaufspaltung: Das Eisen ist im „high-spin“-Zustand (Abb. 15). Demgegenüber ist das Cyanid-Ion ein starker Ligand, und bei Bindung an Stelle des Wasser-Moleküls an das Myoglobin entsteht einen „low-spin“ (Abb. 16).

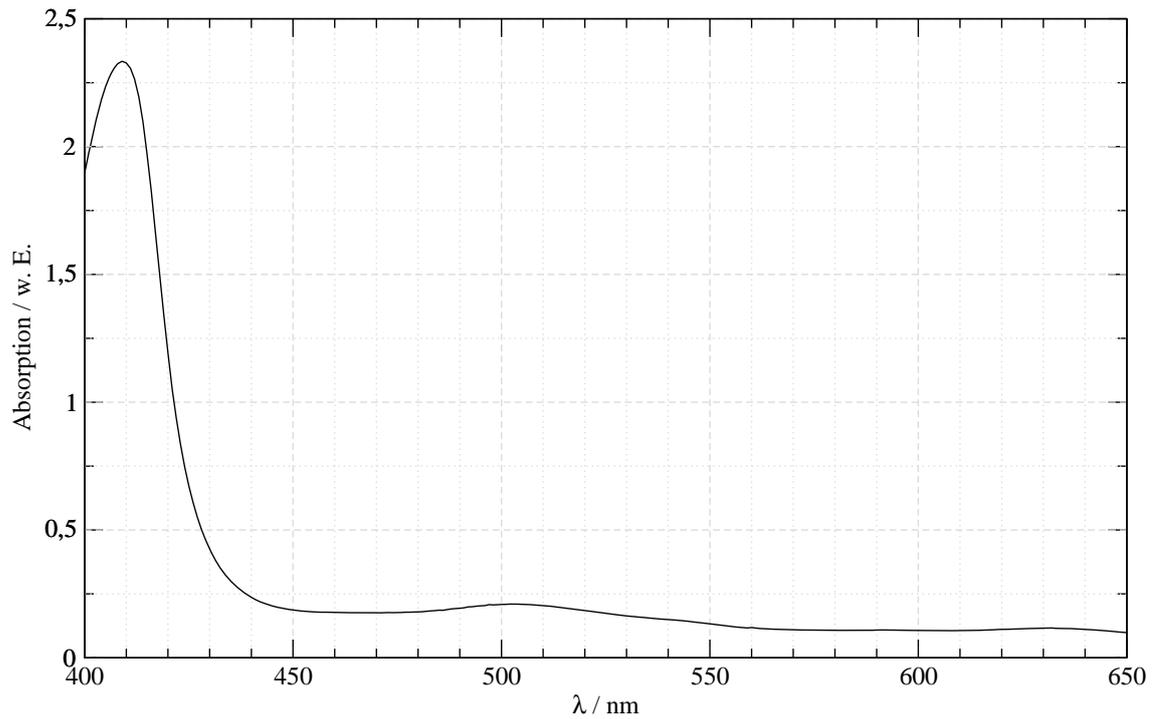


Abb. 15: Spektrum eines „high-spin“-Globins mit dem Eisen im oxidierten Zustand am Beispiel von Met-Myoglobin.

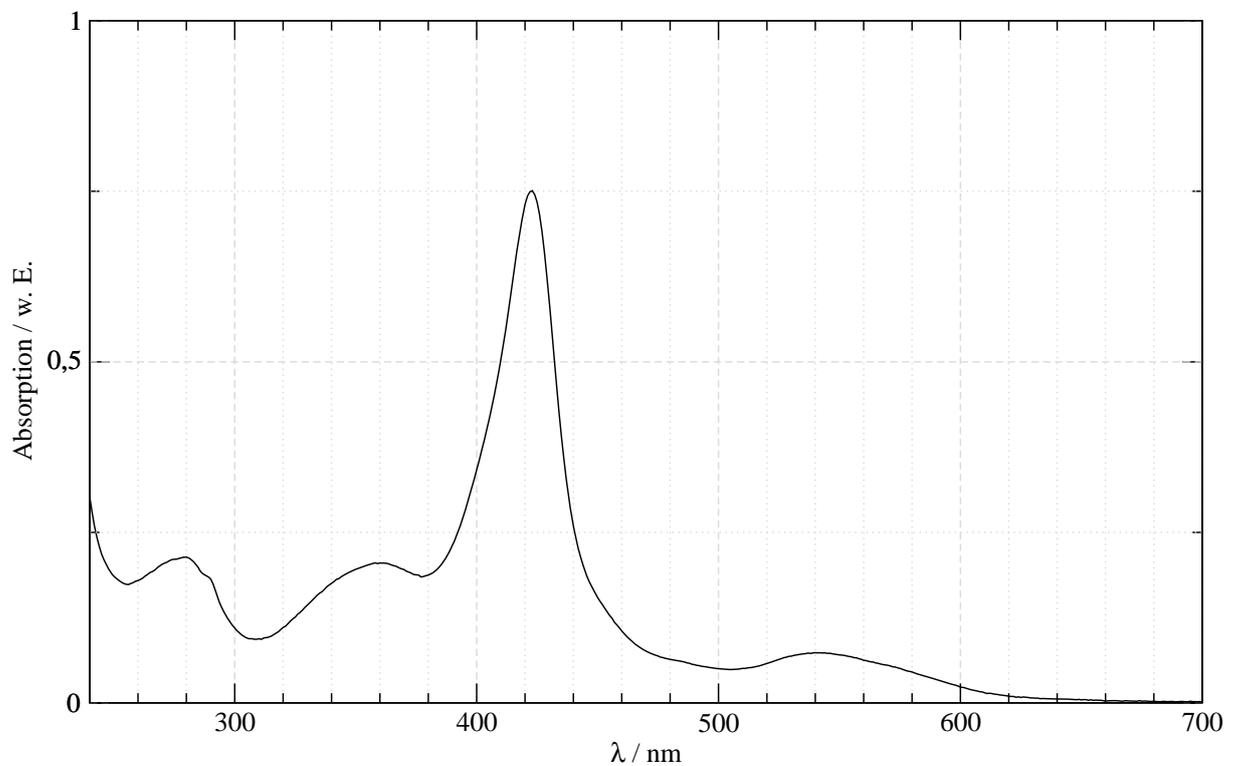


Abb. 16: Spektrum eines „low-spin“ Globins mit dem Eisen im oxidierten Zustand am Beispiel von Cyano-Myoglobin.

In einem Gemisch verschiedener Spezies von sich gegenseitig nicht beeinflussenden Chromophoren ist die gemessene Absorption die Summe der Absorption der einzelnen Spezies:

$$A(\lambda_i, t_j) = \sum_{k=1}^r \varepsilon_k(\lambda_i) \cdot c_k(t_j) \cdot l \quad (8)$$

$A(\lambda_i, t_j)$ ist die Absorption bei der Wellenlänge λ_i und der Zeit t_j . Die Summe auf der rechten Seite läuft über die optischen Dichten $\varepsilon_k(\lambda_i) \cdot c_k(t_j) \cdot l$, $k = 1 \dots r$ der r vorhandenen Spezies, wobei wie in Gl. (3) $\varepsilon_k(\lambda_i)$ der molare Extinktionskoeffizient und $c_k(t_j)$ die zeitabhängige Konzentration der Spezies Nummer k ist und l die Probendicke ist.

Diese Linearität ermöglicht die Anwendung von Werkzeugen aus der Linearen Algebra wie der Singulärwertzerlegung (vgl. Abschnitt 5.2.2.1).

2.2 Ratentheorie

2.2.1 Theorie des Übergangszustandes – Absolute Ratentheorie

Untersucht man den Übergang eines Systems von einem metastabilen Zustand in einen stabilen Endzustand, so findet man in vielen verschiedenen untersuchten Systemen, dass die Reaktionsrate exponentiell von der inversen Temperatur abhängt. Die beiden Zustände sind dabei durch einen Potentialberg (aktivierter Komplex) voneinander getrennt, sodass eine Aktivierungsenergie aufgebracht werden muß. Die Ratengleichung für einen solchen thermisch aktivierten Prozeß wurde von Arrhenius (Van't Hoff-Arrhenius-Gleichung) angegeben (Hänggi, P. et al. 1990):

$$k = \nu \cdot e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{k_B T}} \quad (9)$$

Die Parameter darin sind k für die Übergangsrate, ν für den Vorfaktor, ΔH^\ddagger für die Aktivierungsenthalpie, k_B für die Boltzmannkonstante ($k_B=1,38065 \cdot 10^{-23}$ J/K) und T für die Temperatur.

In der „Absoluten Ratentheorie“ (Eyring, H. 1935) wird der Vorfaktor aus dem zugrunde gelegten Potential bestimmt, so dass k gegeben ist durch:

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \quad (10)$$

Hier wird ein Korrekturfaktor κ (mit $\kappa \leq 1$) eingeführt, der berücksichtigt, dass ein System im Übergangszustand auch wieder in den Ausgangszustand zurückkehren kann und nicht notwendigerweise in den Endzustand relaxiert. Falls κ identisch 1 gesetzt wird, spricht man auch von der „Theorie des Übergangszustandes“. Die weiteren Größen sind das Plancksche Wirkungsquantum h und die Differenz der Gibbschen Freien Energie zwischen aktiviertem Zustand und Ausgangszustand ΔG^\ddagger .

Für Proteine, welche aufgrund ihrer Inhomogenität eine verteilte Übergangsrate $k = k(\Delta G^\ddagger)$ zeigen, wird die Überlebensfunktion $N(t)$ des Intermediates geschrieben als:

$$N(t) = N_0 \int g(\Delta G^\ddagger, t_0) e^{-k(\Delta G^\ddagger, T)t} d(\Delta G^\ddagger) \quad (11)$$

N_0 ist der anfängliche Anteil am Intermediat in der Probe und $N(t)$ der noch nicht relaxierte Anteil zu einem späteren Zeitpunkt t , den man aus der Messung erhält. Mit $g(\Delta G^\ddagger, t_0)$ ist der Anteil an Proteinen mit der Barrierenhöhe ΔG^\ddagger bezeichnet. Die Relaxationsrate $k(\Delta G^\ddagger, T)$ ist abhängig von der Barrierenhöhe und Temperatur nach Gl. (10).

Gl. (11) gilt allerdings nur, soweit keine Übergänge des Proteins zu einer Änderung der Barrierenhöhe während des Zerfalls führen, d. h. ΔG^\ddagger muß für die einzelnen Moleküle des Ensembles konstant sein. Außerdem ist Gl. (11) nicht anwendbar, wenn bis zur Zeit t weiteres Intermediat entsteht. In einem solchen Fall muß in Gl. (11) $N(t)$ und N_0 durch jeweils $Z(t)$ und $Z(t=0)$ ersetzt werden (vgl. hierzu später Abschn. 5.2.3).

2.2.2 Kramers' Gesetz

Bei Berücksichtigung von Reibung (in einem viskosen Medium) weicht der Vorfaktor ν in Gl. (9) wesentlich von dem der Absoluten Ralentheorie aus Gl. (10) ab. Der Vorfaktor im Falle eines Übergangs über eine Potentialbarriere in einem viskosen Medium wurde von Kramers untersucht (Kramers, H. A. 1940; Hänggi, P. et al. 1990).

In (Abb. 17) ist das Potential $U(x)$ mit den Parametern gezeichnet, die den Kramers-Übergang von einem metastabilen Zustand A über einen Potentialberg B in den Endzustand C bestimmen.

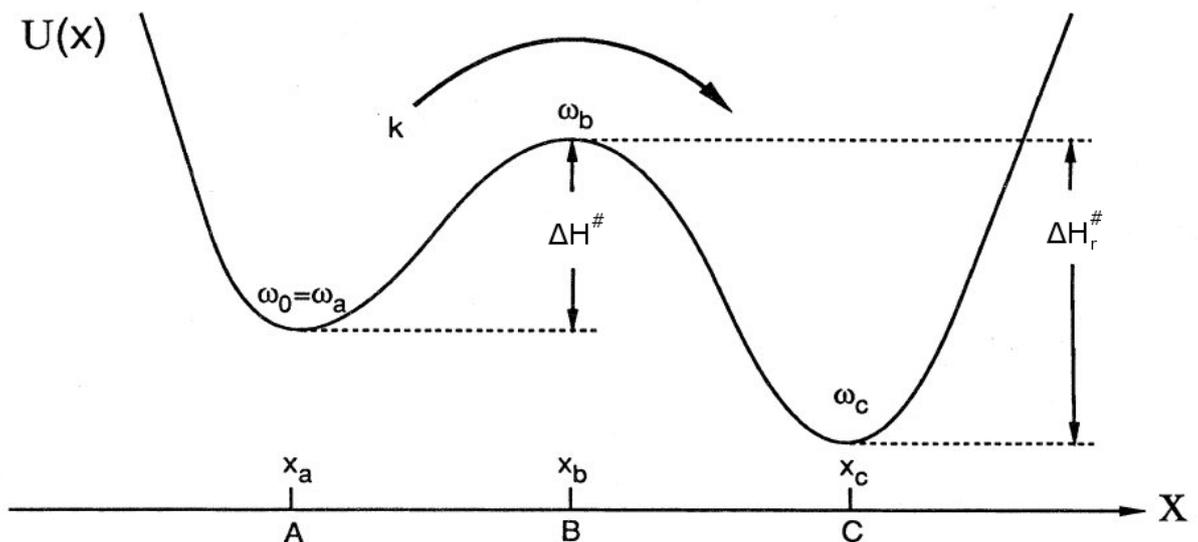


Abb. 17: Potential $U(x)$ mit 2 Zuständen A und C und dem Übergangszustand B. Die Übergangsrate k von A nach C ist, neben der Reibung, abhängig von der Aktivierungsenergie ΔH^\ddagger und den Oszillatorfrequenzen in dem Ausgangszustand $\omega_0 = \sqrt{(M^{-1}U''(X))}$ und der inversen Potentialmulde des Übergangszustandes $\omega_b = \sqrt{(M^{-1}|U''(X)|)}$ (Hänggi, P. et al. 1990).

Für die Übergangsrate k sind die in (Abb. 17) eingezeichneten Krümmungen ω_0 und ω_b des Potentials und die Höhe des Potentialberges ΔH^\ddagger bestimmend:

$$k = \frac{\omega_0}{2\pi\omega_b} \left(\sqrt{\frac{\gamma^2}{4} + \omega_b^2} - \frac{\gamma}{2} \right) e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad (12)$$

ω_0 und ω_b sind die jeweiligen Kreisfrequenzen des metastabilen Ausgangszustandes und des Übergangszustandes (vgl. Abb. 17). Die Temperatur wird mit T bezeichnet. ΔH^\ddagger ist die Differenz der Energien des Übergangszustandes und des Ausgangszustandes. R ist die molare Gaskonstante von 8,31 kJ/mol/K. Der Reibungskoeffizient γ ist die Proportionalitätskonstante zwischen Reibungskraft F_R und Geschwindigkeit v :

$$F_R = \gamma \cdot m \cdot v \quad (13)$$

Darin steht noch die Masse m des Teilchens, so dass γ die Einheit s^{-1} hat.

γ hängt ab von der Viskosität des Mediums und den Teilcheneigenschaften wie z. B. dessen Radius und Form.

Im überdämpften Fall ($\frac{\gamma}{2} \gg \omega_b$) vereinfacht sich Gl. (12) zu:

$$k = \frac{\alpha}{2\pi} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad (14)$$

Dabei ist $\alpha = \frac{\omega_0\omega_b}{\gamma}$.

Damit ist die Übergangsrate umgekehrt proportional zur Reibungskonstante und dadurch stark vom Medium abhängig.

2.3 Proteindynamik – Der erweiterte Brownsche Oszillator

Die proteinspezifischen Bewegungen stellen großräumige Umlagerungen im Protein dar. Dabei verschieben sich Atomgruppen gegeneinander. Eine vereinfachte Beschreibung der Bewegung dieser Segmente kann durch das Modell des Brownschen Oszillators erfolgen. Beim Brownschen Oszillator wird die Bewegung eines Segments durch eine Diffusion im eingeschränkten Raumbereich beschrieben. Das Segment wird

durch Stöße der Umgebung zu Brownscher Bewegung veranlaßt. Durch ein parabelförmiges Potential, in welchem die Diffusion stattfindet, wird eine allzu große Abweichung der Atomkoordinaten von ihrer Gleichgewichtslage und damit eine Denaturierung des Proteins verhindert. In der Erweiterung dieses Modells (Abb. 18) können Proteine in Konformationssubzuständen (CS) strukturell gefangen werden, so dass keine Diffusion mehr möglich ist. In einem solchen Konformationssubzustand ist das Protein relativ steif und kann auch seine biologische Funktion nicht ausüben

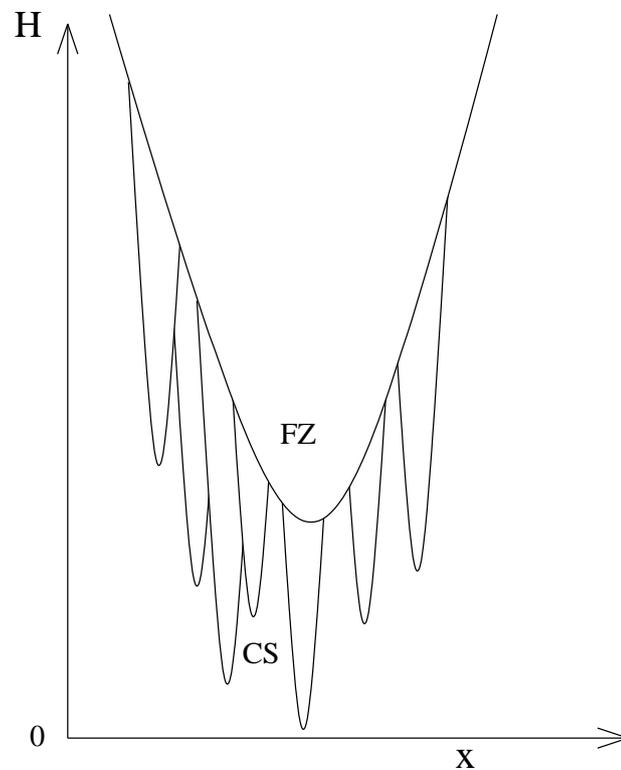


Abb. 18: Modell des erweiterten Brownschen Oszillators: Im flexiblen Zustand (FZ) kann ein Protein großräumige Bewegungen ausführen. Diese sind überdämpft und finden im eingeschränkten Raumbereich statt. Die Konformationssubzustände (CS) bilden Strukturfallen, in denen das Protein gefangen werden kann. Durch thermische Anregung kann es wieder in den flexiblen Zustand gelangen.

Die effektive Reibungskonstante γ ist dann für Prozesse, die wesentlich langsamer ablaufen, verglichen mit den Verweilzeiten des Proteins in einem Konformations-subzustand oder im flexiblen Zustand, erhöht:

$$\gamma = \frac{\gamma_{t0}}{p_t} \quad (15)$$

γ_{t0} ist die Reibungskonstante für ein Segment, wenn sich das Protein ausschließlich im flexiblen Zustand aufhält. p_t ist die Wahrscheinlichkeit für das Protein, sich im flexiblen Zustand zu befinden ($p_t < 1$), und läßt sich bei Vorliegen eines thermischen Gleichgewichts zwischen Konformations-subzuständen und flexiblem Zustand aus dem Boltzmann-Faktor berechnen:

$$p_t = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G_{flex}}{k_B T}}} \quad (16)$$

ΔG_{flex} ist die Differenz der Gibbsschen Freien Energien zwischen dem flexiblen Zustand und den Konformations-subzuständen.

Damit wird die Viskosität im Innern des Proteins temperaturabhängig, da p_t eine Funktion der Temperatur T ist, obwohl γ_{t0} sich nicht mit der Temperatur ändert.

3 Proben

3.1 Probenpräparation

3.1.1 Hämoglobin

Lyophilisiertes menschliches Hämoglobin wurde zunächst durch Gelpermeationschromatographie gereinigt und anschließend dialysiert (Puffer: 400 mM NaCl, 200 mM K_2HPO_4 , 40 mM EDTA, pH 6,8). Nach starker Aufkonzentration durch Zentrifugation in Centricons auf eine Proteinkonzentration von etwa 5 mM wurde Glycerin zugesetzt, um eine Endkonzentration von 75 vol-% Glycerin, 100 mM NaCl, 50 mM K_2HPO_4 und 10 mM EDTA bei einem pH von 7 zu erhalten. Mit dieser Probe wurden die Hämoglobin-Spektren ohne Photoreduktionsmittel gemessen.

Eine weitere Probe wurde erhalten, indem zusätzlich noch Nicotinamid (Fluka) in einer Endkonzentration von ca. 100 mM zugesetzt wurde. Diese Probe wurde für die zeitaufgelösten Messungen an Hämoglobin nach Laserbeschuß verwendet.

Die für Photoreduktionsexperimente notwendigerweise hohe Proteinkonzentration hat auch den Vorteil, dass sich das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht auf die Seite des Tetramers verschiebt.

3.1.2 Myoglobin

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Photoreduktionsexperimente wurde lyophilisiertes Myoglobin aus Pferdeherz (Sigma) verwendet. Dieses zeigt im Vergleich zu Pottwal-Myoglobin eine vierfach höhere Reduktionsausbeute (Lamb, D. C. et al. 1998a). Das Protein wurde, nachdem durch eine SDS-PAGE nachgewiesen worden war, dass keine weitere Reinigung nötig ist, im Puffer (50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 , 100 mM EDTA, 75%

Glyzerin, pH=7,2) gelöst, wobei die Lösung über Nacht umgerührt wurde. Die Probe wurde dann wegen der großen zugegebenen Menge an Protein über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert. Hieraus wurden zwei Proben gewonnen:

Eine Referenzprobe ohne Photoreduktionsmittel ergibt sich durch Verdünnung 50:50 mit dem Puffer.

Die Probe für die zeitaufgelösten Spektren wurde durch Zugabe von einem gleich großen Teil Ru(bpy)₃-Lösung (100 mM Ru(bpy)₃ in Puffer) erhalten, so dass sich eine Endkonzentration von ca. 4 mM Mb, 50 mM Ru(bpy)₃, 50 mM KP_i, 100 mM EDTA, 75% Glyzerin und pH 7,2 einstellt.

Eine weitere Probe für zeitaufgelöste Messungen an Ru(bpy)₃ ohne Protein für Referenzmessungen wurde gemischt, indem eben erwähnte Ru(bpy)₃-Lösung 50:50 mit Puffer verdünnt wurde.

3.1.3 Neuroglobin

Menschliches Neuroglobin wurde rekombinant hergestellt. Dazu wurden von dem das entsprechende Plasmid enthaltenden Bakterienstamm Agar-Kulturen gezüchtet: Die dafür verwendeten Agar-Platten (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Agar, pH=7,4) waren für 30 Min. bei 120 °C sterilisiert und nach Abkühlen auf 40 °C und Zugabe von 100 mg/l Ampicillin und 30 mg/l Chloramphenicol nochmal während einer Stunde UV-Strahlung ausgesetzt worden. Eine der gewachsenen Kolonien wurde mit einer Impföse in 50 ml LB-Medium (10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, pH=7,4), dem nach der Sterilisation und Abkühlen 200 mg/l Ampicillin und 30 mg/l Chloramphenicol zugegeben worden waren, übertragen und bei 37 °C für 24 h im Schüttel-Wasserbad wachsen gelassen. Ein Tropfen davon wird wieder zu Agar-Kulturen herangezogen und 0,5 ml in 70 % Glyzerin eingefroren. Der Rest wird in 1500 ml LB-Medium (5 g/l NaCl, 0,17 g/l δ-Aminolävulinsäure, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, mit 1 M HCl auf pH=7,4 eingestellt), welchem nach der Sterilisation Ampicillin und Chloramphenicol zugesetzt worden sind, für 30 h bei Raumtemperatur

geschüttelt. Durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid) wurde die Expression des Proteins induziert. Nach weiteren 30 h bei Raumtemperatur wurde bei 4 °C das Bakterium abzentrifugiert. Vor dem Einfrieren bei -25 °C wurde die Lösung auf Staphylokokkenbewuchs mit dem Mikroskop untersucht.

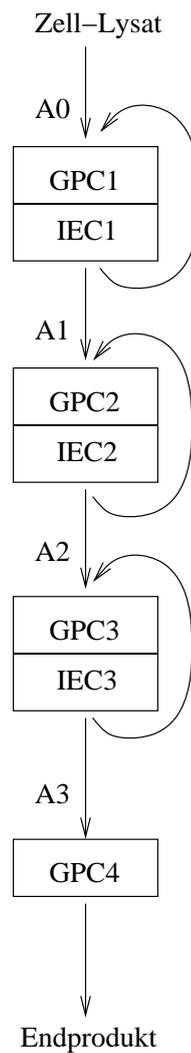


Abb. 19: Flußdiagramm zum Ablauf der Reinigung von Neuroglobin; Die Ausgangslösung ist mit A0 bezeichnet, die nach den einzelnen Reinigungsschritten erhaltenen Zwischenprodukte mit A1, A2 und A3. verwendete Abkürzungen für die Arbeitsschritte: GPC (Gelchromatographie), IEC (Ionenaustauschchromatographie)

Die Bakterien wurden zum Waschen 2 h auf Eis in Tris-Puffer (3,03 g/l Tris, 4,4 g/l EDTA, 100 g/l D-Glukose, pH=8,0) mit einem elektrischen Propeller gerührt und anschließend bei 4 °C abzentrifugiert. Das Aufbrechen der Bakterien im abzentrifugierten Niederschlag geschah im Lysepuffer (6,06 g/l Tris, 18,6 mg/l EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF (α -Toluolsulfonylfluorid), pH=8,0, 0,401 g/l DNase, 4,1 g/l Lysozym). Die Lösung wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgetaut und wieder eingefroren. Am nächsten Tag folgte eine Ultraschallbehandlung.

Von den anderen Zellbestandteilen wurde das gewünschte Protein durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung abgetrennt. Dazu wurde erst durch sehr langsame Zugabe von Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren dessen Konzentration auf 30 % erhöht und am nächsten Tag bei 20 000 g für 5-10 Minuten mit der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde nun in 55%igem Ammoniumsulfat ausgefällt. Der hieraus am folgenden Tag abzentrifugierte Niederschlag wurde in Puffer (6,06 g/l Tris, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, pH=8,0) aufgelöst, nochmals bei 23 000 g für 30 Min. zentrifugiert und der Überstand in Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Diese Masse enthält nur ca. 2 – 5 % Neuroglobin, weshalb das Protein zur Aufreinigung wiederholt an einer Anionentauschersäule gebunden wurde (vgl. Flußdiagramm in Abb. 19). Vor den eigentlichen Reinigungsschritten mußte die Proteinlösung (A0 in Abb. 19) mit Hilfe eines Laufs durch eine Gelpermeationschromatographiesäule (\varnothing 52 mm \times 85 mm), die mit einer Dextran-Matrix (Pharmacia Sephadex G25-m) gefüllt ist, entsalzt werden. Der verwendete Puffer A bestand aus 10 mM Tris-Cl, 0,5 mM DTT (DL-Dithiothreitol), 0,2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und 1 ‰ DMSO (Dimethylsulfoxid) bei pH=8,0. In diesem Zustand kann das Protein an Q-Sepharose in der Anionentauschersäule binden. Die Elution wurde mit einem ansteigenden Salzgradienten durch steigenden Anteil von Puffer B (50 mM Tris-Cl, 2 M NaCl, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1 ‰ DMSO, pH=8,0) im Elutionspuffer durchgeführt. Die Randfraktionen der Neuroglobin enthaltenden Fraktionen wurden noch einmal auf die gleiche Weise gereinigt und erst danach mit den mittleren Fraktionen vereinigt. Die erhaltene Proteinlösung ist in Abb. 19 mit A1 bezeichnet.

Diese Prozedur wurde noch zweimal durchgeführt (Probe A2 und A3 in Abb. 19) bis eine Kontroll-SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) keine Verunreinigung des Neuroglobins mehr zeigte. Durch eine weitere Gelpermeationschromatographie mit Puffer A wurde der Salzgehalt der Endprobe wieder reduziert.

3.2 Photoreduktionsmittel

Die hier vorgestellten Photoreduktionsmittel können durch einen Lichtblitz elektronisch in einen Zustand mit stark negativem Reduktionspotential angeregt werden. Die Elektronenübertragung von diesem angeregten Zustand auf ein Häm-Protein als möglichem Elektronenfänger ermöglicht das Auslösen von Prozessen, die in den gewählten Proteinen nach Reduktion ablaufen.

Zu beachten ist, dass keines der Photoreduktionsmittel nach Anregung durch einen Nanosekundenlaserblitz eine instantane Reduktion (eine Reduktion, die in kürzerer Zeit abläuft als mit der vorhandenen Apparatur aufgelöst werden kann) ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zeitspanne zwischen dem Laserblitz und der Übertragung der Elektronen auf das Protein ausreichend ist für ein Äquilibrieren der Probe auf die Meßtemperatur nach einem durch den Laserstrahl verursachten plötzlichen Aufheizen um mehrere Grad.

3.2.1 Tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(II) - (Ru(bpy)₃)

Tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(II) (Strukturformel siehe Abb. 20), im folgenden kurz mit Ru(bpy)₃ bezeichnet, ist ein effizientes Photoreduktions- als auch -oxidationsmittel und wird in der Biophysik standardmäßig bei lichtinduzierten Reduktionsprozessen verwandt (Contzen, J. und Jung, C. 1999; Telford, J. R. et al. 1999; Engler, N. et al. 2000). Es wurde aufgrund seiner im Vergleich zu den anderen hier vorgestellten Photoreduktanzien schnellen Elektronenübertragung (Kauffmann, E. 2000) bei den zeitaufgelösten Messungen von Myoglobin als Photoreduktionsmittel verwendet. Bei

Myoglobin sind nämlich die schnellen Zeiten entscheidend, da sein Intermediat besonders kurzlebig ist.

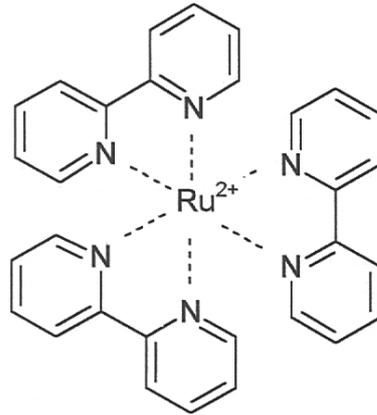
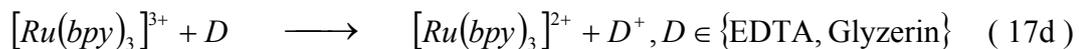
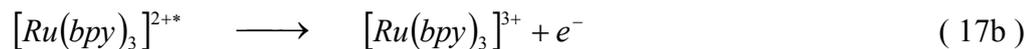
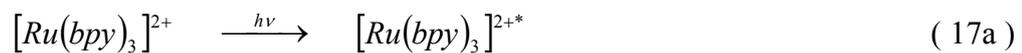


Abb. 20: Struktur von Tris(2,2'-bipyridine)-ruthenium mit dem zentralen Ruthenium-Ion und den drei ligandierten Bipyridinen

Durch Lichtanregung finden folgende Reaktionen statt (Whitten, D. G. 1980):



Die Lichtanregung des Tris(2,2'-bipyridin)-rutheniums (17a) findet dabei während ca. 7 ns statt. Dies ist die Dauer des Laserpulses mit der Wellenlänge 355 nm. Das Redoxpotential $[Ru(bpy)_3]^{3+}/[Ru(bpy)_3]^{2+*}$ ist mit -0,84 V stark negativ (Lin, C.-T. et al. 1976). Somit kann $[Ru(bpy)_3]^{2+*}$ vom energetischen Standpunkt das Häm-Eisen des Myoglobins reduzieren (17b,c). Zur Verhinderung der Rückreaktion, bei welcher das Protein wieder oxidiert und $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ wieder reduziert würde, kann das beigemischte EDTA als auch das Glyzerin des Lösungsmittels als Elektronendonator dienen (17d) (Hamachi, I. et al. 1993; Contzen, J. und Jung, C. 1999).

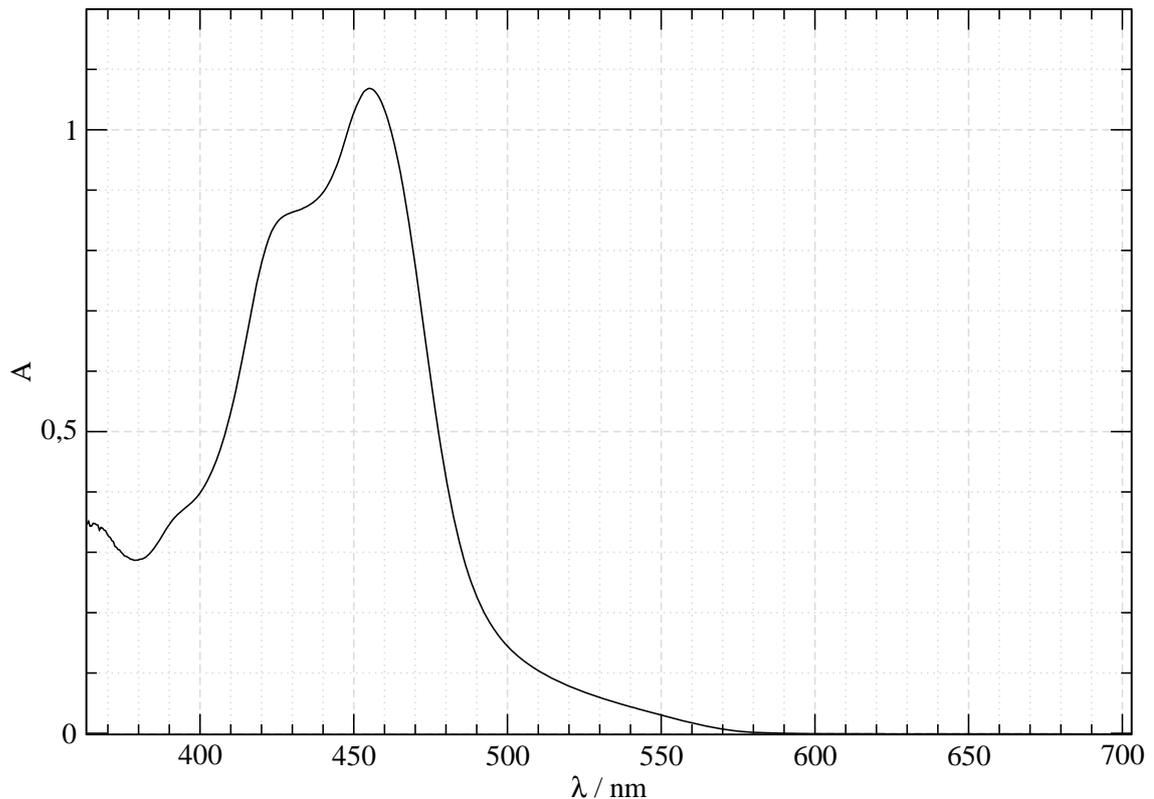


Abb. 21: Absorptionsspektrum von Ru(bpy)₃ bei 190 K. Seine stärkste Absorption liegt zwischen 400 und 500 nm und damit im Bereich der Soret-Bande von Häm-Proteinen. Diese Überlappung führt im Laufe der Auswertung zu Komplikationen (vgl. Kap. 5). Im Bereich der Q-Banden von Häm-Proteinen zwischen 500 und 600 nm findet sich dagegen nur noch ein Ausläufer der Absorptionsbande.

Die Absorptions- und Differenzspektren sind in Abb. 21 bzw. Abb. 22 gezeigt.

In Abb. 22 wird auch ein Nachteil von Ru(bpy)₃ deutlich: Es gibt ein Signal im sichtbaren Wellenlängenbereich und überlappt so mit dem des Myoglobins. Ein weiterer Nachteil dieses Photoreduktionsmittels ist sein komplexes Zeitverhalten: In einer Serie von zu verschiedenen Zeiten gemessenen Differenzspektren ist der Beitrag von Ru(bpy)₃ besonders bei kurzen Zeiten dominierend und wird zu späteren Zeiten schwächer. Allerdings ändert sich dabei auch die Form des Spektrums leicht.

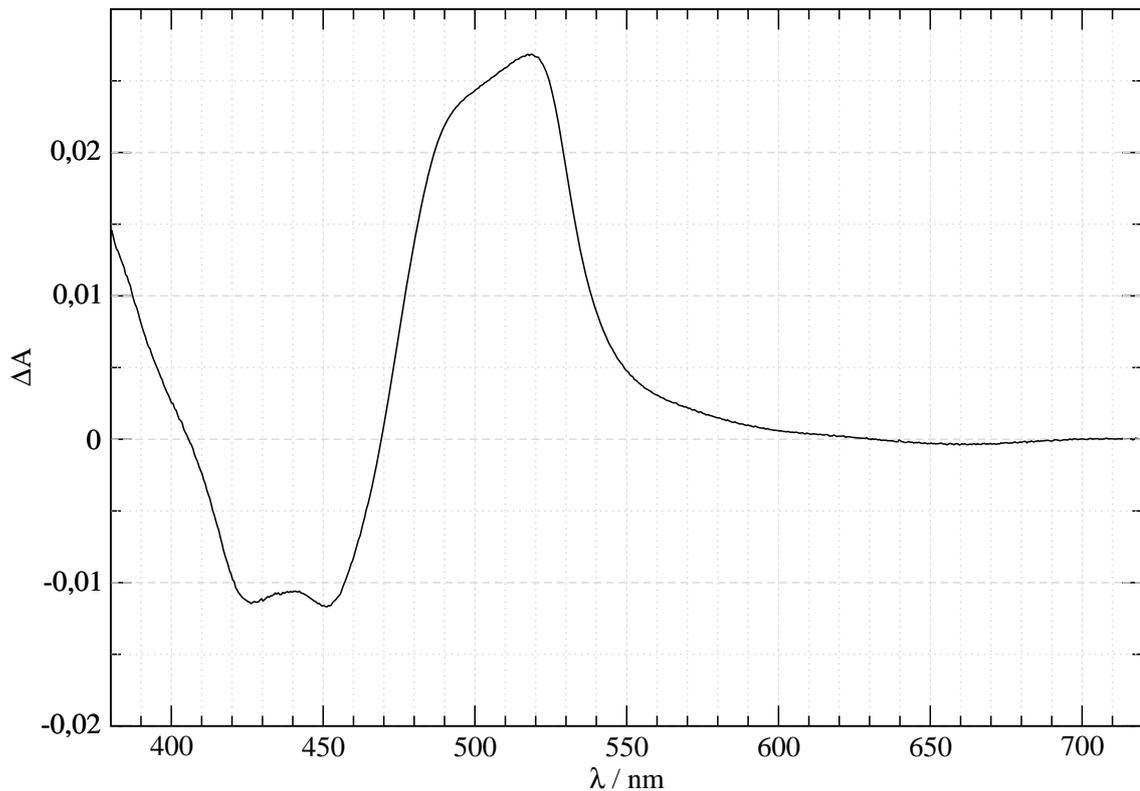


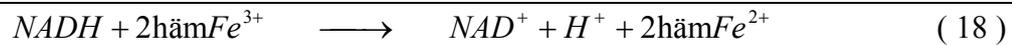
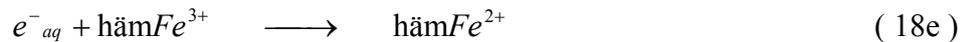
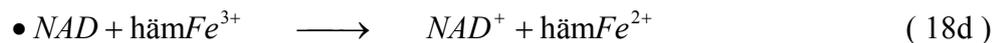
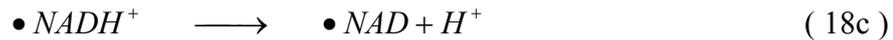
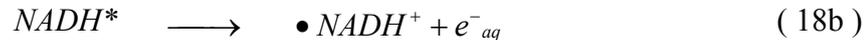
Abb. 22: Differenzspektrum von Ru(bpy)₃ 1,66 s nach der Anregung durch den Laserblitz bei einer Temperatur von 190 K. Die Differenz wurde gegenüber dem Ausgangsspektrum, also dem nicht beleuchteten Ru(bpy)₃, ausgerechnet.

