

Institut für Kernphysik und Nukleare Festkörperphysik E17

Proteinspezifische Dynamik und Relaxation in Myoglobin

Alexandra Gaßmann

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. S. Fischer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F.G. Parak

2. Univ.-Prof. Dr. H.-J. Körner

Die Dissertation wurde am 14.12.1999 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 10.01.2000 angenommen.

für meine Eltern
und Martin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	7
2.1 Methode der Mößbauer-Spektroskopie	7
2.1.1 Der Mößbauer-Effekt	7
2.1.2 Die Hyperfeinwechselwirkungen	8
2.1.3 Auswertung von Mößbauer-Spektren	10
2.1.4 Der Lamb-Mößbauer-Faktor	13
2.1.5. Das Modell des Brownschen Oszillators	16
2.2 Die Optische Absorptionsspektroskopie	18
3. Experimenteller Aufbau und Probenpräparation	26
3.1 Experimenteller Aufbau eines Tieftemperatur-Mößbauer-Spektrometers	26
3.2 Probenpräparation	30
3.2.1 ^{57}Fe -MbCO in Glyzerin	31
3.2.2 ^{57}Fe -MbCO in Trehalose	31
3.2.3 ^{57}Fe -Mbm _{et} in Trehalose	32
3.2.4 ^{57}Fe -MbCO-Kristalle	32
3.2.5 Mb-Einkristall mit eindiffundierter Trehalose-Lösung	34
3.2.6 Metastabiles Mb in Glyzerin	34
4. Dynamikuntersuchungen von Myoglobin	36
4.1 Mößbauer-Spektroskopie an CO-ligandiertem Myoglobin in verschiedenen Medien	36
4.2 Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen von Myoglobin-Kristallen in verschiedenen Ligandierungszuständen	42
4.3 Interpretation der Mößbauer-Messungen mit Hilfe des Brownschen Oszillator- Modells	44
4.4 Optische Absorptionsspektren eines metastabilen Zustands von Myoglobin	54
5. Myoglobin in Trehalose	61
5.1 Röntgenstruktur eines Myoglobin-Einkristalls mit eindiffundierter Trehalose-Lösung ..	61
5.2 Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen von röntgenbestrahltem Myoglobin in Trehalose	64

6. Diskussion.....	70
6.1 Die Abhängigkeit der Proteindynamik von der Ligandierung und der äußeren Umgebung.....	72
6.2 Diskussion des Brownschen Oszillators.....	77
6.3 Diskussion der optischen Absorptionsspektren eines metastabilen Zustands von Myoglobin.....	98
6.4 Vergleich der Röntgenstrukturen eines Mbmet-Trehalose-Kristalls und eines Mbmet-Kristalls.....	102
6.5 Diskussion des Relaxationsverhaltens des metastabilen Zustands von Myoglobin in Trehalose.....	104
Anhang.....	108
Literaturverzeichnis.....	117
Abkürzungsverzeichnis.....	126

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dynamik von Myoglobin im Gleichgewichtszustand und die Relaxation von Myoglobin in einem Ungleichgewichtszustand untersucht.

Mittels Mößbauer-Spektroskopie konnte die Dynamik von Myoglobin im Gleichgewichtszustand in zwei Temperaturbereiche unterteilt werden. Bei tiefen Temperaturen wurden die Bewegungen des Hämeisens als harmonische Festkörperschwingungen identifiziert, die zu linear mit der Temperatur steigenden mittleren quadratischen Auslenkungen $\langle x_v^2 \rangle$ führen. Diese harmonischen Festkörperschwingungen lassen sich sehr gut mit Hilfe von Normalmoden beschreiben. In Abhängigkeit vom Ligandierungszustand des Hämeisens konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Geometrie der Hämgruppe und den mittleren quadratischen Auslenkungen $\langle x_v^2 \rangle$ hergestellt werden. So stellt sich fünffach ligandiertes Hämeisen gegenüber sechsfach ligandiertem Hämeisen als beweglicher dar, d.h. daß der Anstieg der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_v^2 \rangle$ von desoxygeniertem Myoglobin mit zunehmender Temperatur ist größer als in CO- bzw. Wasser-ligandiertem Myoglobin. Die Hämgruppe von Wasser-ligandiertem Myoglobin ist aufgrund einer Wasserstoffbrückenbindung besser stabilisiert als die von CO-ligandiertem Myoglobin. Das Hämeisen in Wasser-ligandiertem Myoglobin weist folglich die kleinsten mittleren quadratischen Auslenkungen auf.

Oberhalb einer charakteristischen Temperatur tritt neben den harmonischen Festkörperschwingungen proteinspezifische Bewegung auf, d.h. eine Bewegung, die für die biochemische Funktion des Proteins von Bedeutung ist. Zur Beschreibung der proteinspezifischen Bewegung wurde die Bewegungsgleichung der überdämpften Brownschen Oszillation erfolgreich eingesetzt. Es gelang damit, die Absorptionsspektren von CO-ligandierten Myoglobin-Kristallen sowie von CO-ligandiertem Myoglobin in Glycerin richtig wiederzugeben. Dabei konnten insbesondere die Temperaturabhängigkeit der Absorptionsfläche sowie die Linienformveränderungen vollständig erklärt werden. Ausgehend von der mittleren quadratischen Auslenkung der proteinspezifischen Bewegung $\langle x_t^2 \rangle$ konnte die Viskosität der Myoglobin-Proben in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet werden. Anhand eines Vergleichs von Proteinen mit Gläsern wurde deutlich, daß das Brownsche

Oszillator-Modell keinen Hinweis auf eine Ähnlichkeit zwischen der Viskosität von Proteinen und Gläsern liefert.

Ein Vergleich der charakteristischen Temperaturen von Myoglobin in unterschiedlichen Medien führte zu dem Ergebnis, daß das Einsetzen der proteinspezifischen Dynamik sehr stark vom äußeren Medium abhängt. Zwischen der charakteristischen Temperatur und der Glastemperatur der äußeren Medien läßt sich ein systematischer Zusammenhang feststellen. Je größer die Glastemperatur des umgebenden Mediums ist, desto später setzt die proteinspezifische Bewegung ein. Im Grenzfall der sehr hohen Glastemperatur von Trehalose ($T_G = 378 \text{ K}$) wird die proteinspezifische Bewegung nahezu vollständig bis zu Raumtemperatur unterdrückt. Im Gegensatz zu Glycerin unterdrückt Trehalose auch die strukturelle Relaxation eines metastabilen Zustands von Myoglobin. Das Einsetzen der proteinspezifischen Bewegung und die strukturelle Relaxation sind folglich von der Viskosität des äußeren Mediums abhängig.

Weiter wurde mittels optischer Absorptionsspektroskopie die Relaxation eines metastabilen Zustands beobachtet, der durch photoinduzierte Reduktion von Wasser-ligandiertem Myoglobin hergestellt wurde. Die Relaxation erfolgte in zwei Schritten: es konnte zuerst eine Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands festgestellt werden, bevor der metastabile Zustand zu desoxygeniertem Myoglobin relaxierte. Die Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands wurde anhand der temperaturabhängigen Veränderungen der Soret-Bande untersucht. Die Soret-Bande des metastabilen Zustands liefert aufgrund der Kopplung des zugrunde liegenden elektronischen Übergangs mit Vibrationen sowohl Hinweise über die Struktur der Hämgruppe als auch über die Dynamik der Relaxation. In Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur deuten die strukturellen Parameter auf ein sechsfach ligandiertes Hämprotein hin, dessen sechster Ligand nur Wasser sein kann. Die dynamischen Parameter hingegen stimmten mit dem fünffach ligandierten Mbdesoxy überein. Die Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands wird folglich aufgrund der veränderten Dynamik angetrieben. Als möglicher Relaxationsmechanismus wird eine geringfügige Verschiebung der Hämgruppe postuliert. Die Relaxation des metastabilen Zustands zu Mbdesoxy erfolgt erst oberhalb der charakteristischen Temperatur, bei der proteinspezifische Dynamik angeregt ist.

1. Einleitung

Proteine spielen Schlüsselrollen in den meisten biologischen Prozessen. Für das Verständnis der biologischen Funktion der Proteine ist die Kenntnis ihrer dreidimensionalen Struktur von wesentlicher Bedeutung. Das Bild einer statischen dreidimensionalen Struktur, wie es beispielsweise durch die Röntgenkristallographie erhalten wird, ist jedoch häufig alleine nicht ausreichend, um einen umfassenden Einblick in Prozesse auf molekularer Ebene zu erhalten.

Eine dreidimensionale statische Struktur liefert die Beschreibung des Proteins in einer Konformation. Diese Konformation ist jedoch nicht starr, da die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch schwache Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird, die durch thermische Fluktuationen gebrochen werden können. Ebenso zeigt das Proteinrückgrat eine gewisse Flexibilität. Die makromolekulare Funktion hängt in den meisten Fällen entscheidend von Übergängen in andere molekulare Zustände ab und ist somit unmittelbar mit Flexibilität gekoppelt.

Beispielsweise führt im Fall des allosterischen Moleküls Hämoglobin die Bindung von Sauerstoff zu signifikanten Änderungen der Quartärstruktur des Proteins. Um eine vollständige und wesentlich nützlichere Beschreibung der Struktur zu erhalten, ist es deshalb erforderlich zu verstehen, wie sich die Struktur mit der Zeit ändert. Das entscheidende Ziel von dynamischen Studien ist es somit, die Lücke zwischen statischen und dynamischen Bildern der molekularen Struktur zu schließen und aufzuzeigen, wie Bewegung und Struktur zusammenhängen.

Eine Methode zur Untersuchung der Dynamik von eisenhaltigen Proteinen ist die Mößbauer-Spektroskopie. Die Mößbauer-Spektroskopie, die auf dem Effekt der rückstoßfreien Resonanzabsorption von γ -Strahlung beruht, erfaßt Bewegungen mit Zeitkonstanten, die kürzer sind als die Lebensdauer des angeregten Kerns. Für Untersuchungen an eisenhaltigen Proteinen durch Mößbauer-Spektroskopie wird das Isotop ^{57}Fe verwendet, dessen angeregter Zustand eine Lebensdauer von ca. 10^{-7} s besitzt. Im Falle der ^{57}Fe -Mößbauer-Spektroskopie werden somit Bewegungen des Eisenatoms detektiert, die schneller als 10^{-7} s sind. Diese sind deutlich langsamer als normale Festkörperschwingungen, deren Frequenzen bei 10^{-12} bis 10^{-13} s

liegen. Die Bewegungen des Eisenatoms geben Aufschluß über die Dynamik des gesamten Proteins, da sie repräsentativ für die mittlere Bewegung aller Atome des Proteins sind (Parak und Reinisch, 1986).

Zu den bislang am besten untersuchten Proteinen der Biophysik zählt das sauerstoffbindende Protein Myoglobin, das als eisenhaltiges Protein auch der Untersuchung durch Mößbauer-Spektroskopie zugänglich ist. Seine wichtigsten Aufgaben sind die Erleichterung des Sauerstofftransports und die Sauerstoffspeicherung im Muskelgewebe. Die Kristallstruktur von Myoglobin wurde 1959 von John Kendrew et al. als erste dreidimensionale Proteinstruktur mit atomarer Auflösung aufgeklärt (Kendrew et al., 1960). Myoglobin besteht aus acht Helices (A bis H), die untereinander durch kurze Peptidsegmente verbunden sind (siehe Abb. 1). 121 der 153 Aminosäuren des Myoglobins finden sich in diesen Helices. In einer hydrophoben Tasche, die bevorzugt von der E- und F-Helix gebildet wird, befindet sich die nicht kovalent gebundene Hämgruppe. Die Hämgruppe enthält als Zentralatom Eisen, das entweder als Fe^{2+} oder Fe^{3+} von einem Porphyrinring, dem Protoporphyrin IX, umgeben ist (siehe Abb. 48).

Das Eisen(II)atom ist im oxygenierten Zustand von Myoglobin von fünf Stickstoff-Liganden und molekularem Sauerstoff quadratisch-bipyramidal umgeben, wobei vier Stickstoff-Liganden in der Ebene des Porphyrinmoleküls liegen. Den fünften Stickstoff-Ligand senkrecht zu dieser Ebene bildet Histidin 93, das sogenannte proximale Histidin. Die dem proximalen Histidin gegenüberliegende Koordinationsstelle des Eisens dient zur reversiblen Bindung von Sauerstoff an das Hämeisen, das damit von seinen Liganden oktaedrisch umgeben ist. Kleine Moleküle wie Kohlenmonoxid oder Stickstoffmonoxid besetzen diese sechste Koordinationsstelle mit größerer Affinität als Sauerstoff.

Im desoxygenierten Zustand von Myoglobin ist die sechste Koordinationsstelle unbesetzt. Das von fünf Stickstoff-Liganden quadratisch-pyramidal umgebene Eisenatom ist aufgrund der Asymmetrie nicht mehr in der Ebene des Porphyrinmoleküls, sondern in Richtung des proximalen Histidins verschoben. Das distale Histidin (Histidin 64) bildet im oxygenierten Zustand von Myoglobin eine Wasserstoffbrücke zum O_2 , während im desoxygenierten Zustand von Myoglobin die sechste Koordinationsstelle des Fe(II) unbesetzt bleibt, weil das distale Histidin zu weit von Fe(II) entfernt ist. Somit nimmt das distale Histidin auf der Seite der sechsten Koordinationsstelle Einfluß auf die Bindungsaffinität. Dies wird dadurch belegt, daß

freies Häm CO in Lösung ca. 1500 mal stärker als O₂ bindet, während im Vergleich dazu Myoglobin mit der Hämgruppe als prosthetischer Gruppe CO nur 30 mal stärker als O₂ bindet (Collman et al., 1976; Antonini und Brunori, 1971).

Fe²⁺ in Myoglobin kann zu Fe³⁺ oxidiert werden, wodurch Metmyoglobin entsteht. Metmyoglobin bindet kein O₂, hier ist Fe³⁺ bereits koordinativ mit Wasser als sechstem Liganden abgesättigt.

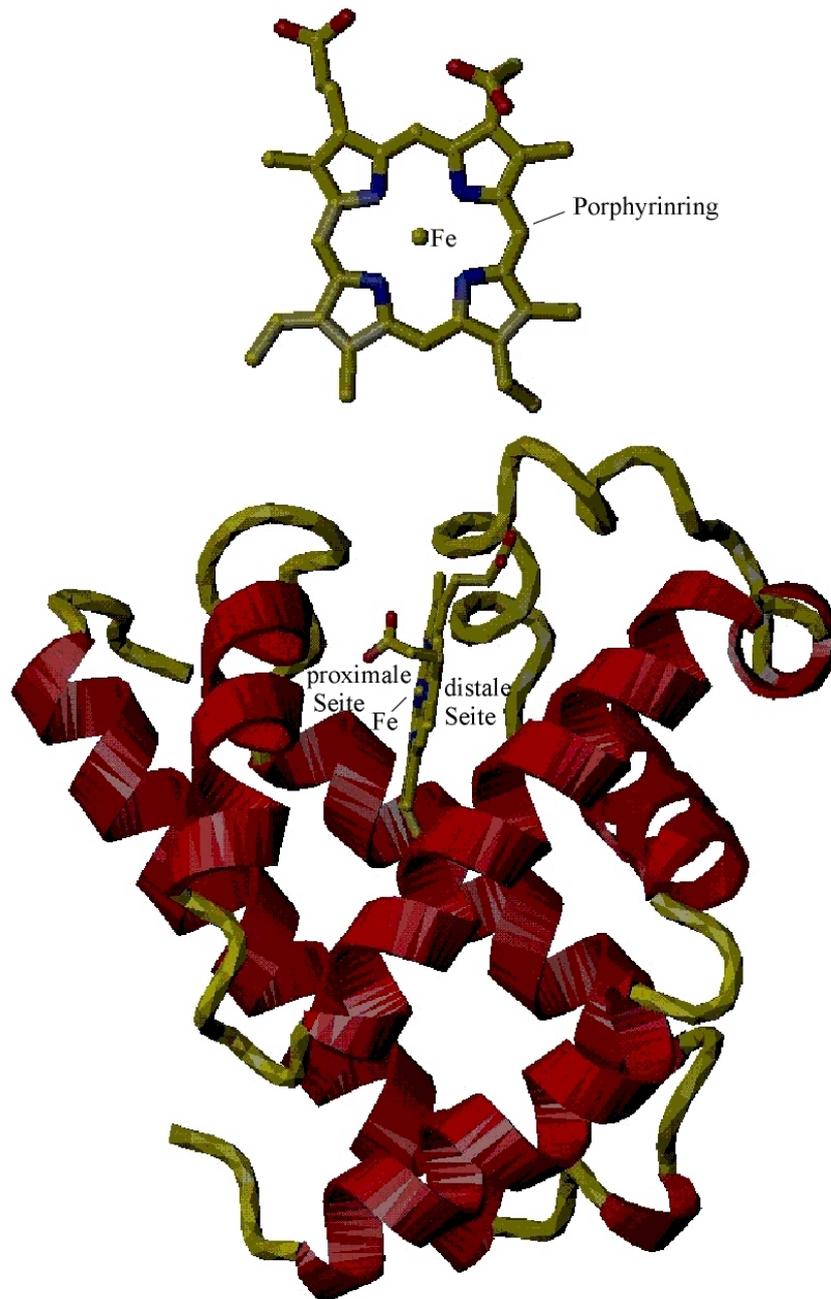


Abb. 1: Die dreidimensionale Struktur von Pottwal-Myoglobin im Bänder-Modell unten, deren Hämgruppe oben vergrößert dargestellt ist.

In Abhängigkeit von dem Ligand, dem Bindungspartner an der sechsten Koordinationsstelle, ändert sich die Konformation des Proteins. Myoglobin nimmt beispielsweise bei der Bindung von Sauerstoff eine andere Konformation (r-Konformation) an als bei dessen Freisetzung (t-Konformation). Wie bereits vorstehend erwähnt, ist die Flexibilität von entscheidender Bedeutung für die Funktion von Proteinen. Aus Röntgenstrukturuntersuchungen an Hämoglobin und Myoglobin ist bekannt, daß der Zugang des O₂-Moleküls zu seinem Bindungsort, dem Eisen der Hämgruppe, sterisch behindert ist (Perutz und Matthews, 1996; Nobbs, 1966; Takano, 1977). Strukturfluktuationen sind deshalb nötig, um die Bindung zu ermöglichen.

Wesentliche Erkenntnisse über Strukturfluktuationen wurden durch Blitzlichtphotolyse-Experimente an mit CO ligandiertem Myoglobin erzielt (Austin et al., 1975). Dabei wurde der CO-Ligand durch einen Lichtblitz dissoziiert und der Zeitverlauf seiner Rückbindung verfolgt. Die Rückbindungskinetik bei tiefen Temperaturen zeigte, daß die Myoglobinmoleküle der untersuchten Probe nicht identisch sind. Bei der Rückbindung an ein Myoglobinmolekül muß der CO-Ligand eine Energiebarriere überwinden, die für identische Moleküle gleich hoch ist. Im Experiment wurde jedoch eine Verteilung von Energiebarrieren gefunden, die nur dadurch zu erklären ist, daß Proteinmoleküle leicht unterschiedliche Strukturen besitzen. Da die Unterschiede nicht mit Hilfe der Röntgenkristallographie aufgelöst werden können, müssen sie sehr gering sein. Die einzelnen Moleküle nehmen also eine Vielzahl geringfügig unterschiedlicher Strukturen an, die als Konformationssubzustände oder Mikrozustände bezeichnet werden. Durch Abkühlen auf tiefe Temperaturen können die Proteinmoleküle in Konformationssubzuständen eingefroren werden. Weitere experimentelle Nachweise von Konformationssubzuständen wurden mittels Röntgenkristallographie (Hartmann et al., 1982; Frauenfelder et al., 1979), optischer Absorptionsspektroskopie (Šrajer et al., 1986) und Molekular-Dynamik-Rechnungen erbracht (Elber et al., 1987).

Anhand dieser Ergebnisse wird die Notwendigkeit von Experimenten bei tiefen Temperaturen deutlich. Bei physiologischen Temperaturen laufen Reaktionen zu schnell ab, um detaillierte Aussagen machen zu können, und zudem überlagern sich verschiedene dynamische Prozesse. Bei tiefen Temperaturen hingegen lassen sich verschiedene Reaktionen leichter separieren, da die zugehörigen Prozesse dann auf unterschiedlichen Zeitskalen stattfinden bzw. vollständig eingefroren sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mößbauer-spektroskopische

Untersuchungen an Myoglobin im Temperaturbereich von 80 K bis 320 K durchgeführt. Dadurch können reine Festkörperschwingungen separiert werden von den für die Funktion des Proteins bedeutenden Bewegungen.

Unterschiede in der Dynamik des Myoglobins können wie vorstehend erwähnt durch verschiedene Liganden an der sechsten Koordinationsstelle des Eisenatoms auftreten. Daneben kann auch die Proteinumgebung Einfluß auf die in der Mößbauer-Spektroskopie sichtbaren Eisenbewegungen nehmen. Die Proteinumgebung bildet mit dem Protein ein gekoppeltes System, so daß Proteinbewegungen und damit auch die Eisenbewegungen durch die umgebende Substanz beeinflusst werden (Lichtenegger et al., 1999). Als Proteinumgebung kommen reines Wasser in Kristallen, wäßrige Lösungen wie z.B. Glycerin-Wasser-Mischungen sowie wasserfreie Zucker wie z.B. Trehalose in Frage. Trehalose ermöglicht es, Proteine in wasserfreier Umgebung aufzubewahren, was sonst nur im gefriergetrockneten Zustand möglich ist (Crowe et al., 1987; Green und Angell, 1989).

Trehalose ist ein über eine α -(1,1)-Bindung verknüpftes Disaccharid (siehe Abb. 2). Trehalose wird in Pollen, Samen, niederen Pflanzen und einigen mikroskopischen Tieren produziert, auf die Streß wie z.B. Trockenheit einwirkt (Crowe und Clegg, 1978). Bei extremer Trockenheit werden bis zu 20 % des Trockengewichts eines solchen Organismus in Trehalose umgewandelt (Madin und Crowe, 1975). Die Organismen können so einen Zustand vollständiger Dehydrierung überstehen (Crowe und Crowe, 1992). Führt man den dehydrierten Organismen wieder Wasser zu, kommt ihr normaler Stoffwechsel innerhalb kurzer Zeit wieder in Gang (Crowe et al., 1987). Myoglobin und andere Biomoleküle können somit in Gegenwart von Trehalose getrocknet werden, ohne dabei zu denaturieren.