3.2.2 Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)

Als Photoreduktionsmittel ist neben Ru(bpy)₃ auch noch Nicotinamidadenindinukleotid, eigentlich Nicotinsäureamidadenindinukleotid (NADH), sehr gebräuchlich (Orii, Y. 1993; Wittung-Stafshede, P. et al. 1999). Dieses wurde für die zeitaufgelösten Reduktionsmessungen an Neuroglobin angewandt, da mit ihm eine höhere Reduktionsausbeute zu erreichen ist.

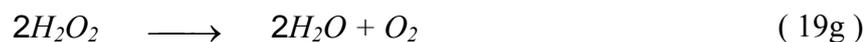
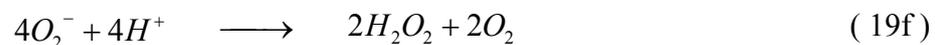
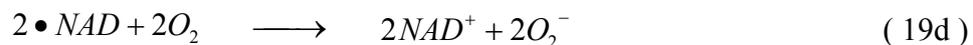
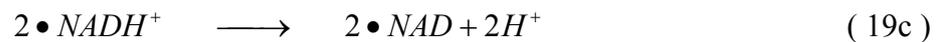
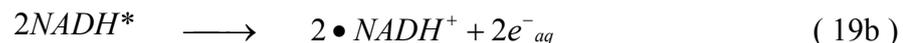
NAD⁺/NADH ist ein wichtiger Cofaktor bei zellulären Prozessen. So tritt es z. B. in der Atmungskette als Oxidationsmittel und als Elektronenüberträger auf. Seine Strukturformel ist in Abb. 23 gezeichnet.

Die folgenden Reaktionen laufen nach der Anregung von NADH durch einen Laserblitz in Gegenwart eines reduzierbaren Häm-Proteins ab (Joubert, F. et al. 2004):



Die Redoxpotentiale des hydratisierten Elektrons e^-_{aq} und des NAD-Radikals $\bullet NAD$ sind mit jeweils -2,9 V und -0,92 V stark negativ. Zu den Gleichungen (18) ist anzumerken, dass die Lösung sauer wird.

In Gegenwart von Sauerstoff in der Lösung können auch Reaktionen nach dem folgenden Schema ohne Beteiligung des Proteins auftreten:



Im Gegensatz zum Falle mit Reduktion des Proteins wird die Lösung basisch.

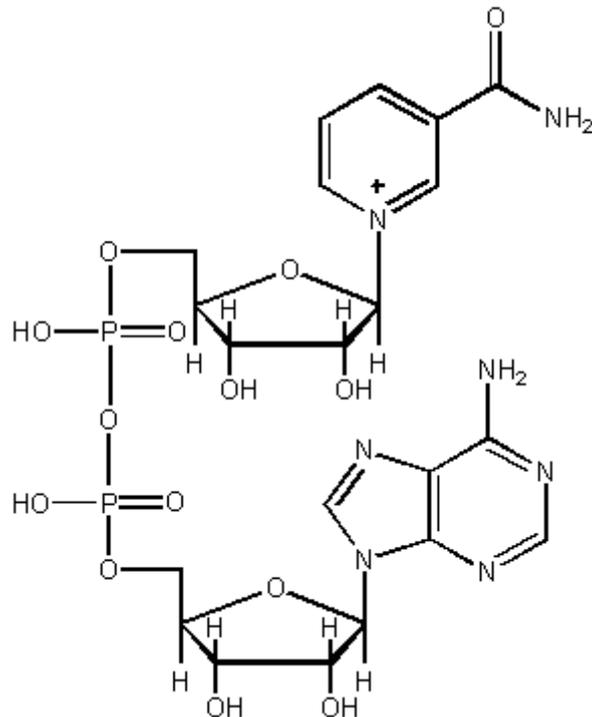


Abb. 23: Strukturformel von NAD^+ . Das photoaktive Zentrum ist der Pyridinring.

Wenn die Reaktionen nach Gl. (18) und (19) in einer Protein-Lösung ablaufen, welche nicht entgast wird und deshalb Sauerstoff gelöst enthält, bleibt der pH-Wert selbst ohne Puffer konstant (Joubert, F. et al. 2004).

Ein Vorteil von NADH neben der höheren Reduktionsausbeute ist auch die Lage seiner Absorptionsbande, die nicht mit dem Wellenlängenbereich, in dem in dieser Arbeit gemessen wurde, überlappt. Als Nachteil kann die gegenüber $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ deutlich langsamere fortschreitende Reduktion eines beigemischten Proteins nach Lichtanregung genannt werden. Außerdem wirkt es in Dunkelheit schon reduzierend auf Hämoglobin, was seinen Einsatz bei diesem Protein verhindert, so dass dort auf eine verwandte Substanz (Nicotinsäureamid) zurückgegriffen werden musste.

3.2.3 Nicotinsäureamid

Nicotinsäureamid, auch Niacinamid, Niacin oder Vitamin B3 genannt, ist der reaktive Teil von NADH (Kalyanasundaram, K. et al. 1989) und wurde stattdessen für die zeitaufgelösten Messungen an Hämoglobin verwendet. Im Gegensatz zu NADH reduziert es nämlich nicht vor der eigentlichen Messung schon einen beträchtlichen Anteil von Hämoglobin auch ohne Belichtung. Ein vor dem Laserblitz reduziertes Myoglobin- oder Hämoglobinmolekül wäre in der Deoxy-Form zwar inert, da es sich nicht weiter reduzieren ließe und trüge also zu den Differenzspektren kein Signal bei. Jedoch der gelöste Sauerstoff bindet an diese Moleküle und diese O₂-beladenen Moleküle erzeugen ein sehr starkes Signal nach einer Laseranregung.

Nachteil des Reduktionsmittels Nicotinsäureamid ist seine tief im UV liegende Absorptionsbande, welche den Experimentator nötigt, die Wellenlänge des Anregelaserpulses zu verkleinern. Die vierte Harmonische eines Nd:YAG-Lasers (bei 266 nm) ist zur Anregung des Nicotinsäureamids gut geeignet (vgl. Abb. 30). Photonen dieser hohen Energie können aber auch Bindungen des Proteins brechen und so zu ungewollten Schädigungen führen. Aufgrund dessen wurde im Experiment mit diesem Photoreduktionsmittel die Energie des Anregelaserpulses auf 20 mJ beschränkt.

4 Aufbau der Apparatur

4.1 Zeitaufgelöstes optisches Spektrometer

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein optisches Spektrometer mit Zeitauflösung im Millisekunden-Bereich (Gutscher, W. 2002) umgebaut und ergänzt, so dass nun eine Kinetik über nahezu 7 Dekaden in der Zeit aufgenommen werden kann.

Das Spektrometer ist in einen Aufbau mit einem Kryostaten, der Probentemperaturen bis hinunter zu 17 K zulässt, integriert. Für Blitzlichtphotolyse und Blitzlichtreduktionsexperimente kann ein Laserpuls den Beginn der Experimente auslösen, indem eine Reaktion in der Probe gestartet wird. Bei Blitzlichtphotolyseexperimenten geschieht dies durch das Abblitzen eines Liganden, der in der Folgezeit wieder rückbindet, und bei Blitzlichtreduktionsexperimenten durch das Anregen eines photoaktiven Reduktionsmittels in der Probe, welches durch die Anregung in die Lage versetzt wird, das zu untersuchende Protein zu reduzieren.

Folgendes Prinzip wird für die Aufnahme angewandt: Um eine hohe Zeitauflösung zu erreichen, wird ein *Photodiodearray* (PDA) eingesetzt. Deshalb muß das Farbspektrum nicht durchgefahen werden. Im vorhandenen Aufbau befindet sich im Detektor eine lineare Anordnung von 1024 Photodioden. Die Probe wird von weißem Licht durchstrahlt, und erst hinter der Probe befindet sich ein Gitterspektrograph, der das Licht in sein Spektrum zerlegt, so dass die transmittierte Intensität wellenlängenabhängig vom PDA registriert werden kann. Jede der Dioden mißt das transmittierte Licht bei einer ganz bestimmten Wellenlänge. Dass das Spektrum nicht mehr durchgefahen werden muß, hat neben der erhöhten Geschwindigkeit, mit der Spektren aufgenommen werden können, auch den Nebeneffekt, dass weniger mechanisch bewegte Teile in den Aufbau integriert sind.

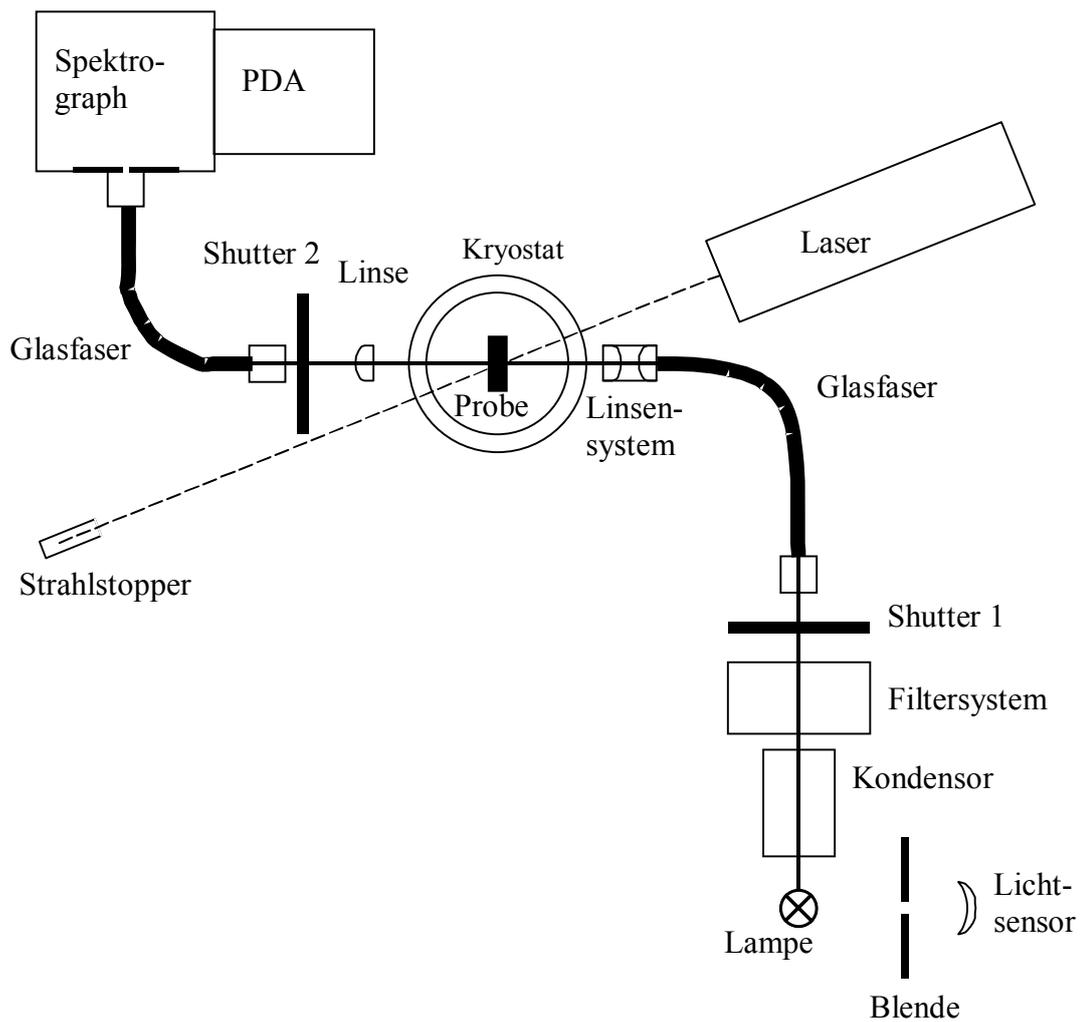


Abb. 24: Schematischer Aufbau des Spektrometers: Der Strahlengang von der Lampe zum Spektrograph ist durch eine dicke Linie gekennzeichnet. Er kreuzt sich am Ort der Probe im Kryostaten mit dem Strahl des Lasers, welcher allerdings nur zu Beginn der Messung einen 7 ns Puls aussendet, um die Reaktion zu starten, den Rest der Messung aber aus ist. Der Photodiodenarray (PDA), auf den das durch den Spektrograph spektral aufgespaltene Licht fällt, wird mit einem Rechner zur Steuerung und zum Datenauslesen verbunden und ermöglicht die Aufnahme von optischen Spektren mit einer Frequenz von 833 Hz. Laser und Shutter werden von einer Elektronik gesteuert und mit der Messung synchronisiert. Da der Aufbau ohne Referenzstrahl realisiert ist, wird die den Lichtsensor erreichende Strahlungsintensität der Lampe auf einen konstanten Wert geregelt.

Abb. 24 zeigt den Aufbau. Die verwendete Lampe ist eine konvektionsgekühlte Halogenlampe mit 10 W bzw. 100 W Leistung. Zur Stabilisierung ihrer Lichtintensität wird die Betriebsspannung der Lampe durch einen Lichtsensor, vor dem sich eine Blende befindet, rückgekoppelt. Das so stabilisierte Licht wird kollimiert und durchläuft danach ein Filtersystem. Dieses besteht zum einen aus einem Wasserfilter mit einer Weglänge von 54 mm destillierten Wassers. Hierdurch wird vor allem der Infrarotanteil, der zu einer thermischen Belastung der Probe führen würde, stark reduziert. Außerdem ist noch ein Rotfilter nachgeschaltet. Dieser verhindert ein Übersteuern des Detektors im roten Spektralbereich. Bevor das Licht in die Glasfaser (aus UV-Quarz) eingekoppelt wird, kann es von einem schnellen elektronischen Verschlussmechanismus (Shutter 1) geblockt werden. Shutter 1 ist während des Abkühlens der Probe geschlossen und wird erst ca. hundert ms vor der Aufnahme der Spektren geöffnet. Durch ein Linsensystem am Ausgang der Glasfaser wird das Licht auf die Probe im optischen Kryostaten (ROK 10-300, Leybold) fokussiert. Eine genaue Beschreibung des Kryostaten und des Kühlsystems findet sich in (Engler, N. 1998). Der Durchmesser des ausgeleuchteten Bereichs beträgt ungefähr 2,5 mm. Hinter der Probe wird das transmittierte Licht durch eine Linse kollimiert, durchtritt einen weiteren Shutter (Shutter 2) und wird wieder in eine Glasfaser eingekoppelt. Der Austritt dieses Lichtleiters, der mit dem Spektrographen (MS 125, Oriol) verbunden ist hat eine Breite von 0,1 mm und eine Höhe von 2,5 mm. Der Spektrograph hat eine Brennweite von 125 mm und ein Öffnungsverhältnis von $f/3,7$. Im Spektrographen wird das Licht nach der gekreuzten Czerny-Turner-Konfiguration zunächst von einem gewölbten Spiegel auf ein Beugungsgitter mit 400 L/mm gelenkt. Über einen weiteren Spiegel trifft das so zerlegte Licht schließlich auf den Photodiodenarray (Insta Spec II, Oriol). Er besteht aus 1024 Photodioden mit einer Größe von $25 \mu\text{m} \times 2500 \mu\text{m}$. Der erzeugte Photostrom wird kapazitiv gespeichert und für jede Photodiode nacheinander ausgelesen. Die maximale Rate, mit der Spektren aufgenommen werden können, ergibt sich zu 833 Hz. Die Steuerung und Datenerfassung erfolgt an einem Rechner durch die Software „INSTASPC“. Zur Verringerung des Dunkelstroms kann der PDA mit einem Peltier-Element auf $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt werden.

Die Synchronisation des Spektrometers mit einem Laser wird durch eine elektronische Schaltung (Anhang A Abb. 66) gewährleistet. Der verwendete Laser, ein gütegeschalteter Nd:YAG-Laser (Surelite I-10, Continuum), erzeugt mit 10 Hz Wiederholfrequenz Laserpulse von ca. 7 ns Dauer. Ursprünglich gibt es daneben die Möglichkeit manuell einen einzelnen Laserpuls auszulösen, indem man einen Druckschalter betätigt. Dieser manuelle Schalter ist durch ein elektronisches (Bauteil MC14016) ersetzt. Die Steuerelektronik ist im Anhang A gezeigt und erklärt. Die Größe des vom Laser ausgeleuchteten Bereichs der Probe ist mit 7 mm deutlich größer als der von der Halogenlampe ausgeleuchtete Bereich. Damit wird eine lateral homogene Probe im Meßbereich auch nach Laserbeschuß gewährleistet. Die Diffusion von Molekülen aus nicht vom Laser beleuchteten Bereichen der Probe in das Meßvolumen wird durch die Größe des Laserflecks auch verhindert.

Die optischen Komponenten sind auf einer gummigelagerten Steinplatte aufgebaut. Diese weist ein Loch auf, in welchem der Kryostat mit der Probe platziert ist, ohne die Steinplatte zu berühren. So wird eine mechanische Entkopplung des stark vibrierenden Kryostaten vom optischen Aufbau erreicht.

4.2 Durchführung einer Messung

Vor Durchführung des eigentlichen Experiments muß eine Untergrundmessung bei geschlossenem Shutter durchgeführt werden. Hierdurch können der Dunkelstrom der Photodioden und systematische Fehler, die durch das elektronische Auslesen der angesammelten Ladungsträger auftreten, bereinigt werden. Auch eine Referenzmessung mit nicht absorbierender Lösung ist nötig. Danach wird Shutter 1 geschlossen, so dass das Meßlicht der Halogenlampe vor der Probenkammer abgeblockt wird, und die (lichtempfindliche) Probe bei Rotlicht in den Kryostaten eingebaut. Vor der Reduktion aber nach Erreichen der gewünschten Temperatur wird ein „statisches“ Spektrum der Probe aufgenommen. Dies ist nötig, um die Differenzspektren bilden zu können, die immer als Differenz gegenüber der unbelichteten Probe zu verstehen sind.

Zur Aufnahme von zeitlich aufgelösten Spektren wird ein Programm gestartet, welches automatisch das Öffnen der Shutter steuert und in zeitlich konstanten Abständen optische Spektren der Probe aufnimmt. Genauer hierzu findet sich in Anhang A.

Sowohl die Proben, in denen sich Proteine gemischt mit einem Photoreduktionsmittel befindet, als auch die Referenzproben, bei denen entweder das Protein oder das Photoreduktionsmittel weggelassen wurden, werden alle nach demselben Meßprotokoll untersucht.

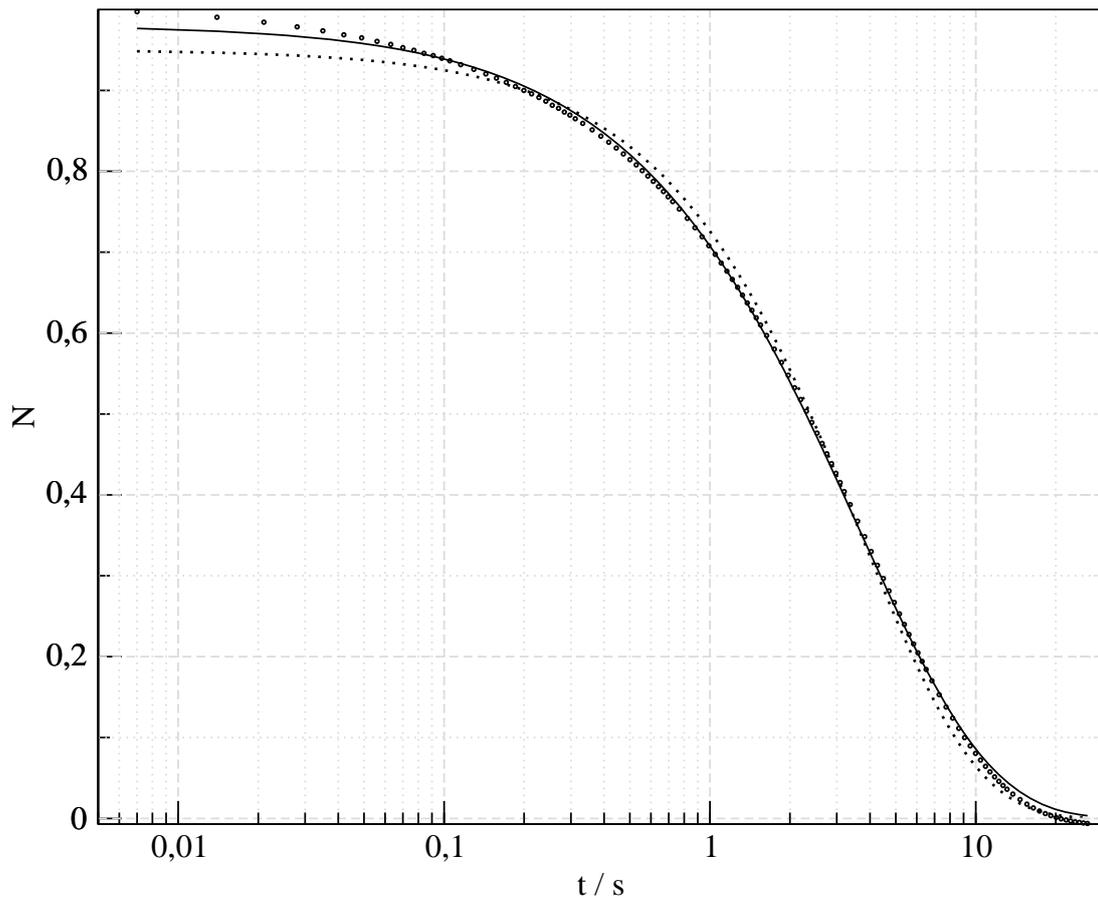


Abb. 25: Dissoziation von MbCN nach Reduktion bei 297 K: Anteil von MbCN in der Probe (Kreise), Anpassung einer Exponentialkurve mit der Lebensdauer von 3,7 s (gepunktete Linie) und die Anpassung mit der gestreckten Exponentialfunktion $N(t) = e^{-\left(\frac{t}{3,6s}\right)^{0,87}}$ (durchgezogene Linie)

Die Spektren sind in Abb. 26 gezeigt.

Die Singulärwertzerlegung (genauer hierüber in Kapitel 5.2.2.1) zeigt deutlich (Abb. 27), dass nur zwei Spezies (das durch Reduktion kurzzeitig entstandene Intermediat und das relaxierte Deoxy-Myoglobin) nötig sind, um den zeitlichen Verlauf der Differenzspektren nach dem Laserblitz zu modellieren. Der Anteil des dritten und auch der höheren Basisspektren aus der Singulärwertzerlegung sind zu allen gemessenen Zeiten nahezu 0 und können deshalb vernachlässigt werden.

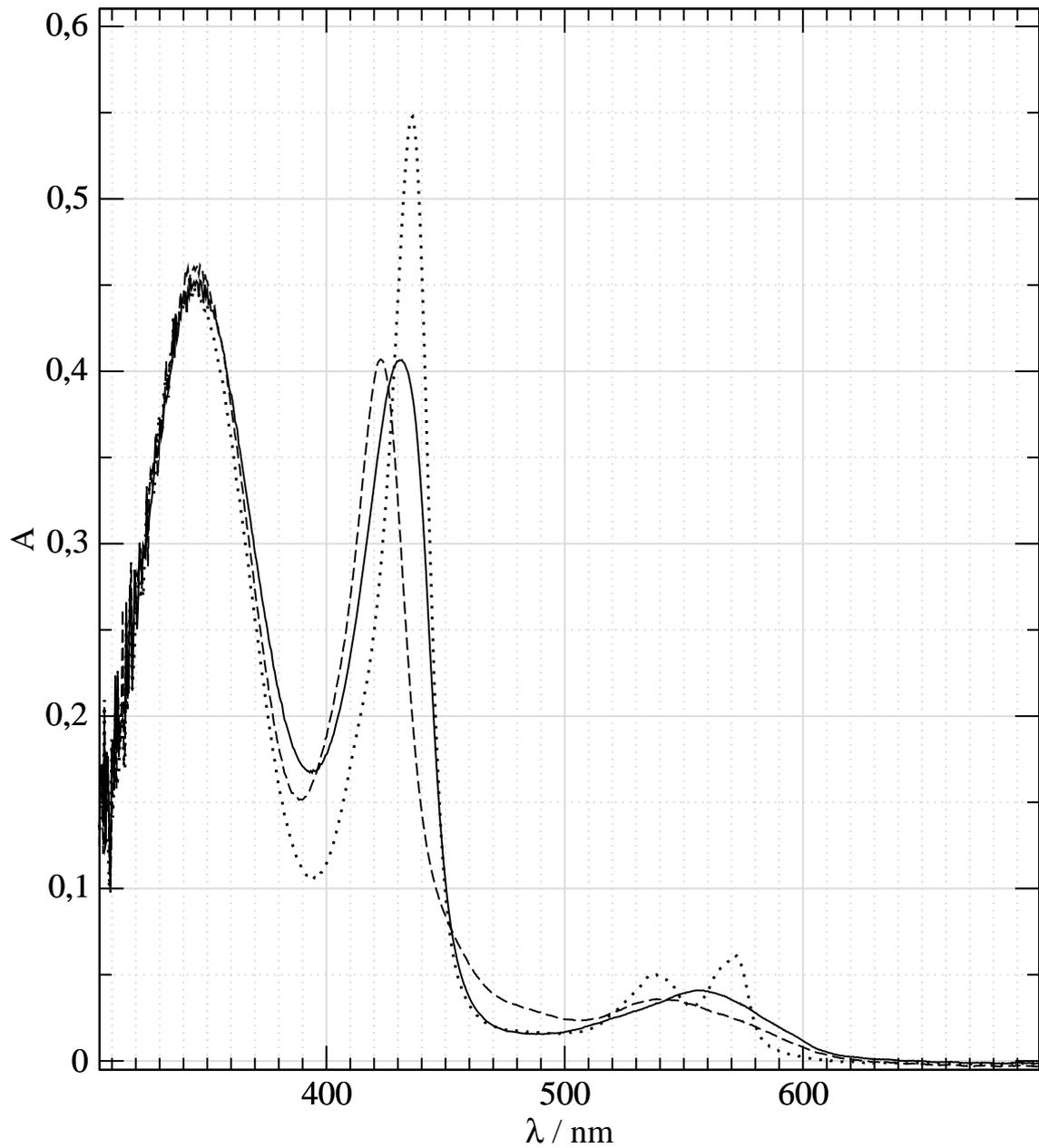


Abb. 26: gemessene Spektren vor und nach der Reduktion von MbCN durch durch einen Laser angeregtes NADH; Die Absorptionsbande bei ca. 350 nm stammt hauptsächlich von NADH, obwohl hier auch das Protein absorbiert. Die gestichelte Kurve zeigt das Spektrum der Ausgangsprobe (Cyanid-ligandiertes Myoglobin), die anderen Spektren zeigen die Spektren bei 7 ms (gepunktet) und 30 s (durchgezogen) nach dem Laserbeschuß.

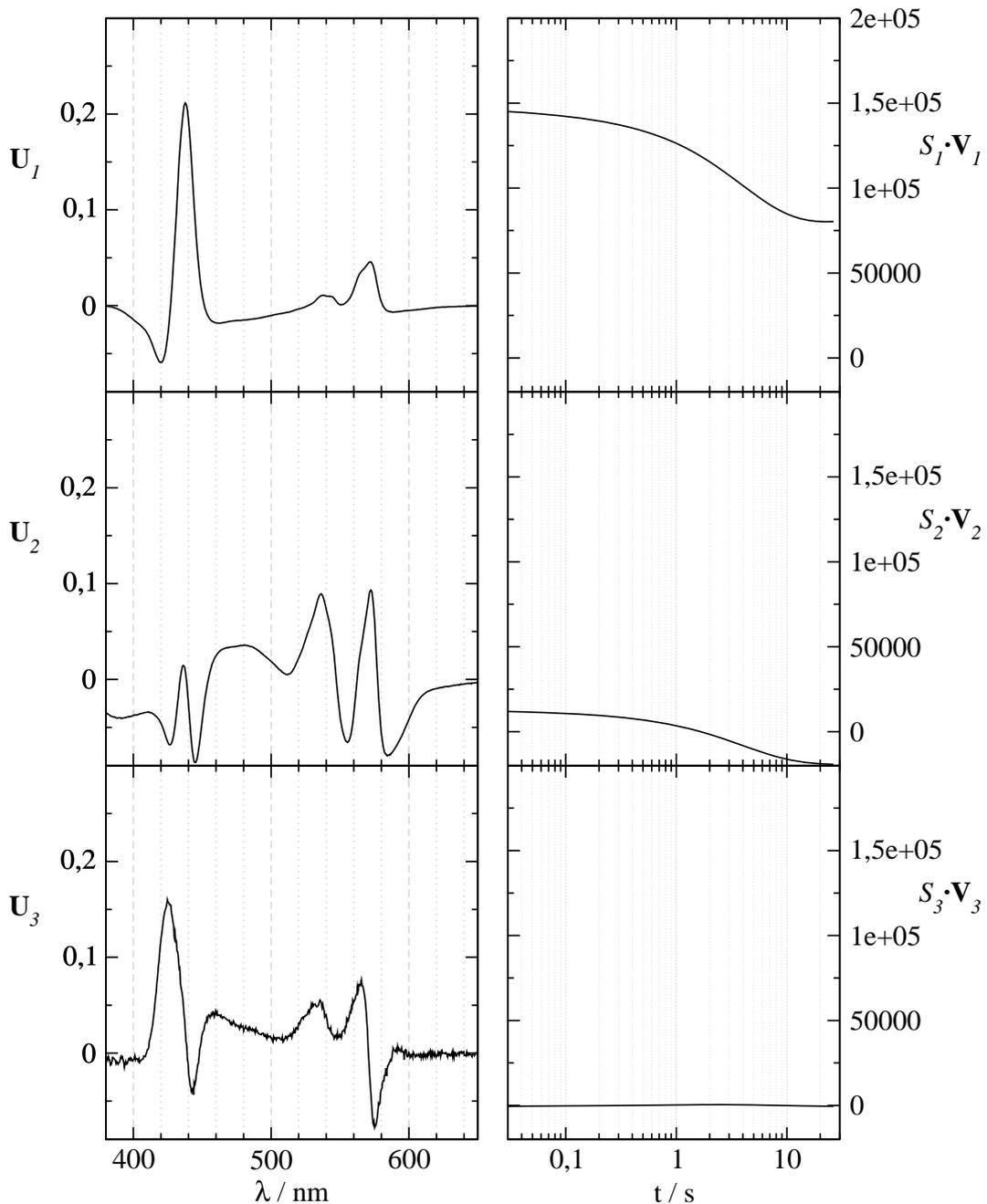
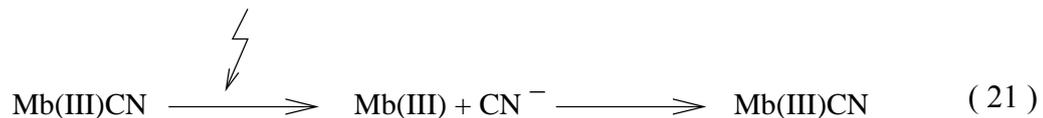


Abb. 27: die ersten drei Basisspektren (links) und die dazugehörigen Zeitverläufe (rechts) nach der Singulärwertzerlegung der Differenzspektren aus dem Versuch die Relaxation von MbCN zeitaufgelöst nach Reduktion zu messen. Diese Spektren besitzen zunächst keine physikalische Bedeutung, jedoch können die aus der Messung erhaltenen Differenzspektren als Linearkombinationen der links gezeichneten Differenzspektren mit der Gewichtung, die rechts für die verschiedenen Zeiten abgelesen werden kann, zusammengesetzt werden. Es fällt auf, dass das dritte Differenzspektrum U_3 zu keinem Zeitpunkt wesentlich zum Gesamtspektrum beiträgt.

Der Zerfall des Intermediates kann mit einer einzigen Exponentialfunktion beschrieben werden. Ihr zeitlicher Verlauf ist in Abb. 25 aufgetragen. Die in der Literatur genannten Dissoziationsraten stimmen mit den mit dieser Apparatur gemessenen gut überein.

5.1.2 Abblitzversuch mit MbCN

Analog zu den in der Einleitung erwähnten CO-Abblitzversuchen an Carboxy-Myoglobin kann mit der aufgebauten Maschine ein exogener Ligand von Häm-Proteinen abgeblitzt und dessen Rückbindung zeitlich verfolgt werden. Solche Prozesse können – zusätzlich zu den durch Reduktion initiierten – auch Absorptionsänderungen der Probe hervorrufen. Der Prozeß



ist z. B. parasitär zu der in Gl. (20) aus Kapitel 5.1.1 beschriebenen Reaktion.

Getestet wurde dieser Vorgang durch ein Experiment, welches zu dem in Abschnitt 5.1.1 erklärten mit einer Ausnahme identisch ist. Der einzige Unterschied bestand darin, dass kein Photoreduktionsmittel in der Probe zugegen war. Die erhaltenen Differenzspektren sind in Abb. 28 gezeigt.

Ein Vergleich der zeitaufgelöst gemessenen Differenzspektren mit einem aus statisch gemessenen Spektren von Met-Myoglobin und Mb(III)CN berechneten Differenzspektren (Abb. 28) zeigt, dass die nach Abblitzen des Liganden entstandene intermediäre Spezies Mb(III) in (21) Met-Myoglobin ist. Die durch das Abblitzen des Cyanid-Ions freigewordene sechste Ligandenposition wird zwischenzeitlich durch ein allgegenwärtiges Wasser besetzt. Außerdem ist ersichtlich, dass nur knapp 1 % der Zyanid-Liganden abgeblitzt werden können. Dies ist zu wenig, um im Photoreduktionsexperiment aus Kapitel 5.1.1 gesehen werden zu können, und stört deshalb dort nicht.

Abb. 29 zeigt den zeitliche Verlauf der Rückbindung der CN^- -Ionen aus dem Lösungsmittel. Der Anteil an nicht mit Cyanid ligandierten Myoglobins geht dabei exponentiell zurück. Die Bindungsrate bei einer CN^- -Konzentration von 9 mM (18 mM gesamt bei 9 mM Mb) in Lösung beträgt bei 296 K $1,5 \text{ s}^{-1}$.

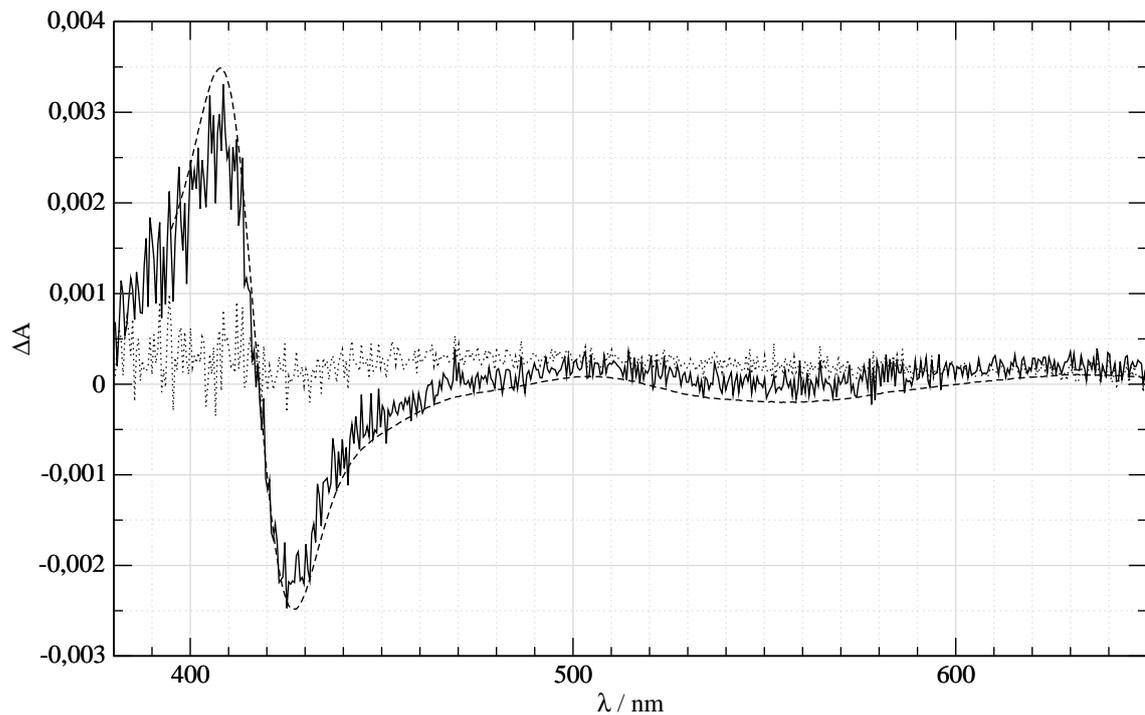


Abb. 28: Differenzspektren von MbCN bei 296,4 K 7 ms (durchgezogene Linie) und 28 s (gepunktete Linie) nach dem Laserbeschuß auf eine Probe ohne Photoreduktionsmittel. Die Differenzspektren sind bezüglich der nicht belichteten Probe angegeben. Gestrichelt eingezeichnet ist außerdem das aus statischen Spektren berechnete Differenzspektrum von Met-Myoglobin minus Mb(III)CN, welches zum Vergleich um den Faktor 100 verkleinert wurde.

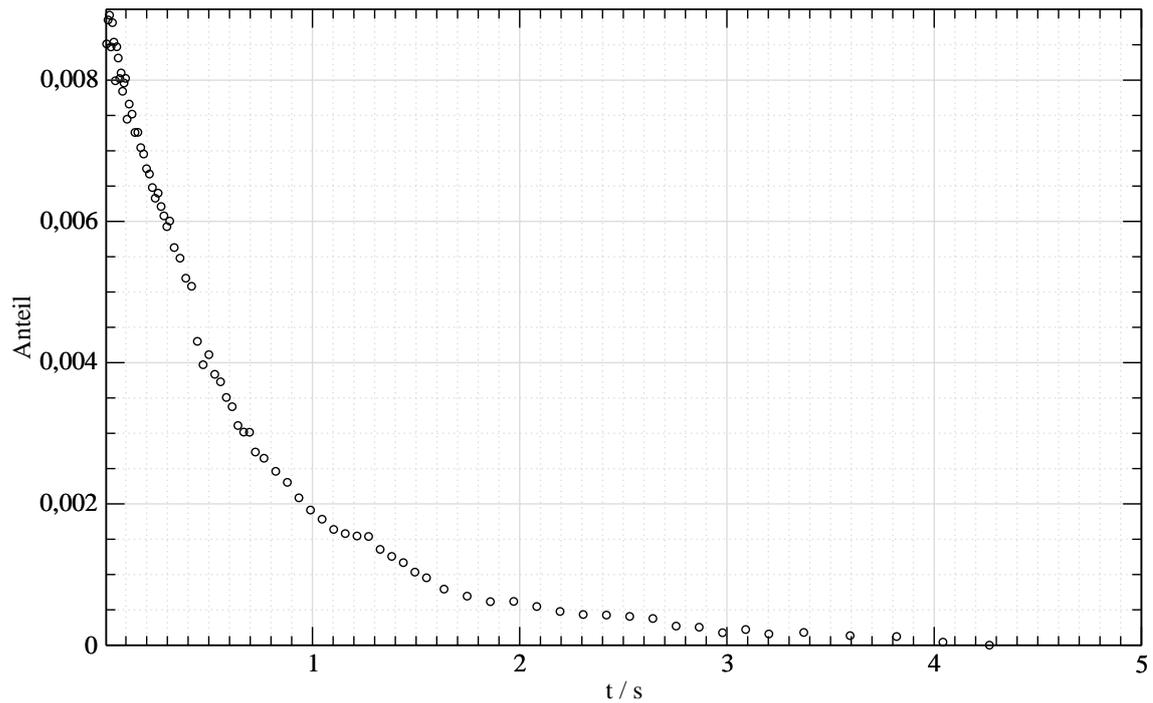


Abb. 29: Anteil an Met-Myoglobin, welches sich nach kurzzeitiger Belichtung einer Mb(III)CN-Probe mit einem kurzen Laserpuls bei 296,4 K gebildet hatte. Die totale Cyanid-Konzentration betrug 18 mM, wovon allerdings die Hälfte an Myoglobin gebunden ist.

5.2 Hämoglobin

5.2.1 Zeitaufgelöste optische Spektren von Hämoglobin

An Hämoglobin wurde zeitaufgelöst die Änderung der optischen Spektren nach Reduktion von Met-Hämoglobin gemessen. Für diese Messungen wurde Nicotinamid zur Photoreduktion eingesetzt. Dieses Photoreduktionsmittel absorbiert nicht im sichtbaren Bereich, was das „self-modeling“ erleichtert, da die gemessene Absorption ausschließlich von Hämoglobin stammt.

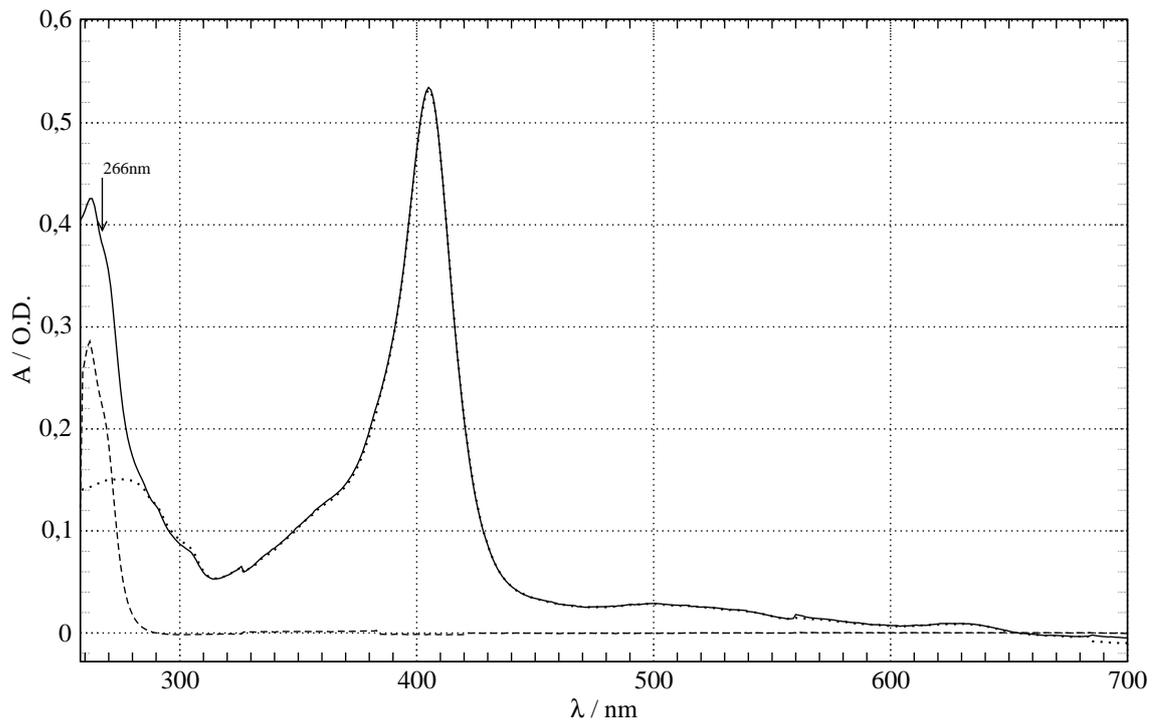


Abb. 30: Die Absorptionsspektren von Met-Hämoglobin (gestrichelte Linie) und Nicotinamid (gepunktete Linie) ergeben in der Summe das Spektrum der Probe (durchgezogene Linie). Während im sichtbaren Wellenlängenbereich nur das Protein absorbiert, liegt die Absorptionsbande von Nicotinsäureamid ziemlich genau bei der verwendeten Laserwellenlänge von 266 nm.

Die Anregung der photoaktiven Substanz erfolgt in diesem Fall mit einem Laserpuls von ca. 20 mJ der vierten Harmonischen des Nd:YAG-Lasers. Die Wellenlänge von 266 nm ist nahe am Maximum der Absorptionsbande von Nicotinamid. Die Hämgruppe absorbiert in diesem Bereich nicht (vgl. Abb. 30), wodurch der Einfluß des Anregeblitzes des Lasers auf das Protein minimiert wird.

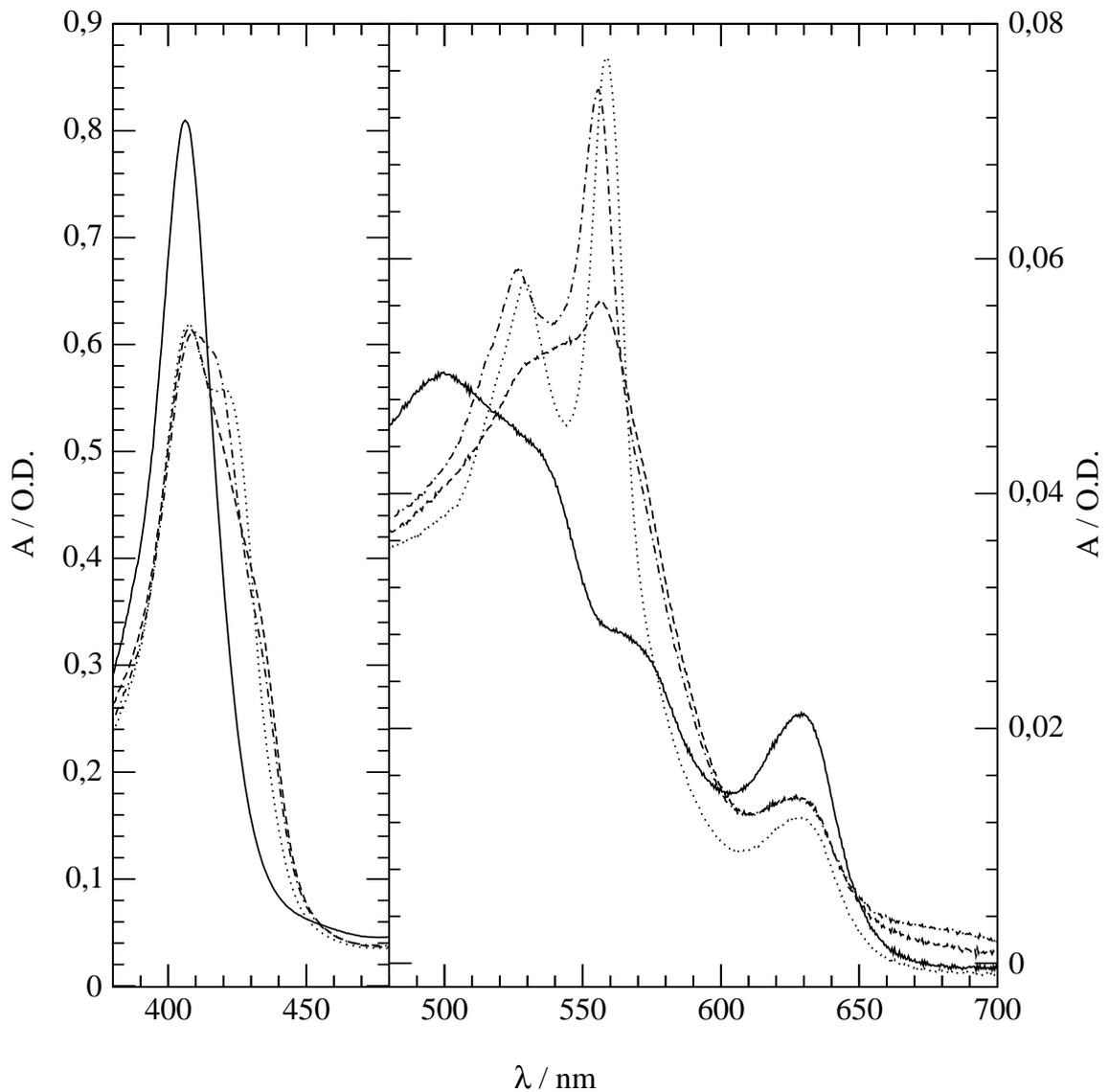


Abb. 31: Die gemessenen optischen Spektren von Hämoglobin bei einer Temperatur von 225 K und verschiedenen exemplarisch herausgegriffenen Zeiten nach dem Laserblitz: Vor dem Laserblitz (durchgezogene Linie) liegt Met-Hämoglobin vor, 116 ms nach dem Laserblitz (gepunktet) ist der größte Teil der Probe (über 60 %) immer noch Met-Hämoglobin, aber die Soret-Bande bei 406 nm ist merklich niedriger. Es ist zu ca. 30 % des intermediären Fe(II)-LS-Zustandes mit der aufgespaltenen Q-Bande (530 und 558 nm) entstanden, welcher bis 648 s nach dem Laserblitz (gestrichelt) zum Großteil wieder verschwunden ist. 48088 s nach dem Laserblitz (strichpunktiert) ist eine weitere Spezies, die auch in einer Fe(II)-LS-Konformation vorliegt, entstanden. Diese zeigt aber gegenüber dem primären „low-spin“ blauverschobene Banden.

Der Laserblitz regt das Nicotinamid an. Daraufhin reduziert dieses das Protein. In einem Laserpuls finden sich mit ca. $3 \cdot 10^{16}$ Photonen ungefähr zehnmal mehr Photonen als Hämgruppen in der belichteten Probe vorhanden sind. Die Zahl der Nicotinamidmoleküle im Meßvolumen übersteigt dagegen 10^{17} . Aufgrund der optischen Dichte (vgl. Abb. 30) werden allerdings nur $7 \cdot 10^{15}$ Photonen durch Nicotinamid absorbiert. Da pro angeregtem Nicotinamid zwei Reduktionsäquivalente (vgl. Gl. (18) auf S. 39) erzeugt werden, stünden bei einer Quanteneffizienz von 100 % immer noch ca. fünfmal so viele Elektronen zur Reduktion zur Verfügung wie insgesamt Hämgruppen in der Probe vorkommen.

Das reduzierte Protein liegt zunächst in einer metastabilen Konfiguration vor. Die Änderung der Ligandierung des Proteins hin zu einer stabilen Konfiguration wurde zeitlich aufgelöst gemessen. Abb. 31 zeigt die Spektren bei 225 K zu verschiedenen Zeiten. Schon mit bloßem Auge lassen sich daran anhand einiger Charakteristika die Vorgänge in der Probe qualitativ beschreiben. Schön zu sehen ist die Abnahme der Soret-Bande bei 405 nm und der Bande bei 630 nm von Met-Hämoglobin. Außerdem fällt die aufgespaltene Q-Bande des direkt nach der Reduktion entstandenen intermediären Fe(II)LS-Zustandes mit seinen relativ scharfen Absorptionsmaxima bei 530 und 558 nm ins Auge. Seine Absorptionsmaxima sind ca. 1 nm gegenüber denen des bei einer Temperatur von 20 K durch Photoreduktion entstandenen intermediären Zustandes rotverschoben (Abb. 51). Dieser intermediäre Zustand zerfällt in Deoxy-Hämoglobin, welches nur eine breite Absorptionsbande zwischen 500 und 600 nm besitzt. Später bilden sich wieder Absorptionsbanden, die denen des zunächst durch Reduktion entstandenen intermediären Zustandes ähneln, jedoch blauverschoben sind. Es ist bekannt, dass sich bei den gemessenen Temperaturen ein Gleichgewicht zwischen 5fach ligandiertem Deoxy-Hämoglobin und einem Bis-Histidyl-Hämoglobin einstellt, bei welchem das distale Histidin an die 6. Koordinationsstelle des Eisens bindet (Levy et al 1985).

5.2.2 Berechnung der zeitlichen Konzentrationsverläufe von Hämoglobin

5.2.2.1 Analyse multivaribler Daten

Die in Abhängigkeit der Zeit gemessenen Spektren sind lineare Superpositionen der reinen Spektren der in der Probe vorhandenen Substanzen. Um aus den umfangreichen Daten die zeitlichen Konzentrationsverläufe dieser Substanzen zu erhalten, wird auf die *Singulärwertzerlegung* zurückgegriffen. Dies ermöglicht eine beträchtliche Reduktion in der Zahl der freien Parameter. Zur Erlangung von unbekanntem Spektren der Zwischenzustände kann hierbei das sog. „*self-modeling*“ angewandt werden. So kann in bestimmten Fällen eine Anpassung durch Simulation eines Reaktionsmodells beschrieben durch ein Differentialgleichungssystem noch vermieden werden. Es ist dann beispielsweise nicht nötig, die Zerfallsfunktionen von metastabilen Substanzen als exponentiell in der Zeit anzunehmen.

Neben der Singulärwertzerlegung gibt es noch eine weitere Methode der Auswertung zeitaufgelöster Spektren, die *globale Analyse*. Ausgehend von einem Modell für den Reaktionsverlauf wird dabei versucht, alle gemessenen Daten gleichzeitig konsistent zu erklären. Probleme bereiten oft die unbekanntem Spektren der intermediären Substanzen. Zur Inkorporation dieser Spektren in die Auswertung muß man sie in geeigneter Weise durch freie Parameter beschreiben. Je nach gewählter Parametrisierung ist die Anzahl der Variablen recht hoch (Henry, E. R. 1997). Eine mögliche Parametrisierung besteht z. B. darin, den Extinktionskoeffizienten bei jeder Wellenlänge für jede Spezies als eigenen Parameter einzuführen. Außerdem beinhaltet das Modell weitere freie Variable wie z. B. die Ratenkoeffizienten bei exponentiellen Zerfallsfunktionen. Die gesamten Parameter müssen nun variiert werden, so dass die mit ihnen simulierten Spektren optimal an die Meßdaten passen. Die große Anzahl an Parametern erschwert dabei die Anpassung. Deshalb wird bei umfangreichen Meßdaten oft auf die Singulärwertzerlegung zurückgegriffen, welche geeignet ist, die Zahl der freien Parameter beträchtlich zu reduzieren. Das Vorgehen dabei wird im Folgenden genauer erklärt.

5.2.2.2 Singulärwertzerlegung

Für die Auswertung wurden die Daten vor der Singulärwertzerlegung in vier Schritten konditioniert (Abb. 32):

Da die Reduktion aller Hämoglobin-Moleküle in der Probe nicht vollständig gelingt, ist Met-Hämoglobin in den Spektren zu allen Zeiten mit mindestens 40 % vertreten. Deshalb wird in einem ersten Schritt (Schritt 1 in Abb. 32) von allen gemessenen Absorptionsspektren das Spektrum der unreduzierten Probe vor dem Laserblitz, der Ausgangsprobe, (Abb. 32b) abgezogen. Eine Gewichtung der Spektren findet hierbei nicht statt. Da die Reduktion nicht vollständig war, erhält man also Spektren mit einem negativen Anteil an Met-Hämoglobin. Zu einem solchen Differenzspektrum liefert der konstante Anteil des nicht reduzierbaren Met-Hämoglobins (ca. 50 %) keinen Beitrag, genauso wie der Teil der Probe (ca. 1 bis 2 %), der schon vor der eigentlichen Messung ohne Belichtung vom Photoreduktionsmittel reduziert wird und im Verlauf des Experiments inert ist. Die Verwendung von Differenzspektren (Abb. 32c) ermöglicht in der Singulärwertzerlegung eine bessere Abseparation der wellenlängen-korrelierten Störungen (Henry, E. R. und Hofrichter, J. 1992). Außerdem werden so instrumentelle Fehlerquellen aus den Daten entfernt, was bei der Inkorporation bekannter Spektren in die Modellierung wichtig ist. Zu diesen Fehlerquellen zählen Schwankungen der Lampenintensität zwischen der Aufnahme des Referenzspektrums einer durchsichtigen Probe bei der Kalibrierung und der eigentlichen Messung (dazwischen vergehen je nach Meßtemperatur mehrere Stunden), wie auch eine gegenüber der Referenz verdrehte Montage der Probe im Kryostaten, was zu unterschiedlicher Reflexion an der Oberfläche der Probenzelle führt. Verfälschungen der Wellenlängenkalibrierung durch Erschütterungen oder Schwankungen der Raumtemperatur können auf diese Weise allerdings nicht behoben werden und müssen durch entsprechende andere Maßnahmen wie einen stabilen Aufbau (vgl. Kap. 4.1) oder eine helle bzw. Sonnenlicht reflektierende Verkleidung der Fenster minimiert werden.

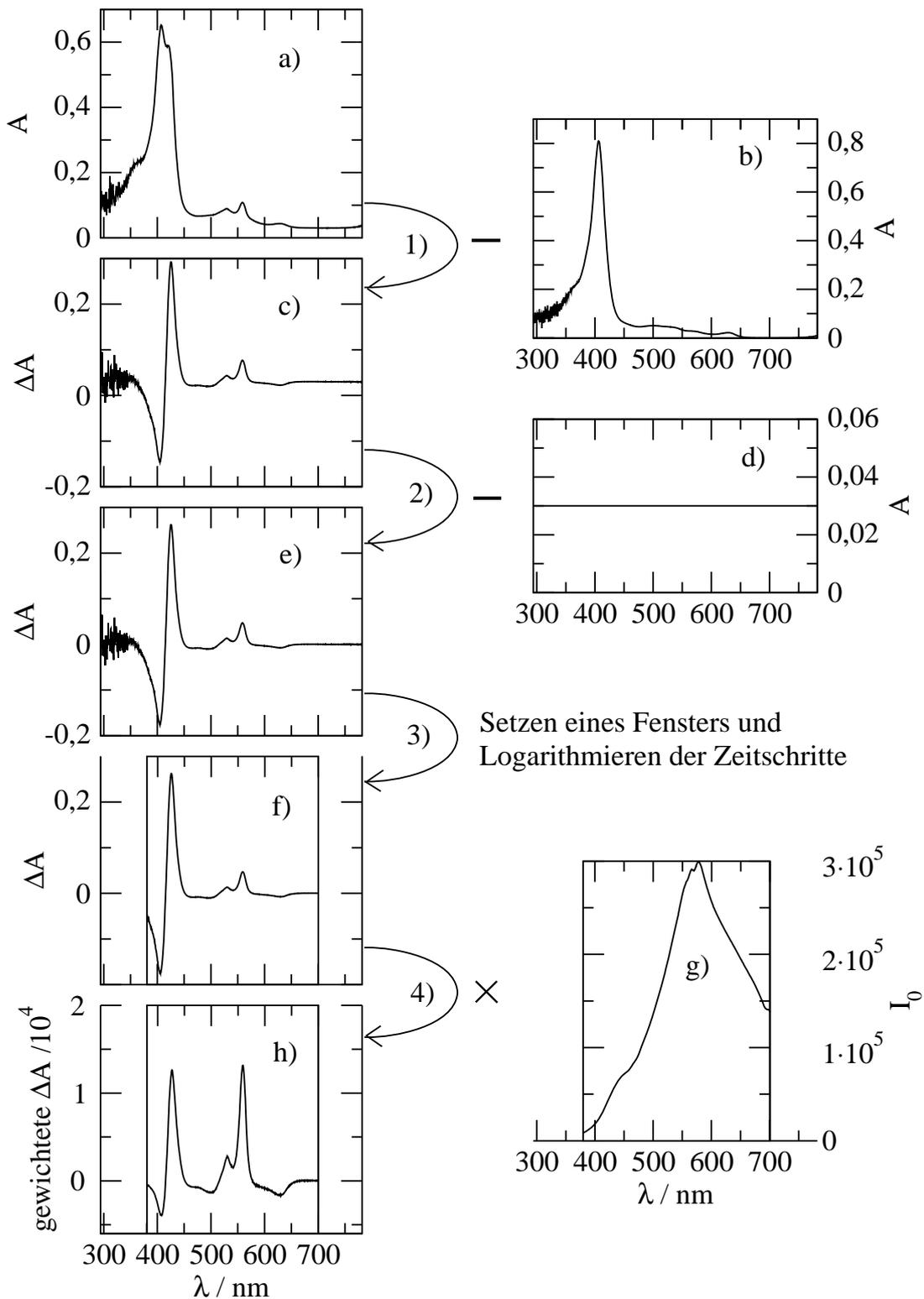


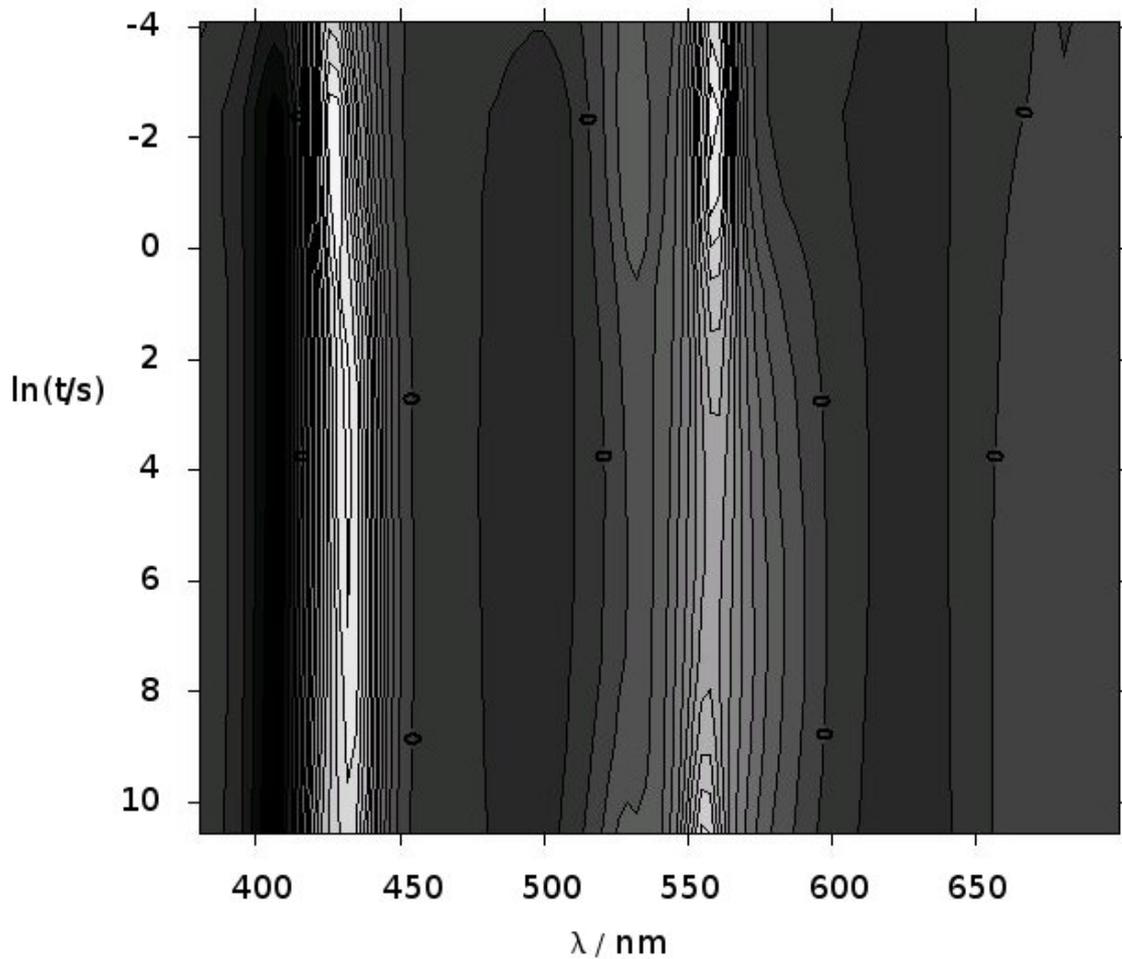
Abb. 32: Vorkonditionierung der Daten am Beispiel des Spektrums von Hämoglobin bei 225 K und 32 ms nach dem Laserblitz: 1): Bildung des Differenzspektrums; 2): Untergrundkorrektur; 3): Setzen eines Fensters und Logarithmieren der Zeitschritte; 4): Gewichtung der Meßpunkte

Von diesem Differenzspektrum (Abb. 32c) wird in einem zweiten Schritt (Schritt 2 in Abb. 32) eine konstante Absorption (Abb. 32d) subtrahiert, da der Untergrund zeitlich schwankt. Dazu wurde die mittlere Absorption zwischen 700 nm und 735 nm – ein Wellenlängenbereich ohne merkliche Absorption – von jedem Spektrum abgezogen (Verarbeitungsschritt zu Abb. 32e). Der Untergrund entsteht durch Reflexion des Spektrometerstrahls an den Glasoberflächen der Probenzelle und durch Streuung in der Probe. Er kann sich deshalb bei mechanischen Erschütterungen des Aufbaus und Veränderungen im Lösungsmittel in der Probe auch infolge des Laserpulses während der Messung ändern.

In einem dritten Schritt (Schritt 3 in Abb. 32) werden Bereiche mit starkem Rauschen (im UV-Bereich bei Wellenlängen, die kleiner als 380 nm sind) bzw. ohne sichtbare Absorption (im IR-Bereich bei Wellenlängen größer 700 nm) gelöscht. Außerdem werden hier die Zeitschritte von einer linearen Skala in eine logarithmische umgerechnet (nicht sichtbar in Abb. 32). Um eine auf der Zeitskala logarithmische Verteilung der Datenpunkte zu erhalten, wurden wie in Austin (1975) beschrieben anwachsende Zeitintervalle gesetzt und die Spektren innerhalb dieser Intervalle gemittelt. Dies geschieht nicht nur, um die Menge an zu verarbeitenden Daten zu reduzieren, sondern auch um den Spektren bei kurzen Zeiten eine stärkere Gewichtung in der Singulärwertzerlegung zu verleihen.

In einem vierten Schritt (Schritt 4 in Abb. 32) wird das so erhaltene Differenzspektrum (Abb. 32f) noch mit der Lichtintensität aus der Referenzmessung mit einer nicht absorbierenden Probe (Abb. 32g) gewichtet, um eine über den gesamten Wellenlängenbereich ungefähr gleiche Streuung der Daten zu erhalten. Dadurch erreicht man in dem genauer gemessenen Wellenlängenbereich der Q-Banden eine stärkere Gewichtung in der nachfolgenden Singulärwertzerlegung als er ohne diesen Schritt aufgrund der relativ geringen Absorption hätte. Auch beim späteren Anpassen der ebenfalls gewichteten realen Spektren durch eine Linearkombination der aus der Singulärwertzerlegung erhaltenen Spektren (siehe Gl. (27) auf S. 69) muß so eine ansonsten nötige Gewichtung der Datenpunkte nicht mehr vorgenommen werden.

Die so gewonnenen Daten (Abb. 32h) sind die Eingabe für die Singulärwertzerlegung.



Graustufenskala: 
-5000 0 5000 10000

Abb. 33: Die Kodierung der Daten (der gewichteten Absorptionsdifferenz) durch eine Grauskala ermöglicht in einer Konturendarstellung das Sichtbarmachen der Änderungen in der Absorption während der Zeit t . Die Helligkeit gibt die Höhe der gewichteten Absorptionsdifferenz an (vgl. Abb. 32h). Helle Bereiche entsprechen einer hohen Absorptionsänderung gegenüber der Ausgangssubstanz während geringe oder negative Absorptionsänderung durch dunkle Einfärbung kodiert ist. In dieser Darstellung lassen sich die zeitlichen Veränderungen der Spektren sichtbar machen. Das Auftauchen und Verschwinden von helleren Bereichen (Inseln) zeigt das Entstehen und Zerfallen von Intermediaten.

Derart konditionierte Daten können wie in Abb. 33 bildlich dargestellt werden.

Die aus der der Singulärwertzerlegung folgenden Auswertung derart vorverarbeiteter Daten erhaltenen Zeitverläufe geben direkt den Anteil der jeweiligen Spezies zu allen Zeiten in der Probe an. Die realen Spektren der einzelnen Intermediate müssen allerdings erst durch Rückgängigmachen der Gewichtung und Addition des Met-Spektrums berechnet werden.

Da die Singulärwertzerlegung ein Werkzeug der Linearen Algebra ist, werden die Spektren am besten in einer Datenmatrix repräsentiert. Das ist möglich, da auch die gemessene optische Dichte, Gl. (3), bei einer Wellenlänge im Idealfall (bei sich nicht gegenseitig beeinflussenden Chromophoren, keiner Auslese nach der Orientierung der Moleküle durch Polarisierungseffekte) als Summe der optischen Dichten der einzelnen Substanzen geschrieben werden kann Gl. (8).

Im Folgenden werden die Daten (Abb. 33) in Matrixform dargestellt¹:

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} D(380,4nm;t_1) & D(380,4nm;t_2) & \cdots & D(380,4nm;t_{-1}) \\ D(380,9nm;t_1) & D(380,9nm;t_2) & \cdots & D(380,9nm;t_{-1}) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ D(699,9nm;t_1) & D(699,9nm;t_2) & \cdots & D(699,9nm;t_{-1}) \end{pmatrix}$$

Die Spalten in \mathbf{D} enthalten die gewichteten Differenzspektren $D(\lambda, t)$ (gewichtetes ΔA) zu den verschiedenen Zeiten t_1, t_2, \dots, t_{-1} . Die Datenmatrix zur Temperatur 225 K enthält z. B. in der Spalte zur Zeit 32 ms das Spektrum aus Abb. 32h.

Mit Hilfe der Matrixmultiplikation läßt sich dann schreiben:

$$\mathbf{D} = \mathbf{F} \cdot \mathbf{C}^T \quad (22)$$

In den Spalten der Matrix \mathbf{F} finden sich die gewichteten Differenzspektren $f_r = \Delta \varepsilon_r(\lambda_i) \cdot I_0(\lambda_i) \cdot l$, der realen Substanzen r (deren Anzahl SS ist) wieder:

¹ Matrizen werden im Text durch Großbuchstaben und Fettdruck dargestellt (Bsp.: \mathbf{D} , \mathbf{U}). Wird nur eine Spalte einer Matrix referenziert, so wird die Nummer der Spalte als Index an den Buchstaben der Matrix geschrieben (Bsp.: \mathbf{T}_j). Vektoren sind Großbuchstaben mit einem Pfeil darüber (Bsp.: \vec{R}). Skalare Größen werden durch Klein- und Großbuchstaben in kursiver Schrift angezeigt.

$$\mathbf{F} = \begin{pmatrix} f_1(380,4nm) & f_2(380,4nm) & \cdots & f_{SS}(380,4nm) \\ f_1(380,9nm) & f_2(380,9nm) & \cdots & f_{SS}(380,9nm) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ f_1(699,9nm) & f_2(699,9nm) & \cdots & f_{SS}(699,9nm) \end{pmatrix}$$

Für das Intermediat ist $\Delta\varepsilon$ gleich $\varepsilon_{Int} - \varepsilon_{Met}$, der Differenz zwischen dem Extinktionskoeffizienten des Intermediates und der Met-Form. Entsprechendes gilt für Deoxy-Hämoglobin bzw. -Myoglobin. Für die Rutheniumsubstanz ist $\Delta\varepsilon$ gleich $\varepsilon_{Ru^{3+}} - \varepsilon_{Ru^{2+}}$, der Differenz der Extinktionskoeffizienten von oxidiertem und reduziertem Tris(2,2'-bipyridin)ruthenium.

In dem r -ten Zeilenvektor von \mathbf{C}^T sind die Konzentrationen der r -ten Spezies zu den verschiedenen Zeiten gelistet:

$$\mathbf{C}^T = \begin{pmatrix} c_1(t_1) & c_1(t_2) & \cdots & c_1(t_{-1}) \\ c_2(t_1) & c_2(t_2) & \cdots & c_2(t_{-1}) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{SS}(t_1) & c_{SS}(t_2) & \cdots & c_{SS}(t_{-1}) \end{pmatrix}$$

Ziel ist die Zerlegung von \mathbf{D} in die Spektren \mathbf{F} und die Konzentrationsverläufe \mathbf{C}^T wie in Gl. (22), was allerdings nicht eindeutig möglich ist, solange man nur \mathbf{D} kennt. In der Tat gibt es sogar unendlich viele Möglichkeiten, \mathbf{D} in ein Paar von Matrizen Faktor zu zerlegen (Nagle, J. F. et al. 1995). Man kann also aus den Daten \mathbf{D} nicht ohne weiteres die Spektren der einzelnen Substanzen und deren Konzentrationsverläufe berechnen. Die Singulärwertzerlegung ist nun in der Lage, eine Zerlegung der Datenmatrix ähnlich zu Gl. (22) vorzunehmen. Diese spezielle Zerlegung hat einige Vorteile gegenüber den anderen unendlich vielen möglichen Zerlegungen wie im folgenden Text näher erläutert wird.

Bei der Singulärwertzerlegung wird folgende Faktorisierung der Datenmatrix erreicht (Malinowski, E. R. 2002):

$$\mathbf{D} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{V}^T = \mathbf{R} \cdot \mathbf{V}^T \quad (23)$$

Dabei ist \mathbf{S} eine Diagonalmatrix mit den Wurzeln der Eigenwerte der Matrix $\mathbf{D}^T\mathbf{D}$, den *Singulärwerten*, als Diagonalelemente. Die Singulärwerte sind dabei entlang der Diagonalen der Größe nach geordnet. Der Rang von \mathbf{S} entspricht dem von \mathbf{D} . In den Spalten von \mathbf{U} sind die orthonormalen *linken singulären Vektoren* enthalten. Diese werden auch als Basisspektren bezeichnet und stellen Linearkombinationen der gewichteten Differenzspektren dar. Durch Multiplikation von \mathbf{U} mit \mathbf{S} erhält man die Matrix \mathbf{R} . In den Spalten von \mathbf{R} finden sich die gleichen Basisspektren wie in den Spalten von \mathbf{U} , allerdings sind diese nun nicht mehr normiert, sondern mit dem dazugehörigen Singulärwert multipliziert. Orthogonal sind die Spalten von \mathbf{R} weiterhin. Zu jedem Basisspektrum gehört ein in den Reihen von \mathbf{V}^T stehender sog. Amplitudenvektor. Dies sind die ebenfalls orthonormalen *rechten singulären Vektoren*. Wenn man sie mit den dazugehörigen Singulärwerten multipliziert, geben sie den Anteil des jeweiligen Basisspektrums aus \mathbf{U} am Meßspektrum an.

Diese Singulärwertzerlegung ist exakt und beschreibt damit auch Meßfehler und das Rauschen. Numerisch eingesetzt werden effizientere Algorithmen als die Eigenwertanalyse der Matrix $\mathbf{D}^T\mathbf{D}$, die aber äquivalent sind und auch die Anordnung der Singulärwerte nach ihrer Größe gewöhnlich automatisch liefern.

Als Beispiel ist in Abb. 35 die Singulärwertzerlegung der Meßdaten von Hämoglobin bei 225 K gezeigt. Aus den angegebenen Singulärwerten ergibt sich, dass schon der vierte Singulärwert mit 9,415 nur noch zu ca. 1 % zu den Spektren beiträgt. In Abb. 34 sind die höchsten Singulärwerte graphisch dargestellt. Die höheren Singulärwerte (ab dem fünften) sind nur noch sehr klein. Manipulationen an einem einzigen Datenpunkt der aufgenommenen Zeitreihe führen schon zu beträchtlichen Änderungen in den Singulärwerten ab 5, so dass diese nicht mehr als vertrauenswürdig angesehen werden können. Wie im Folgenden erklärt wird, können diese unberücksichtigt bleiben.

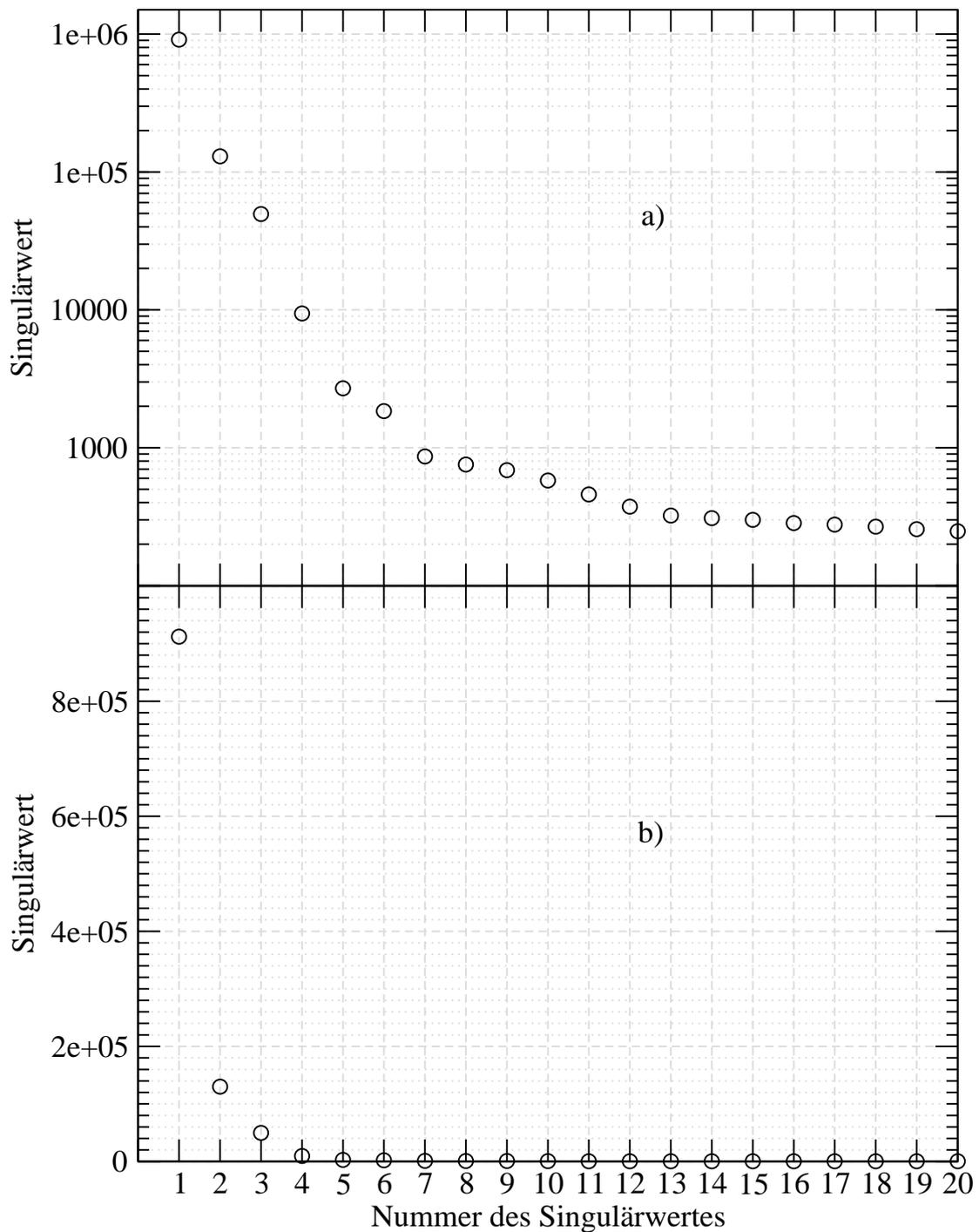


Abb. 34: Die ersten 20 Singulärwerte aus der Messung der Relaxation des Intermediates von Hämoglobin bei 225 K. Nur die ersten Singulärwerte variieren stark. Die höheren Singulärwerte dagegen unterscheiden sich nur noch unwesentlich. Sie sind zwar von 0 verschieden, enthalten aber vor allem Rauschen, da die Messung fehlerbehaftet ist. Gegenüber der logarithmischen Auftragung der Singulärwerte in a) macht die lineare Auftragung in b) besonders deutlich, dass die Singulärwerte ab 5 vernachlässigt werden können.