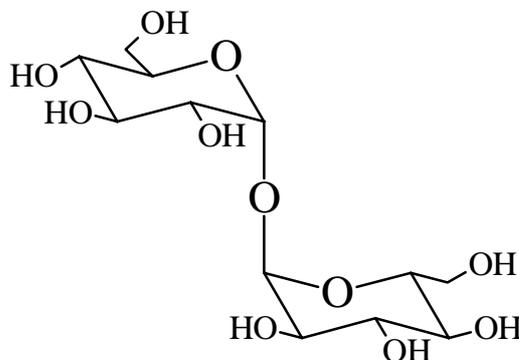


Abb. 2: Strukturformel von α -(1,1)-Trehalose

Von der Dynamik des Proteins in einem Gleichgewichtszustand, der durch Auslenkungen der Atome um eine mittlere Gleichgewichtsposition charakterisiert ist, sind diejenigen Bewegungen zu trennen, welche die Konformation des Proteins ändern. Die Konformation des Proteins ändert sich beispielsweise, wenn das Protein aus einem Ungleichgewichtszustand durch Energiezufuhr bzw. Temperaturerhöhung in einen Gleichgewichtszustand relaxiert. Während der Relaxation in den Gleichgewichtszustand werden Proteinbewegungen initiiert, die zu strukturellen Änderungen im Protein führen. Die Untersuchung von Ungleichgewichtszuständen ermöglicht es deshalb, die zur Proteindynamik komplementären Informationen über Strukturrelaxationen zu gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Ligandierungszustände sowie unterschiedlicher Proteinumgebungen auf die Dynamik des Hämeisens in Myoglobin mit Hilfe der Mößbauer-Spektroskopie untersucht. Zur Beschreibung der Proteindynamik von Eisen wurde ein Modell, das sogenannte Brownsche Oszillator-Modell, angewendet. Die Relaxation eines metastabilen Zustands von Mb wurde sowohl mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie als auch mit Hilfe der Mößbauer-Spektroskopie untersucht. Ziel der Mößbauer-Experimente an Myoglobin in Trehalose war es, den besonderen Einfluß von Trehalose sowohl auf die Gleichgewichtsschwingungen als auch auf die Proteinrelaxation zu verstehen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Methode der Mößbauer-Spektroskopie

Im Jahre 1958 entdeckte R.L. Mößbauer den Effekt der Kernresonanzabsorption, für den er drei Jahre später mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Aus dem nach ihm benannten Mößbauer-Effekt sind zahlreiche Anwendungen in der Festkörperphysik, Chemie, Biologie, Metallurgie und Archäologie hervorgegangen. Im folgenden soll der Mößbauer-Effekt und die daraus entwickelte spektroskopische Methode vorgestellt werden. Für eine detaillierte Einführung sei auf die umfangreiche Spezialliteratur verwiesen (Danon, 1968; Dickson et al., 1986; Goldanskii und Herber, 1968; Gonser, 1975; Wegener, 1965).

2.1.1 Der Mößbauer-Effekt

Die Emission eines γ -Quants ist aufgrund der Impulserhaltung mit einer Rückstoßenergie E_R verbunden:

$$E_\gamma = E_0 - E_R \quad ; \quad E_R = \frac{\hbar^2 k^2}{2M} \quad (1)$$

wobei $E_0 = \hbar\omega_0$ die Energie des Übergangs, $p = \hbar k$ der Impuls des emittierten Quants und M die Atommasse ist. Analog muß bei der Absorption ein γ -Quant eine um die Rückstoßenergie E_R erhöhte Energie besitzen. Das heißt also, daß die Energie der Emissionslinie um $2E_R$ kleiner ist als die der Absorptionslinie. Im Falle des hier verwendeten Mößbauer-Isotops ^{57}Fe ($\tau_n = 141$ ns, $E_\gamma = 14.4$ keV) wird bei dem Übergang des angeregten Zustandes (Kernspin $I = 3/2$) in den Grundzustand ($I = 1/2$) auf den Kern eine Rückstoßenergie von 2 meV übertragen. Dieser Energieübertrag ist wesentlich größer als die natürliche Linienbreite des Kernübergangs, $\Gamma_{\text{nat}} = 4.67$ neV, so daß die Resonanzbedingung verletzt ist. Wird der Kern jedoch in einen Festkörper eingebaut, kann der Rückstoß von dem Festkörper kollektiv aufgenommen werden. Die Rückstoßenergie geht wegen der in erster Näherung unendlichen Masse des Festkörpers gegen Null. Die Absorption kann ohne Energieverschiebung erfolgen.

Allerdings dürfen bei diesem Prozeß keine Gitterschwingungen angeregt werden, da diese eine Energieverschiebung bewirken würden. Der Anteil der Quanten, die Gitterschwingungen

anregen, läßt sich durch Absenkung der Temperatur verringern. Resonanzabsorption ist also bei Einbau der Kerne in einen Festkörper und bei ausreichend tiefen Temperaturen möglich. Die Energieauflösung der Resonanzabsorption ist dabei lediglich durch die natürliche Linienbreite Γ_{nat} der Mößbauer-Strahlung beschränkt. Für das verwendete ^{57}Fe -Isotop ergibt sich eine relative Energieauflösung von $\Gamma_{\text{nat}}/E_{\gamma} = 3.3 \cdot 10^{-13}$. Dies ist eine extrem hohe Energieauflösung, die es ermöglicht, Energieverschiebungen im neV-Bereich zu messen. Verschiebungen der Resonanzlinie im neV-Bereich treten beispielsweise aufgrund der weiter unten beschriebenen Hyperfeinwechselwirkungen auf. Um die Resonanzbedingung auch bei verschobenen Linien erfüllen zu können, muß die Energie der emittierten γ -Quanten entsprechend verändert werden. Experimentell wird dies erreicht, indem der γ -Emitter auf einen oszillierenden Antrieb montiert wird. Unter Ausnutzung des Doppler-Effektes wird somit die emittierte γ -Strahlung, deren Ruheenergie gleich E_s ist, in Abhängigkeit von der oszillierenden Antriebsgeschwindigkeit v variiert:

$$E_{\gamma} = E_s \left(1 + \frac{v}{c}\right) \quad (2)$$

Die Maximalgeschwindigkeit des Antriebs legt dabei den Energiebereich der emittierten Mößbauer-Strahlung fest. Für typische Antriebsgeschwindigkeiten von einigen mm/s wird die Energie in der Größenordnung von 10 neV variiert.

2.1.2 Die Hyperfeinwechselwirkungen

Physikalische Ursache von Linienverschiebungen ist die elektromagnetische Wechselwirkung zwischen dem absorbierenden Kern und der ihn umgebenden Elektronenstruktur. Formal resultieren die Wechselwirkungsterme aus einer Entwicklung der elektrischen und magnetischen Multipole, die zu der elektrischen Monopolwechselwirkung, auch Isomerieverschiebung genannt, der magnetischen Dipolwechselwirkung und der elektrischen Quadrupolwechselwirkung führen. Alle weiteren Terme höherer Ordnung können in der Multipolentwicklung aufgrund ihrer Kleinheit vernachlässigt werden.

Isomerieverschiebung

Wenn sich die Mößbauerkerne von Quelle und Absorber in verschiedenen Materialien befinden, tritt eine Verschiebung der Absorptionslinie bezüglich der Geschwindigkeit des

Mößbauer-Antriebs $v = 0$ auf. Dieser Effekt wird Isomerieverschiebung genannt und beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung des endlich ausgedehnten Kerns mit den Elektronen der Hülle. Die Energie eines ausgedehnten Kerns ist gegenüber der eines punktförmigen Kerns um

$$\Delta E = \frac{2\pi}{3} Z e^2 |\Psi(0)|^2 \langle r^2 \rangle \quad (3)$$

erhöht, wobei Z die Kernladungszahl, e die Elementarladung, $\langle r^2 \rangle$ der mittlere Kernradius und $|\Psi(0)|^2$ die Elektronendichte am Ort des ausgedehnten Kerns ist. Besitzt ein Kern im angeregten Zustand einen anderen Radius als im Grundzustand (Indizes e bzw. g), wie das beispielsweise bei ^{57}Fe der Fall ist, so nimmt die Übergangsenergie folgende Form an:

$$\Delta E = \frac{2\pi}{3} Z e^2 |\Psi(0)|^2 (\langle r^2 \rangle_e - \langle r^2 \rangle_g) \quad (4)$$

Eine Änderung der chemischen Umgebung des Kerns beeinflusst darüber hinaus die Ladungsverteilung und damit die Elektronendichte $|\Psi(0)|^2$ am Kernort. Die Herleitung eines quantitativen Ausdrucks für die Isomerieverschiebung folgt aus der oben erwähnten Multipolentwicklung. Für die Verschiebung δ der Resonanzlinie relativ zur Geschwindigkeit $v = 0$ ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\delta = \text{const.} \cdot (|\Psi_a(0)|^2 - |\Psi_s(0)|^2) (\langle r^2 \rangle_e - \langle r^2 \rangle_g) \quad (5)$$

Dabei sind $|\Psi_s(0)|^2$ und $|\Psi_a(0)|^2$ die Elektronendichten von Quelle bzw. Absorber am Kernort. In der experimentellen Praxis kommt bei der Messung der Isomerieverschiebung ein weiterer Term hinzu, die quadratische Dopplerverschiebung. Sie beruht auf einem relativistischen Effekt, der durch die thermische Bewegung der Atome im Festkörper ebenfalls zu einer Linienverschiebung führt und nicht vom obigen Effekt zu trennen ist. Daher wird als Isomerieverschiebung meist die Summe beider Terme bezeichnet.

Quadrupolaufspaltung

Kerne, die von der Kugelsymmetrie abweichen, besitzen ein Kernquadrupolmoment Q , das mit einem elektrischen Feldgradienten wechselwirken kann. Infolge der Wechselwirkung spalten die Kernniveaus nach dem Betrag von M_I auf (Stark-Effekt). Der Hamiltonian H zur Beschreibung der elektrischen Quadrupolwechselwirkung lautet:

$$H = \frac{eQV_{zz}}{4I(2I+1)} \cdot [3I_z^2 - I(I+1) + \eta(I_x^2 - I_y^2)] \quad (6)$$

Dabei ist η der Asymmetrieparameter, der ein Maß für die Anisotropie des Feldgradienten mit den Tensorkomponenten ist:

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (7)$$

Löst man das Eigenwertproblem für Grund- und Anregungszustand, so erhält man für den Fall von ^{57}Fe eine Energieaufspaltung von:

$$\Delta E_Q = \frac{eQV_{zz}}{2} \cdot \sqrt{1 - \frac{\eta^2}{3}} \quad (8)$$

Magnetische Hyperfeinaufspaltung

Durch die Wechselwirkung des magnetischen Dipolmoments des Kerns mit einem Magnetfeld am Kernort spalten die Kernniveaus auf. Diese Wechselwirkung wird als Kern-Zeemann-Effekt bezeichnet. Im Gegensatz zu dem der elektrischen Quadrupolwechselwirkung zugrundeliegenden Stark-Effekt wird die Entartung bezüglich M_I nun vollständig aufgehoben. Das erforderliche Magnetfeld kann entweder ein von außen angelegtes Feld sein, oder durch die Hüllenelektronen erzeugt werden. In letzterem Fall muß entweder bei sehr tiefen Temperaturen gemessen (4 K) oder ein kleines externes Magnetfeld in der Größenordnung von $B_{\text{ex}} \approx 20$ mT angelegt werden. Das äußere Magnetfeld hat die Aufgabe, eine Quantisierungsachse zu definieren, und wird als sogenannte "weak field stabilization" bezeichnet. Als Beispiel einer magnetischen Aufspaltung sei metallisches Eisen erwähnt, das unter Berücksichtigung der Auswahlregel für magnetische Dipolübergänge ($\Delta M_I = 0, \pm 1$) ein 6-Linien-Spektrum aufweist.