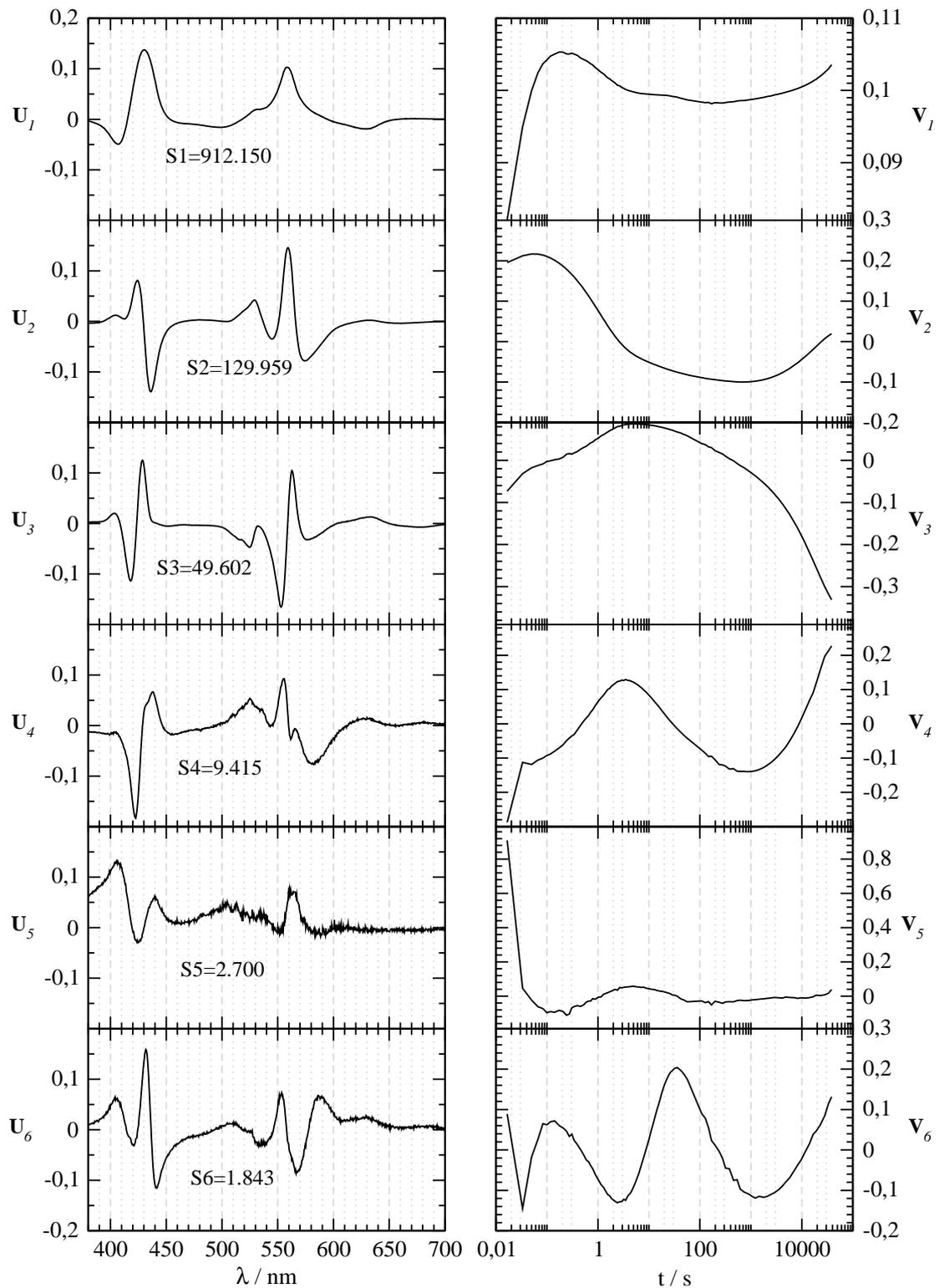


Abb. 35: Singulärwertzerlegung am Beispiel der Daten von Hämoglobin bei 225 K: links sind die ersten sechs linken singulären Vektoren (die Spalten von \mathbf{U}) der Reihe nach von oben nach unten mit dem zugehörigen Singulärwert aufgezeichnet. Rechts sind die entsprechenden rechten singulären Vektoren (die Spalten von \mathbf{V}) aufgeführt.

Vernachlässigt man kleine Singulärwerte und behält nur die zu den größten, den *signifikanten Singulärwerten* gehörenden singulären Vektoren, so kann man mit diesen in der Zahl der Spalten bzw. Reihen gegenüber \mathbf{R} und \mathbf{V}^T verkleinerten Matrizen \mathbf{R}^\ddagger und $\mathbf{V}^{\ddagger T}$ die Datenmatrix \mathbf{D} annähern:

$$\mathbf{D} \approx \mathbf{R}^\ddagger \cdot \mathbf{V}^{\ddagger T} = \mathbf{D}^\ddagger \quad (24)$$

In den Spalten von \mathbf{R}^\ddagger stehen nur noch die signifikanten nicht normierten Basisspektren, die gebraucht werden, um die Messung zu interpretieren.

Eine wichtige Eigenschaft der Singulärwertzerlegung ist nun, dass diese Näherung die beste im Sinne der kleinsten Fehlerquadrate ist. Die Singulärwertzerlegung sortiert das Rauschen automatisch in die zu kleinen Singulärwerten gehörenden Vektoren, und die zu großen Singulärwerten gehörenden Vektoren beinhalten die Information. Diese Eigenschaft der Singulärwertzerlegung ist eine sehr wichtige, denn sie erlaubt dem Forscher eine Abschätzung, wie viele unterschiedliche Spezies an der gemessenen Reaktion teilnehmen.

Ist zwar die Singulärwertzerlegung eine rein mathematische Operation, so kann man doch in gewisser Weise die Bedeutung der singulären Vektoren veranschaulichen: Der erste linke Singulärwert entspricht einem über die Zeit gemittelten experimentellen Durchschnitts-Differenzspektrum und der erste rechte singuläre Vektor seinem Beitrag zu den Meßspektren bei den verschiedenen Zeiten. Der zweite linke singuläre Vektor ähnelt den mittleren Abweichungen der Messung von der Anpassung mit den ersten singulären Vektoren und der zweite rechte singuläre Vektor enthält die Größe dieser Abweichungen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

Die Eigenschaften der aus der Singulärwertzerlegung erhaltenen Matrizen können am besten erläutert werden, wenn man zunächst eine Zerlegung fehler- und rauschfreier Daten diskutiert: In diesem Fall wären nur die ersten signifikanten Singulärwerte ungleich 0 und ihre Zahl entspräche der Zahl der spektroskopisch unterscheidbaren Spezies. Das Ungefähr-Zeichen in Gl. (24) würde zu einem Gleichheitszeichen. Die signifikanten Singulärwerte unterscheiden sich stark in ihren Werten. Alle höheren

Singulärwerte wären gleich 0, da die Daten schon durch die signifikanten Vektoren exakt nachgebildet werden könnten.

Hat man nun aber verrauschte Daten, sind auch die höheren Singulärwerte ungleich 0, jedoch kleiner als die signifikanten. Auch in der Größe ihrer Werte unterscheiden sie sich nicht wesentlich, da das Rauschen statistisch ist und damit unkorreliert. Falls zwei Spezies allerdings sehr ähnliche Spektren aufweisen, bzw. diese linear abhängig sind, kann es sein, dass die Singulärwertzerlegung diesen Unterschied nicht vom Rauschen trennen kann und man einen kleineren Satz signifikanter Vektoren erhält. Dies tritt auch im Falle paralleler Konzentrationsverläufe auf. Andererseits kann es bei instrumentellen Instabilitäten wie z. B. Schwankungen im Lampenspektrum, wie sie durch Alterungsprozesse in der Lichtquelle hervorgerufen werden, zu künstlich signifikanten Faktoren kommen (Bonneau, R. et al. 1997).

Die Beziehung zwischen den aus der Singulärwertzerlegung erhaltenen \mathbf{R}^\ddagger und $\mathbf{V}^{\ddagger T}$ in Gl. (24) einerseits und andererseits den physikalisch sinnvollen Spektren und Konzentrationsverläufen in \mathbf{F} und \mathbf{C}^T in Gl. (22) ist durch eine Transformation gegeben:

$$\mathbf{F} \approx \mathbf{R}^\ddagger \cdot \mathbf{T} = \overline{\mathbf{R}} \quad (25)$$

$$\mathbf{C}^T \approx \mathbf{T}^{-1} \cdot \mathbf{V}^{\ddagger T} = \overline{\mathbf{C}}^T \quad (26)$$

In den Spalten von $\overline{\mathbf{R}}$ stehen also möglichst gut an die realen Spektren f (in den Spalten von \mathbf{F}) angepaßte Linearkombinationen der Basisspektren. Die Transformation in (26) erzeugt aus $\mathbf{V}^{\ddagger T}$ die Zeitverläufe $\overline{\mathbf{C}}$. Die Transformationsmatrix \mathbf{T} ist eine Diagonalmatrix. Die Zahl der Reihen und Spalten entspricht der Zahl der signifikanten Singulärwerte.

Um die Spektren der reinen Substanzen und deren Konzentrationsverläufe berechnen zu können, müssen die Einträge der Transformationsmatrix \mathbf{T} gefunden werden. Diese können bei bekannten Spektren der einzelnen Substanzen bzw. bei bekannten Konzentrationsverläufen berechnet werden:

Bei einem bekannten Spektrum \vec{P} ist eine Spalte von \mathbf{T} berechenbar. Es gilt z. B. für die l -te Spalte von \mathbf{T} (bezeichnet mit \mathbf{T}_l):

$$\mathbf{T}_l = \mathbf{S}^{\ddagger^{-1}} \mathbf{S}^{\ddagger^{-1}} \mathbf{R}^{\ddagger T} \vec{P} \quad (27)$$

\mathbf{S}^{\ddagger} ist dabei die verkleinerte Diagonalmatrix \mathbf{S} , welche nur noch die signifikanten Singulärwerte enthält.

Der gemäß dieser Transformation aus den linken singulären Vektoren linearkombinierte Vektor

$$\vec{R}_l = \mathbf{R}^{\ddagger} \cdot \mathbf{T}_l \quad (28)$$

beschreibt das Spektrum \vec{P} am besten als Linearkombination aus Basisspektren (gemäß der kleinsten Abweichungsquadrate).

Bei Auftreten intermediärer Zustände, für welche die Spektren unbekannt sind, müssen zusätzliche Informationen oder Annahmen herangezogen werden, um die Konzentrationsverläufe berechnen zu können. Das können charakteristische spektrale Eigenschaften sein, wie z. B. die Bande bei 630 nm in den Met-Globinen, die zur Normierung der modellierten Differenzspektren geeignet ist, oder die aufgespaltene Q-Bande des Fe(II)LS in Häm-Spektren, die in den Fe(II)HS-Spektren nicht zu sehen sein sollte. Ein Testvektor \vec{P} , der dem angenommenen Spektrum entspricht, wird mit einem Vektor \vec{R}_l verglichen, der durch Linearkombination der linken singulären Vektoren in der Art gewonnen wird, dass die Quadratnorm des Differenzvektors von \vec{R}_l und \vec{P} minimiert wird (vgl. Gl. (27) und (28)). Im Falle des Myoglobins kann der Testvektor durch Extrapolation der bekannten Tiefsttemperaturspektren des Intermediats gewonnen werden. Im Falle von Hämoglobin kann mit Hilfe des sog. „self-modeling“ das Spektrum von Intermediaten gefunden werden.

5.2.2.3 Self-modeling

Bei Hämoglobin waren die Tiefsttemperaturspektren noch unbekannt, so dass hier das „self-modeling“ (Zimányi, L. et al. 1999b; Zimányi, L. et al. 1999a) genutzt wurde, um die Spektren der Zwischenzustände zu erhalten. Beim „self-modeling“ kann man aus dem zeitlichen Verlauf der Komponenten der rechten singulären Vektoren auf die Intermediate und wie sie aus den Basisvektoren linearkombiniert werden, schließen:

Trägt man die Komponenten der rechten singulären Vektoren gegeneinander in einem Raum von der Dimension der Anzahl der signifikanten Singulärwerte auf, so sind dies Punkte innerhalb eines Hyperpolyeders. Man erhält für jeden Zeitpunkt, an dem ein Spektrum aufgenommen wurde, einen solchen Punkt. Die Koordinaten dieses Punktes sind also die Wichtungsfaktoren bei der Linearkombination des Meßspektrums aus den Basisspektren. Das Spektrum eines Gemisches der Basisspektren, also auch die Meßspektren, findet sich innerhalb des Polyeders. Ein Eckpunkt dieses Polyeders zeigt die Linearkombination einer reinen Spezies aus den Basisspektren an. Da sich die Komposition der Meßspektren aus den Basisspektren zeitlich ändert, erzeugen die aufeinander folgenden Punkte eine Spur in diesem Raum. Wenn nun eine reine Spezies in eine andere reine Spezies übergeht, würden die Punkte in diesem Hyperraum auf einer Strecke liegen, welche die beiden reinen Spezies miteinander verbindet. Bei einem Gemisch aus mehr als zwei Spezies liegen die Punkte auch auf einer Geraden, wenn nur ein Prozeß vorherrscht, also die Konzentrationen der anderen Spezies in der Probe konstant sind. Geht man entlang dieser Geraden gibt es einen Punkt, an dem die Konzentration von der sich bildenden Spezies 0 ist, bzw. in der entgegengesetzten Richtung auf der Geraden einen Punkt, in dem die Konzentration der zerfallenden Substanz 0 ist. Gefunden kann diese Gerade werden, wenn die Reaktionsraten sich stark unterscheiden, man also ein Zeitintervall findet, in dem nur ein Prozeß stattfindet und die vorausgehenden Bildungsprozesse und die nachfolgenden Abbauprozesse vernachlässigt werden können. Das reine Spektrum befindet sich dann im Schnittpunkt der Geraden zu zweien aufeinander folgenden Prozessen.

Abb. 36 veranschaulicht in einer 2-dimensionalen Grafik, wie aus der gegenseitigen Auftragung der ersten beiden rechten singulären Vektoren die Anteile der ersten beiden Basisspektren am reinen Hämoglobin-Intermediat gefunden werden können. Führt man diese Rückextrapolation entlang Gerade b im 4-dimensionalen Raum durch, der von den Komponenten der ersten 4 rechten singulären Vektoren aufgespannt wird, so erhält man auch die Anteile der Basisspektren 3 und 4 am Differenzspektrum des Hämoglobin-Intermediats. Da sich die Reduktion und die Relaxation des Intermediates zeitlich überlagern, tritt ein solches Spektrum während der Messung nie pur auf, kann aber auf die beschriebene Art extrapoliert werden.

Im konkreten Fall der Temperaturreihe von Hämoglobin wurde nur das Intermediat der Messung bei 210 K auf die beschriebene Weise durch „self-modeling“ erhalten. In den höheren Temperaturbereichen, bei denen das anfängliche Fortschreiten der Reduktion zu schnell für die Zeitauflösung der Apparatur ist, sowie für die 200 K-Messung wurde das „self-modeling“ leicht abgewandelt: Durch Rückextrapolation entlang Gerade b wird ein Spektrum gesucht, welches dem bei 210 K bestimmten möglichst gut entspricht. Dieses Vorgehen setzt als Bedingung zeitlich gut separierte Prozesse voraus (vgl. Kapitel 6.1). Um den Fehler bei der Extrapolation entlang der Geraden zu minimieren, sollte die Streuung in den Datenpunkten gering sein. Die gefundenen Spektren (jedoch nicht die Differenzspektren) und Konzentrationsverläufe müssen dem Nichtnegativitätskriterium genügen (Lawton, W. H. und Sylvestre, E. H. 1971). Eine Ausnahme gibt es hier nur, wenn die Schwankungen des Untergrundes durch eine eigene Spezies in die Auswertung inkorporiert wurden. Diese Schwankungen können auch negativ werden.

Die Auswertung mit Singulärwertzerlegung ergibt die Spezies, die nötig sind, um die Messungen anzupassen.

Die Modellierung der relaxierten Fe(II)HS-Spezies erfolgt dabei durch Anpassen der linken singulären Vektoren an ein Deoxy-Hämoglobin-Differenzspektrum gemäß Gl. (27) und Gl. (28).

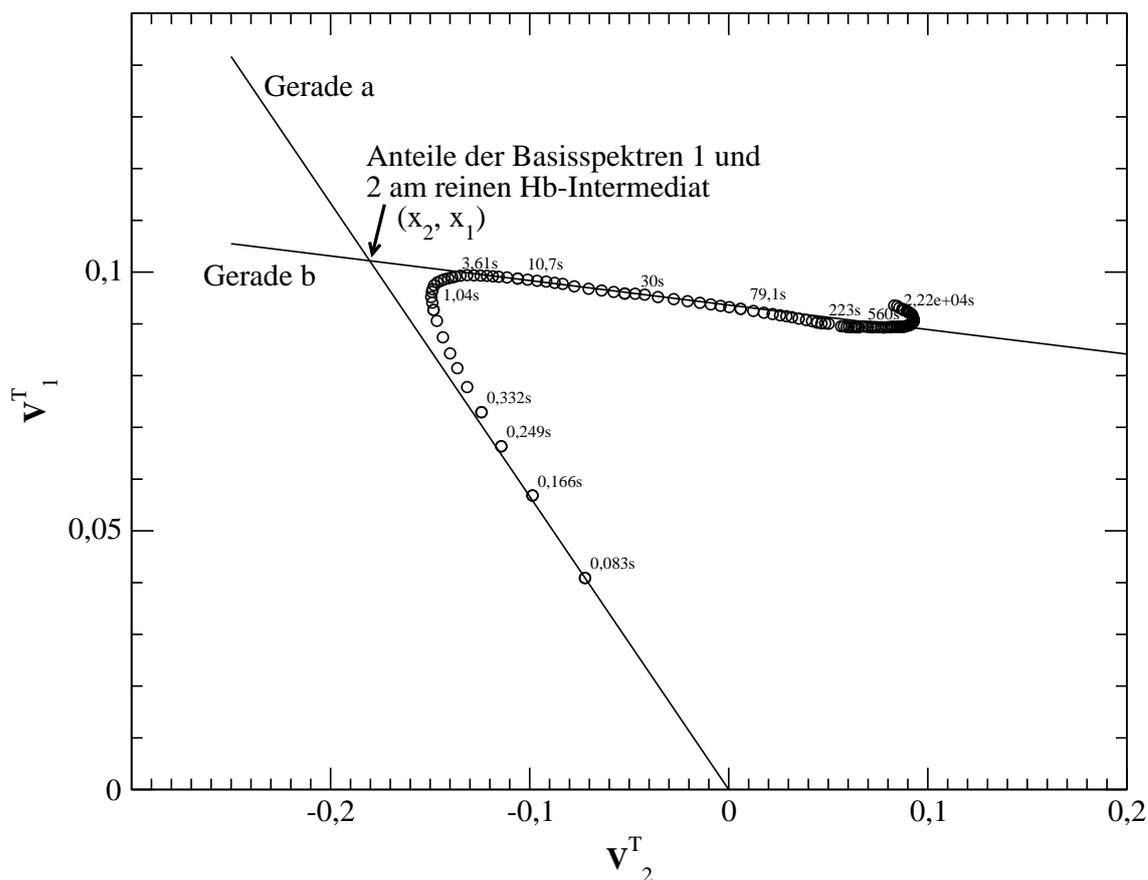


Abb. 36: Auftragung der Komponenten der ersten zwei rechten singulären Vektoren aus der Singulärwertzerlegung der Meßdaten aus der Reduktion von Hämoglobin bei 210 K gegeneinander. In dieser Auftragung sieht man, mit welchem Gewicht die linken singulären Vektoren (die Basisspektren) zu den verschiedenen Zeiten nach dem Laserblitz zum gemessenen Spektrum beitragen. Rechts oberhalb ausgewählter Punkte ist die zugehörige Zeit angegeben. Die Gerade a (Entstehungstangente) ist eine Tangente an die Punkte zu frühen Zeiten, bei denen durch Reduktion von Met-Hämoglobin Intermediat aufgebaut wird und Gerade b (Zerfallstangente) zu Zeiten, bei denen die Reduktion abgeschlossen ist und das gebildete Intermediat zerfällt. Der Schnittpunkt der beiden Geraden (mit Pfeil gekennzeichnet) gibt an, mit welchem Gewicht die ersten beiden linken singulären Vektoren zu einem reinen Intermediatspektrum beitragen würden.

Für Hämoglobin zeigt sich, dass neben der primär erzeugten intermediären Spezies und der daraus hervorgehenden relaxierten Fe(II)HS-Spezies bei langen Zeiten eine weitere Fe(II)LS-Spezies benötigt wird, welche gegenüber der primär erzeugten intermediären Spezies blauverschobene Banden besitzt (Abb. 38). Für die bei langen Zeiten

entstehende Fe(II)LS-Spezies konnte beim „Self-modeling“ leider keine Zerfallstangente (analog Gerade b in Abb. 36) gefunden werden. In höheren Temperaturbereichen, bei denen die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Deoxy-Hämoglobin und dieser weiteren „low-spin“ Spezies schnell genug vonstatten gehen sollte, entsteht diese Spezies nur in geringem Maße. Deshalb wurde nur die Entstehungstangente so weit extrapoliert, dass das Absorptionsspektrum keine Schulter in der Flanke der Soret-Bande besitzt (Abb. 37).

Bei diesem Fe(II)LS handelt es sich nicht – da spektroskopisch unterschiedlich - um CO-ligandiertes Hämoglobin, wie es bei den Proben, die bei tiefsten Temperaturen (20 K) reduziert werden bzw. die mit Mößbauerspektroskopie untersucht wurden (Croci, S. 2006), beim Aufheizen entsteht. Bei derart tiefen Temperaturen mußte nicht nur einmal, sondern viele tausendmal auf die Probe geblitzt werden, um eine ausreichende Reduktion zu erzielen. Dabei wurden kovalente Bindungen gebrochen und CO erzeugt.

Außerdem zeigt sich während des „Self-modeling“, dass das Intermediat biphasig zerfällt: Folgt man Gerade b in Abb. 36 in Richtung höherer Zeiten, so sollten diese auf den Punkt zulaufen, der als Koordinaten der Fe(II)HS-Spezies hat. Es fällt auf, dass die Punkte ab einer gewissen Zeit von Gerade b abknicken und erst dann auf einen Punkt zulaufen, der Fe(II)HS entspricht. Der Knick ist allerdings äußerst schwach und erst ab dem dritten Singulärwert sichtbar, so dass er in Abb. 36 nur ganz leicht beim Punkt zur Zeit 223 s zu sehen ist. Wendet man das „self-modeling“ für diesen „Knick“ an, so erhält man ein Spektrum, das einer Mischung aus „low-“ und „high-spin“ entspricht. In der Auswertung wurden deshalb zunächst vier signifikante Vektoren berücksichtigt.

Es ergab sich am Schluß, dass eines der drei aus dem „self-modeling“ erhaltenen Spektren auch relativ gut als Linearkombination des Intermediat-Spektrums und des Deoxy-Spektrums dargestellt werden kann. Dies ist das im vorhergehenden Abschnitt erwähnte, aus einer Mischung aus „low-“ und „high-spin“ bestehende Spektrum. Da es nicht möglich war, die reine Spezies zu diesem vierten Singulärwert zu ermitteln, wurde dieses Spektrum aus den Berechnungen entfernt, indem der zugehörige

Konzentrationsverlauf zu den Zeitverläufen von Intermediat und Deoxy-Myoglobin anteilig (entsprechend der spektralen Anteile von „low-“ und „high-spin“) hinzuaddiert wurde.

Für das vorgerechnete Beispiel ist in Abb. 39 ersichtlich, wie sich das Gesamtspektrum aus den Spektren der einzelnen Spezies ergibt.

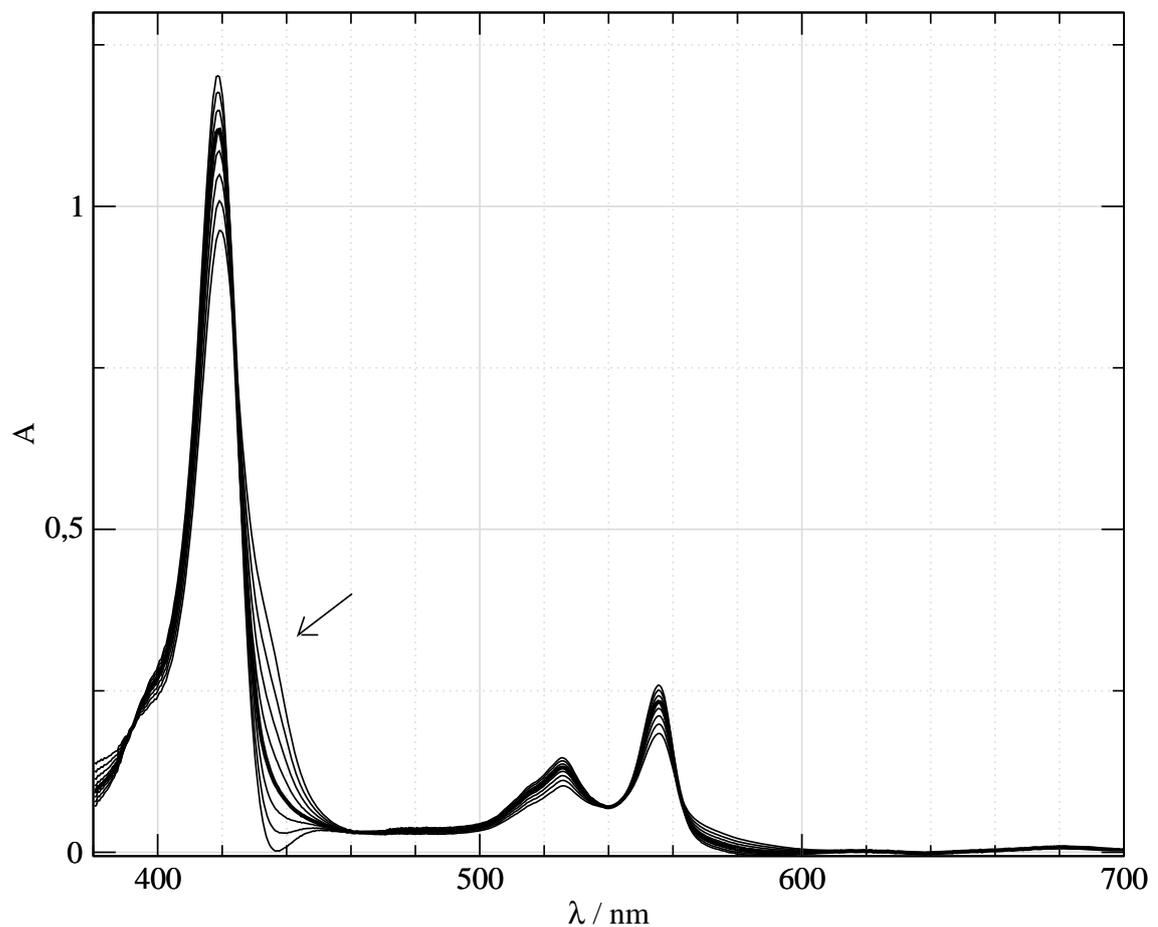


Abb. 37: Self-modeling der bei langen Zeiten entstehenden Fe(II)LS-Spezies bei 225 K, modelliert entlang der Entstehungsgeraden. Dargestellt sind hier schon die Spektren nach Rückgängigmachen der Wichtung, und auch das Ausgangsspektrum ist schon wieder addiert, so dass es sich nicht um Differenzspektren handelt. Je nachdem wie weit man den Verlauf der linken singulären Vektoren über das Ende der Messung hinaus extrapoliert, erhält man unterschiedliche Spektren für diese Spezies. Die richtige Extrapolation (Spektrum mit dicker Linie) erkennt man am Fehlen der Schulter (Pfeil) in der langwelligigen Flanke der Soret-Bande.

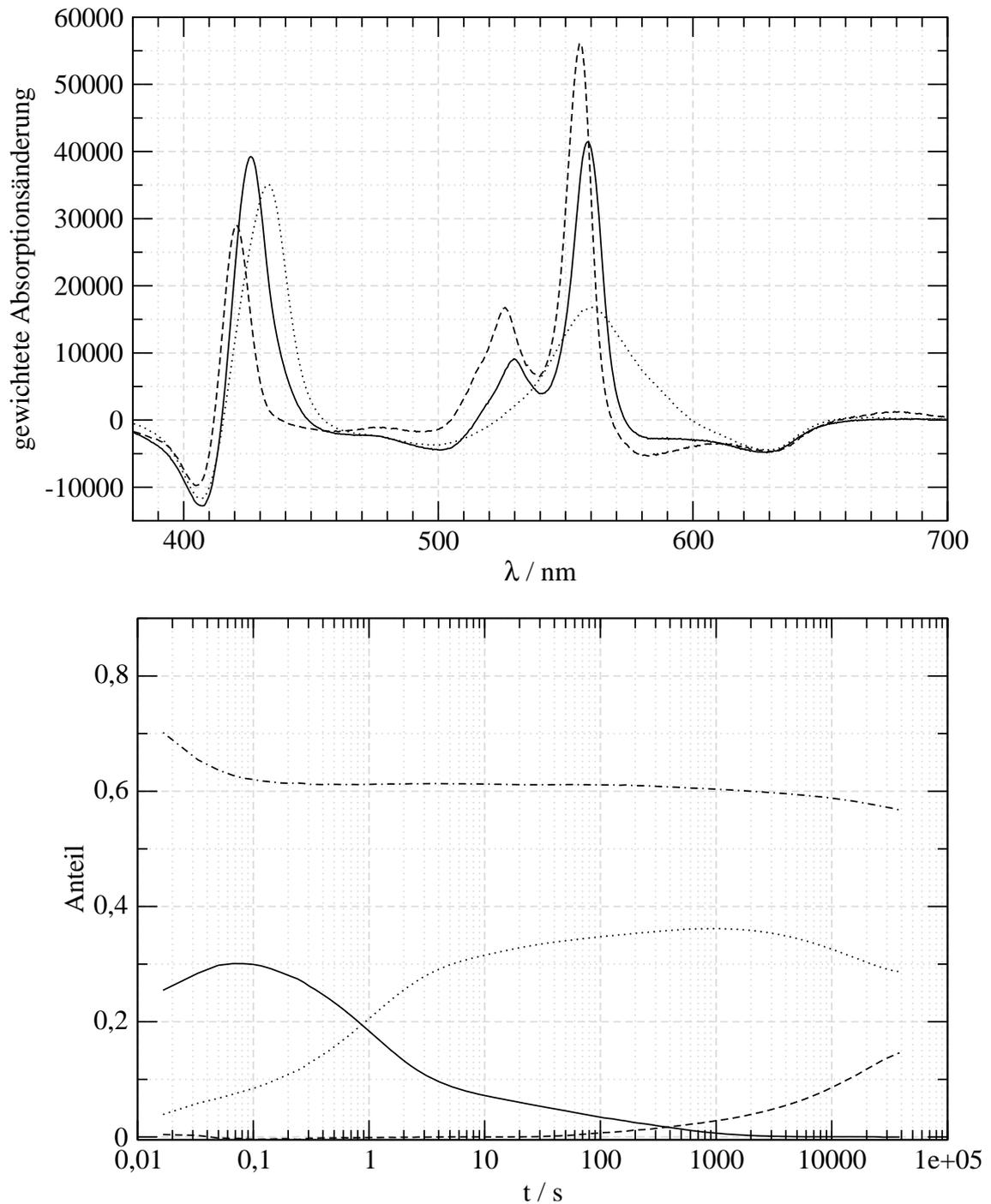


Abb. 38: linke und rechte singuläre Vektoren nach der Transformation in den Raum der gewichteten realen Spezies für Hb bei 225 K. Die linken Vektoren entsprechen den gewichteten Differenzspektren von Met-Hämoglobin (oberes Bild). Die rechten Vektoren geben den Anteil der jeweiligen Spezies in der Probe an (unteres Bild). Es bedeuten: Fe(II)LS (durchgezogene Linie), Fe(II)HS (punktiert) und Fe(II)LS2 (gestrichelt). Hier ist zusätzlich noch der Anteil von Met-Hämoglobin (strichpunktiert) aufgetragen.

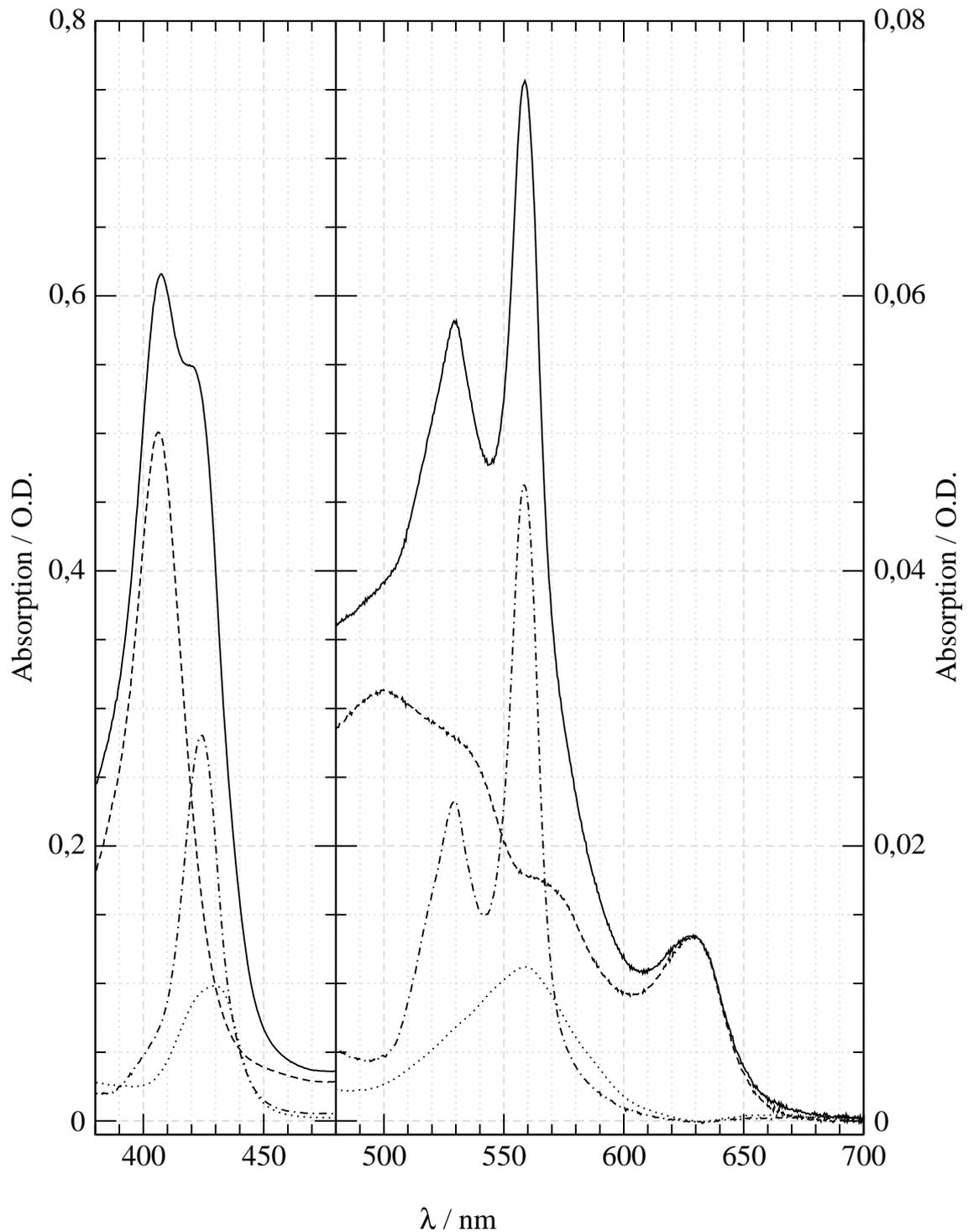


Abb. 39: Demonstration der Zusammensetzung eines gemessenen Spektrums (durchgezogene Linie) aus den Spektren der einzelnen reinen Spezies. Das Spektrum stammt aus der Messung bei 225 K und ist 307 ms nach dem Laserblitz aufgenommen worden. Die Anteile der einzelnen Substanzen sind darin: 62 % Met-Hämoglobin (gestrichelt), 26 % Fe(II)-LS (strichpunktiert), 13 % Fe(II)-HS (gepunktet) und 0 % Fe(II)-LS2.

5.2.3 Ermittlung der Zerfallsfunktion des Intermediates aus den Konzentrationsverläufen

Die Konzentrationsverläufe der intermediären Zustände zeigen i. A. erst eine Zunahme des Intermediates, wenn es aus der Ausgangssubstanz Met-Hämoglobin durch fortschreitende Reduktion aufgebaut wird, und daraufhin eine Abnahme, während es zerfällt. Die Zeitabhängigkeit der Konzentration des Intermediates $C_{\text{int}}(t)$ ist durch folgende Faltung gegeben:

$$C_{\text{int}}(t_i) = \int_0^{t_i} Z(t') \cdot \left(-\frac{dC_m(t)}{dt} \right) \Big|_{t_i-t'} dt' \quad (29)$$

Dabei ist $Z(t')$ die Zerfallsfunktion des Intermediats und $C_m(t)$ die Konzentration der Ausgangssubstanz. Zur Zeit t wird pro Zeiteinheit ein kleiner Teil Intermediat aus Met-Globin durch Reduktion erzeugt, der durch $\left(-\frac{dC_m(t)}{dt} \right)$ gegeben ist. Bis zum Zeitpunkt der Messung t_i ist davon ein Teil schon relaxiert und das so verbleibende Intermediat durch den Integranden in Gl. (29) gegeben. Die Zerfallsfunktion $Z(t)$ wäre der zeitliche Konzentrationsverlauf der intermediären Spezies, wenn es gelänge, das gesamte Met-Globin zum Zeitpunkt $t = 0$ zu reduzieren und keine Nachreduktion aufträte. Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Gleichung zur Berechnung der Intermediatkonzentration ist, dass die Reduktion von Met-Hämoglobin homogen verläuft. Es darf also keine Korrelation zwischen Redoxpotential und Zerfallsrate des Intermediates geben.

Um die reelle Laplace-Transformation aus (29) umzukehren und $Z(t)$ zu finden, wurde, wie im anschließenden Text erläutert, verfahren:

Für Zerfallskurven kann eine Summe von Exponentialfunktionen in folgender allgemeiner Form für $Z(t)$ angenommen werden, vorausgesetzt, es werden genügend viele Exponentialfunktionen herangezogen (Ware, W. R. et al. 1973):

$$Z(t) = \sum_{k=1}^n a_k e^{-\gamma_k t} \quad (30)$$

n ist die Zahl der Exponentialfunktionen. a_k sind positive reelle Zahlen, die angepaßt werden, und γ_k nicht variierende Zahlen, welche einen genügend großen Wertebereich umspannen.

Bei aus der Singulärwertzerlegung bekannten Konzentrationen $C_{\text{int}}(t)$ und $C_m(t)$ läuft die Entfaltung von Gl. (29) auf die Lösung eines linearen Gleichungssystems mit den n Variablen a_k hinaus. Ein weiterer allgemeinerer Ansatz bedient sich einer Auswertung, bei der die Konzentrationen des Intermediates zu diskretisierten Zeitpunkten direkt gesucht werden, um die Zerfallsfunktion des Intermediates zu finden (Abb. 40). Dies ist ein allgemeinerer Ansatz, da nicht vorgegeben wird, nach welcher Funktion der Zerfall zu erfolgen hat. Beide Methoden liefern die nahezu gleichen Zerfallsfunktionen.

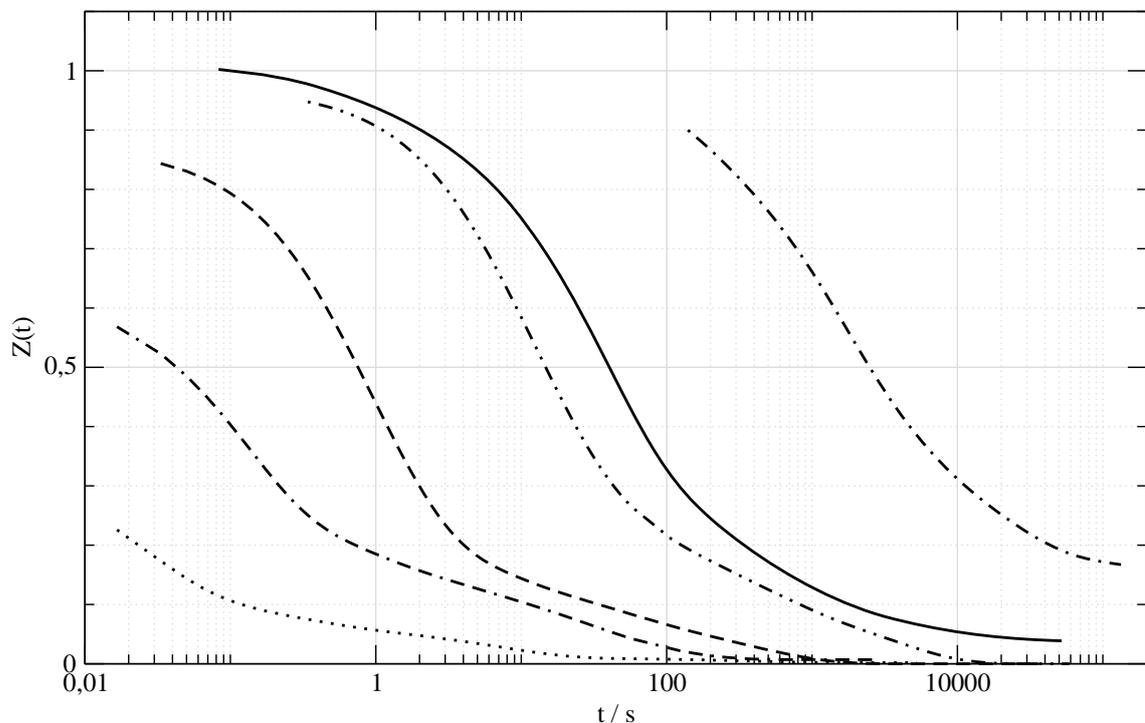


Abb. 40: Zerfallsfunktion $Z(t)$ des Hämoglobin-Intermediates für verschiedene Temperaturen: 200 K (Strich-Punkt), 210,5 K (durchgezogen), 215 K (Strich-Punkt-Punkt), 225 K (gestrichelt), 235 K (Strich-Strich-Punkt), 245 K (punktiert).

5.3 Myoglobin

5.3.1 Messungen an Myoglobin

Um die Ligandierungsänderung von der metastabilen „low-spin“- zur „high-spin“-Konformation nach Reduktion von Met-Myoglobin verfolgen zu können, wird die Reduktion durch einen 7 ns langen Laserblitz mit 40 bis 60 mJ bei einer Wellenlänge von 355 nm ausgelöst. Dadurch wird das sich neben Myoglobin in der Probe befindliche photoaktive Ru(bpy)₃ in einen Zustand angeregt, der sehr stark reduzierend und so als Elektronen-Donator für Met-Myoglobin wirkt. Gegenüber dem bei Hämoglobin verwendeten Reduktionsmittel Nicotinamid verläuft die Reduktion durch das angeregte Ru(bpy)₃ deutlich schneller.

Die optischen Spektren (Abb. 41) zeigen eine Überlagerung verschiedener Spezies: Da die Probe nur zu höchstens 10 % reduziert werden kann, liegt ein Großteil der Probe auch nach dem Laserbeschuß noch als Met-Myoglobin vor. In den Absorptionsspektren ist deshalb mit bloßem Auge nur eine Verschiebung der Spektren um einen konstanten Untergrund sichtbar. Außerdem kommen die metastabile Fe(II)LS-Form und Deoxy-Myoglobin vor. Als weitere Spezies in der Probe sind die oxidierte und die reduzierte Form des Ru(bpy)₃ zu nennen.

Um die zeitlichen Veränderungen in der Probe sichtbar zu machen, ist es angebracht, die Differenzspektren zu berechnen. Dazu wird von den nach dem Laserblitz zeitaufgelöst gemessenen Spektren das Ausgangsspektrum der noch unbeleuchteten Probe abgezogen. Zusätzlich wird noch eine Untergrundkorrektur vorgenommen, indem den Differenzspektren ein über den gesamten Wellenlängenbereich konstantes Spektrum derart hinzugerechnet wird, dass die Abweichung der erhaltenen Differenzspektren von der Nulllinie im Wellenlängenbereich zwischen 700 und 735 nm minimiert wird. Die so errechneten Differenzspektren sind in Abb. 42 gezeigt.

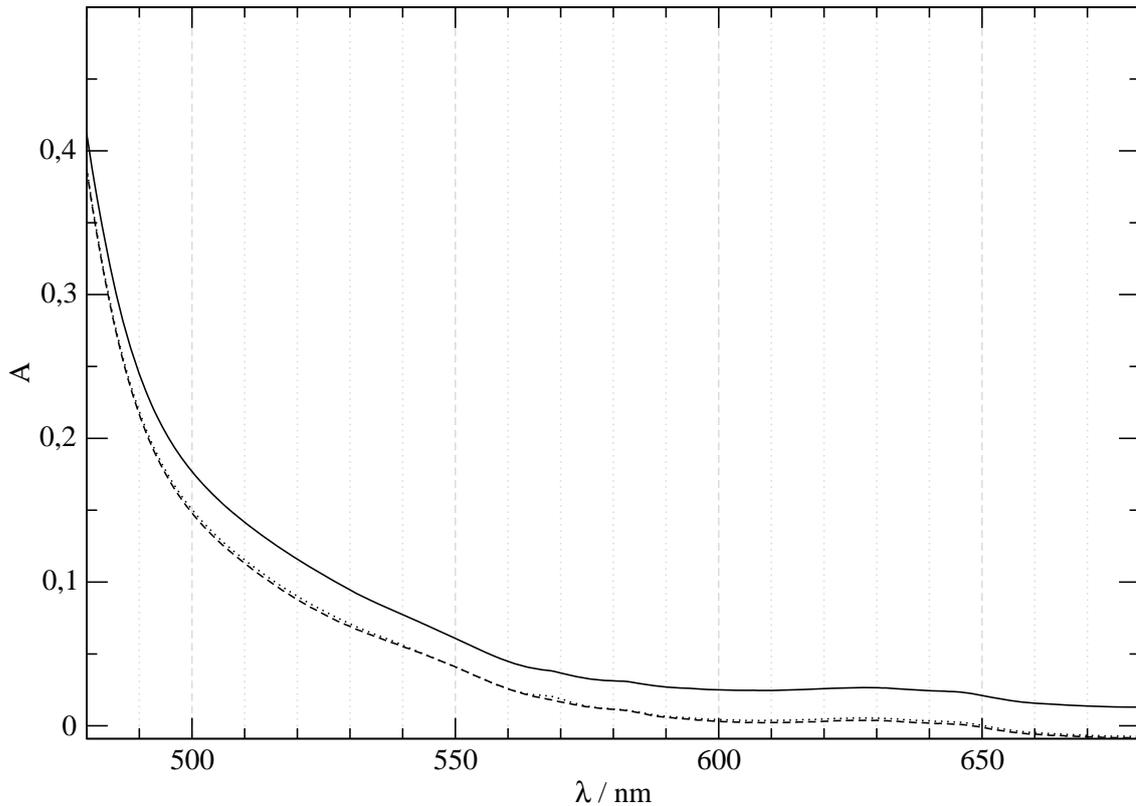


Abb. 41: gemessene optische Spektren der Myoglobin-Proben (Myoglobin und Ru(bpy)) bei der Beispieltemperatur von 191 K: Ausgangsprobe vor dem Laserblitz (durchgezogene Linie), 349 s nach dem Laserblitz (punktirt) und 24892 s nach dem Laserblitz (gestrichelt). Da bei den gemessenen Temperaturen (190 bis 240 K) nur gut 10 % der in der Probe befindlichen Proteinmoleküle reduziert werden können, ist in dieser Darstellung der Rohdaten nur eine Verschiebung der Spektren um einen konstanten Untergrund sichtbar.

Aus Abb. 42 können schon einige Folgerungen gezogen werden: Da nur Met-Myoglobin wesentlich bei 630 nm absorbiert, zeigt die Abnahme der Absorptionsdifferenz bei dieser Wellenlänge mit der Zeit das Fortschreiten der Reduktion während der Messung. Die bei kurzen Zeiten, wie z. B. im strichpunktieren Spektrum in Abb. 42 bei 8,3 s, hervorstechende Bande bei 520 nm stammt von Ru(bpy)₃. Bei 349 s (punktirtes Spektrum in Abb. 42) ist das Differenzspektrum geprägt durch die scharfen Linien des intermediären Zustandes. Man kann gut seine vier Absorptionsbanden bei ca. 527 nm, 537 nm, 554 nm und 568 nm erkennen, während der Beitrag von Ru(bpy)₃ wesentlich geringer geworden ist. Noch später, 24892 s nach dem

Laserblitz (gestricheltes Spektrum), ist von den Absorptionsbanden des metastabilen Zustandes kaum noch ein Rest auszumachen. Die breite Bande von Deoxy-Myoglobin ist aufgetaucht.

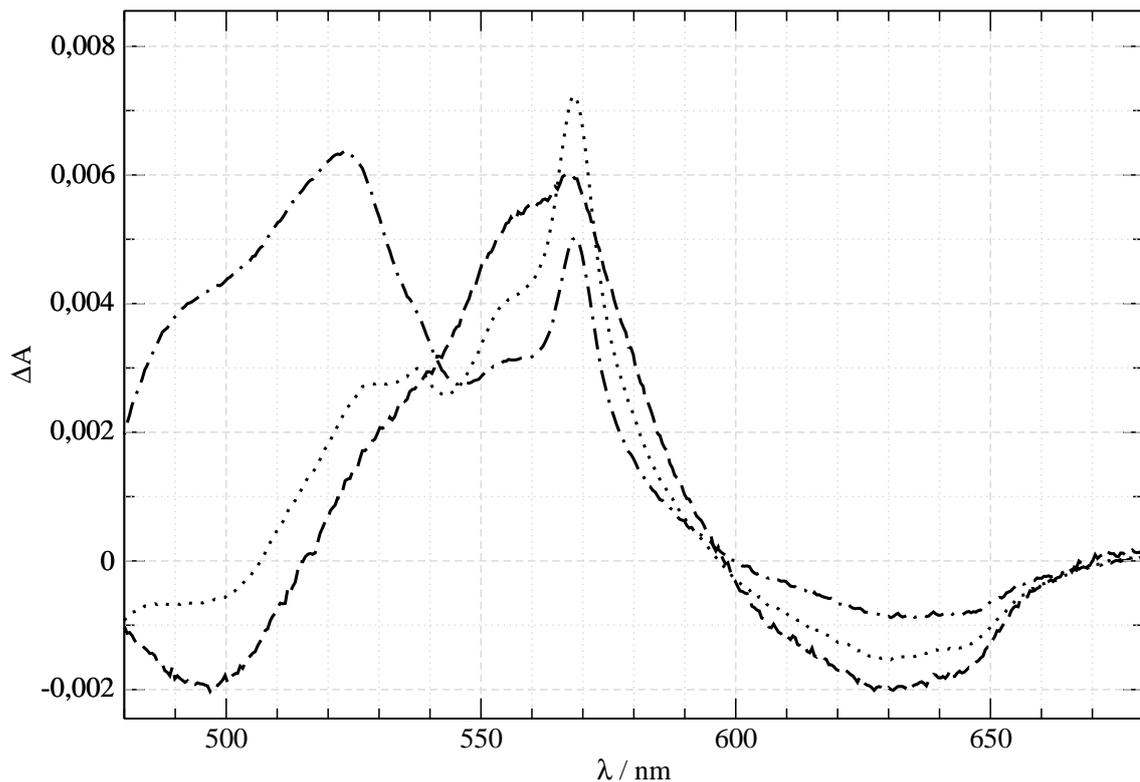


Abb. 42: Differenzspektren der Myoglobin-Probe bei 191 K nach Abzug eines konstanten Untergrundes; von den zeitaufgelöst gemessenen Spektren nach dem Laserblitz wurde das Spektrum der Ausgangsprobe abgezogen; strichpunktirt: Spektrum 8,3 s nach dem Laserblitz; gepunktet: 349 s nach dem Laserblitz; gestrichelt: 24892 s nach dem Laserblitz; die Abnahme der Absorption bei 630 nm bekundet das Verschwinden von Met-Myoglobin und damit den Fortschritt der Reduktion, die Bande bei 520 nm stammt von Ru(bpy).

5.3.2 Die zeitlichen Konzentrationsverläufe von Myoglobin bei intermediären Temperaturen

Für die Auswertung der Myoglobin-Daten mit Hilfe der Singulärwertzerlegung sind folgende Anmerkungen zu machen:

Die gemessenen Spektren sind Linearkombinationen der Spektren von Met-Myoglobin, Intermediat und Deoxy-Myoglobin. Des Weiteren finden sich in den gemessenen Spektren Beiträge des reduzierten und oxidierten Ru(bpy). Eine Absorptionsbande bei 580 nm (die dazugehörige Bande bei 540 nm ist aufgrund ihrer größeren Breite nicht markant genug) zeigt das Vorhandensein von Oxy-Myoglobin an, das entsteht, wenn der in der Lösung vorhandene Sauerstoff an Deoxy-Myoglobin bindet. Sein Anteil ist in den meisten Proben verschwindend gering und wurde deshalb nur wenn nötig berücksichtigt. Insgesamt sind also 6 verschiedene Spezies in der Probe vorhanden.

Durch die Bildung der Differenzspektren kann die Zahl der zur Anpassung benötigten Spektren von 6 auf 4 (bzw. 3, wenn kein Oxy-Myoglobin ausgemacht werden kann) eingeschränkt werden. Dies sind folgende Spektren:

1. für das Intermediat: $\epsilon_{Int} - \epsilon_{Met}$
2. für Deoxy-Myoglobin: $\epsilon_{Deoxy} - \epsilon_{Met}$
3. für Oxy-Myoglobin: $\epsilon_{Oxy} - \epsilon_{Met}$
4. für Ru(bpy)₃: $\epsilon_{Ru3+} - \epsilon_{Ru2+}$

Bei Schwankungen im Untergrund erhöht sich diese Zahl allerdings wieder um eins, weil ein künstlicher signifikanter Faktor hinzukommt.

Analog zu Schritt 4) in Abb. 32 bei der Auswertung der Messungen an Hämoglobin wurden auch die Differenzspektren der Messungen an Myoglobin vor der Singulärwertzerlegung mit dem Referenzspektrum gewichtet. Als Beispiel sind in Abb. 43 die größten singulären Vektoren gezeigt, wie man sie aus der Messung bei 191 K erhält. Bei dieser Temperatur findet man 4 signifikante Singulärwerte.

Für die Transformation der singulären Vektoren auf die Spektren und Zeitverläufe der realen Spezies kann im Fall von Myoglobin zum Teil auf bekannte Spektren zurückgegriffen werden. Die gewichteten Differenzspektren für Deoxy-Myoglobin und $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ sind für alle Temperaturen bekannt. Das gewichtete Differenzspektrum für die $\text{Fe}(\text{II})\text{LS}$ -Form wurde an das für diese Spezies bei einer tieferen Temperatur von 160 K bekannte Spektrum (Lamb, D. C. et al. 1998a) angepaßt. Da die optischen Spektren der Globine sehr stark temperaturabhängig sind, ist diese Anpassung recht ungenau und die erhaltenen Ergebnisse müssen auf Plausibilität überprüft werden. Beim 191 K-Spektrum des Intermediats wird so der Anteil des Ruthenium-Komplexes negativ. Dies kann korrigiert werden, indem aus dem Spektrum des Intermediats so lange ein Teil des Ruthenium-Spektrums abgezogen wird bis es zu einem konsistenten Konzentrationsverlauf kommt (Abb. 44). Aufgrund der Schwankung im Untergrund zwischen 40 und 80 s bei dieser Temperatur wurde neben den ersten 3 signifikanten singulären Vektoren auch der 4. noch zur Modellierung eines linearen Untergrundes einbezogen (vgl. Abb. 44). Diese Schwankungen wurden aber nur bei 191 K berücksichtigt. Bei Erhöhung der Temperatur laufen die Reaktionen schneller ab, und es muß nicht so lange gemessen werden. Der Untergrund braucht dann, da über den Meßzeitraum konstant genug, nicht als 4 „Spezies“ in die Auswertung inkorporiert werden. Dort ergeben sich nur 3 signifikante Singulärwerte. Es sei denn der Beitrag von Oxy-Myoglobin ist wie erwähnt nicht vernachlässigbar, was aber nur bei wenigen Temperaturen der Fall war.

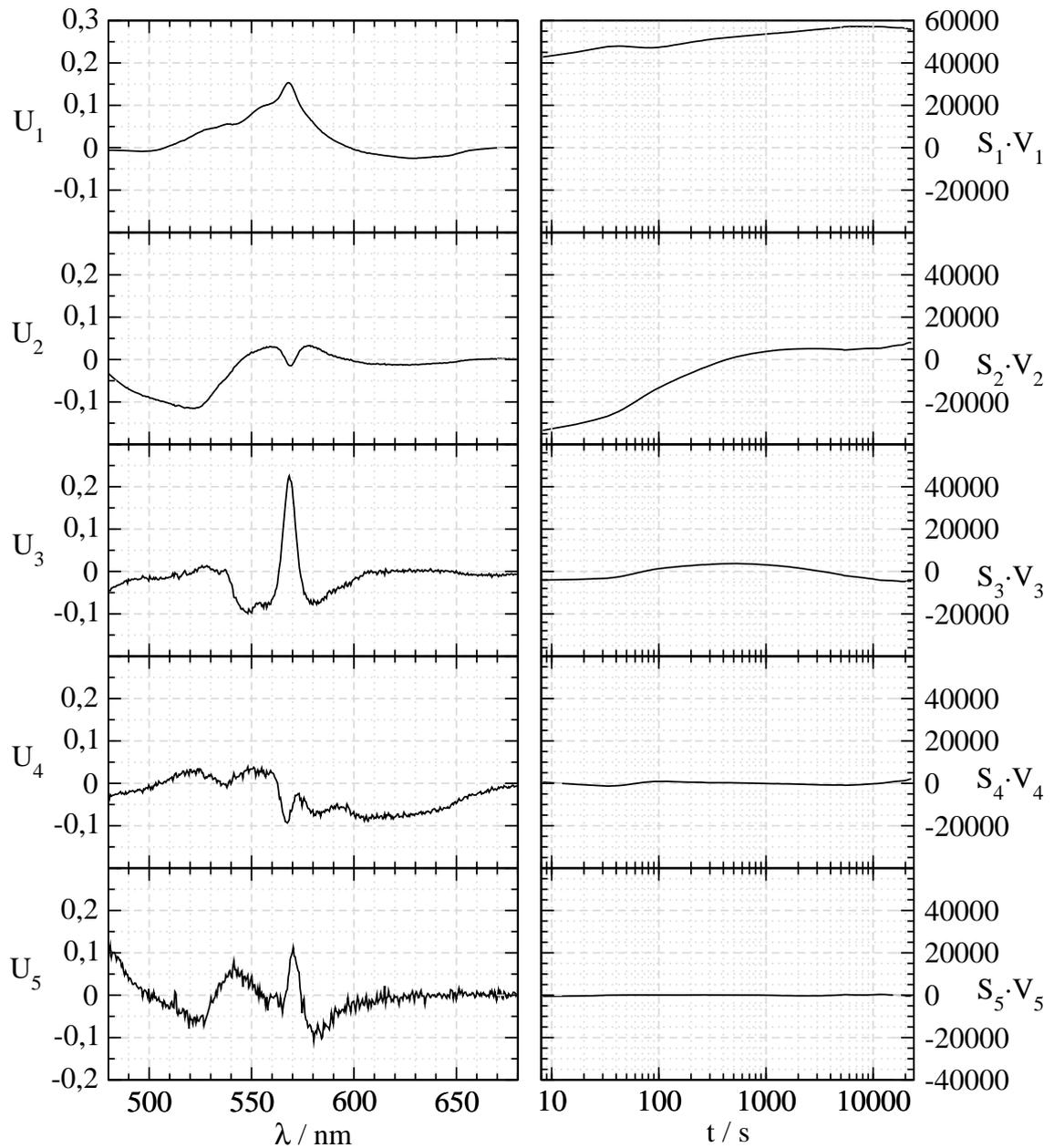


Abb. 43: Die ersten fünf linken und rechten singulären Vektoren für die zeitabhängigen Spektren nach dem Photoreduzieren von Mb mit Hilfe von Ruthenium am Beispiel der Daten bei der Temperatur 191 K. Die Basisspektren (links), U_1 bis U_5 , sind orthonormal. Währenddessen sind die Zeitverläufe (rechts), V_1 bis V_5 , mit dem jeweiligen Singulärwert ($S_1=501.649$, $S_2=91.845$, $S_3=27.807$, $S_4=6.356$, $S_5=1.745$) gewichtet dargestellt. Werden die rechten singulären Vektoren in der jeweils gleichen Achsenskalierung aufgetragen, wird deutlich, wie stark die linken Spektren im Zeitverlauf zu den gewichteten Differenzspektren (der Messung) beitragen.

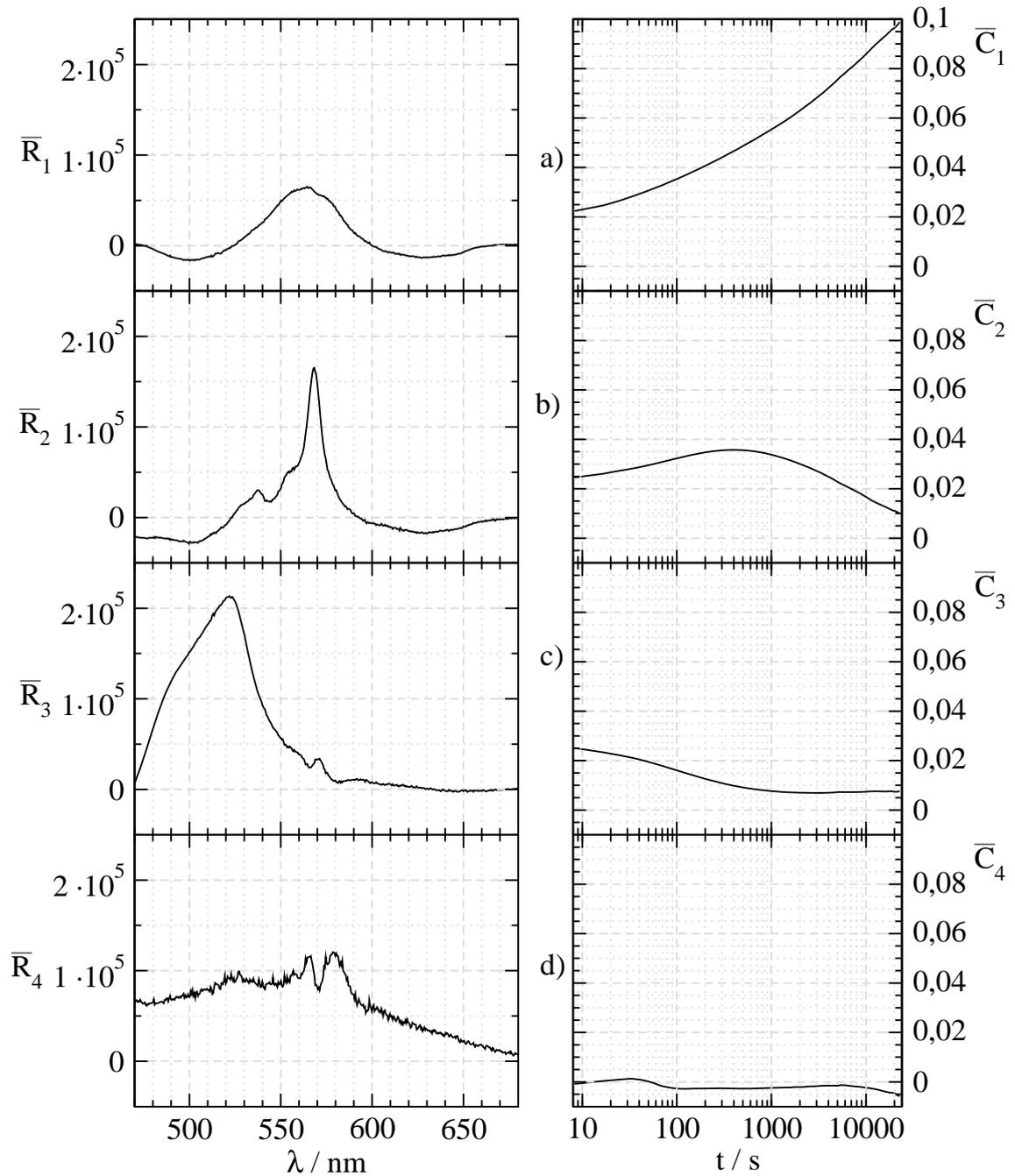


Abb. 44: Nach der Transformation der ersten vier linken singulären Vektoren aus Abb. 43 auf die gewichteten Differenzspektren der realen Spezies gemäß Gl. (25) (links) erhält man den Konzentrationsverlauf der einzelnen Spezies (rechts): Deoxy-Myoglobin (a), Fe(II)LS-Myoglobin (b), Ru(bpy) (c) und der Untergrund (d). Bis etwa 400 s nach dem Laserblitz nehmen bei dieser Temperatur ($T=191$ K) sowohl die Deoxy-Form als auch die Fe(II)LS-Form von Myoglobin zu: Das Protein wird reduziert. Bei größeren Zeiten relaxiert Fe(II)LS nach Deoxy-Myoglobin.

Aus den so gewonnenen gewichteten Differenzspektren erhält man durch Rückgängigmachen der Gewichtung mit der Lampenintensität und Addition des Met-Spektrums die in Abb. 45 gezeigten realen optischen Spektren von Deoxy-Myoglobin und des Intermediats. Das Intermediat zeigt 4 Q-Banden und damit eine weitere Aufspaltung gegenüber der von anderen Häm-Proteinen bekannten vibronischen Aufspaltung der Q-Bande. Die zusätzliche Aufspaltung rührt von einer Aufhebung der 4-fachen Rotationssymmetrie der Umgebung des Häm-Eisens her (rhombische Störung).

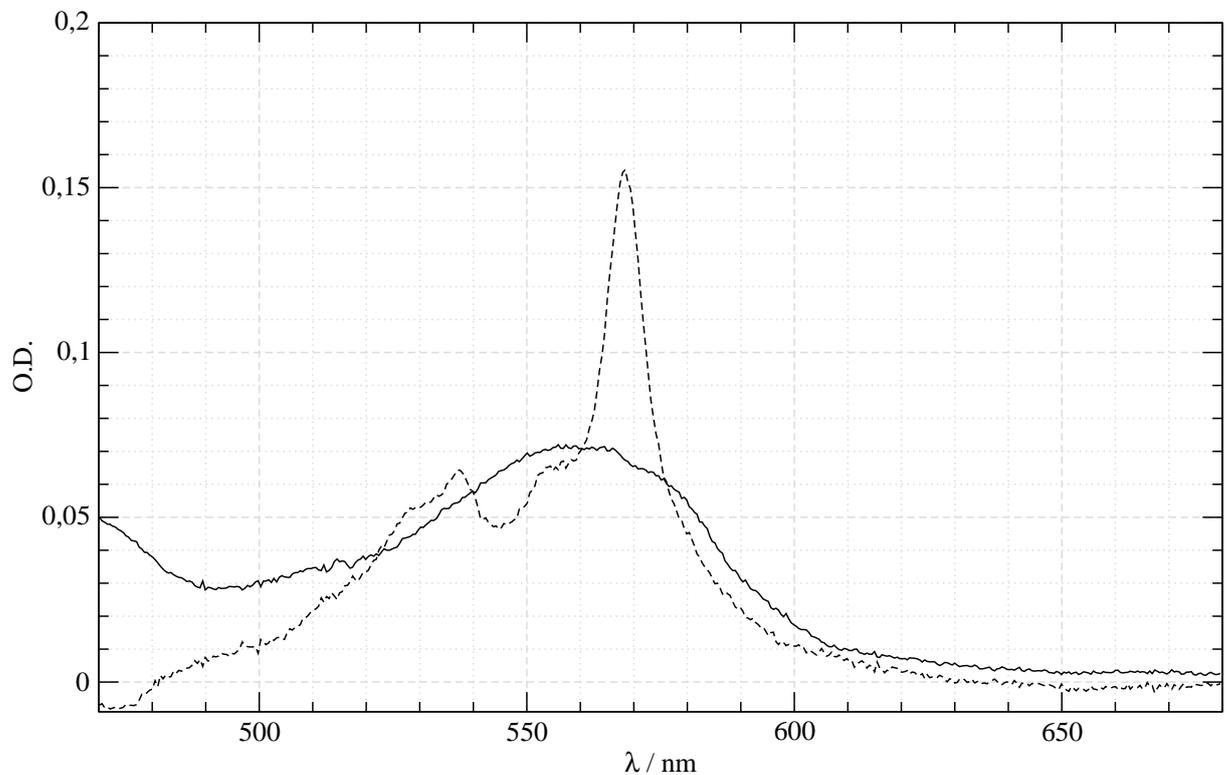


Abb. 45: Die realen extrahierten Spektren aus der zeitaufgelösten Messung der Reduktion von Myoglobin bei 191 K. Gezeichnet sind die Spektren der reduzierten Substanzen: durchgezogen (Deoxy-Myoglobin) und Intermediat (gestrichelt).

5.3.3 Die Zerfallsfunktion des Intermediates

Da die Reduktion während der Messung fortschreitet, muß der Konzentrationsverlauf des Intermediates korrigiert werden, indem die Faltung nach Gl. (29) rückgängig gemacht wird (Abb. 46). Die Anpassung der errechneten Zerfallskurven für das Intermediat ist in Abb. 47 gezeigt. Der Verlauf bei kurzen Zeiten konnte wegen der langsamen Reduktion nicht besser aufgelöst werden, d. h. ein Teil der Intermediat-Moleküle hat derartig hohe Zerfallsraten, dass die Bildung langsamer als der Zerfall vonstatten geht. Deshalb starten die Zerfallskurven nicht bei 1. Dies ist ein wichtiger Unterschied zu der Messung an Hämoglobin, bei welcher der komplette Zerfall des Intermediates aufgezeichnet werden konnte.

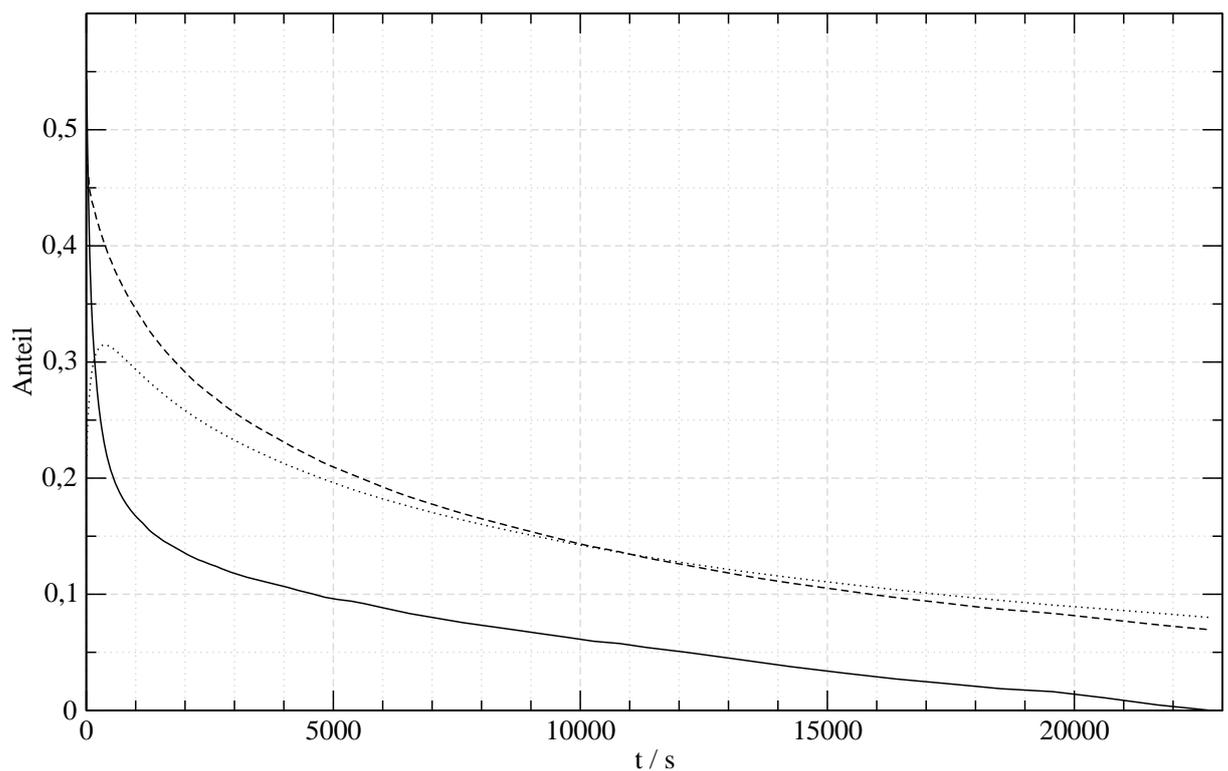


Abb. 46: Entfaltung der Konzentrationsverläufe, um die Zerfallsfunktion des Intermediates (gestrichelte Linie) zu erhalten, am Beispiele der Messung an Myoglobin bei 191 K: Anteil an Met-Myoglobin (korrigiert um den während der gesamten Messung nicht reduzierten Anteil) (durchgezogene Linie) und Anteil an Fe(II)LS (gepunktete Linie).

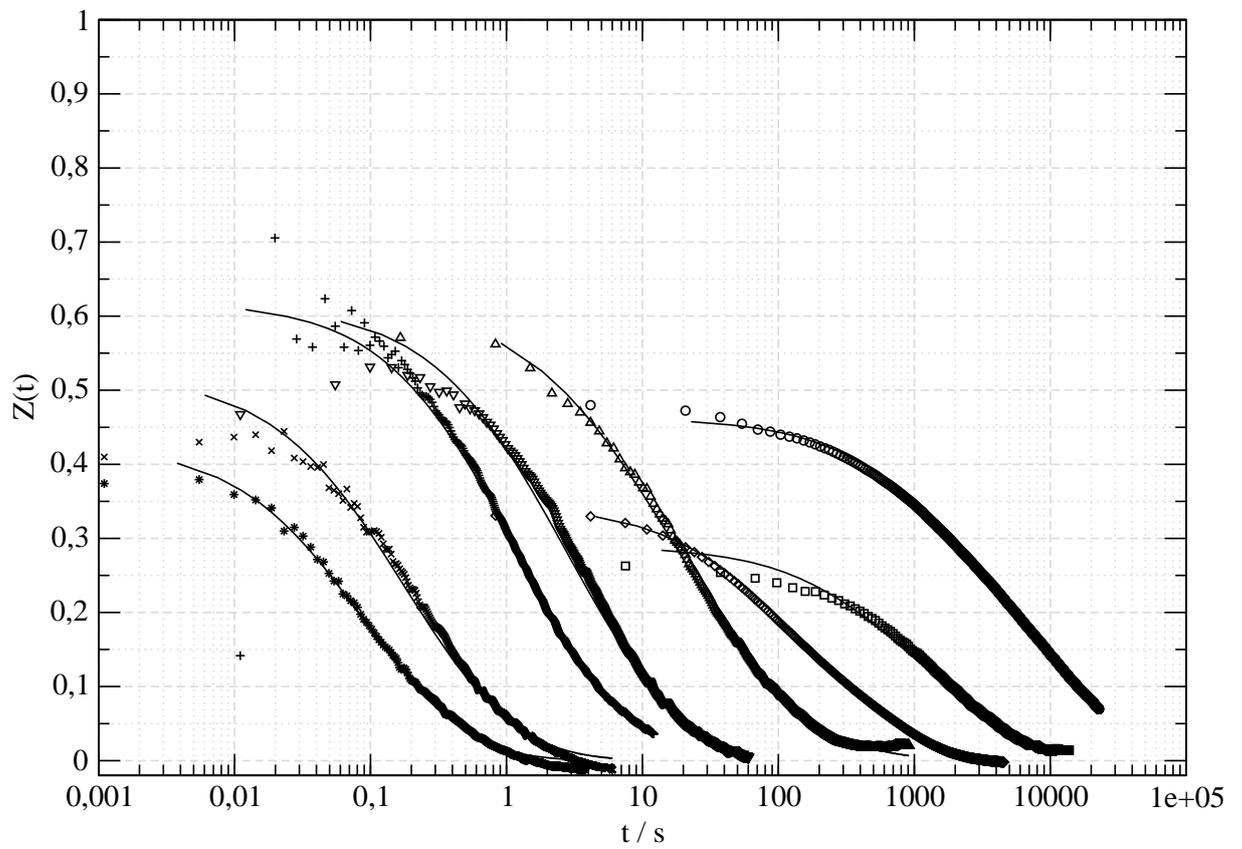


Abb. 47: Die entfaltenen Zerfallsfunktionen des intermediären Zustandes bei den Temperaturen zwischen 191 K und 225 K (Symbole) mit den mit einer Gaußverteilten Barrierenhöhe angepaßten Funktionen nach Gl. (11) (durchgezogene Linien): 191 K (Kreise), 195 K (Quadrate), 200 K (Rauten), 205 K (Dreiecke mit Spitze nach oben), 210 K (Dreiecke mit Spitze nach unten), 215 K (Pluszeichen), 220 K (Kreuze) und 225 K (Sterne)

5.4 Neuroglobin

5.4.1 Messungen an Neuroglobin

Neuroglobin tritt ohne externen Liganden sowohl in der reduzierten als auch in der oxidierten Form als „low-spin“ mit dem distalen Histidin als Liganden an der sechsten Bindungsstelle auf. Um optisch eine Ligandierungsänderung verfolgen zu können, wird

deshalb von Cyanid-ligandiertem Neuroglobin gestartet. Cyanid bindet nur an das Eisen der Hämgruppe, wenn dieses mit der Oxidationszahl 3 vorliegt.