2.1.3 Auswertung von Mößbauer-Spektren

Das Transmissionsintegral

Im folgenden soll kurz dargestellt werden, wie sich eine Absorptionslinie im Mößbauer-Spektrum formal beschreiben läßt. Der allgemeine Ausdruck für die Transmission $T(\nu)$, also die Zählrate $Z(\nu)$ in Abhängigkeit von der Antriebsgeschwindigkeit, normiert auf die Zählrate $Z(\infty)$ weitab der Resonanz, lautet:

$$T(\nu) = \frac{Z(\nu)}{Z(\infty)} = 1 - Rf_S \left[1 - \int_{-\infty}^{\infty} Q(\nu, E_S, E) e^{-\sigma_a(E_a, E) n_{Fe}} dE \right] \quad (9)$$

Im Idealfall, d.h. unter Vernachlässigung von Kernbewegungen und Inhomogenitäten, besitzt das Emissionsspektrum der Quelle eine Lorentz-Form:

$$Q(\nu, E_S, E) = \frac{\frac{\Gamma_{nat}}{2\pi}}{\left(E - E_S \left(1 + \frac{\nu}{c} \right) \right)^2 + \left(\frac{\Gamma_{nat}}{2} \right)^2} \quad (10)$$

Analog läßt sich der Absorptionswirkungsquerschnitt des Absorbers als Lorentz-Funktion darstellen:

$$\sigma_a(E_a, E) = \sigma_0 f_a \frac{\left(\frac{\Gamma_{nat}}{2} \right)^2}{(E - E_a)^2 + \left(\frac{\Gamma_{nat}}{2} \right)^2} \quad (11)$$

Zur Transmission trägt nur die durch den Korrekturfaktor R untergrundbereinigte und von der Quelle rückstoßfrei emittierte Strahlung (Anteil f_S) bei. Der Integralausdruck sagt aus, daß das Emissionsspektrum Q der Quelle nach dem Lambert-Beer-Gesetz geschwächt wird. Im Exponenten der Exponentialfunktion steht der Absorptionswirkungsquerschnitt des Absorbers σ_A und die Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} . Die Lorentz-förmigen Verteilungen der Wirkungsquerschnitte Q und σ_A sind abgesehen von den Vorfaktoren und den Energieschwerpunkten E_S (Quelle) bzw. E_A (Absorber) identisch. Γ_{nat} ist die natürliche Linienbreite von ^{57}Fe , $\sigma_0 = 2.56 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$ der Einfangsquerschnitt für 14.4 keV-Quanten und f_a der Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers.

Aus Blitzlichtphotolyse-Experimenten ist bekannt, daß Proteine durch eine Verteilung von strukturellen Subzuständen charakterisiert sind (Austin et al., 1975; Frauenfelder et al., 1988). Jedes Proteinmolekül besitzt also eine etwas unterschiedliche Struktur. Für die Mößbauer-Spektroskopie bedeutet dies, daß infolge der unterschiedlichen Struktur die magnetischen und elektrischen Felder am Ort des Eisens variieren. Aufgrund der Sensitivität des Resonanz-Effektes liefert deshalb jeder Kern ein individuelles Resonanzspektrum. Die Absorptionskurve besteht dann aus einer Überlagerung von Lorentz-Kurven, deren Verteilung durch eine Gauß-Kurve beschrieben werden kann. Die Verteilung von Lorentz-Linien führt zu einer Erhöhung der Halbwertsbreite. Da der physikalische Grund die Inhomogenität der Proteine ist, nennt man

diesen Effekt Inhomogenitätsverbreiterung (Γ_{inh}). Weiterhin besitzt nahezu jede mikroskopische Struktur Verunreinigungen, so daß auch im Wirkungsquerschnitt der Quelle von einer Inhomogenitätsverbreiterung auszugehen ist. Ein weiterer Effekt, der die Linienform verbreitert, ist der sogenannte Dickeneffekt. Er kommt dadurch zustande, daß beim Durchgang der Mößbauer-Strahlung durch einen Absorber mit großer Flächendichte n_{Fe} das Zentrum der Lorentz-verteilten Strahlung überproportional stärker geschwächt wird als die intensitätsarmen Flanken. Infolge der genannten Linienverbreiterungsmechanismen muß die natürliche Linienbreite Γ_{nat} in Gl.(10) durch die experimentelle Linienbreite der Quelle Γ_s bzw. in Gl.(11) durch die experimentelle Linienbreite des Absorbers Γ_a ersetzt werden.

Die dünne Absorbernäherung

Für dünne Absorber, das sind Absorber mit geringer Flächendichte n_{Fe} , kann man die Transmissionsfunktion analytisch berechnen. Die Approximation ist dann gültig, wenn die effektive Absorberdicke t_a die Bedingung erfüllt:

$$t_a \equiv \sigma_0 f_a n_{Fe} \ll 1 \quad (12)$$

In diesem Fall kann die Exponentialfunktion entwickelt und das Integral mit Hilfe des Faltungssatzes analytisch berechnet werden:

$$T(v) = 1 - Rf_s t_a \frac{\Gamma_{nat}}{2} \frac{\frac{\Gamma_s + \Gamma_a}{2}}{\left(E_a - E_s \left(1 + \frac{v}{c} \right) \right)^2 + \left(\frac{\Gamma_s + \Gamma_a}{2} \right)^2} \quad (13)$$

Die Fläche A unter dem Mößbauer-Spektrum berechnet sich aus der Transmission T(v) durch den Ausdruck:

$$A = \int_{-\infty}^{+\infty} [1 - T(v)] dv \quad (14)$$

In der Praxis wird nur über den gemessenen Geschwindigkeitsbereich integriert. Um die gesamte Absorptionsfläche zu erhalten, muß die Maximalgeschwindigkeit so groß sein, daß an den Grenzen des Spektrums keine Resonanz mehr auftritt.

In der dünnen Absorbernäherung kann man das Integral in Gl.(14) analytisch berechnen:

$$A = \frac{1}{2} Rf_s \pi \Gamma f_a \sigma_0 n_{Fe} \quad (15)$$

und daraus den linearen Zusammenhang zwischen der Fläche A und dem Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers f_a ablesen. Aus der gemessenen Fläche erhält man somit bei bekannten Quellenparametern den Lamb-Mößbauer-Faktor f_a des Absorbers.

2.1.4 Der Lamb-Mößbauer-Faktor

Für die Untersuchung von Proteindynamik ist der Lamb-Mößbauer-Faktor f ein wichtiger Parameter. Er gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein γ -Quant rückstoßfrei emittiert bzw. absorbiert wird. Der Anteil der Quanten, die ohne Änderung des Schwingungszustandes am Resonanzprozeß teilnehmen, läßt sich auf vielzählige Arten herleiten. Eine sehr anschauliche Herleitung geht von der Photonenemission als Abstrahlung einer gedämpften elektromagnetischen Welle aus. Das Feld $E(t)$ der Mößbauer-Strahlung ist eine gedämpfte elektromagnetische Welle, deren Kreisfrequenz $\omega_0 = \frac{E_\gamma}{\hbar}$ und deren Dämpfung indirekt proportional zur mittleren Lebensdauer τ des angeregten Kerns ist:

$$E(t) \propto e^{-i(\omega_0 t + kx(t))} \cdot e^{-t/2\tau} \quad (16)$$

Das elektrische Feld zieht mit Lichtgeschwindigkeit über den Absorberkern hinweg. Dabei kann Resonanzabsorption nur solange erfolgen, wie die Welle noch eine merkliche Restamplitude hat. Die Zeit, in der eine Wechselwirkung zwischen dem Strahlungsfeld und der Kernwellenfunktion möglich ist, wird durch die mittlere Lebensdauer τ der ausgesandten γ -Strahlung bestimmt. Nach Ablauf der Zeit $\Delta t = \tau$ ist die Intensität der Welle auf $1/e$ abgeklungen. Nach wesentlich längeren Zeiten ist die Restamplitude so klein, daß eine Wechselwirkung zwischen Strahlungsfeld und Kernwellenfunktion vernachlässigt werden kann. Vollzieht der Absorberkern während der Zeit τ einen Sprung um Δx , macht sich dies in der Amplitude als Phasenverschiebung $e^{i\delta}$ mit einer Phase von:

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta x \quad (17)$$

bemerkbar. Entwickelt man die Exponentialfunktion für kleine Werte von Δx in eine Taylorreihe, ergibt sich ein Faktor $e^{-\frac{1}{2}k^2\Delta x^2}$. Quadriert man schließlich den Amplitudenfaktor und bildet das Zeitmittel, erhält man den Lamb-Mößbauer-Faktor f :

$$f = e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (18)$$

Der Lamb-Mößbauer-Faktor ist im wesentlichen durch das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ des ^{57}Fe -Kerns während des Absorptionsprozesses bestimmt. Die Kenntnis des Lamb-Mößbauer-Faktors erlaubt deshalb die Bestimmung derjenigen Bewegungsmoden, die an das Eisen ankoppeln und deren Schwingungsdauern kleiner als die mittlere Lebensdauer τ des angeregten Eisenkerns sind.

Herleitung des Lamb-Mößbauer-Faktors mit Hilfe der Korrelationsfunktion

Exakt läßt sich der Lamb-Mößbauer-Faktor über die Greensche Selbstkorrelationsfunktion $G_S(\vec{r}, t)$, die in der Neutronen-Streutheorie üblicherweise als Van-Hovesche Selbstverteilungsfunktion bezeichnet wird, herleiten. Damit behält Gl.(18) für beliebige x -Werte ihre Gültigkeit.