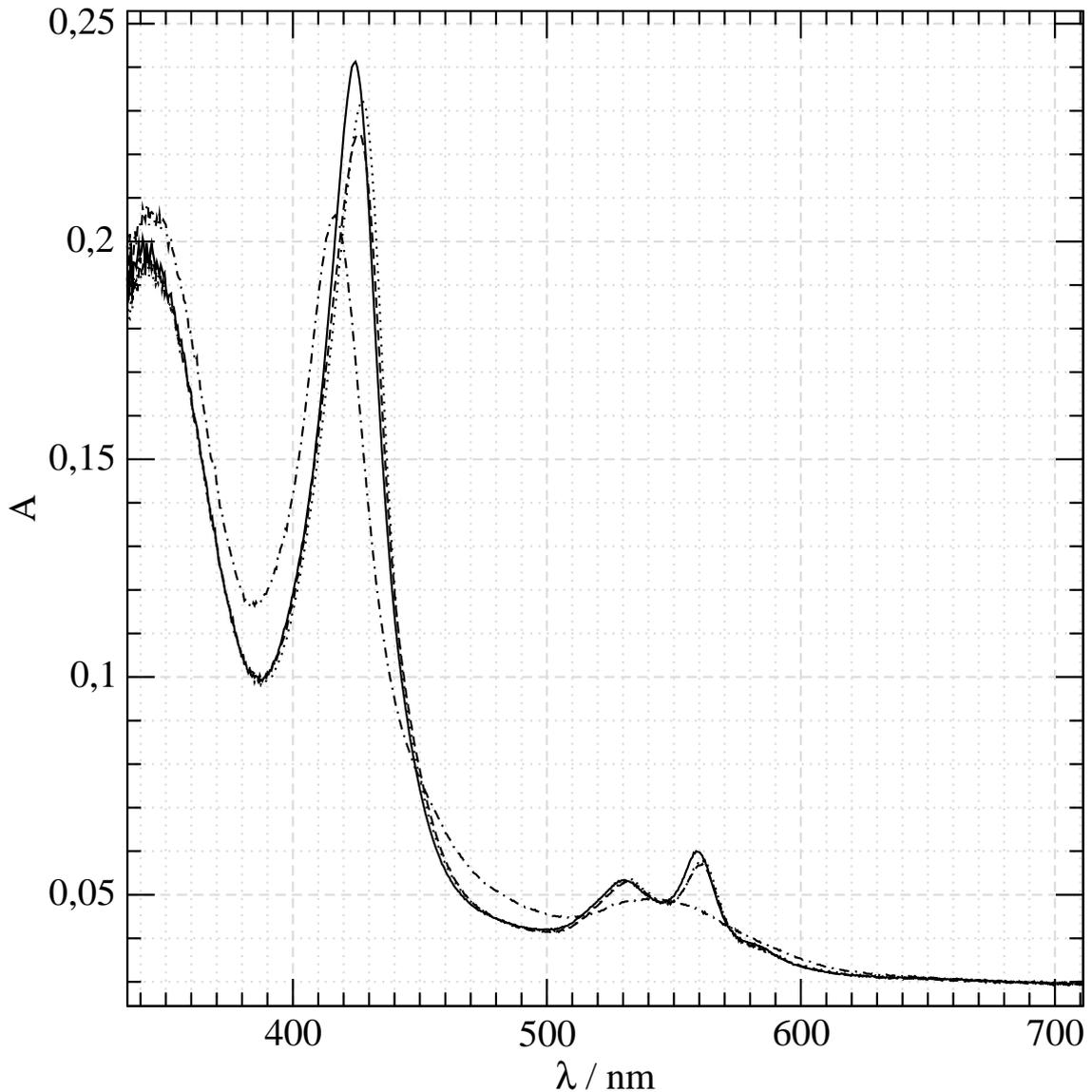


Abb. 48: Spektren des CN-ligandierten Neuroglobins vor und nach Reduktion durch NADH bei unterschiedlichen Zeitpunkten: vor dem Laserblitz (strichpunktiert), 7 ms nach dem Laserblitz (punktiert), 1,6 s nach dem Laserblitz (gestrichelt) und 30 Min. nach dem Laserblitz (durchgezogen). Ngb-CN vor der Reduktion besitzt eine relativ kleine breite Soret-Bande und Q-Bande. Die Fe(II)LS-Spezies nach der Reduktion besitzen eine aufgespaltene Q-Bande und schmälere Banden.

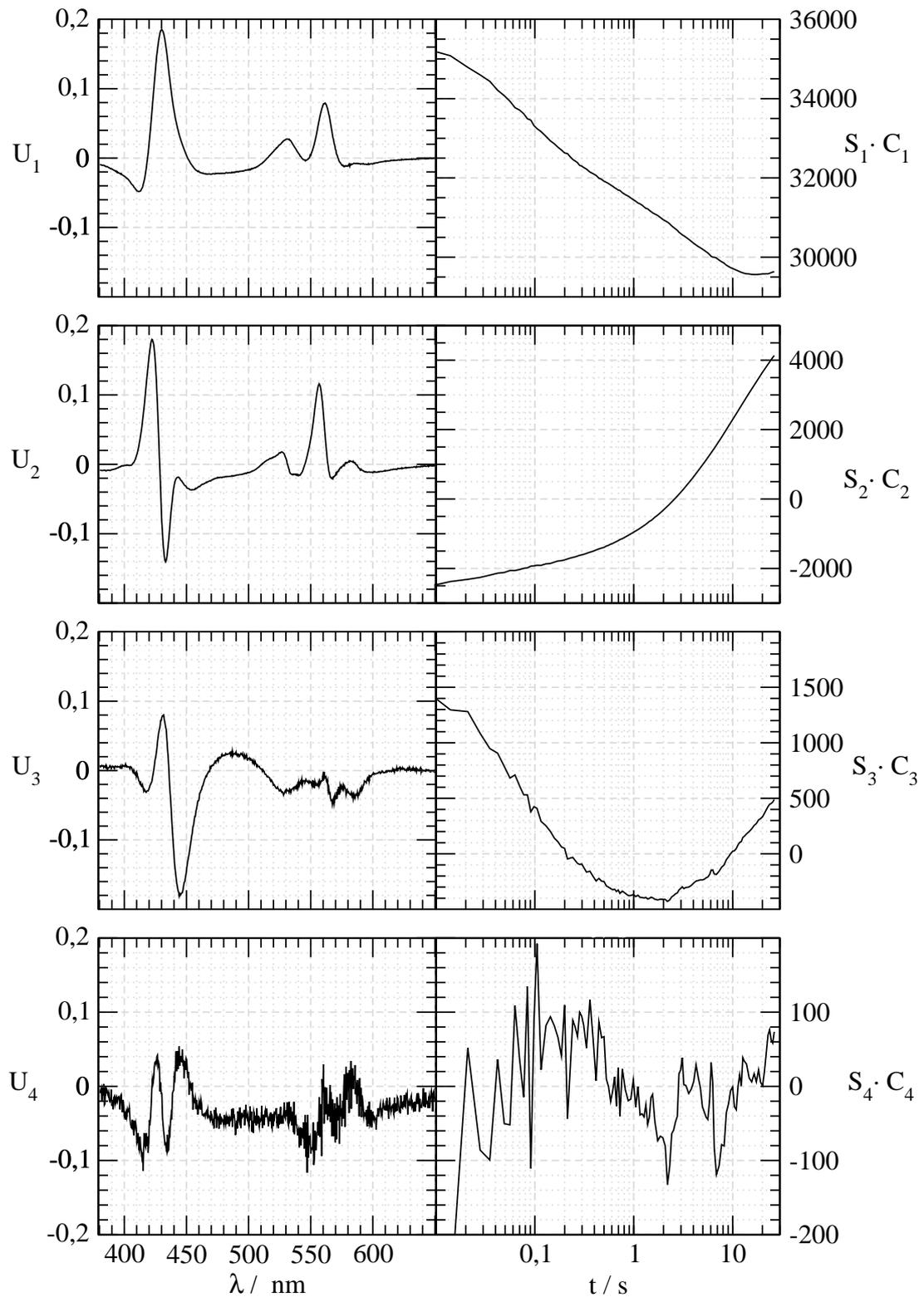


Abb. 49: die vier linken und rechten singulären Vektoren der Messung der Photoreduktion von NgbCN bei 296 K; mit den ersten drei (signifikanten) kann der Zerfall des photoreduzierten NgbCN beschrieben werden

Die optischen Spektren von Cyanid-ligandiertem Neuroglobin nach der Reduktion zeigen nur eine geringe zeitliche Variation (Abb. 48). Das intermediäre Neuroglobin, bei welchem an der sechsten Ligandierungsstelle noch das Cyanid-Ion gebunden ist, ist ebenso ein „low-spin“ wie auch das relaxierte Neuroglobin, bei dem das distale Histidin das Cyanid verdrängt hat. Am deutlichsten sichtbar ist die Blauverschiebung der Absorptionsmaxima hin zu den Peaklagen des reduzierten Neuroglobins mit dem endogenen distalen Histidin als sechstem Liganden.

Die Singulärwertzerlegung der Differenzspektren ergibt 3 nötige Spezies (Abb. 49). Es tritt also neben der kurz nach der Reduktion entstandenen intermediären Spezies und der relaxierten Form noch eine weitere Spezies in Erscheinung. Aufgrund der Bande bei 580 nm kann diese als Oxy-Neuroglobin identifiziert werden (Dewilde, S. et al. 2001).

5.4.2 Berechnung der Zeitkonstanten aus den Messungen an Neuroglobin

Für Messungen bei Zimmertemperatur, bei der die Zerfälle exponentiell angenommen werden können, ist es möglich, eine Transformationsmatrix zu suchen, so dass die Konzentrationsverläufe einem bestimmten Modell entsprechen (Henry, E. R. und Hofrichter, J. 1992):

$$\mathbf{K}(t) \approx \bar{\mathbf{C}} \quad (31)$$

Dabei ist $\mathbf{K}(t)$ die Matrix mit den aus dem Modell folgenden Konzentrationsverläufen.

Dann muß \mathbf{T} dementsprechend bestimmt werden, so dass

$$\Phi^2 = \sum_i s_i^2 \cdot \left| \mathbf{V}_i^\dagger - (\mathbf{T} \cdot \mathbf{K})_i \right|^2 \quad (32)$$

minimiert wird. s_i ist dabei der i -te Singulärwert, \mathbf{V}_i^\dagger der i -te rechte singuläre Vektor und $(\mathbf{T} \cdot \mathbf{K})_i$ die i -te Spalte der Matrix $\mathbf{T} \cdot \mathbf{K}(t)$. i läuft über die Zahl der signifikanten Singulärwerte. In diesem Fall werden die rechten singulären Vektoren also so linearkombiniert, dass ein modellabhängiger zeitlicher Verlauf beschrieben wird.

Durch eine Anpassung der Neuroglobin-Daten mit zwei exponentiellen Zerfällen erhält man die Reaktionsraten aus Abb. 50.

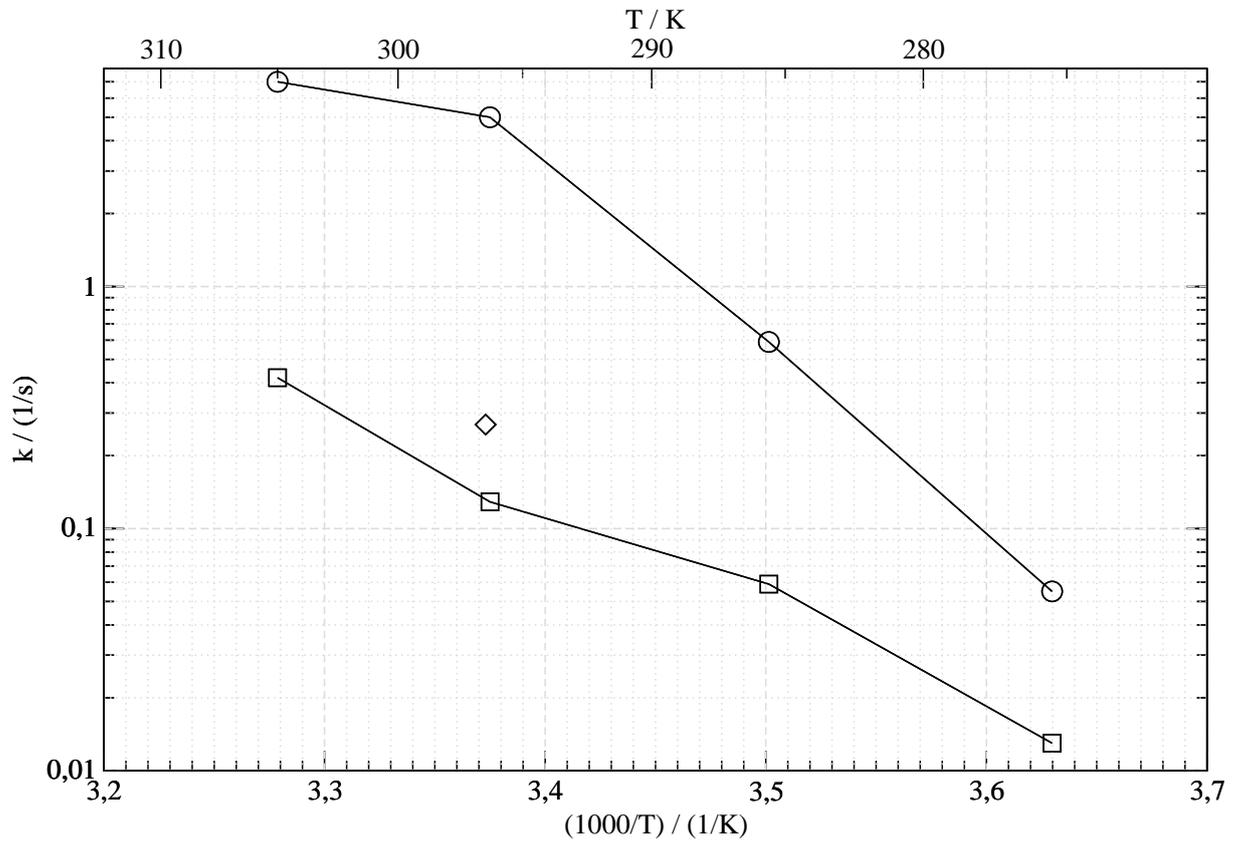


Abb. 50: Zerfallsraten aus der Anpassung der Messungen am intermediären Neuroglobin mit zwei exponentiellen Verläufen (Kreise und Quadrate); als Vergleich ist die mit k_{AB} vergleichbare Rate, mit der der CN-Ligand Myoglobin bei 296,5 K verlässt, als Raute eingezeichnet.

6 Diskussion

6.1 Modellierung der Spektren der Intermediate

Bei der Auswertung der Messungen an Hämoglobin wurde das Spektrum des Intermediats, in dem das Eisen reduziert ist, die Struktur des Proteins aber noch der des Met-Zustandes entspricht, durch Extrapolation aus gemessenen Spektren, in denen das Intermediat nur im Gemisch mit anderen Spezies vorkommt, erhalten. Von vornherein ist dabei nicht klar, ob alle Voraussetzungen für die Anwendbarkeit des durchgeführten „self-modeling“ erfüllt sind. Besonders die Annahme, dass die Relaxation des Intermediates zu ganz frühen Zeiten noch nicht einsetzt, muß unbedingt hinterfragt werden, denn bei den vermessenen Temperaturen um 200 K sind die Prozesse in Proteinen nicht exponentiell und erstrecken sich über sehr große Zeitbereiche. Deshalb wird das modellierte Spektrum mit einem Spektrum des Intermediates verglichen (Abb. 51), welches bei einer sehr tiefen Temperatur aufgenommen wurde, bei der das Intermediat nicht relaxiert und somit direkt gemessen werden kann. Das modellierte Spektrum stimmt dabei nicht völlig mit dem Spektrum des Intermediats bei 20 K überein.

Die beobachtete Differenz in den auf verschiedene Weise erhaltenen Spektren ist jedoch in Einklang mit dem Temperaturverhalten der stabilen Spezies von Häm-Proteinen. So zeigen sowohl Carboxy-Myoglobin als auch Oxy-Myoglobin bei Absenken der Temperatur eine Blauverschiebung und Verschmälerung der Absorptionsbanden sowie eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten des Absorptionsmaximums für die Soret- und die Q-Banden (Leone, M. et al. 1987). Das Temperaturverhalten der Spektren des Intermediates ist damit in Übereinstimmung. Das schärfer Werden der Absorptionslinien bei absinkender Temperatur kann durch die Abnahme der Ankopplung des Wärmebades erklärt werden, welches die Spektren verbreitert (Cupane,

A. et al. 2005). Die Annahmen, die zur Ermittlung des Intermediatspektrums im „self-modeling“ getroffen wurden, sind damit gerechtfertigt.

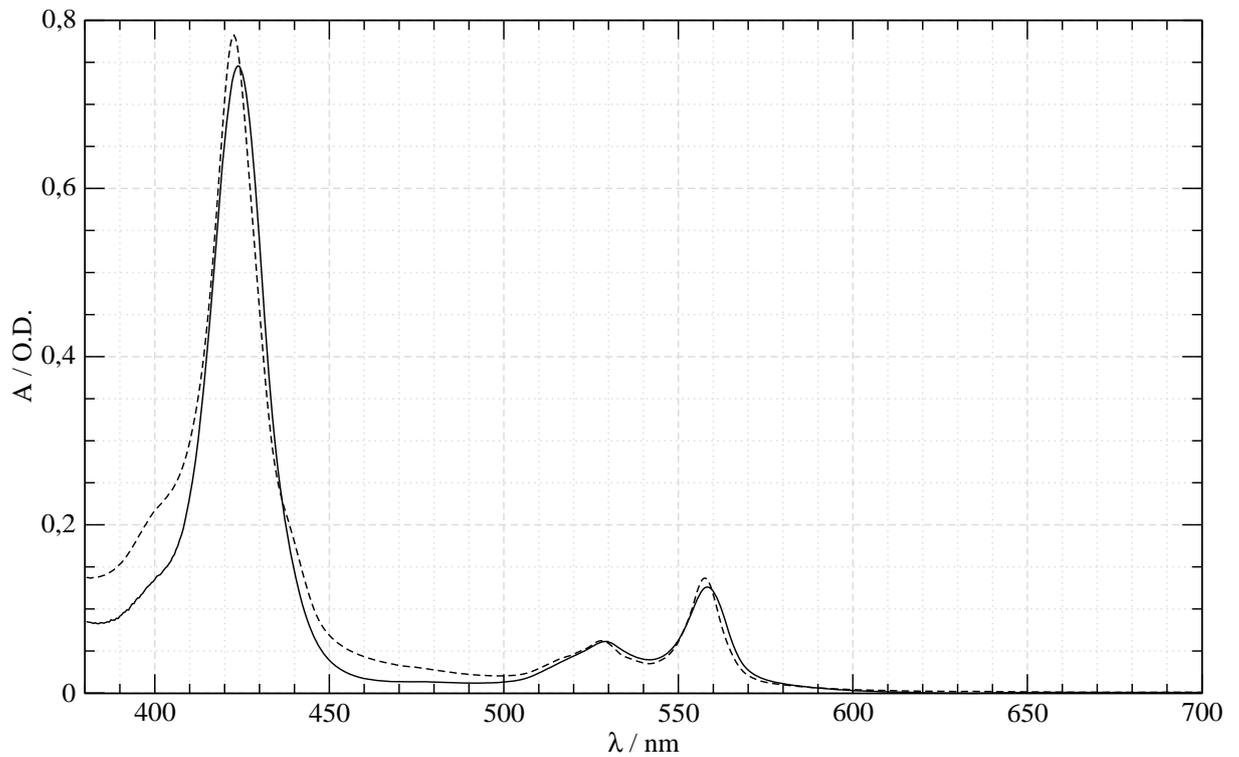


Abb. 51: optische Spektren des durch Photoreduktion aus Met-Hämoglobin erzeugten metastabilen Fe(II)LS Zustandes bei den Temperaturen 20 K (gestrichelt) und 210 K (durchgezogene Linie); die Lage der Maxima ist bei der tieferen Temperatur um ca. 1 nm blauverschoben; aufgrund von Lichtstreuung ist der Untergrund bei 20 K im blauen Spektralbereich erhöht

6.2 Interpretation des Zerfalls des Intermediats

6.2.1 Extrapolation der Tieftemperaturmessungen

Die Zerfallsfunktion des Intermediats läßt sich nicht durch eine einfache Exponentialfunktion beschreiben und wird phänomenologisch oft durch sog. gestreckte Exponentialkurven angepaßt (Abb. 52). Ein Grund hierfür ist die in der Einleitung

genannte Komplexität von Proteinen. Aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt ist die Potentiallandschaft in jedem Molekül der Probe etwas anders.

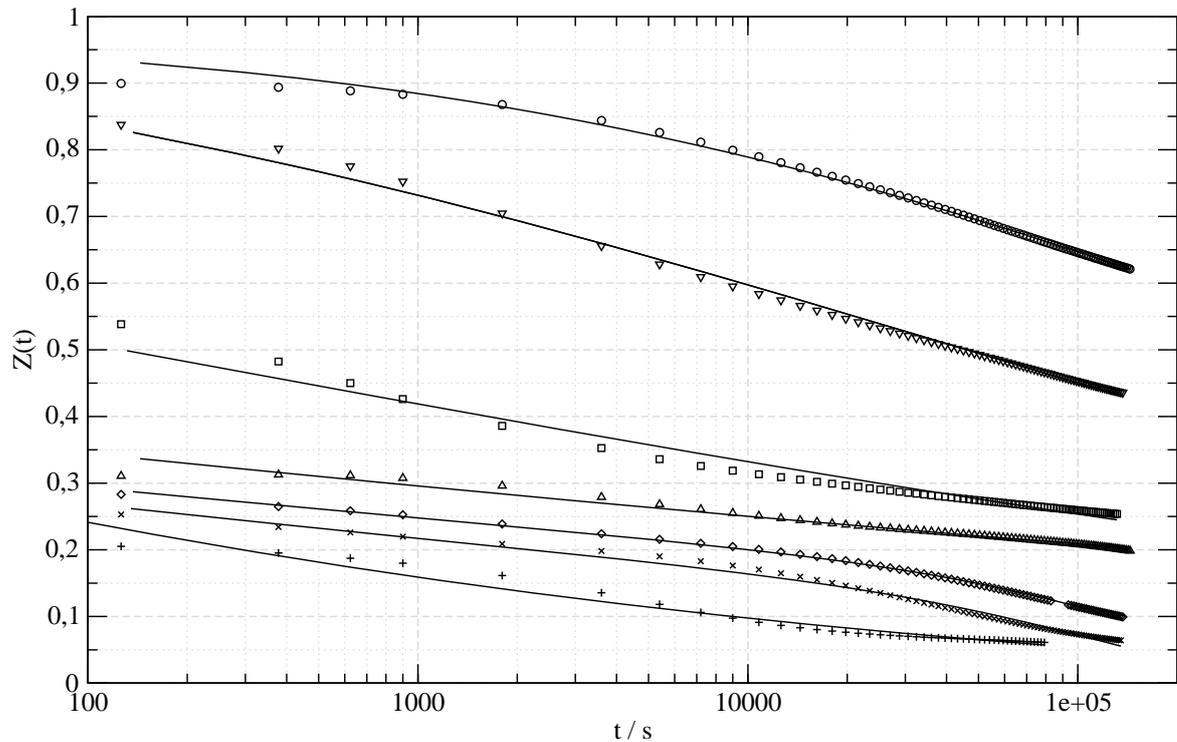


Abb. 52: Entfalteter Zerfall $Z(t)$ der Tieftemperaturmessungen am Protein Pferde-Myoglobin in 50 % Glycerin-Wasser (v/v): Der Zerfall der intermediären Spezies bei den Temperaturen 160 K (Kreise), 165 K (Dreiecke mit Spitze nach unten), 170 K (Quadrate), 175 K (Dreiecke mit Spitze nach oben), 180 K (Rauten), 185 K (Kreuze) und 190 K (Plus-Zeichen) und die jeweilige Anpassung mit zwei gestreckten Exponentialfunktionen (durchgezogene Linien); Entfaltung von Messungen von D. C. Lamb (Lamb, D. C. et al. 1998a)

Unterhalb von 150 K sind die Proteine in Konformationszuständen eingefroren. Die Bewegungen im Protein sind da stark eingeschränkt. Ein Entkommen des Liganden ins Lösungsmittel ist praktisch unmöglich. Je nach Temperatur, bei der man den intermediären Zustand erzeugt, geht allerdings auch schon bei diesen tiefen Temperaturen ein geringer Prozentsatz davon in den „high-spin“-Endzustand über (Parak, F. und Prusakov, V. E. 1994).

Andererseits beobachtet man nach dem Abblitzen des Wasserliganden vom Eisen im Intermediat bei so niedrigen Temperaturen ein vollständiges Rückbinden der abgeblitzten H₂O-Moleküle an die sechste Koordinationsstelle des Häm-Fe (Lamb, D. C. et al. 1998b). Die Rückbindung ist dabei nicht exponentiell. Sie kann mit einer Kinetik angepaßt werden, bei der die Barrierenhöhe in der Arrhenius-Gleichung (9) eine Verteilung aufweist. Diese Resultate zeigen, dass auch die Wassermoleküle wie die in der Einleitung genannten Kohlenmonoxidmoleküle bei ihrer Bewegung durch unterschiedliche Proteinmoleküle verschieden hohe Barrieren zu überwinden haben.

Bei Temperaturen um und über 180 K, bei denen Proteine ihre Struktur ändern können (Einsetzen der Proteindynamik), muß für die Zerfallskinetik auch das dynamische Verhalten der Proteine mit berücksichtigt werden. Extrapolationen der Kinetik mit der bei tiefen Temperaturen mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie gefundenen Barrierenhöhenverteilungen von Myoglobin und Hämoglobin (Croci, S. 2006) zu höheren Temperaturen beschreiben die in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht richtig:

Die Anpassung des in Mößbauer-Untersuchungen gemessenen Zerfalls des Hämoglobin-Intermediates (Croci, S. 2006) erfolgte gemäß der Theorie des Übergangszustandes mit einer verteilten Rate nach Gl. (11). Die Verteilungsfunktion $g(\Delta G^\ddagger)$ wurde durch eine Gaußverteilung mit der Breite σ und der Lage ΔG^\ddagger_{max} dargestellt:

$$g(\Delta G^\ddagger) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\Delta G^\ddagger - \Delta G^\ddagger_{max})^2}{2\sigma^2}} \quad (33)$$

Die Verteilung konnte dort für die verschiedenen tiefen Temperaturen konstant gehalten werden, wobei sich für ΔG^\ddagger_{max} ein Wert von 61 kJ/mol und für σ ein Wert von ca. 4 kJ/mol ergaben.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen über 200 K läßt sich der Zerfall nicht mehr durch eine temperaturunabhängige Barrierenhöhenverteilung beschreiben. Zwar sind die für die Temperatur von 200 K gefundenen Parameter ($\Delta G^\ddagger_{max} = 62,6$ kJ/mol und $\sigma = 4,3$ kJ/mol) noch in Übereinstimmung mit den unterhalb

dieser Temperatur durchgeführten Messungen, da die kleinen Abweichungen sich durch die unterschiedlichen Meßmethoden und die unterschiedliche Reduktion der Probe erklären lassen: Die Reduktion in den optisch vermessenen Proben ist nicht vollständig und zudem abhängig vom Redoxpotential, welches mit der Barrierenhöhe korreliert. Außerdem ist in Croci (2006) der biphasige Zerfall des Hämoglobin-Intermediates (vgl. Abb. 40) nicht berücksichtigt. Allerdings ist es bei höheren Temperaturen nicht mehr möglich, eine temperaturunabhängige Barrierenhöhenverteilung zu erhalten.

Weder die Kinetiken zum Zerfall von Myoglobin noch von Hämoglobin lassen sich bei intermediären Temperaturen mit der bei tiefen Temperaturen gefundenen Barrierenhöhenverteilung beschreiben. Die in diesem Temperaturbereich aus Anpassungen an Gl. (11) und Gl. (33) folgenden Barrierenhöhen wurden mit steigender Temperatur bei beiden Proteinen zu tieferen Energien verschoben. Das unterschiedliche Zerfallsverhalten in den besprochenen Temperaturbereichen zeigt, dass die in Mößbauerabsorptionsexperimenten an der dynamischen Übergangstemperatur beobachtete Änderung der Proteindynamik für Kinetikexperimente berücksichtigt werden muß. Für die Bewegung des Liganden darf die Proteindynamik nicht vernachlässigt werden.

6.2.2 Dissoziation des Liganden im viskosen Medium

Aufgrund ihrer Komplexität werden Dissoziationsprozesse eines Liganden, die im intermediären Temperaturbereich stattfinden, in dem auch Proteinrelaxation vor sich geht, oft durch eine gestreckte Exponentialfunktion phänomenologisch parametrisiert (Kleinert, T. 1997) (Abb. 52):

$$N(t) = N_0 e^{-(k \cdot t)^\beta}, \text{ wobei } 0 < \beta < 1 \quad (34)$$

Abb. 53 zeigt die Dissoziationsraten k_{CS} (Modell aus Abb. 8) für CO aus MbCO bei verschiedenen Temperaturen (Kleinert, T. et al. 1998), nachdem jenes von seinem Bindungsplatz abgeblitzt worden ist, und vergleicht diese mit den Raten k für den

Zerfall des Intermediats Mb(II, ls, w), wenn die Zerfallsfunktionen (Abb. 47) mit einer gestreckten Exponentialfunktion angepaßt werden.

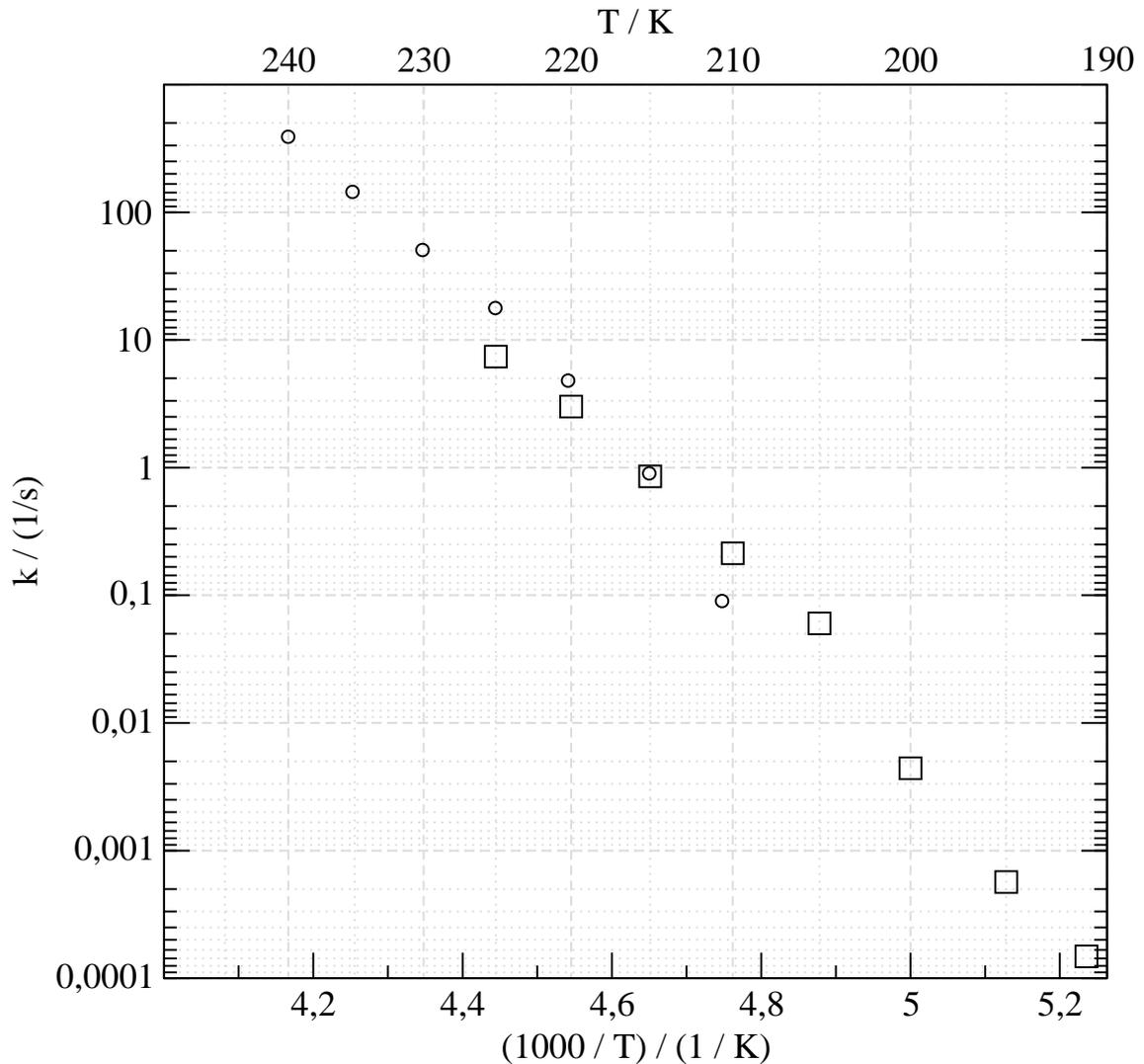


Abb. 53: Arrhenius-Auftragung der Relaxationsraten von Intermediaten von Mb: Zerfall des H₂O-Intermediates (Quadrate), Entkommrate k_{CS} (vgl. Abb. 8) von CO aus dem Innern von Myoglobins ins Lösungsmittel (75 % Glyzerin v/v) (Kreise) (Kleinert, T. et al. 1998).

Die dabei zutage tretende gute Übereinstimmung der beiden verglichenen Raten legt nahe, zunächst derselben Datenauswertung zu folgen, wie es Kleinert tat. Kleinert hat schon darauf hingewiesen, dass die Rate k_{CS} vor allem vom Protein und seiner

Umgebung abhängt und weniger vom Liganden an sich. Die Zerfallsrate des Mb(II, ls, w) soll also zunächst anhand der Kramers-Theorie beschrieben werden.

Gl. (14) wird unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen Reibung γ und Viskosität η nach dem Stokesschen Gesetz zu:

$$k = \frac{k_\eta}{\eta} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad (35)$$

k_η enthält alle konstanten Vorfaktoren und hat die Dimension einer Viskosität pro Zeit.

Das Problem bei der folgenden Auswertung ist die unbekannte Viskosität η , welche sich im Protein vom Wert im Lösungsmittel gravierend unterscheiden kann.

In der Arbeit von Kleinert (1997) ist die Bewegung des Liganden durch ein von Kramers (1940) entworfenes Modell beschrieben, in welchem sich dieser in einem vorgegebenen Potential (Abb. 17) bewegt, wobei die Bewegung durch die viskosen Eigenschaften der Umgebung stark gedämpft wird. Dabei wurde angenommen, dass die Viskosität im Innern des Proteins vernachlässigt werden kann, da sie weitaus kleiner ist als die Viskosität des Lösungsmittels und deshalb das Lösungsmittel die Rate bestimmt (Abb. 55).

η aus:	$k_\eta / (\text{P/s})$	$\Delta H^\ddagger / (\text{kJ/mol})$
Viskosität des Lösungsmittels (gepunktete Linie in Abb. 55)	$1,4 \cdot 10^{11}$	23,3

Tab. 1: Parameter aus der Anpassung von Gl. (35) an die Daten in Abb. 54

Für einen Vergleich mit den Messungen an Carboxy-Myoglobin wurden die Messungen an Mb(II, ls, w) zunächst analog zu Kleinert (1997) ausgewertet und also die Reibung im Innern des Proteins nicht berücksichtigt. Passt man Gl. (11) mit k_η und ΔH^\ddagger als temperaturunabhängige Parameter und den Werten für die Viskosität von 75 %iger

Glyzerinlösung (v/v) (Abb. 55) an die gemessenen Zerfallsraten (Abb. 54) an, so erhält man Tab. 1.

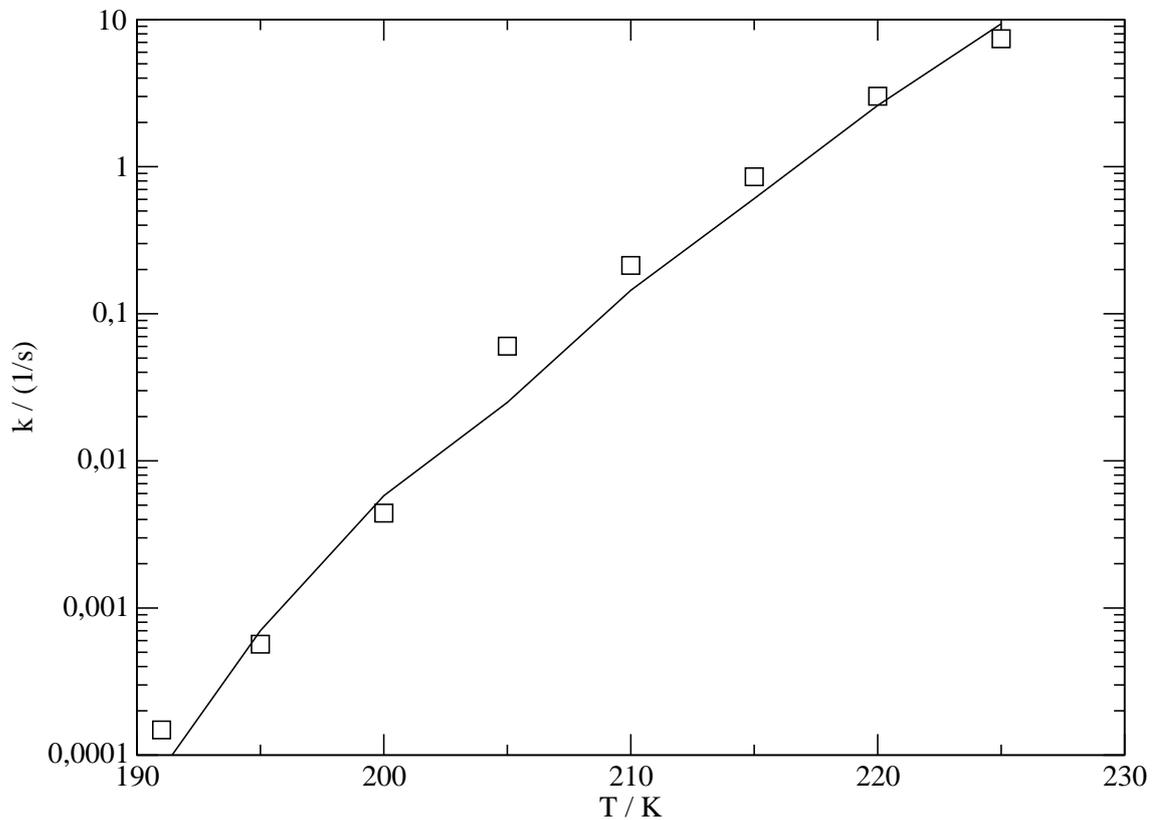


Abb. 54: Anpassung von Gl. (35) (durchgezogene Linie) an die Messung des Zerfalls von Mb(II, ls, w) (Quadrate) mit Viskositäten, die denen des Lösungsmittels (75%ige Glyzerin/Wasser-Mischung v/v) entsprechen

Die erhaltenen Werte für die Enthalpiebarriere von CO und Wasser aus dem Innern des Proteins ins Lösungsmittel stimmen gut überein (beide bei 23 kJ/mol). Diese relativ gute Übereinstimmung für die beiden Liganden läßt vermuten, dass hier vor allem die großräumigen Proteinumlagerungen wichtig sind und nicht die lokalen Bindungskräfte des Liganden an das Eisen, was auch Kleinert et. al. ohne Kenntnis der Wasserdissociationsraten Ende der 1990er Jahre schon folgerten.