Die Greensche Selbstkorrelationsfunktion gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen, das sich zur Zeit $t_0 = 0$ am Ort $\vec{r}_0 = \vec{r}(0)$, zur Zeit $t_1 = t$ am Ort $\vec{r}_1 = \vec{r}(t)$ vorzufinden (van Hove, 1954):

$$G_S(\vec{r}, t) = \langle \delta(\vec{r} - [\vec{r}(t) - \vec{r}(0)]) \rangle \quad (19)$$

Die Korrelationsfunktion verknüpft die Zeit- und Ortsabhängigkeit des diffundierenden Kerns mit dem Mößbauer-Spektrum. Die räumliche Integration der Greenschen Selbstkorrelationsfunktion führt zu der intermediären Streufunktion $I_S(\vec{k}, t)$, deren Fourier-Transformierte in t wiederum dynamische Streufunktion $S_S(\vec{k}, \omega)$ genannt wird. Letzere ist proportional zum Absorptionswirkungsquerschnitt $\sigma_a(\omega)$:

$$I_S(\vec{k}, t) = \int d\vec{r} \cdot e^{i\vec{k}\vec{r}} \cdot G_S(\vec{r}, t) = \langle e^{i\vec{k}[\vec{r}(t) - \vec{r}(0)]} \rangle = \langle e^{i\vec{k}\vec{r}} \rangle \quad (20)$$

$$S_S(\vec{k}, \omega) = \int dt \cdot \exp\left\{-i\omega t - \frac{\Gamma_{\text{nat}}}{2\hbar} t\right\} \cdot I_S(\vec{k}, t) \quad (21)$$

$$\sigma_a(\vec{u}) = \frac{\tilde{A}_{\text{nat}}}{4\hbar} \sigma_0 \cdot S_S(\vec{k}, \omega) \quad (22)$$

wobei $\vec{r} = \vec{r}(t) - \vec{r}(0)$ die Auslenkung des Teilchens, \vec{k} der Wellenvektor, ω die Kreisfrequenz, Γ_{nat} die natürliche Linienbreite und σ_0 der Wirkungsquerschnitt für resonante Absorption der emittierten Strahlung ist. Das Skalarprodukt von \vec{k} und \vec{r} ist identisch dem Produkt aus der Wellenzahl k und Δx , wobei letzteres die Auslenkung des Teilchens in Richtung \vec{e}_k der einfallenden Welle ist.

Mit Hilfe der Kumulanten-Expansion läßt sich die intermediäre Streufunktion $I_S(\vec{k}, t)$ in ein unendliches Produkt von Exponentialfunktionen umschreiben:

$$I_S(k, t) = \langle e^{ik\Delta x} \rangle = \exp \left\{ \sum_{N=1}^{\infty} \frac{(ik)^N}{N!} \kappa_N \right\} \quad (23)$$

mit:

$$\kappa_1 = \langle \Delta x \rangle \quad (24)$$

$$\kappa_2 = \langle \Delta x^2 \rangle - \kappa_1^2 \quad (25)$$

$$\kappa_3 = \langle \Delta x^3 \rangle - 3\kappa_1 \kappa_2 - \kappa_1^3 \quad (26)$$

$$\kappa_4 = \langle \Delta x^4 \rangle - 4\kappa_1 \kappa_3 - 6\kappa_1^2 \kappa_2 - 3\kappa_2^2 - \kappa_1^4 \quad (27)$$

Der Vorteil der Kumulanten-Expansion liegt darin, daß im Falle einer Gauß-Verteilung alle Kumulanten κ_n mit $n \geq 3$ verschwinden (Dietrich und Fenzl, 1989). Mit $\langle \Delta x \rangle = 0$ ist in diesem Fall $\kappa_2 = \langle \Delta x^2 \rangle$ als einziger Kumulant von Null verschieden, so daß die Mittelung der Exponentialfunktion in Gl.(23) ohne weitere Näherung in folgenden Ausdruck übergeht:

$$I_S(k, t) = e^{-\frac{k^2}{2} \langle \Delta x^2 \rangle} = e^{-\frac{k^2}{2} \left\{ \langle x^2(0) \rangle + \langle x^2(t) \rangle - 2\langle x(0)x(t) \rangle \right\}} \quad (28)$$

Der Lamb-Mößbauer-Faktor f gibt den Anteil der rückstoßfrei emittierten bzw. absorbierten γ -Quanten an ($S_S(\vec{k}, 0)$). Die Resonanzabsorption ist somit ein elastischer Prozeß, für den die Absorberkerne eine verschwindende Energiedifferenz $\hbar \omega \approx 0$ durch Eigenbewegung aufbringen. Im Zeitraum entspricht diese verschwindende Energiedifferenz der Grenzwertbildung $t \rightarrow \infty$. Infolge einer endlichen Korrelationszeit τ_k des Kernortes geht $\lim_{t \rightarrow \infty} \langle x(0)x(t) \rangle$ gegen Null und mit Hilfe der Identität der Varianzen

$$\langle x^2(0) \rangle = \langle x^2(\infty) \rangle = \langle x^2 \rangle \quad (29)$$

erhält man aus Gl.(28) den Lamb-Mößbauer-Faktor für beliebige Werte von x :

$$f = e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (30)$$

2.1.5. Das Modell des Brownschen Oszillators

Die Transmission in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Mößbauer-Antriebs $T(v)$ (Gl.(9)) wird maßgeblich von der Art der Bewegung der absorbierenden Eisenkerne bestimmt. Bis zu einer charakteristischen Temperatur T_C führen Phononenanregung bzw. -vernichtung zu rein harmonischen Oszillationen der Eisenatome. Harmonische Oszillationen verändern nicht die Lorentz-Form der Mößbauer-Linien. Erst bei Temperaturen über T_C weicht die Linienform der Absorptionslinien von der Lorentz-Form ab. Dies deutet auf das Einsetzen einer neuartigen Bewegung hin, die explizit in der Transmissionsfunktion berücksichtigt werden muß. Diese neuartige Bewegung wird als proteinspezifische Bewegung bezeichnet, da sie nur bei Proteinen, nicht aber bei herkömmlichen Festkörpern beobachtbar ist. Als theoretisches Modell zur Beschreibung der proteinspezifischen Bewegung wird im folgenden der Brownsche Oszillator verwendet. In dem Modell des Brownschen Oszillators wird eine Bewegungsgleichung für das Eisen aufgestellt, die der Bewegungsgleichung eines gedämpften Oszillators entspricht, der durch eine stochastische Kraft, z.B. die Brownsche Bewegung von Wassermolekülen, angestoßen wird. Die Kenntnis einer Bewegungsgleichung ist von entscheidender Bedeutung, da sie erlaubt, die Korrelationsfunktion $\langle x(t)x(0) \rangle$ zu berechnen, die letztlich zur Berechnung der Transmissionsfunktion $T(v)$ notwendig ist.

Die Bewegungsgleichung der gedämpften Brownschen Oszillation entspricht einer Langevin-Gleichung mit einer rücktreibenden Kraft (Becker, 1978):

$$\ddot{x}_t(t) + 2\hat{\alpha}_t \dot{x}_t(t) + \hat{\omega}_t^2 x_t(t) = \bar{F}(t) \quad (31)$$

Der Parameter β_t ist die Dämpfungskonstante, ω_t die Eigenschwingungsfrequenz und $\bar{F}(t)$ eine statistische äußere Kraft, die im Zeitmittel gleich Null ist. Um an das übliche Bild der Brownschen Bewegung anzuknüpfen, kann man sich vorstellen, daß die äußere Kraft durch diffundierende Wassermoleküle hervorgerufen wird, die an die Proteinoberfläche stoßen. Bereiche des Moleküls versuchen der Bewegung der Wassermoleküle zu folgen. Die Beschleunigung \ddot{x}_t wird durch die Reibung $\beta_t \dot{x}_t$ gebremst. Eine harmonische rücktreibende Kraft $\omega_t^2 x_t$ sorgt schließlich dafür, daß jedes Molekülsegment nur in einem engen Bereich von der mittleren Struktur abweichen kann. Die aus der Bewegungsgleichung des Brownschen

Oszillators in Gl.(31) berechnete Korrelationsfunktion $\langle x(t)x(0) \rangle$ lautet (Chandrasekhar, 1943):

$$\langle x(t)x(0) \rangle = \frac{k_B T}{m_t \omega_t} e^{-\beta_1 t} \left[\cosh \beta_1 t + \frac{\beta_t}{\beta_1} \sinh \beta_1 t \right] \quad (32)$$

mit:

$$\beta_1^2 = \beta_t^2 - \omega_t^2 \quad (33)$$

Die Korrelationsfunktion in Gl.(32) gilt für den Fall einer sehr starken Dämpfung. Wie sich zeigen läßt, ist für Proteine die Annahme einer stark überdämpften Schwingung gültig. Setzt man diese Korrelationsfunktion in die intermediäre Streufunktion in Gl.(28) ein und berechnet hieraus die Fourier-Transformierte (Gl.(21)), erhält man in der Näherung eines stark überdämpften Brownschen Oszillators folgenden Term für die dynamische Streufunktion:

$$S_S(E, E_a) = \frac{1}{\delta} e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle} \sum_{N=0}^{\infty} \frac{[k^2 \langle x_t^2 \rangle]^N}{N!} \frac{\frac{\tilde{A}_{\text{nat}}}{2} + N\hbar\alpha_t}{(E - E_a)^2 + \left(\frac{\tilde{A}_{\text{nat}}}{2} + N\hbar\alpha_t \right)^2} \quad (34)$$

wobei k die Wellenzahl, $\langle x_t^2 \rangle$ das mittlere Auslenkungsquadrat der überdämpften Schwingung und Γ_{nat} die natürliche Linienbreite der Mößbauer-Strahlung ist. Der Parameter α_t gibt das Verhältnis der Eigenschwingungsfrequenz zur Dämpfung an:

$$\alpha_t = \frac{\omega_t^2}{2\beta_t} \quad (35)$$

Aus der dynamischen Streufunktion errechnet sich der Wirkungsquerschnitt des Absorbers (Gl.(22)) und daraus wiederum die Transmissionsfunktion in der dünnen Absorbernäherung:

$$T(v) = 1 - n_{\text{Fe}} \sigma_0 R f_s f_a e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle} \frac{\Gamma_{\text{nat}}}{2} \frac{1}{2} \cdot \sum_{N=0}^{\infty} \frac{[k^2 \langle x_t^2 \rangle]^N}{N!} \frac{\frac{\Gamma_a + \tilde{A}_S}{2} + N\hbar\alpha_t}{\left[E_a - E_s \left(1 - \frac{v}{c} \right) \right]^2 + \left[\frac{\Gamma_a + \tilde{A}_S}{2} + N\hbar\alpha_t \right]^2} \quad (36)$$

Die Transmissionsfunktion setzt sich aus einer Summe von Lorentz-Linien zusammen, deren Breite mit N zunimmt. Für $N = 0$ reduziert sich diese Summe auf eine einzige schmale Lorentz-Linie. Wie bereits oben erwähnt, sind Lorentz-Linien in der Transmissionsfunktion auf harmonische Oszillationen zurückzuführen. Die schmale Lorentz-Linie spiegelt folglich das Spektrum derjenigen Eisenatome wieder, die aufgrund der Kopplung an das Phononenbad rein

harmonisch schwingen. Alle weiteren Beiträge der Transmissionsfunktion ($N > 0$) sind Lorentz-Linien, die durch gedämpfte Brownsche Oszillationen verbreitert sind. Die Dämpfung dieser Schwingungen ist dabei so stark, daß der Kriechfall eintritt, d.h. überhaupt keine Schwingungen mehr zustande kommen. Die Schwingung klingt exponentiell ab. Die Bewegung wird deshalb als quasi-diffusiv bezeichnet. Infolge der rücktreibenden Kraft ist die Auslenkung begrenzt, weshalb man auch von quasi-diffusiver Bewegung in einem begrenzten Raum spricht.

2.2 Die Optische Absorptionsspektroskopie

Myoglobin eignet sich sehr gut für optische Absorptionsmessungen, da es ein starkes Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich besitzt. Dieses Absorptionsmaximum wird als Soret-Bande bezeichnet und resultiert aus einem erlaubten Dipolübergang der π -Elektronenwolke der Hämgruppe. Die π -Elektronenwolke der Hämgruppe ist über die ringförmig angeordneten Kohlenstoffatome ausgeschmiert. Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda \approx 400$ nm führt die delokalisierte π -Elektronenwolke in den angeregten Zustand π^* über. Durch die Kopplung dieses elektronischen Übergangs an Vibrationen wird das Spektrum im Bereich der Soret-Bande temperaturabhängig. Mißt man die optische Absorption im Bereich der Soret-Bande über einen gewissen Temperaturbereich, können somit temperaturabhängige Veränderungen der Vibrationen gemessen werden.

Die Fähigkeit, Licht zu absorbieren, kann mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie gemessen werden. Der prinzipielle Aufbau eines optischen Spektrometers ist in Abb. 3 dargestellt.

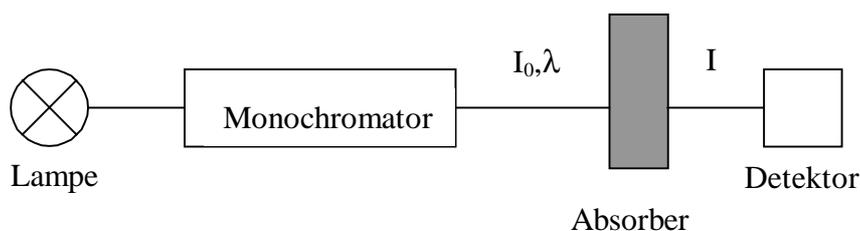


Abb. 3: Prinzip der optischen Absorptionsspektroskopie

Mit Hilfe eines Monochromators wird weißes Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich monochromatisiert. In dem Strahlengang des monochromatisierten Lichts der Wellenlänge λ befindet sich der Absorber, der das Licht nur teilweise absorbiert. Das transmittierte Licht wird von dem Detektor in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgenommen. Die Schwächung des einfallenden Lichtstrahls durch die zu untersuchende Probe kann somit als Funktion der Wellenlänge gemessen werden. Nimmt man an, daß die Moleküle in dem Absorber einander nicht beeinflussen, wird das einfallende Licht auf der Strecke dl um die Intensität dI geschwächt. Die Integration über die transmittierte Strecke in dem Absorber liefert das Lambert-Beer-Gesetz:

$$I(\nu) = I_0 \cdot e^{-\mu(\nu) \cdot x} \quad (37)$$

wobei I_0 die Intensität der einfallenden Strahlung und I die Intensität der transmittierten Strahlung ist. Die Intensität I nimmt exponentiell mit dem Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ und der transmittierten Strecke x im Absorber ab.

Im folgenden soll für den Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ ein analytischer Ausdruck abgeleitet werden, der eine Interpretation der Absorptionsspektren ermöglicht. Bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung regt ein Photon einen elektronischen Übergang in der Probe an. Dabei koppelt das elektromagnetische Feld des Quants an das Dipolmoment des Übergangs. Das Quant wird dabei absorbiert und das Molekül geht in einen angeregten Zustand über, der durch Reemission oder strahlungslose Prozesse zerfällt. Die Übergangswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit, W_{ba} , mit der das elektronische System vom Grundzustand a in den angeregten Zustand b angeregt wird, ist durch Fermis Goldene Regel definiert:

$$W_{ba} = \frac{16\pi^4}{3h^2} \cdot \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot |R_{ba}|^2 \cdot \rho(\nu) \cdot \delta(\nu - \nu_{ba}) \quad (38)$$

wobei ϵ_0 die allgemeine Dielektrizitätskonstante, $|R_{ba}|$ das optische Dipolmoment, $\rho(\nu)$ die Energiedichte des elektromagnetischen Feldes und ν_{ba} die Übergangsfrequenz zwischen Grund- und Anregungszustand darstellt. Multipliziert man die Übergangswahrscheinlichkeit W_{ba} mit der Energie des elektronischen Übergangs $h\nu_{ba}$ und mit der Anzahl der Absorbermoleküle pro Fläche n_0 , erhält man daraus den differentiellen Intensitätsverlust dI pro transmittierter Strecke dl :

$$-dI = h\nu_{ba} \cdot W_{ba} \cdot n_0 \cdot dl \quad (39)$$

Unter Verwendung von Gl.(38) kann aus diesem Ausdruck die Intensität berechnet werden. Löst man Gl.(37) nach dem Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ auf und setzt den gewonnenen Term für die Intensität ein, läßt sich der Absorptionskoeffizient folgendermaßen schreiben:

$$\mu(\nu) = \text{const.} \cdot \nu_{ba} \cdot |R_{ba}|^2 \cdot \frac{\Gamma}{(\nu - \nu_{ba})^2 + \Gamma^2} \quad (40)$$

In diesem Ausdruck wurde bereits die anfänglich gemachte Annahme einer deltaförmigen Energiedifferenz zwischen Anfangs- und Endzustand, $\delta(\nu - \nu_{ba})$, an die reale Situation angepaßt, d.h. die delta-Funktion wurde aufgrund der endlichen Lebensdauer Γ des angeregten Zustands in eine Lorentz-Funktion, $\frac{\Gamma}{(\nu - \nu_{ba})^2 + \Gamma^2}$, umgewandelt.

Als nächster Schritt wird die vereinfachte Betrachtung eines isolierten elektronischen Systems fallengelassen und die Kopplung des elektronischen Übergangs mit Gitterschwingungen berücksichtigt. Unter Berücksichtigung der Kopplung des elektronischen Übergangs mit Gitterschwingungen wird die Übergangsfrequenz ν_{ba} berechnet. Hierzu werden zunächst die Energien des Grund- und Anregungszustands bestimmt.

Bei der Kopplung eines elektronischen Systems mit Gitterschwingungen wird dem System zusätzliche Energie in Form von Schwingungsenergie zugeführt. Quantenmechanisch lassen sich Gitterschwingungen wie eine Summe von harmonischen Oszillatoren behandeln. Die Energien des Grund- und Anregungszustandes E_a bzw. E_b werden deshalb in eine Nullpunktenergie η (des isolierten elektronischen Systems) und in den Schwingungsterm eines harmonischen Oszillators zerlegt:

$$E_a = \eta_a + \frac{1}{2} h^2 \sum_j \nu_j^2(a) \cdot q_j^2 \quad (41)$$

$$E_b = \eta_b + \frac{1}{2} h^2 \sum_j \nu_j^2(b) \cdot Q_j^2 \quad (42)$$

wobei ν_j die Schwingungsfrequenz des j-ten Atoms und q_j bzw. $Q_j = q_j - \Delta_j$ die generalisierte Ortskoordinate der Schwingung im Grund- bzw. Anregungszustand ist. Der Index a bezieht sich auf den Grundzustand, der Index b auf den Anregungszustand. In Abb. 4 sind die Energieniveaus von Grund- und Anregungszustand im Bild der generalisierten Koordinate q_j bzw. Q_j dargestellt. Die Parameter n und m bezeichnen die Energieniveaus der harmonischen Oszillatoren.

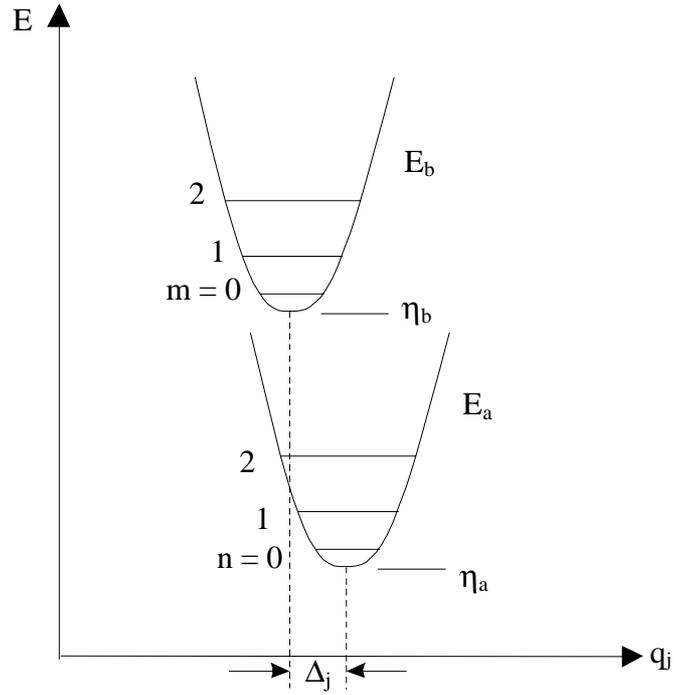


Abb. 4: Darstellung der Energieniveaus von Grund- und Anregungszustand im Bild der generalisierten Koordinaten. Die Energie in Grund- und Anregungszustand kann in eine Nullpunktenergie η und einen Schwingungsterm, der durch die Quantenzahlen n bzw. m der harmonischen Oszillatoren charakterisiert ist, zerlegt werden.

Um die Kopplung des elektronischen Übergangs an Vibrationen mathematisch erfassen zu können, wird die Energiedifferenz zwischen Grund- und Anregungszustand in eine Fourier-Reihe bis zu Termen 2. Ordnung entwickelt:

$$E_b - E_a = \Delta E_0 + \sum_j \alpha_j q_j + \frac{1}{2} \sum_j \alpha_{jj} q_j^2 \quad (43)$$

mit

$$\Delta E_0 = \Delta E_{q=0} = \eta_b - \eta_a + \frac{1}{2} h^2 \sum_j v_j^2(b) \Delta_j^2 \quad (44)$$

$$\alpha_j = \frac{\partial \Delta E}{\partial q} \Big|_{q=0} = -h^2 \sum_j v_j^2(b) \Delta_j \quad (45)$$

$$\alpha_{jj} = \frac{\partial^2 \Delta E}{\partial q^2} \Big|_{q=0} = h^2 \sum_j [v_j^2(b) - v_j^2(a)] \quad (46)$$

Aus der Fourier-Reihe kann die lineare und die quadratische Kopplung des elektronischen Übergangs mit den Gitterschwingungen abgelesen werden. Die lineare bzw. quadratische Kopplung erhält man aus der Fourier-Reihe durch Einbeziehung Terme erster bzw. zweiter

Ordnung. In der linearen Kopplung ist der Koeffizient des quadratischen Termes, α_{jj} , gleich Null. Unter Verwendung von Gl.(46) folgt aus dieser Bedingung die Identität der Schwingungsfrequenzen:

$$v_j^2(b) = v_j^2(a) = v_j^2 \quad (47)$$

In der linearen Kopplung sind also die Schwingungsfrequenzen in Grund- und Anregungszustand gleich. Lediglich der Schwerpunkt der Schwingung wird um Δ_j verschoben. Die Übergangsfrequenz v_{ba} setzt sich in der linearen Kopplung aus der rein elektronischen Übergangsfrequenz v_{00} und der Differenz der Vibrationsmoden in Einheiten der Schwingungsfrequenz v_j zusammen:

$$v_{ba}^{\text{lin}} = v_{00} + \sum_j (m_j - n_j) v_j \quad (48)$$

Der rein elektronische Übergang ist dadurch charakterisiert, daß weder Grund- noch Anregungszustand an Vibrationsmoden gekoppelt sind. In Abb. 4 entspricht der rein elektronische Übergang dem Übergang zwischen dem Grundzustand mit der Quantenzahl $n = 0$ und dem Anregungszustand mit der Quantenzahl $m = 0$.