Diese Übereinstimmung zwischen den beiden Liganden kann aber auch Zufall sein. Ein Hinweis darauf ist die unveränderte Kinetik in verschiedenen Lösungsmitteln: Während sich die Übergangsrate von Zustand C nach S (Abb. 8) für Kohlenmonoxid in verschiedenen Lösungsmitteln stark unterscheidet, geschieht der Zerfall des Intermediates bei 191 K in 75 %igem (v/v) Glycerin im Rahmen der Meßgenauigkeit genauso schnell wie der Zerfall bei 190 K in 50 %igem Glycerin (v/v) (vgl. hierzu Abb. 57). Diese Übereinstimmung wäre nur erklärbar, wenn sich die Viskosität in der näheren Umgebung um das Protein von der Viskosität im Lösungsmittel unterscheidet und für beide Glycerinkonzentrationen dieselbe wäre, was durch partielle Entmischung des Lösungsmittels hervorgerufen werden kann. Allerdings wurde bei den CO-Dissoziations-Messungen eine partielle Entmischung erst bei 90 %igem Glyzeringehalt evident. Dies deutet also darauf hin, dass der Ligand nicht in das Lösungsmittel dissoziiert, sondern im Proteininneren verbleibt, was schon Engler (Engler, N. 2002) für wahrscheinlich hielt. Da die lokale Fe-Umgebung in diesem Falle wie für Deoxy-Myoglobin fünffache Koordinierung aufwies, wären die optischen Spektren nicht zu unterscheiden.

Dass der Ligand nach der Dissoziation vom Eisen nicht direkt in die Lösungsumgebung verschwindet, wird auch durch Strukturuntersuchungen unterstützt. Bei Deoxy-Myoglobin findet die Röntgenkristallographie auf der distalen Seite der Hämgruppe ein nicht koordiniertes Wassermolekül, das durch eine Wasserstoffbrücke zum distalen Histidin stabilisiert wird (Quillin, M. L. e. a. 1995; Ostermann, A. 2000). Dieses Wasser behindert stark die Bewegung von anderen Liganden in die Häm-Tasche. NMR-Messungen zeigen das Vorhandensein von weiteren, wenig geordneten Wassermolekülen in Myoglobin (Denisov, V. P. und Halle, B). Bei Met-Myoglobin befindet sich neben dem gebundenen Wasser ein weiteres, nicht koordiniertes Wasser in der Häm-Tasche, das vermutlich eine Wasserstoffbrücke zum gebundenen Wasser bildet (Quillin, M. L. et al. 1993).

Da die Viskosität im Innern des Proteins deutlich von der im Lösungsmittel abweicht (Abb. 55), kann die oben gewonnene Information nur eine ganz grobe Näherung sein.

Ein genaueres Einbeziehen der Proteindynamik ist notwendig. Eine gute Beschreibung hierfür ist das Brownsche Oszillatormodell.

6.2.3 Das Brownsche Oszillatormodell und das Modell von Kramers

Der Ligand bewegt sich bei intermediären Temperaturen von ca. 200 K im Inneren des Proteins effektiv durch ein viskoses Medium, das Reibung erzeugt. Diese ist stark von der Temperatur abhängig, wie es die mit Hilfe des Stokesschen Gesetzes aus Mößbauerspektroskopischen Messungen gewonnenen Daten für die Viskositäten im Innern von Proteinen in Abb. 55 zeigen. In derartigen Fällen ist die Absolute Raten Theorie nicht mehr auf eine solche Kinetik anwendbar.

Für den Zerfall des Intermediates ($\text{Fe(II)LS} \rightarrow \text{Fe(II)HS}$) muß nicht nur das Wassermolekül dissoziieren, sondern auch eine Strukturänderung des Proteins stattfinden. Denn ohne Strukturänderung würde, wie in Abblitzexperimenten bei äußerst tiefen Temperaturen, bei denen die Proteinstruktur eingefroren ist, gezeigt, der Ligand nach der Dissoziation wieder zurückbinden. Andererseits wird die Proteinstruktur nicht in die „high-spin“-Struktur übergehen, solange der Ligand am Eisen gebunden ist. Diese beiden Prozesse, Dissoziation des Liganden und Strukturänderung des Proteins, bedingen sich demnach gegenseitig. Insgesamt muß man also einen Übergang des Gesamtsystems über eine Barriere betrachten.

Dies ist ein fundamentaler Unterschied zu den Experimenten, bei welchen der Ligand durch einen kurzen Laserblitz dissoziiert wird, und eventuell vor der Rückbindung stattfindende großräumige Proteinstrukturänderungen darauf folgende Reaktionen darstellen.

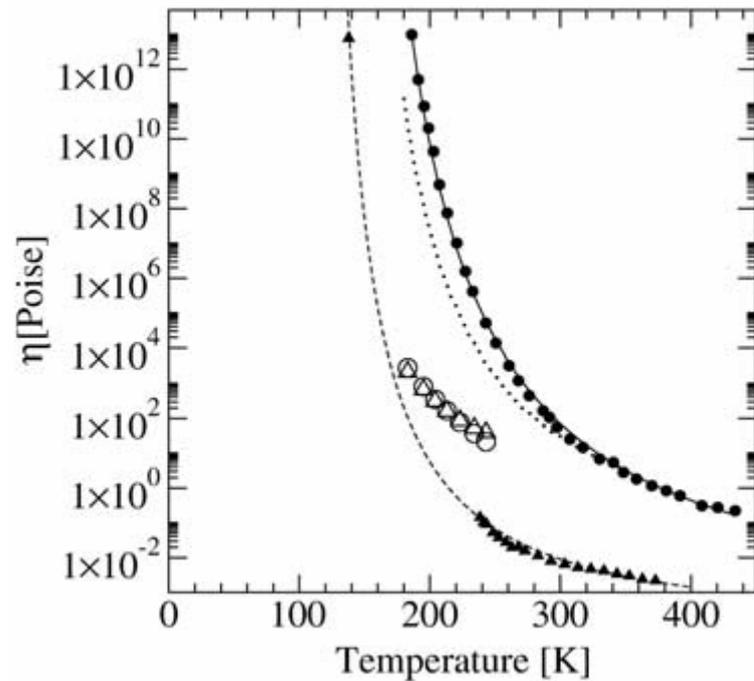


Abb. 55: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der internen Viskosität von MbCO mit der von Lösungsmitteln: Viskosität von purem Glyzerin (gefüllte Kreise) und die daran angepaßte Vogel-Fulcher-Gleichung, einer Glyzerin/Wasser-Mischung (3/1 vol/vol) (punktirierte Linie), reinen Wassers (geschlossene Dreiecke) und die daran angepaßte modifizierte Vogel-Fulcher-Gleichung (gestrichelte Linie), die interne Viskosität in MbCO in Glyzerin/Wasser (offene Kreise) und in MbCO-Kristallen (offene Dreiecke) (Huenges, A. et al. 2002)

Der Übergang $\text{Fe(II)LS} \rightarrow \text{Fe(II)HS}$ geschieht in einem viskosen Medium und ist durch das Kramersche Gesetz (vgl. Gl. (12) und (14)) beschreibbar. Dieses Gesetz wurde von Kramers zwar für eine eindimensionale Fragestellung gelöst, während in Proteinen Trajektorien im multidimensionalen Konformationsraum vorherrschen. So wäre eigentlich die multidimensionale Generalisierung von Langer (1969) anzuwenden. Berezhkovskii et. al. (2005) konnten jedoch zeigen, dass das Problem auf eine eindimensionale Reaktionskoordinate reduziert werden kann, wenn die folgenden zwei Bedingungen erfüllt sind: (1) Reaktant und Produkt sind durch einen einzigen hohen Sattelpunkt getrennt. (2) Die Rate ist durch die Diffusion des Systems über diese Sattelregion bestimmt. Die Gültigkeit vor allem der ersten Voraussetzung ist zwar für

Proteine aufgrund ihrer Komplexität fraglich, wird aber dennoch in dieser Arbeit aus Gründen der Einfachheit angenommen, da die Trajektorien des Systems nicht bekannt sind.

Das Problem bei der folgenden Diskussion sind die unbekanntenen Werte für die Parameter (vgl. Abb. 17) ω_0 , ω_b und γ und damit α in Gl. (14). Letzterer kann durch einen Vergleich mit dem Brownschen Oszillatormodell erhalten werden.

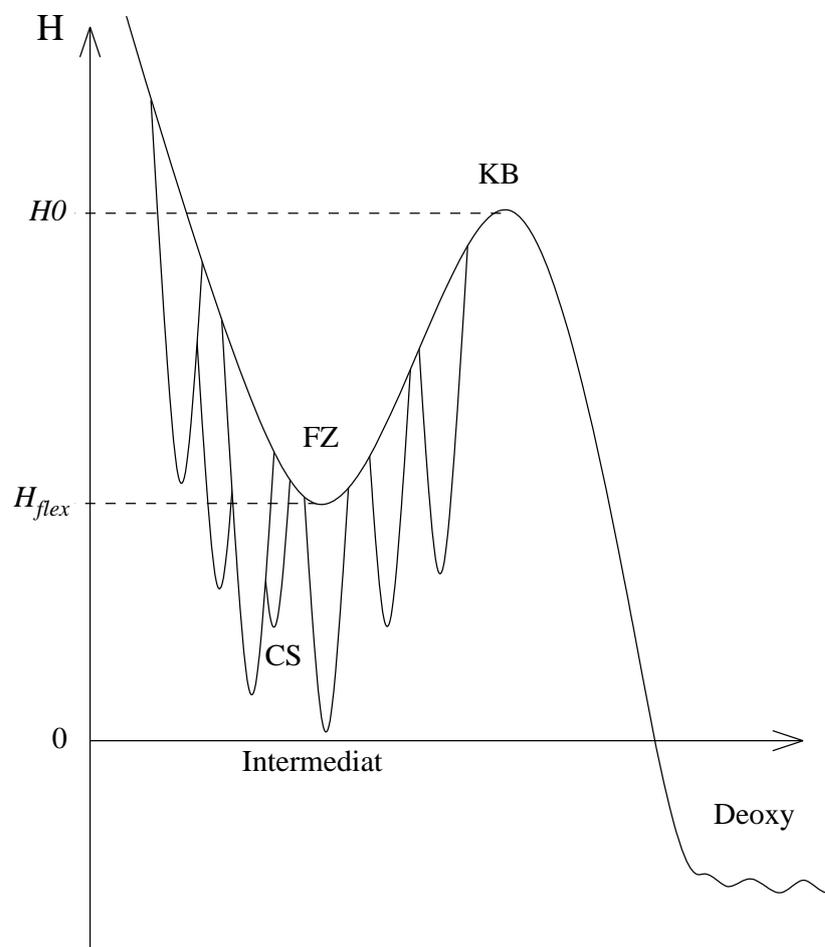


Abb. 56: Potentiallandschaft (Enthalpie H) für das Protein bei der Relaxation vom intermediären Zustand in den Deoxy-Endzustand. Die für die untersuchte Kinetik wichtigen, mit Kürzeln bezeichneten Zustände sind: Konformationssubzustände (CS), flexibler Zustand (FZ) und Kramers-Barriere (KB) mit einer Enthalpiedifferenz (H_0).

Der erweiterte Brownsche Oszillator ist ein geeignetes einfaches Modell, welches die Proteindynamik beschreibt und mit der Kramers-Theorie (Beschreibung der Diffusion über eine Barriere) verknüpft wird, um ein komplettes Bild für die ablaufenden Prozesse zu erhalten (Abb. 56).

Für den Übergang von Fe(II)LS (Intermediat) nach Fe(II)HS (Deoxy), muß das System über die Kramers-Barriere (H_0) gelangen. Die Konformationsänderung eines Proteins geschieht in einem diffusiven Prozeß und wird durch Reibung gebremst. Die Reibung ist von der Wahrscheinlichkeit, das Protein im flexiblen Zustand (FZ) anzutreffen, abhängig. Für Proteine in einem Konformationszustand wird die interne Viskosität als unendlich groß angenommen, während sie für Proteine im flexiblen Zustand konstant und von der Temperatur unabhängig ist. Bei Änderung der Temperatur wird nur die Wahrscheinlichkeit p_t , das Protein im flexiblen Zustand anzutreffen (vgl. Gl. (16)), variiert, so dass die effektive Viskosität temperaturabhängig wird.

Die Rate k in Gl. (14) für den Kramers-Übergang wird damit zu:

$$k = p_t \cdot k_{t0} = p_t \cdot \frac{\alpha}{2\pi} \exp \left(-\frac{H_0 - H_{flex} - S \cdot T}{R \cdot T} \right) \quad (36)$$

Darin sind außerdem die Parameter k_{t0} für die Übergangsrate in einem Protein im flexiblen Zustand, $(H_0 - H_{flex})$ für die Höhe der Kramers-Barriere, H_{flex} für die Tiefe der Konformationszustände und S für die Differenz der Enthalpien zwischen dem aktivierten Zustand (KB) und dem flexiblen Zustand (FZ).

Die Dissoziation ist nicht-exponentiell, da die Übergangsrate eine Verteilung aufweist: Zum einen haben die Wahrscheinlichkeiten p_t eine Verteilung, welche aus der Maxwellverteilung $maxwT(G_{flex})$ der Tiefe der Konformationszustände folgt:

$$maxwT(G_{flex}) \sim \sqrt{\frac{G_{flex}}{\pi(RT)^3}} \exp \left(-\frac{G_{flex}}{RT} \right) \quad (37)$$

Diese Verteilung in G_{flex} führt dazu, dass sich die effektive Viskosität von Molekül zu Molekül in der Probe unterscheidet.

Zum anderen ist es auch bei Temperaturen um und unter der dynamischen Übergangstemperatur nötig, der Kramers-Barriere eine Verteilung $g(H)$ zuzuweisen, welche als Gaußförmig angenommen wird:

$$g(H) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (38)$$

Der neu eingeführte Parameter σ bedeutet dabei die Breite der Verteilung. Die Probe ist also auch in Bezug auf die Höhe der Kramers-Barriere inhomogen.

Insgesamt ergibt sich in diesem Bild eine von der Proteindynamik abhängige Kinetik des Zerfalls des Intermediates. Die Anpassung dieses Modells an die Zerfallskurven, die aus den Messungen mit der optischen Spektroskopie errechnet wurden, ist für Myoglobin in Abb. 57 bis Abb. 61 und für Hämoglobin in Abb. 62 bis Abb. 64 dargestellt. Dabei wurde angenommen, dass der Parameter α von derselben Größenordnung ist, wie ihn die Anpassung der Messung der mittleren quadratischen Auslenkung von Eisen in der Mößbauerspektroskopie an das Modell des Brownschen Oszillators liefert. Da aber die Parameter α und S in Gl. (36) nicht unabhängig voneinander sind, muss einer der beiden Parameter festgesetzt werden. So wurde α der Wert von $6,64 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, der für kristalline Proben gilt, zugewiesen. Ist also α um den Faktor e^n falsch (z. B. weil α im verwendeten glyzerinhaltigen Lösungsmittel um den Faktor $e^{1,14}$ größer ist) angesetzt worden, ändert sich die errechnete Entropiedifferenz S um den additiven Wert nR (in Glycerin/Wasser muß zu den errechneten Werten von S also $9,47 \text{ J/mol/K}$ hinzu addiert werden).

Um die Messung für den Zerfall des Mb(II, ls, w) bei den Temperaturen 180 K und 184,8 K beschreiben zu können, war außer einer Verteilung in der Tiefe der Konformationssubzustände auch eine Verteilung in der Höhe der Kramers-Barriere nötig (vgl. Tab. 4). Hier sind die optisch gemessenen Zerfallsverläufe in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Mößbauerspektroskopischen Untersuchungen, bei denen auch eine verteilte Kramers-Barriere zur Erklärung der Daten benötigt wurde. Erst bei Temperaturen über 190 K ist die Proteindynamik so schnell, dass die Kramers-Barriere für alle Moleküle gleich erscheint (Bewegungsverschmälerung).

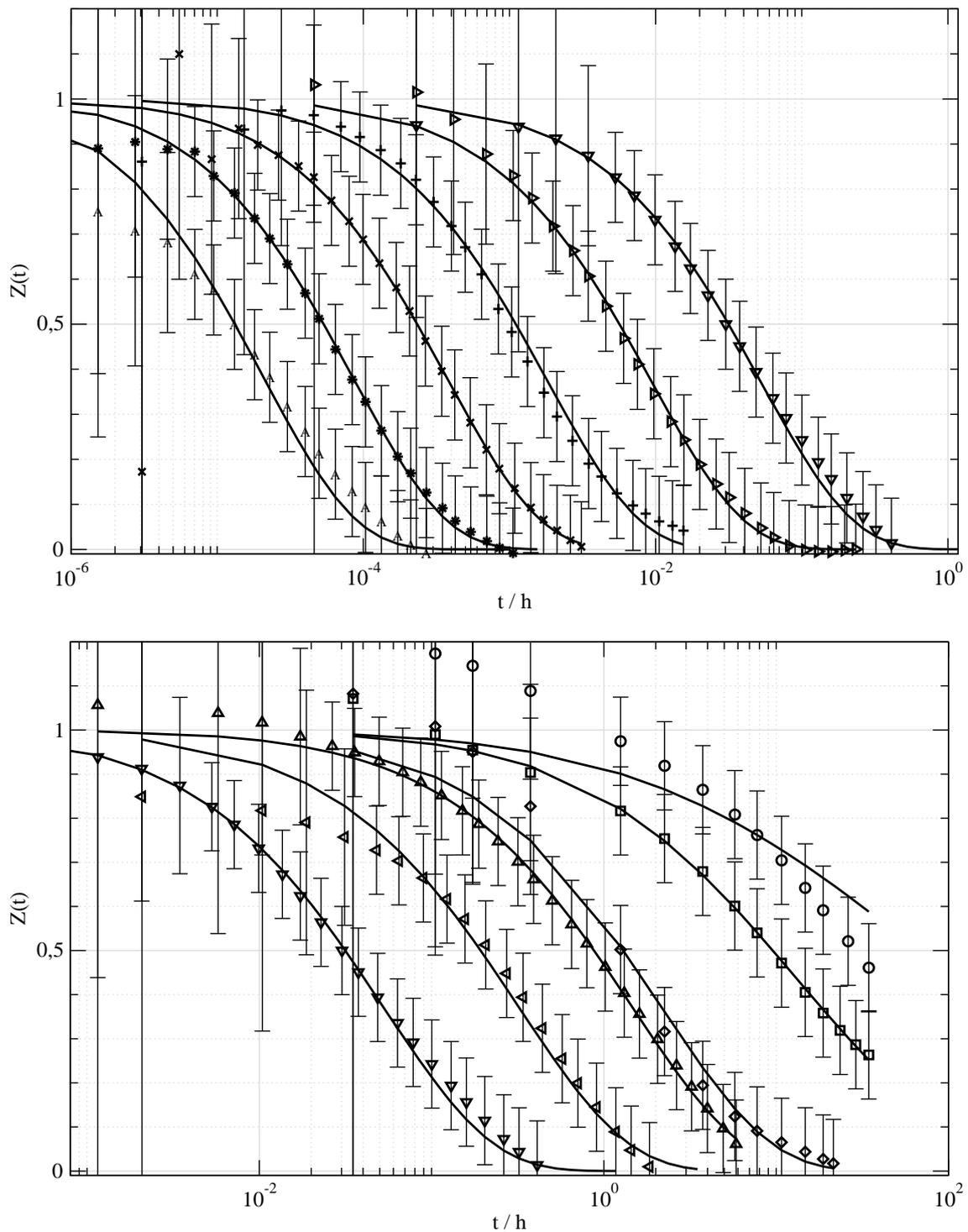


Abb. 57: Anpassung des Zerfalls des nach Reduktion entstandenen intermediären Zustandes von Myoglobin mit Hilfe des Kramers-Modells für die Temperaturen 180 K (Kreise), 185 K (Quadrate), 190 K (Rauten), 191 K (Dreiecke, Spitze oben), 195 K (Dreiecke, Spitze links), 200 K (Dreiecke, Spitze unten), 205 K (Dreiecke, Spitze rechts), 210 K (Pluszeichen), 215 K (Kreuze), 220 K (Sternchen) und 225 K (A-Zeichen) auf 1 hochnormiert mit Untergrundkorrektur. Der Glycerin-Anteil war von 180 K bis 190 K 50 %.

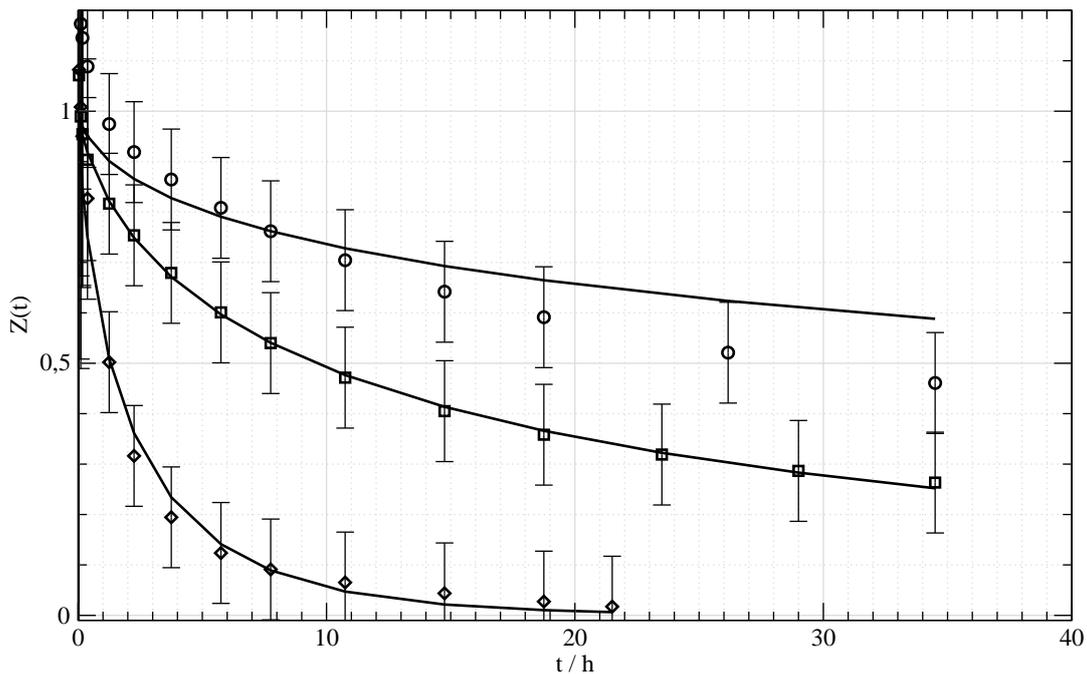


Abb. 58: lineare Auftragung der Anpassung des Modells (durchgezogene Linien) an die normierte, untergrundkorrigierte Zerfallskurve des Myoglobin-Intermediates Mb(II, ls, w) bei den Temperaturen 180 K (Kreise), 184,8 K (Quadrate) und 190 K (Rauten) in 50 %igem Glycerin

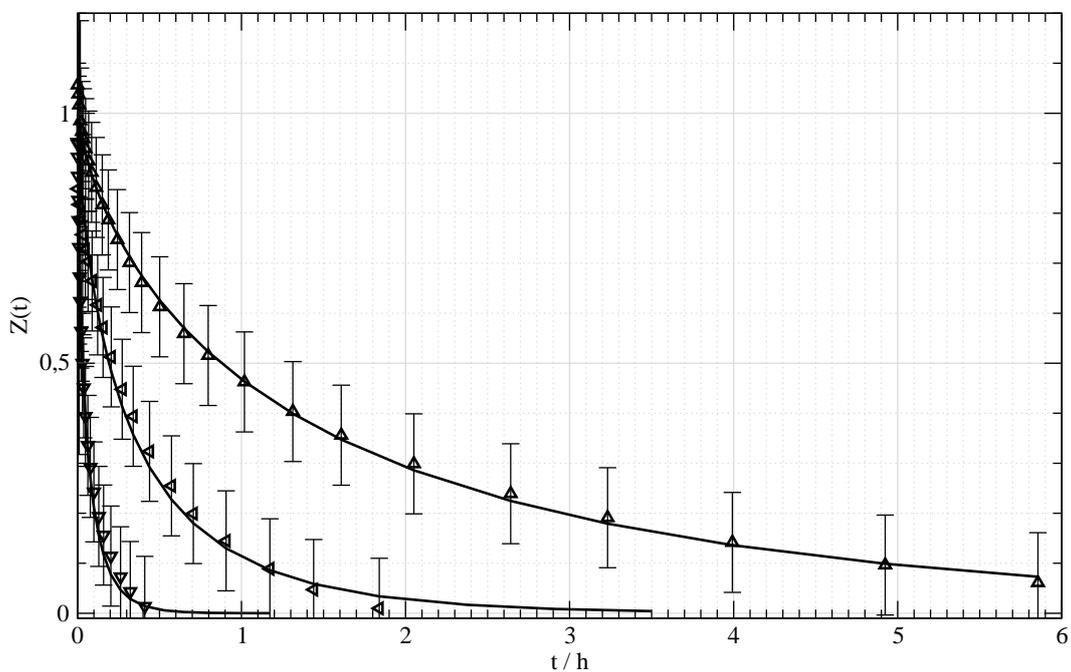


Abb. 59: lineare Auftragung der Anpassung des Modells (durchgezogene Linien) an die normierte, untergrundkorrigierte Zerfallskurve des Myoglobin-Intermediates Mb(II, ls, w) bei den Temperaturen 191 K (Dreiecke, Spitze nach oben), 195 K (Dreiecke, Spitze nach links) und 200 K (Dreiecke, Spitze nach unten) in 75 % Glycerin

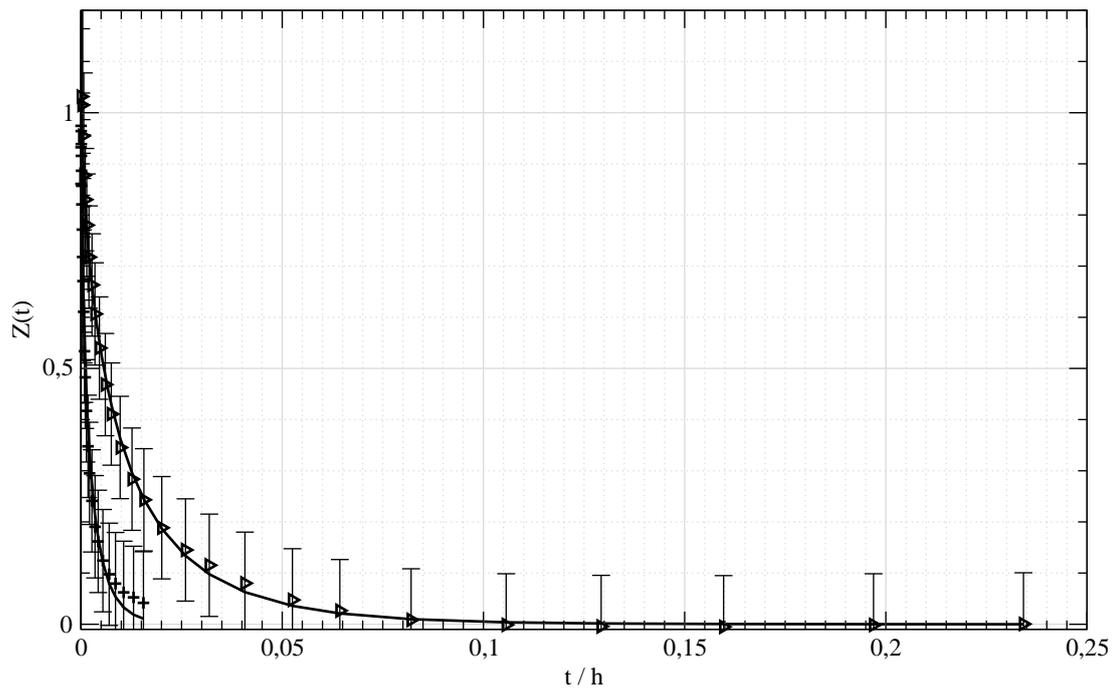


Abb. 60: lineare Auftragung der Anpassung des Modells (durchgezogene Linien) an die normierte untergrundkorrigierte Zerfallskurve des Myoglobin-Intermediates Mb(II, ls, w) bei den Temperaturen 205 K (Dreiecke, Spitze nach rechts) und 210 K (Pluszeichen) in 75 % Glyzerin

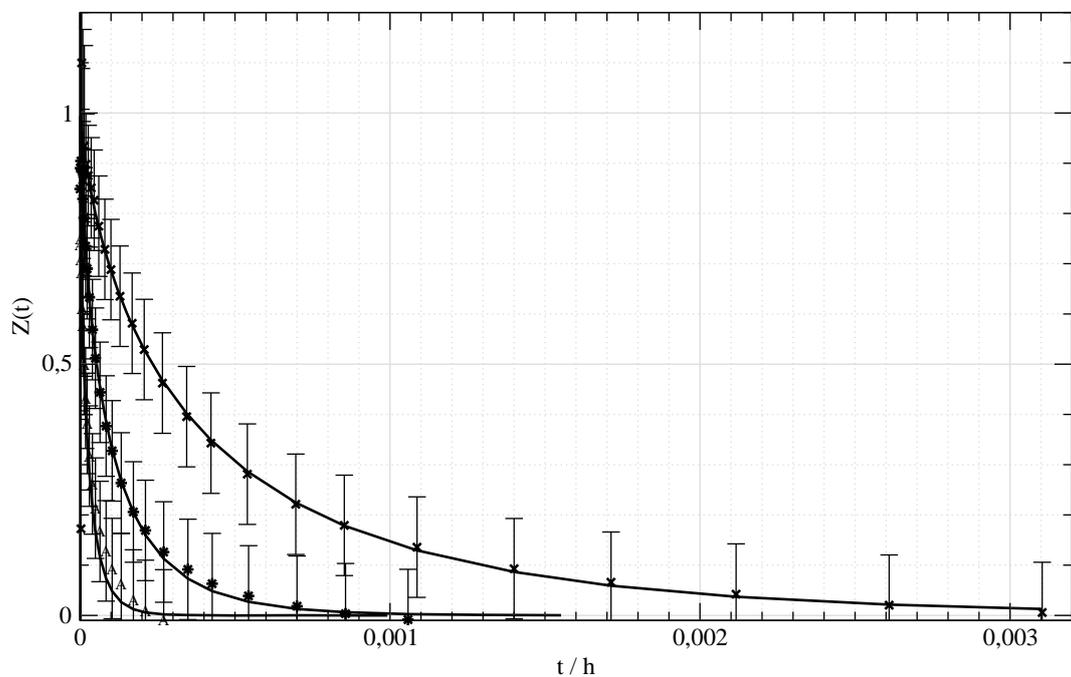


Abb. 61: lineare Auftragung der Anpassung des Modells (durchgezogene Linien) an die normierte untergrundkorrigierte Zerfallskurve des Myoglobin-Intermediates Mb(II, ls, w) bei den Temperaturen 215 K (Kreuze), 220 K (Sternchen) und 225 K (A) in 75 % Glyzerin

Sowohl für Myoglobin als auch für Hämoglobin ergeben sich übereinstimmend in diesem Bild relativ große Barrierenhöhen H_0 von ca. 120 kJ/mol und Entropiedifferenzen von ca. 260 J/mol/K (vgl. Anhang C). Die Enthalpiedifferenz zwischen Kramers-Barriere und flexiblem Zustand beträgt also ca. 85 kJ/mol. Bei der Barrierenhöhe geht sowohl die Energie für die Brechung der Bindung des Liganden zum Eisen ein, als auch die Energie, die das Protein benötigt, um die schwachen Bindungen zu brechen und flexibel zu sein. Die hohe Entropiedifferenz kann so erklärt werden, dass der Ligand im Proteininneren nach dem Brechen der Bindung eine große Freiheit besitzt, da er sich ja nun unspezifisch gebunden im Protein aufhalten kann und dort auch mehrere freie Räume existieren (z. B. Xenon-Löcher). Deshalb sind beide Aktivierungsparameter deutlich höher als für $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ mit $\Delta H^\ddagger = 41,4$ kJ/mol und $\Delta S^\ddagger = 21,2$ J/mol/K (Helm, L. und A.E., M. 1999).

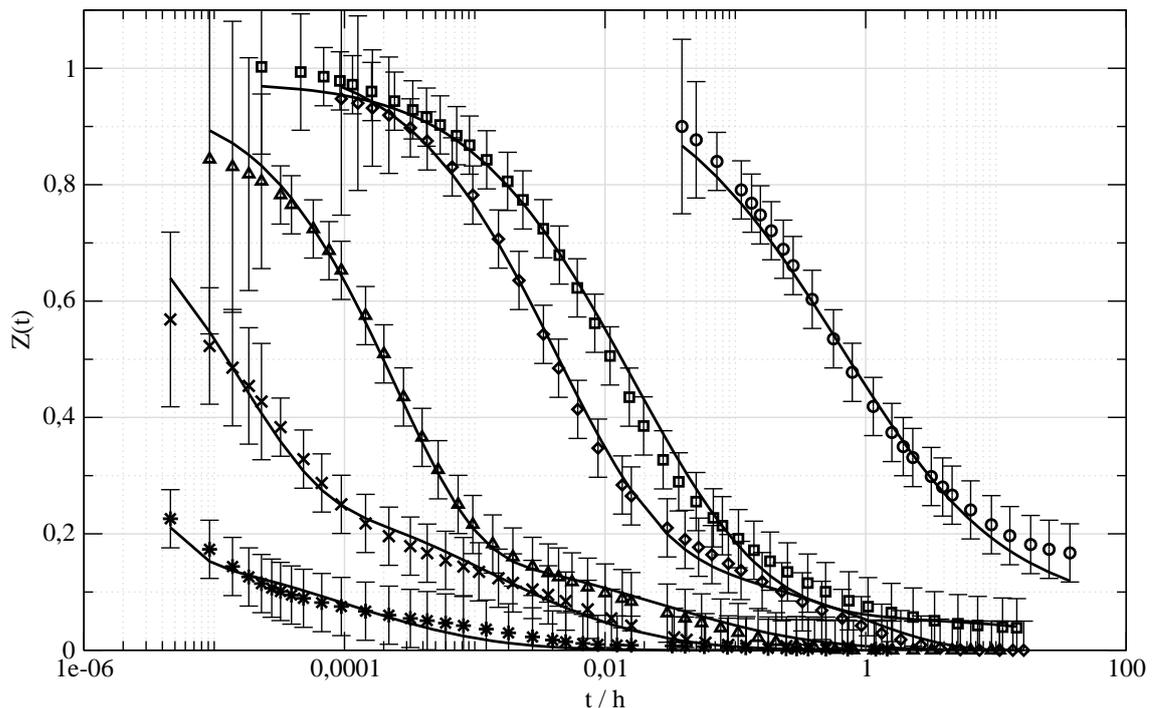


Abb. 62: Anpassung des Zerfalls des Intermediates von Hämoglobin bei den Temperaturen 200 K (Kreise), 210,5 K (Quadrate), 215 K (Rauten), 225 K (Dreiecke), 235 K (Kreuze) und 245 K (Sternchen).

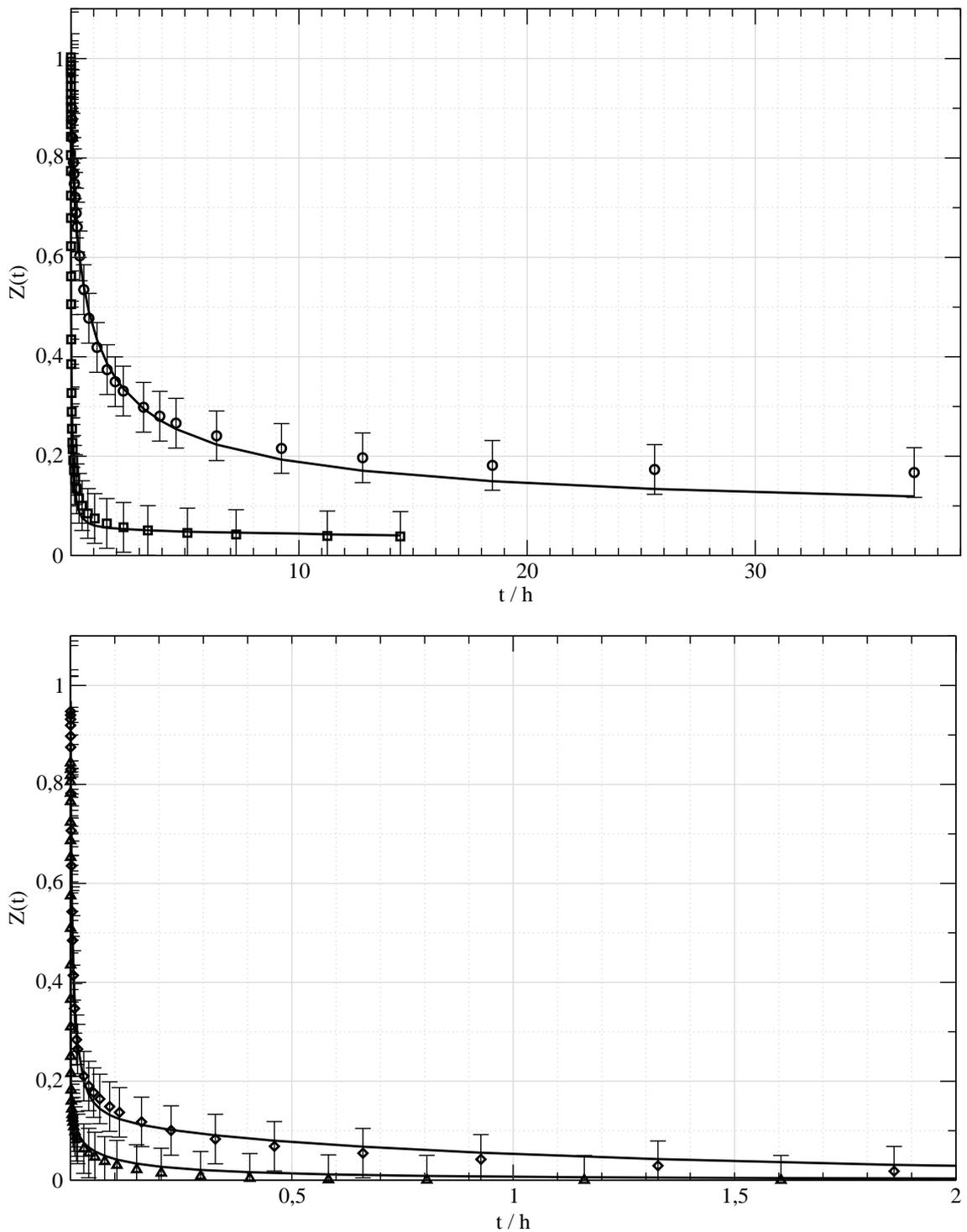


Abb. 63: Anpassung des Zerfalls des Intermediates von Hämoglobin Hb(II, ls, w) bei den Temperaturen 200 K (Kreise), 210,5 K (Quadrate), 215 K (Rauten) und 225 K (Dreiecke) im linearen Maßstab

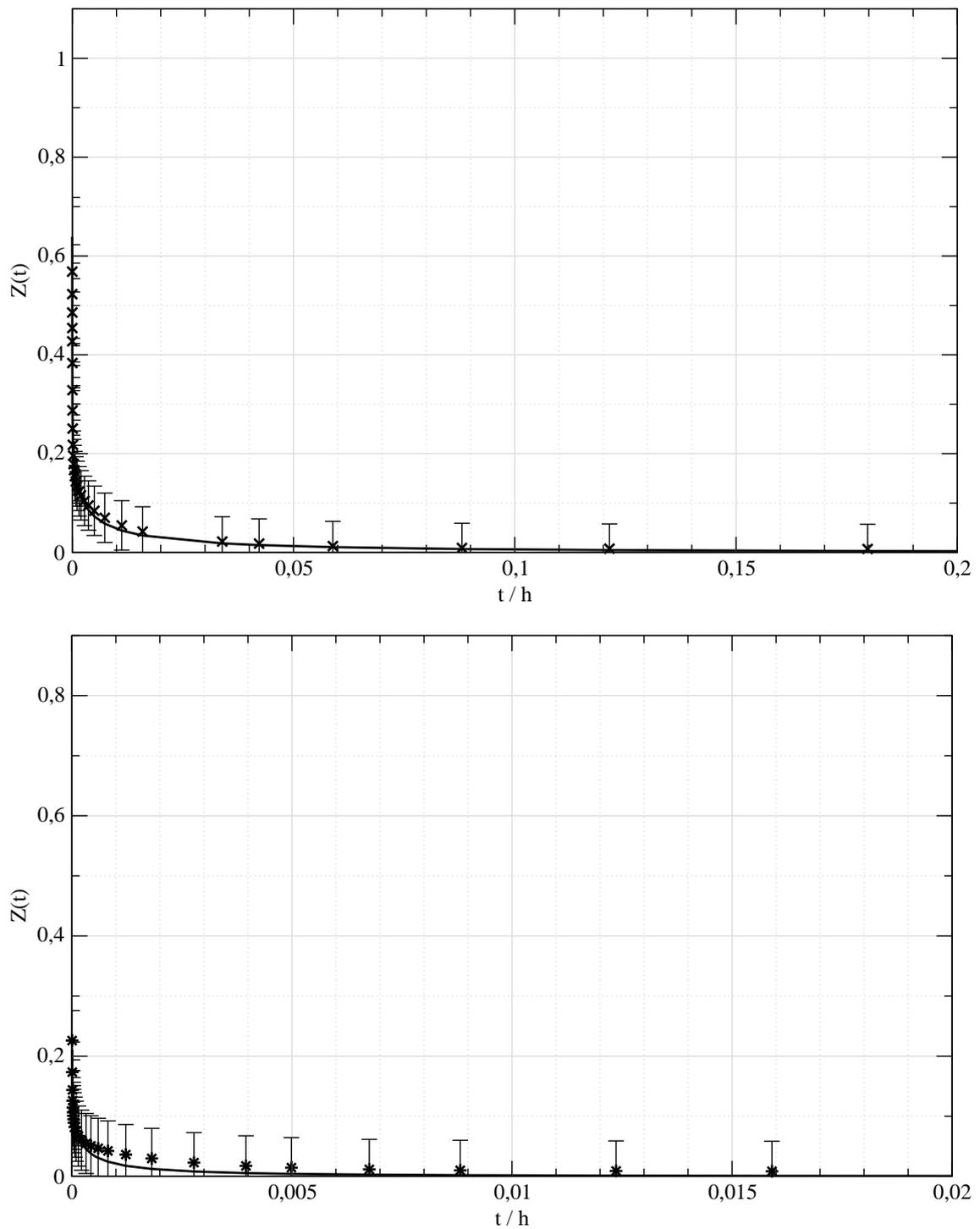


Abb. 64: Anpassung des Zerfalls des Intermediates von Hämoglobin Hb(II, ls, w) bei den Temperaturen 235 K (Kreuze) und 245 K (Sternchen) im linearen Maßstab

Für Hämoglobin wurden aufgrund des biphasigen Zerfalls (Abb. 40) zwei Kramers-Barrieren angenommen ($H0$ und $H0b$), die jeweils gaußverbreitert sind. Für beide Phasen wurde jedoch mit derselben Entropiedifferenz gerechnet.

Der zweiphasige Zerfall von Hämoglobin kann von verschiedenen Strukturhierarchien herrühren. Schon bei der IR-Spektroskopie an CO-Myoglobin fiel die Grobaufteilung des Proteinensembles in mehrere Konformationen auf (Ansari, A. et al. 1987). Mikroskopisch kann diese bei Hämoglobin in der unterschiedlichen Protonierung des distalen Histidins begründet sein, zu welchem der Wasser-Ligand eine Wasserstoffbrückenbindung aufbauen kann. Diese Bindung vergrößert die Enthalpiedifferenz, welche bei der Dissoziation aufgebracht werden muß. Die unterschiedlichen Subpopulationen machen sich dann in der Kinetik des Hämoglobins durch einen zweiphasigen Zerfall bemerkbar.

Die große Breite der Verteilung in der zweiten etwas höheren Kramers-Barriere, ist ein Indiz für eine große Inhomogenität in der Probe, die durch Änderungen der Proteinstruktur (Quartärstruktur) nach der Dissoziation des Liganden erklärt werden kann (Crocì, S. et al. 2002). Diese Inhomogenität ist bei einem Tetrapeptid und nur ca. 50 %iger Reduktion zu erwarten. In der Probe können von einigen Proteinen alle vier Häm-Eisen reduziert werden, von anderen dagegen nur drei, zwei oder auch keines.

Es ist noch anzumerken, dass bei Anpassungen des Modells an die Zerfallsfunktionen deutlich niedrigere Werte für die Enthalpiedifferenz und die Entropiedifferenz der Kramers-Barriere erhalten werden, wenn die Temperaturen oberhalb von 200 K vernachlässigt werden. Bei Myoglobin ergibt sich $\Delta H^\ddagger = 73,4$ kJ/mol und $\Delta S^\ddagger = 28,1$ J/mol/K, wenn für die Anpassung nur die Zerfälle von 180 – 195 K berücksichtigt werden. Diese Variation ist in Übereinstimmung mit den Anpassungen des Modells an die mit Mößbauerspektroskopie gemessenen Zerfallsfunktionen des Intermediats von Pferdeherz-Myoglobin ($\Delta H^\ddagger = 8$ kJ/mol und $\Delta S^\ddagger = -80,7$ J/mol/K) (Parak, F. G. et al. 2007). In diesem unteren vermessenen Temperaturbereich weist auch die Kramers-Barriere eine größere Verteilung auf. Die dortige Verminderung der Proteindynamik senkt also die Aktivierungsparameter ab.

6.3 Das Intermediat des Neuroglobins

Aus der Auswertung des Verlaufs der zeitaufgelösten Spektren von Neuroglobin-Cyanid nach der Reduktion durch den Laserblitz ergeben sich zwei Zerfallszeiten (Abb. 50). Da das dritte Basisspektrum nur einen sehr geringen Anteil an den Meßspektren besitzt, ist es schwierig den Ursprung dieser dritten Spezies zuzuordnen. Da bei der Oxigenierung ein ähnliches Spektrum zu sehen war, wird zur Erklärung des hier erörterten zeitlichen Verlaufs das Trap-Modell (Abb. 65) angewandt.

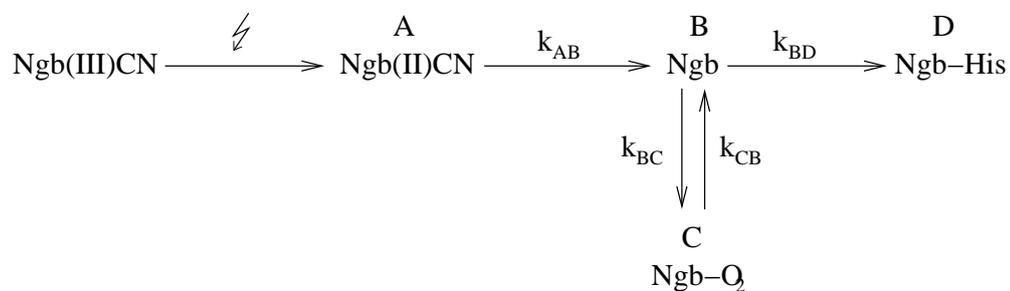


Abb. 65: Schema des Zerfalls des metastabilen reduzierten Neuroglobincyanids (Ngb(II)CN); nach der Dissoziation von Cyanid bildet sich ein nur fünffach ligandiertes Neuroglobin (Ngb), welches mit extrem hohen Raten Sauerstoff im bzw. das distale Histidin bindet. Durch Reduktion wird der Sauerstoff im Laufe der Messung aus der Lösung entfernt, so dass der endgültige Zustand das durch das distale Histidin ligandierete Neuroglobin (Ngb-His) ist.

Die zwei die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmenden, langsamen Raten sind dabei k_{AB} und k_{CB} , während hingegen k_{BC} und k_{BD} sehr schnell sind: Neuroglobin kann sich in der Lösung befindenden molekularen Sauerstoff mit einer extrem hohen Rate k_{BC} binden. Die bimolekulare Assoziationsrate beträgt $130\text{-}250 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Dewilde, S. et al. 2001; Trent III, J. T. et al. 2001) und ist damit zehn mal höher als in Myoglobin. Die Assoziationsrate für den internen Liganden Histidin k_{BD} ist mit 2000s^{-1} auch sehr hoch. Aufgrund der kleinen Bildungsrate des fünffach ligandierten Neuroglobins (B in Abb. 65) kann dieses nicht gesehen werden. Nachdem der Sauerstoff in der Lösung

verbraucht ist, geschieht die Dissoziation des CN (Quadrate in Abb. 50) fast genauso schnell wie in Myoglobin (Raute in Abb. 50).

Literatur

- Ansari, A., Berendzen, J., Braunstein, D., Cowen, B. R., Frauenfelder, H., Hong, M. K., Iben, I. E. T., Johnson, J. B., Ormos, P., Sauke, T. B., Scholl, R., Schulte, A., Steinbach, P. J., Wittitow, J. und Young, R. D. (1987) "Rebinding and relaxation in the myoglobin pocket." *Biophysical Chemistry* 26: 337-355.
- Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J. und Eaton, W. A. (1994) "Conformational Relaxation and Ligand Binding in Myoglobin." *Biochemistry* 33: 5128-5145.
- Antonini, E. und Brunori, M. (1971) "Hemoglobin and myoglobin in their interactions with ligands". Amsterdam and London, Horth-Holland Publishing Company.
- Austin, R. H., Beeson, K. W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. und Gunsalus, I. C. (1975) "Dynamics of ligand binding to myoglobin." *Biochemistry* 14: 5355-5373.
- Berezhkovskii, A. und Szabo, A. (2005) "One-dimensional reaction coordinates for diffusive activated rate processes in many dimensions." *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* 122(1): 014503/1-014503/4.
- Bonneau, R., Wirz, J. und Zuberbühler, A. D. (1997) "Methods for the analysis of transient absorbance data." *Pure & Appl. Chem.* 69(5): 979-992.
- Brunori, M. (2001) "Nitric oxide moves myoglobin centre stage." *Trends Biochem. Sci.* 26: 209-210.
- Brunori, M. und Vallone, B. (2006) "A globin for the brain." *The FASEB Journal* 20: 2192-2197.
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S. und Hankeln, T. (2000) "A vertebrate globin expressed in the brain." *Nature* 407: 520-523.
- Contzen, J. und Jung, C. (1999) "Changes in Secondary Structure and Salt Links of Cytochrome P-450cam Induced by Photoreduction: A Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study." *Biochemistry*(38): 16253-16260.
- Croci, S. (2006) "Conformational Changes in Hemoglobin triggered by changing the Iron Charge, High and Low Affinity Hemoglobin". Physik Department. Technische Universität München

- Croci, S., Dilg, A., Engler, N., Prusakov, V., Iakovleva, O., Ortalli, I. und Parak, F. G. (2002) "Structural relaxation from X-ray irradiated metastable Hbmet investigated by Mössbauer spectroscopy." Proceedings of the Mössbauer conference 2001, Oxford.
- Cupane, A., Cammarata, M., Cordone, L., Leone, M., Eugenio, V., Engler, N. und Parak, F. (2005) "Spectral broadening of the Soret band in myoglobin: an interpretation by the full spectrum of low-frequency modes from a normal modes analysis." *Eur Biophys J* 34: 881-889.
- Darnell, J., Lodish, H. und Baltimore, D. (1990) "Molecular Cell Biology". New York, Scientific American Books.
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzat, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R. und Moens, L. (2001) "Biochemical Characterization and Ligand Binding Properties of Neuroglobin, a Novel Member of the Globin Family." *The Journal of Biological Chemistry* 276(42): 38949-38955.
- Eaton, W. A. und Hofrichter, J. (1981) "Polarized Absorption and Linear Dichroism Spectroscopy of Hemoglobin" in "Hemoglobins". Antonini, E., Rossi-Bernardi, L. und Chiancone, E. New York, Academic Press. *Methods in Enzymology* 76.
- Engler, N. (1998) "Untersuchung metastabiler Konformationen von Proteinen". Physik Department. TU München
- Engler, N. (2002) "Struktur, Strukturfluktuationen und Relaxationen von Myoglobin: Optische Spektroskopie, Neutronen- und Röntgenstrukturanalyse." Physik - Department E17. Technische Universität München
- Engler, N., Ostermann, A., Gassmann, A., Lamb, D. C., Prusakov, V. E., Schott, J., Schweitzer-Stenner, R. und Parak, F. G. (2000) "Protein dynamics in an intermediate state of myoglobin: Optical absorption, resonance Raman spectroscopy, and X-ray structure analysis." *Biophysical Journal* 78: 2081-2092.
- Eyring, H. (1935) "The Activated Complex in Chemical Reactions." *Journal of chemical physics* 3: 107-115.
- Frauenfelder, H., Parak, F. und Young, R. D. (1988) "Conformational substates in proteins." *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17: 451-479.
- Gutscher, W. (2002) "Dynamische Eigenschaften von Minimyoglobin". Physik-Department E17. TU München
- Haken, H. und Wolf, H. C. (1991) "Molekülphysik und Quantenchemie". Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

- Hamachi, I., Tanaka, S. und Shinkai, S. (1993) "Light-Driven Activation of Reconstituted Myoglobin with a Ruthenium Tris(2,2'-bipyridine) Pendant." *J. Am. Chem. Soc.* 115: 10458-10459.
- Hänggi, P., Talkner, P. und Borkovec, M. (1990) "Reaction-rate theory: fifty years after Kramers." *Reviews of Modern Physics* 62(2): 251-342.
- Helm, L. und A.E., M. (1999) "Water exchange on metal ions: experiments and simulations." *Coord. Chem. Rev.* 187: 151-181.
- Henry, E. R. (1997) "The Use of Matrix Methods in the Modeling of Spectroscopic Data Sets." *Biophysical Journal* 72: 652-673.
- Henry, E. R. und Hofrichter, J. (1992) "Singular Value Decomposition: Application to Analysis of Experimental Data" in "Numerical Computer Methods". Brand, L., Johnson, M., Abelson, J. und Simon, M. *Methods in Enzymology* 210: 129-192.
- Huenges, A., Achterhold, K. und Parak, F. G. (2002) "Mössbauer Spectroscopy in the Energy and in the Time Domain, a Crucial Tool for the Investigation of Protein Dynamics." *Hyperfine Interact.* 144/145: 209-222.
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. (1996) "VMD - Visual Molecular Dynamics." *J. Molec. Graphics* 14: 33-38.
- Joubert, F., Fales, H. M., Wen, H., Combs, C. A. und Balaban, R. S. (2004) "NADH Enzyme-Dependent Fluorescence Recovery after Photobleaching (ED-FRAP): Applications to Enzyme and Mitochondrial Reaction Kinetics, In Vitro." *Biophysical Journal* 86: 629-645.
- Kalyanasundaram, K., Colassis, T., Humphry-Baker, R., Savarino, P. und Barni, E. (1989) "Luminescence, Charge-Transfer Complexes, and Photoredox Processes Involving N-Alylnicotinamide/Dihydronicotinamide Surfactants." *J. Am. Chem. Soc.* 111(9): 3300-3311.
- Kauffmann, E. (2000) "Zeitaufgelöste vibrationsspektroskopische Untersuchungen zur Proteinfaltung". Fakultät für Chemie. Ruhr-Universität Bochum
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C. und Shore, V. C. (1960) "Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution." *Nature* 185: 422-427.
- Kleinert, T. (1997) "Blitzphotolysemessungen zum Einfluß des Lösungsmittels auf die CO-Bindungskinetik von Myoglobin und Hämoglobin". Fakultät für Physik. Technische Universität München

- Kleinert, T., Doster, W., Leyser, H., Petry, W., Schwarz, V. und Settles, M. (1998) "Solvent composition and viscosity effects on the kinetics of CO binding to horse myoglobin." *Biochemistry* 37: 717-733.
- Kramers, H. A. (1940) "Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions." *Physica* 7(4): 284-304.
- Lamb, D. C., Ostermann, A., Prusakov, V. E. und Parak, F. G. (1998a) "From metmyoglobin to deoxy myoglobin: relaxations of an intermediate state." *Eur Biophys J* 27: 113-125.
- Lamb, D. C., Prusakov, V., Engler, N., Ostermann, A., Schellenberg, P., Parak, F. G. und Nienhaus, G. U. (1998b) "Photodissociation and rebinding of H₂O to ferrous sperm whale myoglobin." *J. Am. Chem. Soc.* 120: 2981-2982.
- Langer, J. S. (1969) "Statistical Theory of the Decay of Metastable States." *ANNALS OF PHYSICS* 54(2): 258-275.
- Lawton, W. H. und Sylvestre, E. H. (1971) "Self-modeling Curve resolution." *Technometrics* 13: 617-633.
- Leone, M., Cupane, A., Vitrano, E. und Cordone, L. (1987) "Dynamic Properties of Oxy- and Carbonmonoxyhemoglobin Probed by Optical Spectroscopy in the Temperature Range of 300-20 K." *Biopolymers* 26: 1769-1779.
- Lichtenegger, H., Doster, W., Kleinert, T., Birk, A., Sepiol, B. und Vogl, G. (1999) "Heme-Solvent Coupling: A Mössbauer Study of Myoglobin in Sucrose." *Biophysical Journal* 76: 414-422.
- Lin, C.-T., Böttcher, W., Chou, M., Creutz, C. und Sutin, N. (1976) "Mechanism of the Quenching of the Emission of Substituted Polypyridineruthenium(II) Complexes by Iron(III), Chromium(III), and Europium(III) Ions." *Journal of the American Chemical Society* 98(21): 6536-6544.
- Makinen, M. W. und Churg, A. K. (1983) "Structural and Analytical Aspects of the Electronic Spectra of Hemeproteins" in "Iron Porphyrins, Part One". Lever, A. B. und Gray, H. B., Addison-Wesley.
- Malinowski, E. R. (2002) "Factor Analysis in Chemistry". New York, Wiley-Interscience.
- Nagle, J. F., Zimanyi, L. und Lanyi, J. K. (1995) "Testing BR Photocycle Kinetics." *Biophysical Journal* 68: 1490-1499.
- Nienhaus, G. U., Mourant, J. R. und Frauenfelder, H. (1992) "Spectroscopic evidence for conformational relaxation in myoglobin." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 2902-2906.

- Nobbs, C. L., Watson, H. C. und Kendrew, J. C. (1966) "Structure of deoxymyoglobin: a crystallographic study." *Nature* 209: 339-341.
- Orii, Y. (1993) "Immediate Reduction of Cytochrome c by Photoexcited NADH: Reaction Mechanism As Revealed by Flow-Flash and Rapid-Scan Studies." *Biochemistry* 32(44): 11910-11914.
- Ostermann, A. (2000) "Untersuchung der Proteindynamik und metastabiler Proteinzustände mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse." Physik Department E17. Technische Universität München
- Parak, F. und Knapp, E. W. (1984) "A consistent picture of protein dynamics." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7088-7092.
- Parak, F., Knapp, E. W. und Kucheida, D. (1982) "Protein dynamics: Mössbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals." *J. Mol. Biol.* 161: 177-194.
- Parak, F. und Prusakov, V. E. (1994) "Relaxation of non-equilibrium states of myoglobin studied by Moessbauer spectroscopy." *Hyperfine Interact.* 91: 885-890.
- Parak, F. G. (2004) "Biomoleküle in Bewegung." *Phys. Unserer Zeit* 35(6): 274-281.
- Parak, F. G., Achterhold, K., Croci, S. und Schmidt, M. (2007) A Physical Picture of Protein Dynamics and Conformational Changes obtained from the Heme Proteins Myoglobin and Nitrophorin IV. "ICBP 2007 Proceedings".
- Perutz, M. F. und Mathews, F. S. (1966) "An X-ray study of azide methaemoglobin." *J. Mol. Biol.* 21(1): 199-202.
- Prusakov, V. E., Lamb, D. C., Parak, F. und Goldanskii, V. I. (1999) "Photoinitiated generation of reduced myoglobin intermediates at cryogenic temperatures and their relaxation." *Chem. Phys. Reports* 18: 835-853.
- Prusakov, V. E., Steyer, J. und Parak, F. G. (1995) "Moessbauer spectroscopy on nonequilibrium states of myoglobin: a study of r-t relaxation." *Biophysical Journal* 68: 2524-2530.
- Prusakov, V. E., Stukan, R. A. und Parak, F. (1990) "Non-equilibrium states of myoglobin induced at low temperatures and investigated by Mössbauer spectroscopy." *Chemitsch.Fisika (russ.)* 9: 44-45.
- Prusakov, V. Y., Parak, F., Chekunayev, N. I. und Gol'danskii, V. I. (1996) "Polychromatic kinetics of conformational and spin relaxation of reduced myoglobin intermediates." *Biophysics, Original(russ.) Biofizika* 41,995-1006 41: 1005-1015.

- Quillin, M. L. e. a. (1995) "Structural and functional effects of apolar mutations of the distal valine in myoglobin." *J. Mol. Biol.* 245: 416-436.
- Ringe, D. und Petsko, G. A. (2003) "The 'glass transition' in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it." *Biophysical Chemistry* 105: 667–680.
- Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U. und Burmester, T. (2003) "How Does the Eye Breathe?" *The Journal of Biological Chemistry* 278(3): 1932-1935.
- Schneider, S. W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R. R. und Schneider, M. F. (2007) "Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers." *PNAS* 104(19): 7899-7903.
- Soret, J. L. (1883) "Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette." *Compt. Rend. Acad. Sci.*(97): 1269-1273.
- Steinbach, P. J., Ansari, A., Berendzen, J., Braunstein, D., Chu, K., Cowen, B. R., Ehrenstein, D., Frauenfelder, H., Johnson, J. B., Lamb, D. C., Mourant, J. R., Nienhaus, G. U. I., Ormos, P., Philipp, R., Xie, A. und Young, R. D. (1991) "Ligand binding to heme proteins: connection between dynamics and function." *Biochemistry* 30: 3988-4001.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y. und Greenberg, D. A. (2001) "Neuroglobin is up-regulated by and protect neurons from hypoxic-ischemic injury." *PNAS* 98: 15306-15311.
- Telford, J. R., Tezcan, F. A., Gray, H. B. und Winkler, J. R. (1999) "Role of Ligand Substitution in Ferrocycochrome c Folding." *Biochemistry* 38(6): 1944-1949.
- Trent III, J. T., Watts, R. A. und Hargrove, M. S. (2001) "Human Neuroglobin, a Hexacoordinate Hemoglobin That Reversibly Binds Oxygen." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 276(32): 30106-30110.
- Ware, W. R., Doemeny, L. J. und Nemzek, T. L. (1973) "Deconvolution of Fluorescence and Phosphorescence Decay Curves. A Least-Squares Method." *The Journal of Physical Chemistry* 77(17): 2038-2048.
- Whitten, D. G. (1980) "Photoinduced Electron-Transfer Reactions of Metal Complexes in Solution." *Accounts of Chemical Research*(13): 83-90.
- Wittung-Stafshede, P., Lee, J. C., Winkler, J. R. und Gray, H. B. (1999) "Cytochrome b562 folding triggered by electron transfer: Approaching the speed limit for formation of a four-helix-bundle protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6587-6590.

-
- Zimányi, L., Kulcsár, Á., Lanyi, J. K., Sears, J. D. F. und Saltiel, J. (1999a) "Intermediate spectra and photocycle kinetics of the Asp96 -->Asn mutant bacteriorhodopsin determined by singular value decomposition with self-modeling." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4414-4419.
- Zimányi, L., Kulcsár, Á., Lanyi, J. K., Sears, J. D. F. und Saltiel, J. (1999b) "Singular value decomposition with self-modeling applied to determine bacteriorhodopsin intermediate spectra: Analysis of simulated data." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4408-4413.

Anhang

Anhang A Steuerelektronik

Die Steuerelektronik synchronisiert den Laser und die Software-gesteuerte Aufnahme von optischen Spektren.

Soll zeitgleich mit dem Start einer Aufnahme von zeitlich aufgelösten Spektren ein Laserpuls erzeugt werden, muß der Kippschalter der Elektronik auf die Stellung „EIN“ gelegt werden. Zum Spektrometer gehört eine sogenannte „I/O Box“. An ihr wird bei jeder Aufnahme eines Spektrums an der BNC-Buchse „Fire“ ein Rechteckpuls abgegriffen. Dieser wird an den „Clock“-Eingang eines J-K Flip-Flops (SN7473N) gelegt. Dessen Ausgang \bar{Q} wird bei Start der Aufnahme des ersten Spektrums von „high“ nach „low“ geschaltet. Dadurch wird dann der Ausgang „Shutter 1“ von „high“ nach „low“ geschaltet und so Shutter 1 vor der Probe geöffnet. Der elektronische Schalter, der die Einzelpulsauslösung des Lasers steuert, wird mit einer Verzögerung, die der Öffnungszeit des Shutters 1 entspricht, geschlossen. Die Verzögerung wird durch einen Schmitt-Trigger (SN74LS14), ein Potentiometer und einen Kondensator realisiert. Der erzeugte Laserpuls trifft auf die Probe, während Shutter 2 vor dem PDA noch geschlossen ist. Am Laser wird bei jedem Laserpuls ein Rechtecksignal an der BNC-Buchse „Fixed Sync Out“ ausgegeben. Dieses wird von einem weiteren J-K Flip-Flop verarbeitet. Dadurch wird der Ausgang „Shutter 2“ von „high“ auf „low“ geschaltet und so Shutter 2 geöffnet. Außerdem wird der den Laser steuernde elektronische Schalter wieder geöffnet. Nach Beendigung der Messung können durch Drücken des Knopfes „Reset“ die Ausgänge der Flip-Flops wieder auf „high“ geschaltet werden und die Shutter geschlossen werden. Die Aufnahme einer weiteren Serie von Spektren kann nun gestartet werden.

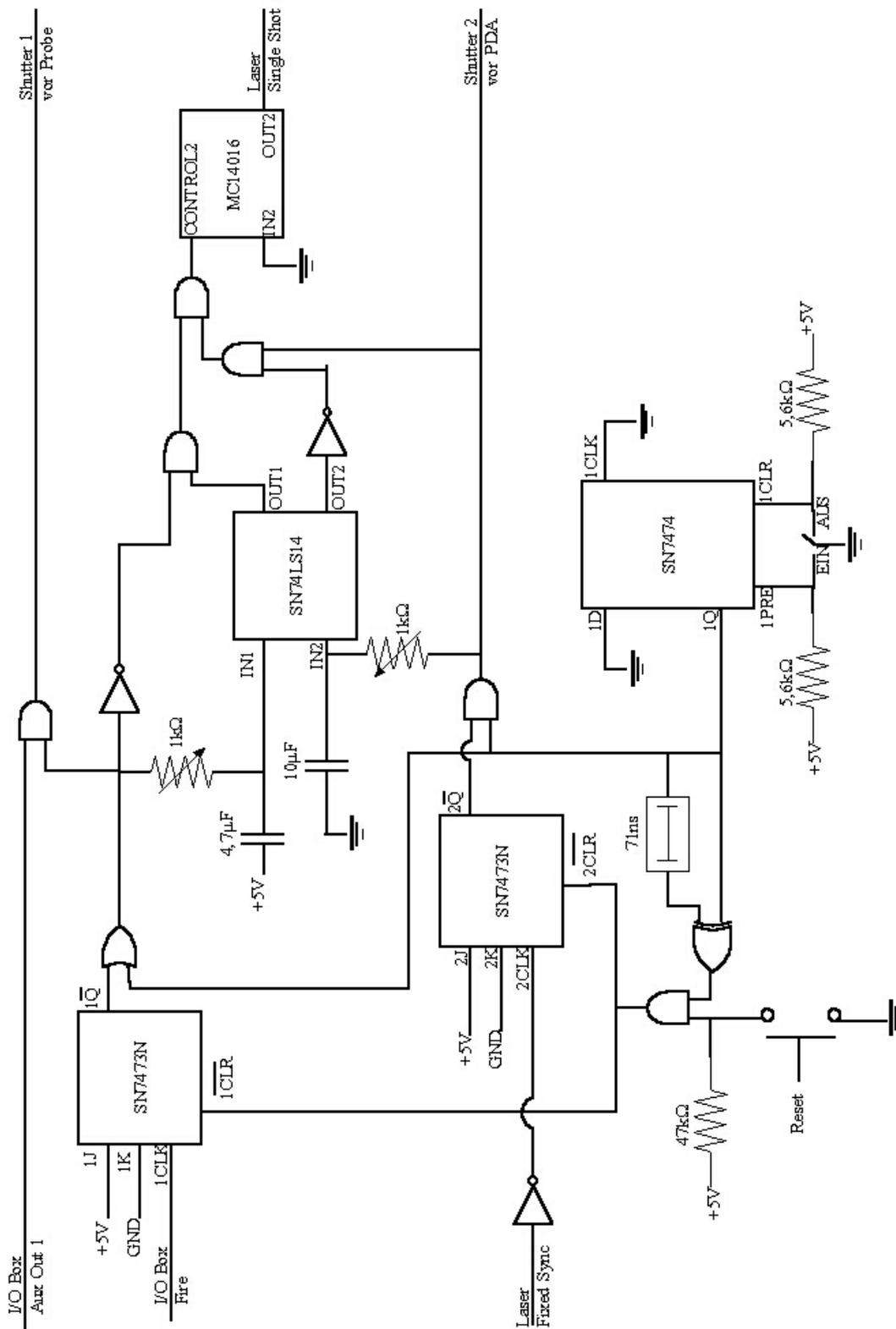


Abb. 66: Elektronik zur Laser- und Shutter-Steuerung für zeitaufgelöste optische Messungen

Soll ein Spektrum gemessen werden, ohne einen Laserpuls zu erzeugen, so muß der Kippschalter auf „AUS“ gelegt werden. Damit ist die elektronische Einzelpulsauslösung außer Betrieb. Auch Shutter 2 wird dadurch geöffnet. Shutter 1 bleibt weiter geschlossen. Computerprogrammgesteuert kann bei einer Messung der Ausgang „Aux Out 1“ an der „I/O Box“ auf „low“ geschaltet (Shutter 1 öffnet), die Aufnahme eines Spektrum gestartet und schließlich Shutter 1 wieder geschlossen werden.

Anhang B Extinktionskoeffizienten von Myoglobin und Hämoglobin

Protein	Soret-Bande λ / nm $\varepsilon \cdot \text{mM cm}$	Q_v -Bande λ / nm $\varepsilon \cdot \text{mM cm}$	Q_0 -Bande λ / nm $\varepsilon \cdot \text{mM cm}$
Deoxy-Myoglobin	435 <i>121</i>	560 <i>13,8</i>	
MbCO	424 <i>207</i>	540 <i>15,4</i>	579 <i>13,9</i>
MbO ₂	418 <i>132</i>	542 <i>13,9</i>	580 <i>14,4</i>
Met-Myoglobin	408 <i>188</i>	502 <i>10,2</i>	630 <i>3,9</i>
Mb ⁺ (OH ⁻)	411 <i>119</i>	539 <i>8,8</i>	585 <i>7,8</i>
Deoxy-Hämoglobin	430 <i>133</i>	555 <i>12,5</i>	
HbCO	419 <i>191</i>	540 <i>13,4</i>	569 <i>13,4</i>
HbO ₂	415 <i>125</i>	541 <i>13,8</i>	577 <i>14,6</i>
Met-Hämoglobin	405 <i>179</i>	500 <i>10,0</i>	631 <i>4,4</i>
Hb ⁺ (OH ⁻)	414 <i>120</i>	542 <i>11,0</i>	582 <i>9,2</i>

Tab. 2: Die Wellenlänge der Absorptionsbanden mit den dazugehörigen Extinktionskoeffizienten für Myoglobin und Hämoglobin (Antonini, E. und Brunori, M. 1971; Kleinert, T. 1997)

Anhang C Parameter aus den Anpassungen der Zerfallskurven von Myoglobin und Hämoglobin

Anpassung des Zerfalls von Mb(II, ls, w) an das Kramers-Modell:

H_0 : Kramers-Barriere (siehe Abb. 56)

S : Entropiedifferenz zwischen Kramers-Barriere und flexiblem Zustand

H_{flex} : Enthalpiedifferenz zw. flexiblem Zustand und den Konformationssubzuständen

S_{flex} : Entropiedifferenz zwischen flexiblem Zustand und Konformationssubzuständen

σ : Breite der Verteilung der Kramers-Barrierenhöhe

N_0 : Startpopulation an Intermediat

U : Untergrund

Parameter	Wert
H_0	117586 J/mol
S	258,4 J/mol/K
H_{flex}	34981 J/mol
S_{flex}	121,3 J/mol/K

Tab. 3: Werte der temperaturunabhängigen Parameter aus der Anpassung des in Kap. 6.2.3 beschriebenen Modells an die Zerfallsdaten für das Intermediat Mb(II, ls, w) von Myoglobin im Temperaturbereich 180 K bis 225 K.

T / K	σ / (J/mol)	N_0	U
180	3641	0,226	fest auf 0,00
184,8	1824	0,231	0,006
190	fest auf 10	0,135	0,059
191	fest auf 10	0,406	0,052
195	fest auf 10	0,284	0,021
200	fest auf 10	0,336	0,014
205	fest auf 10	0,534	0,020
210	fest auf 10	0,563	-0,017
215	fest auf 10	0,608	0,037
220	fest auf 10	0,482	0,000
225	fest auf 10	0,483	0,018

Tab. 4: Werte der temperaturabhängigen Parameter aus der Anpassung des in Kap. 6.2.3 beschriebenen Modells an die Zerfallsdaten für das Intermediat Mb(II, ls, w) von Myoglobin im Temperaturbereich 180 K bis 225 K. Ab 190 K ist keine Verteilung in der Höhe der Kramers-Barriere mehr nötig und die Breite der Verteilung wurde auf einen sehr kleinen Wert von 10 J/mol festgesetzt.

Die zusätzlichen Parameter für die Anpassung an den Zerfall des Hämoglobin-Intermediates sind:

$H0b$: Kramers-Barriere der langsam zerfallenden Subpopulation (siehe Abb. 56)

σb : Breite der Verteilung von der Kramers-Barriere in der langsam zerfallenden Subpopulation

p : Anteil der langsam zerfallenden Subpopulation

Parameter	Wert
$H0$	123505 J/mol
$H0b$	132987 J/mol
S	264 J/mol/K
H_{flex}	34981 J/mol
S_{flex}	121,3 J/mol/K

Tab. 5: Werte der temperaturunabhängigen Parameter aus der Anpassung des in Kap. 6.2.3 beschriebenen Modells an die Zerfallsdaten für das Intermediat Hb(II, ls, w) von Hämoglobin im Temperaturbereich 200 K bis 245 K.

T / K	σ / (J/mol)	σb / (J/mol)	N0	p / %	U
200	2539	unbestimmbar	1,00 fest	15,6	fest auf 0,00
210,5	2276	unbestimmbar	1,00 fest	11,1	fest auf 0,00
215	1618	unbestimmbar	1,00 fest	12,8	fest auf 0,00
225	10 fest	3264	1,00 fest	17,0	fest auf 0,00
235	10 fest	3550	1,00 fest	27,6	fest auf 0,00
245	10 fest	3415	1,00 fest	16,9	fest auf 0,00

Tab. 6: Werte der temperaturabhängigen Parameter aus der Anpassung des in Kap. 6.2.3 beschriebenen Modells an die Zerfallsdaten für das Intermediat Hb(II, ls, w) von Hämoglobin im Temperaturbereich 200 K bis 245 K. Ab 225 K ist keine Verteilung in der Höhe der Kramers-Barriere mehr nötig und die Breite der Verteilung wurde auf einen sehr kleinen Wert von 10 J/mol festgesetzt.

Danksagung

Allen voran möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Fritz Parak für das überaus interessante Thema und die Bereitstellung der hervorragenden Forschungsmöglichkeiten danken. Er brachte dieser Arbeit riesiges Interesse entgegen und hat durch intensiv geführte Diskussionen ganz entscheidend zum Gelingen beigetragen.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Marius Schmidt danken, der mir die Singulärwertzerlegung mit „self-modeling“ nahebrachte und ohne den diese Arbeit so nie verwirklicht worden wäre. Er verstand es immer mit Witz alle zum Lachen zu bringen.

Überaus herzlich zu Dank verpflichtet bin ich Dr. Klaus Achterhold für seine vielen Diskussionsbeiträge. Zudem hat er mir die Urversion des Programms zum Anpassen des Kramers-Modells zur Verfügung gestellt.

Mein Dank gilt darüber hinaus Dr. Thomas Nawroth für die Hilfe bei der Probenpräparation, sowie seine Unterstützung bei technischen Problemen an der Apparatur.

Bei meinen Arbeitskollegen Valeri Prusakov und Simonetta Croci möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit und für ihre gute Stimmung im Labor bedanken. An Andreas Ostermann geht mein Dank für die gemeinsamen für mich lehrreichen Stunden im Chemielabor und die Versorgung mit Literatur. Allen meinen Arbeitskollegen und insbesondere meinen Schreibtischnachbarn Matthias Mentler, Andreas Weiss und Angela Krasselt gebührt Dank für das hervorragende Arbeitsklima, welches von Hilfsbereitschaft und Kooperation geprägt war.