Wie in Cupane et al. (1995) gezeigt wird, wird die Übergangsfrequenz in der quadratischen Kopplung temperaturabhängig:

$$v_{ba}^{\text{quadrat.}} = v_0(T) + \sum_j (m_j - n_j) v_j \quad (49)$$

An die Stelle der rein elektronischen Übergangsfrequenz v_{00} der linearen Kopplung tritt bei der quadratischen Kopplung die temperaturabhängige Frequenz $v_0(T)$. In der weiteren Berechnung des Absorptionskoeffizienten wird die quadratische Kopplung des elektronischen Übergangs mit Gitterschwingungen berücksichtigt. Eine analytische Darstellung des Absorptionskoeffizienten $\mu(\nu)$ erfordert allerdings die Separation der Vibrationsmoden in niedrige und hohen Frequenzen (Chan und Page, 1983, Chan und Page, 1984, Šrajer et al., 1986). Die niedrigen Frequenzen unterscheiden sich von den hohen Frequenzen dadurch, daß höhere Schwingungszustände im Grundzustand durch thermische Anregung besetzt werden können. Optische Übergänge, die an niederfrequente Vibrationsmoden gekoppelt sind, können deshalb von $n = 0,1,2,\dots$ nach $m = 0,1,2,\dots$ erfolgen. Im Gegensatz dazu sind die Energieniveaus der hochfrequenten Vibrationsmoden so hoch, daß sie nicht thermisch angeregt werden können. Anregungen erfolgen deshalb nur von dem Zustand $n = 0$ nach $m = 0,1,2,\dots$

Die hochfrequenten Vibrationsmoden werden explizit in Gl.(49) berücksichtigt. Die niedrigen Frequenzen gehen in die temperaturabhängige Frequenz $\nu_0(T)$ ein, die sich folgendermaßen schreiben läßt (Di Pace et al., 1992):

$$\nu_0(T) = \nu_{00} - \frac{1}{4} (1 - R_l) \sum_{l=1}^{N_l} \nu_{lj} \coth \frac{h\nu_{lj}}{2k_B T} + \sum_{j=1}^{N_l} S_l R_l \nu_{lj} - \frac{1}{4} \sum_{j=1}^{N_h} (1 - R_{hj}) \nu_{hj} \quad (50)$$

In Gl.(50) beziehen sich die Parameter mit Index l auf niederfrequente Gitterschwingungen (l für low) bzw. die Parameter mit Index h auf hochfrequente Gitterschwingungen (h für high). Der Parameter N gibt die Zahl der Gitterschwingungen an, R ist die quadratische und S die lineare Kopplungskonstante. Die linearen Kopplungskonstanten sind proportional zu der Differenz der Gleichgewichtspositionen von Grund- und Anregungszustand, Δ_j , und der Frequenz der hochfrequenten Schwingungen ν_j :

$$S_j = \frac{h}{2} \nu_j \cdot \Delta_j^2 \quad (51)$$

Die quadratische Kopplungskonstante R_j gibt das Verhältnis der Schwingungsfrequenzen des Atoms j im Anregungs- bzw. Grundzustand an:

$$R_j = \frac{\nu_j^2(b)}{\nu_j^2(a)} \quad (52)$$

Die quadratische Kopplungskonstante ist näherungsweise gleich eins, d.h. die Schwingungsfrequenzen in Grund- und Anregungszustand sind ungefähr gleich groß.

Als einziger unbekannter Parameter in dem Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ in Gl.(40) verbleibt nunmehr noch das optische Dipolelement $|R_{ba}|$. Für die Wellenfunktionen des Diolmatrizelementes $R_{ba} = \langle \Psi_b | e\vec{r} | \Psi_a \rangle$ ist die Born-Oppenheimer-Näherung anzuwenden. In der Born-Oppenheimer-Näherung kann die Elektronen- und die Kernbewegung in gewissem Umfang voneinander getrennt werden, d.h. als quasi unabhängig voneinander behandelt werden. Dies ist dadurch begründet, daß sich die Kerne aufgrund ihrer größeren Masse viel langsamer bewegen als Elektronen. Unter Verwendung der Born-Oppenheimer-Näherung kann der Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ in seiner endgültigen Form dargestellt werden (Cupane et al., 1995).

Der Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ ist eine Voigt-Kurve, die aus der Faltung einer Lorentz- mit einer Gauß-Kurve entsteht:

$$\mu(\nu) = C \cdot \nu \cdot \{L(\nu) \otimes G(\nu)\} \quad (53)$$

mit der Lorentz-Funktion $L(\nu)$:

$$L(\nu) = \sum_{m_{h1}, m_{h2}, \dots, m_{hN}} \left[\frac{\prod_{j=1}^N (S_{hj})^{m_{hj}} \cdot e^{-S_{hj}}}{m_{hj}!} \right] \frac{\Gamma}{\left[\nu - \nu_0(T) - \sum_{j=1}^N m_{hj} R_{hj} \nu_{hj} \right]^2 + \Gamma^2} \quad (54)$$

und der Gauß-Funktion $G(\nu)$:

$$G(\nu) = \frac{1}{\sigma(T)} \cdot e^{-\frac{\nu^2}{2\sigma^2(T)}} \quad (55)$$

Vernachlässigt man vorerst die Vibrationsmoden, so stellt $L(\nu)$ in Gl.(54) eine Lorentz-Funktion mit einer Linienbreite Γ dar, die um den Mittelpunkt $\nu_0(T)$, der temperaturabhängigen Übergangsfrequenz, verteilt ist. Die Linienbreite Γ ist durch die Lebensdauer des angeregten Zustands bestimmt. Bezieht man die Vibrationsmoden in die Betrachtung mit ein, wird der Mittelpunkt der Lorentz-Funktion zu höheren Frequenzen hin verschoben ($\nu_0(T) + \sum_{j=1}^N m_{hj} R_{hj} \nu_{hj}$). Die Verschiebung hängt dabei von den Frequenzen der

hochfrequenten Moden ν_{hj} , deren Vibrationsquantenzahlen m_{hj} und der quadratischen Kopplungskonstanten R_{hj} ab. Die hochfrequenten Vibrationsmoden in der Lorentz-Funktion

(Gl.(54)) werden mit dem Produktterm $\prod_{j=1}^N \frac{(S_{hj})^{m_{hj}} \cdot e^{-S_{hj}}}{m_{hj}!}$ gewichtet, der sich aus den

linearen Kopplungskonstanten der hochfrequenten Schwingungen S_{hj} und den Vibrationsquantenzahlen m_{hj} zusammensetzt.

Die Verbreiterung der Gauß-Kurve, $\sigma(T)$, in Gl.(55) wird maßgeblich durch die niederfrequenten Moden mit den Frequenzen ν_{lj} bestimmt (Di Pace et al., 1992):

$$\sigma^2(T) = \sum_j^{N_l} S_j R_j^2 \nu_{lj}^2 \coth \frac{h\nu_{lj}}{2k_B T} \quad (56)$$

Bei der Berechnung des Absorptionskoeffizienten wurde bisher der Einfluß von Inhomogenitäten unberücksichtigt gelassen. Infolge der Inhomogenität der Probe nehmen die

Parameter in Gl.(54), das sind die lineare und quadratische Kopplungskonstante S und R, die hoch- und niederfrequenten Moden ν_{hj} und ν_{lj} , Ensemble-Durchschnittswerte an. Außerdem unterliegt die rein elektronische Übergangsfrequenz ν_{00} einer Verteilungsfunktion $P(\nu_{00})$, die von dem Ligandierungszustand des Hämeisens und der Inhomogenität des Absorbers abhängt. Der Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ wird mit dieser Verteilungsfunktion gefaltet. Für sechsfach ligandierte Hämproteine behält der Absorptionskoeffizient $\mu(\nu)$ sein ursprüngliches Voigt-Profil bei (Cupane et al. 1995). Die Inhomogenität unter den einzelnen Proteinmolekülen führt für sechsfach ligandierte Proteine lediglich zu einer Verbreiterung der Gauß-Kurve im Absorptionsspektrum. Gl.(56) wird hierbei um eine additive, inhomogene Gaußverbreiterung σ_{inh} erweitert:

$$\sigma^2(T) = \sum_j^{N_l} S_j R_j^2 \nu_{lj}^2 \coth \frac{h\nu_{lj}}{2k_B T} + \sigma_{inh}^2 \quad (57)$$

Im Gegensatz zu sechsfach ligandierten Hämproteinen resultiert die Faltung des Absorptionskoeffizienten mit der Verteilungsfunktion für fünffach ligandierte Hämproteine in einer drastischen Änderung der Linienform. Durch die Faltung wird die ursprünglich symmetrische Voigt-Kurve asymmetrisch. Der Grund für die verschiedenen Linienformen läßt sich anschaulich erklären: Die verschiedenen Positionen, welche die Eisenatome im fünffach ligandierten Zustand relativ zur Hämebene einnehmen können, bewirken die charakteristische Asymmetrie der Soret-Bande. Da im Rahmen dieser Arbeit lediglich sechsfach ligandierte Hämproteine mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie untersucht werden, sei für ein genaueres Studium des Absorptionskoeffizienten für fünffach ligandierte Hämproteine auf Cupane et al. (1995) verwiesen.

3. Experimenteller Aufbau und Probenpräparation

3.1 Experimenteller Aufbau eines Tieftemperatur-Mößbauer-Spektrometers

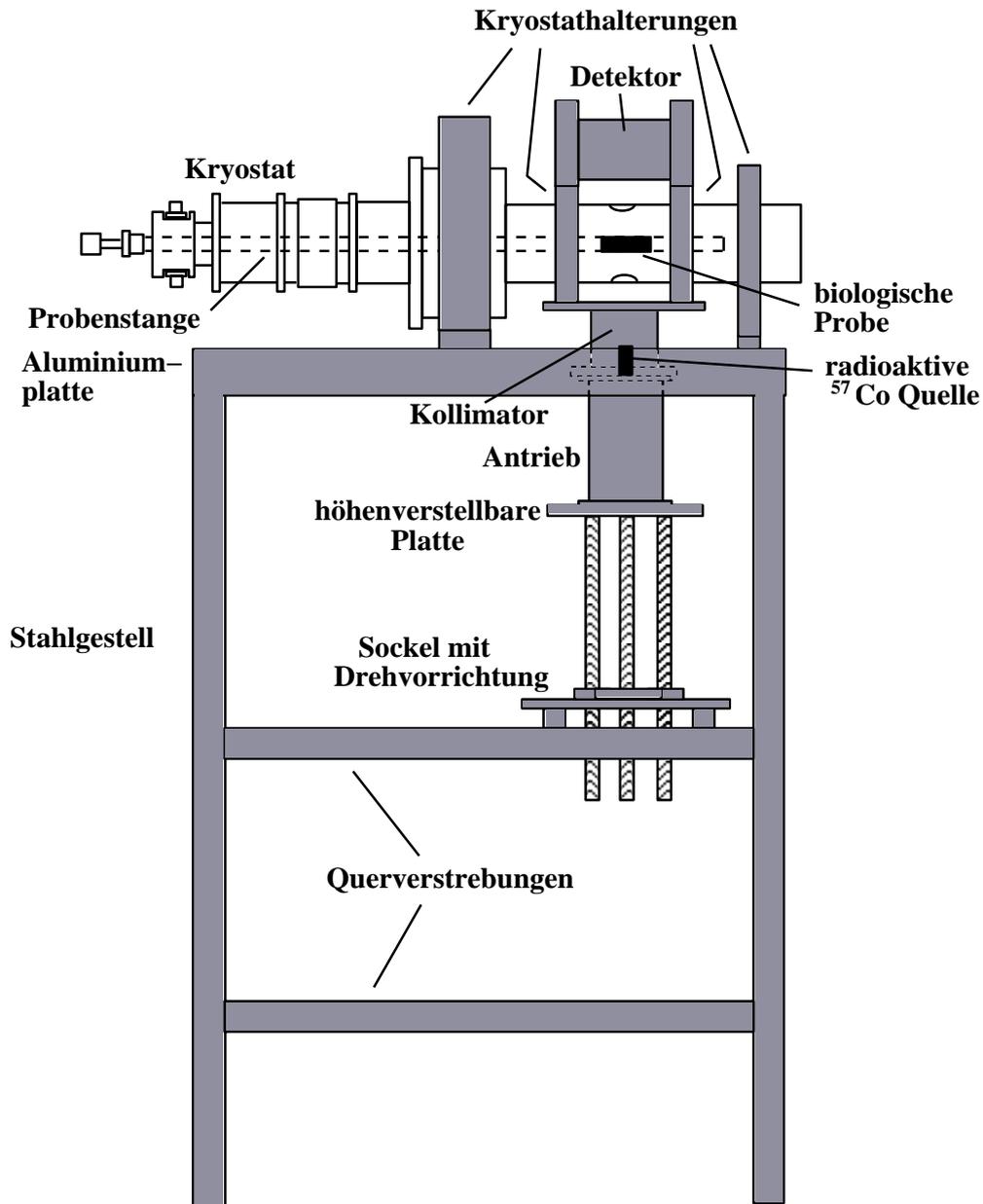


Abb. 5: Aufbau eines Tieftemperatur-Mößbauer-Spektrometers. Der horizontal gelagerte Kryostat ist über Halterungen mit einer massiven Aluminiumplatte verbunden. Die Aluminiumplatte wird von einem Stahlgestell getragen, das mit schwingungsdämpfenden Querverstrebungen versehen ist. Auf einer Querverstrebung ist eine Drehvorrichtung mit höhenverstellbarer Platte befestigt, die ein Auswechseln der in dem Mößbauer-Antrieb befindlichen radioaktiven Quelle ermöglicht. Die kollimierte radioaktive Strahlung trifft auf die im Kryostat befindliche biologische Probe, wobei der von der Probe transmittierte Teil der Strahlung im Detektor registriert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Tieftemperatur-Mößbauer-Spektrometer aufgebaut. Am Beispiel dieses in Abb. 5 dargestellten Spektrometers wird der prinzipielle Aufbau und die Funktionsweise der Apparatur erklärt. Zu den wesentlichen Elementen eines Mößbauer-Spektrometers zählen der Kryostat, der Antrieb und der Detektor. Der Kryostat dient zur Kühlung der Probe, da der Anteil der rückstoßfrei absorbierten Quanten (f_a) bei Raumtemperatur sehr klein ist.

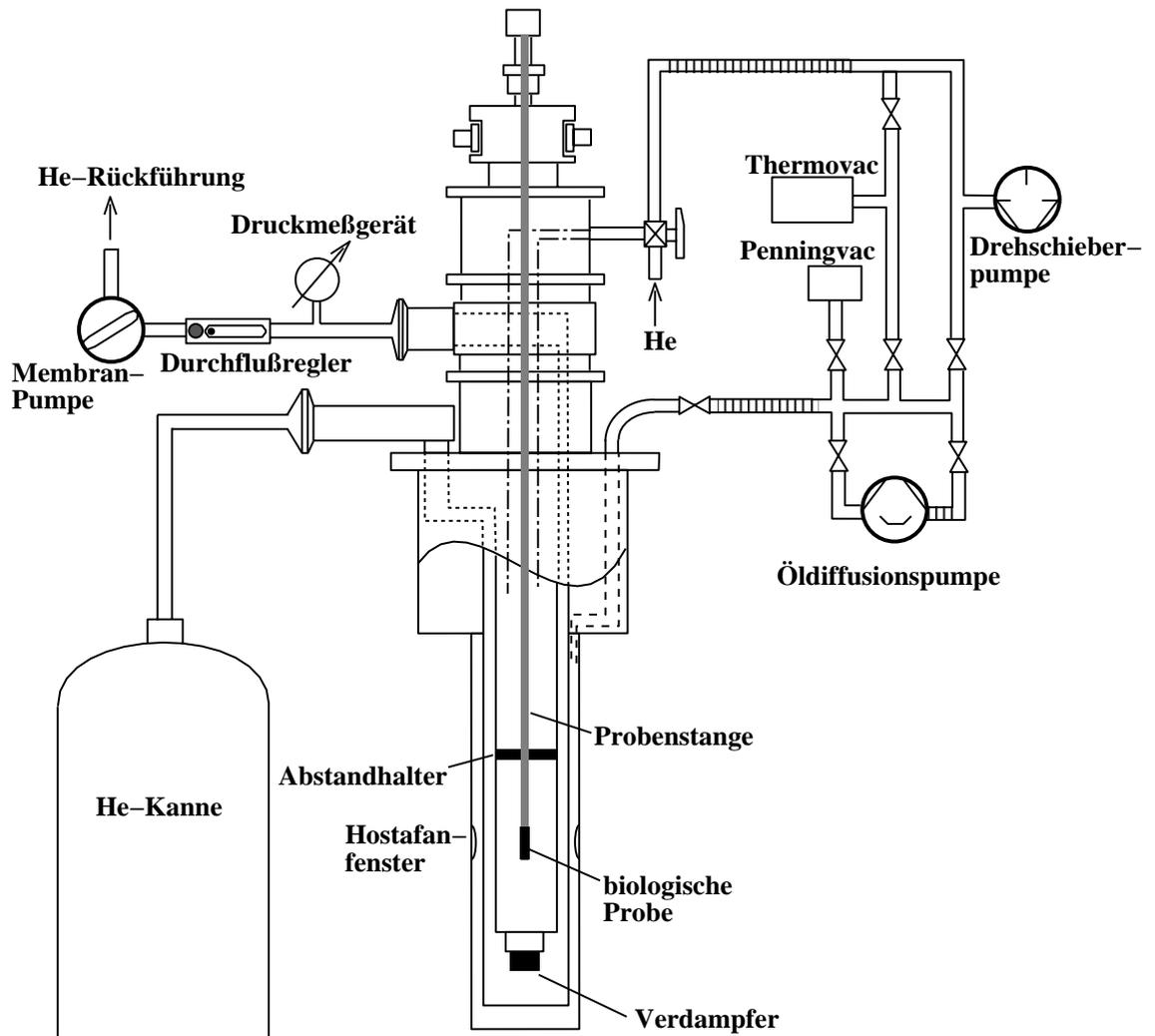


Abb. 6: Der Durchflußkryostat der Fa. CIA wird mit flüssigem Helium gekühlt, das über einen Durchflußregler und eine Membranpumpe kontinuierlich durch den Kryostat gepumpt wird. Das flüssige Helium steht über den Verdampfer mit dem mit gasförmigem Helium gefüllten Probenraum in Kontakt. Der Helium-kalte Verdampferraum ist dabei gegen die Umgebung über einen Vakuumraum thermisch isoliert. Das Vakuum wird mit Hilfe des aus einer Öldiffusions- und Drehschieberpumpe bestehenden Pumpsystems erzeugt. Am Ende der in dem Probenraum befindlichen Probenstange ist die biologische Probe angebracht. Ein Abstandhalter unterdrückt unerwünschte Schwingungen der Probenstange samt Probe. Radioaktive Strahlung gelangt in Höhe der Hostafanfenster in den Kryostat und in die Probe.

Bei der Art und Weise der Kühlung unterscheidet man grundsätzlich zwischen Durchfluß- und Bad-Kryostaten. Während bei Durchfluß-Kryostaten das Kühlmittel kontinuierlich durch die Apparatur gepumpt wird und an einem Verdampfer der Wärmeaustausch stattfindet, werden Bad-Kryostaten mit dem Kühlmittel gefüllt, welches sie dann sukzessive verbrauchen. Der hier verwendete Kryostat ist ein Durchfluß-Kryostat der Fa. CRYO INDUSTRIES OF AMERICA (CIA). Der Kryostat entspricht dem Modell des optischen Kryostat RC152, der entsprechend den Mößbauer-spektroskopischen Anforderungen modifiziert wurde (siehe Abb. 6). Während in einem typischen Aufbau der Kryostat samt Probenstange senkrecht aufgestellt wird, ist er in der vorliegenden Apparatur horizontal gelagert (siehe Abb. 5). Dies hat den Vorteil, daß eine viskose Probe in der Nähe des Gefrierpunkts ihre geometrische Form beibehält. Damit ist eine über den Probendurchmesser konstante Dicke gewährleistet, die wesentlich für eine exakte Auswertung der Mößbauer-Spektren ist. An das Ende der Probenstange wird die biologische Probe montiert und in den Kryostat eingeführt. Der mit Heliumgas gefüllte Probenraum steht über Wärmeleitung durch eine Metallwand in thermischem Gleichgewicht mit dem Verdampfer. Die Temperatur am Verdampfer und somit auch im Probenraum wird durch den Kühlmitteldurchfluß grob geregelt. Die Feinregulierung erfolgt über eine um die Probenstange gewickelte Heizwindung. Die Temperatur des Verdampfers und der Probe wird über Silizium-Dioden und eine externe Regeleinheit (CONDUCTUS, Modell LTC-10) auf $\pm 10^{-3}$ K eingestellt. Die Temperaturregelung ermöglicht es, Mößbauer-Spektren bei verschiedenen Temperaturen durchzuführen und aus der Flächenabnahme des Absorptionsspektrums die mittlere quadratische Auslenkung des Mößbauer-Isotops zu berechnen (vgl. Gl.(15) und Gl.(30)). Wärmeverluste des Kühlmittels werden durch ein Strahlenschild und einen evakuierten Raum, der den Probenraum konzentrisch umgibt, minimiert. Das Vakuum (ca. 10^{-6} mbar) wird durch eine Öldiffusions- und eine Drehschieberpumpe erzeugt und mit Hilfe eines Penning- bzw. Thermovacs kontrolliert.

Die Probe wird von einer radioaktiven Quelle bestrahlt. Sie besteht aus ^{57}Co in einer Rhodium-Matrix und emittiert die als Mößbauer-Linie verwendete 14.4 keV-Strahlung von ^{57}Fe . Die radioaktive Quelle wird auf einem elektromagnetischen Antrieb befestigt. Dieser ist auf einer höhenverstellbaren Platte plaziert, um die Quellen ein- und ausbauen zu können. Über dem Antrieb befindet sich ein Kollimator, der die Streustrahlung aus der Quelle wirkungsvoll absorbiert und dadurch den Untergrund stark reduziert (siehe Abb. 5). Das von einem Frequenzgenerator aufgeprägte sinusförmige Antriebssignal führt zu einer periodischen

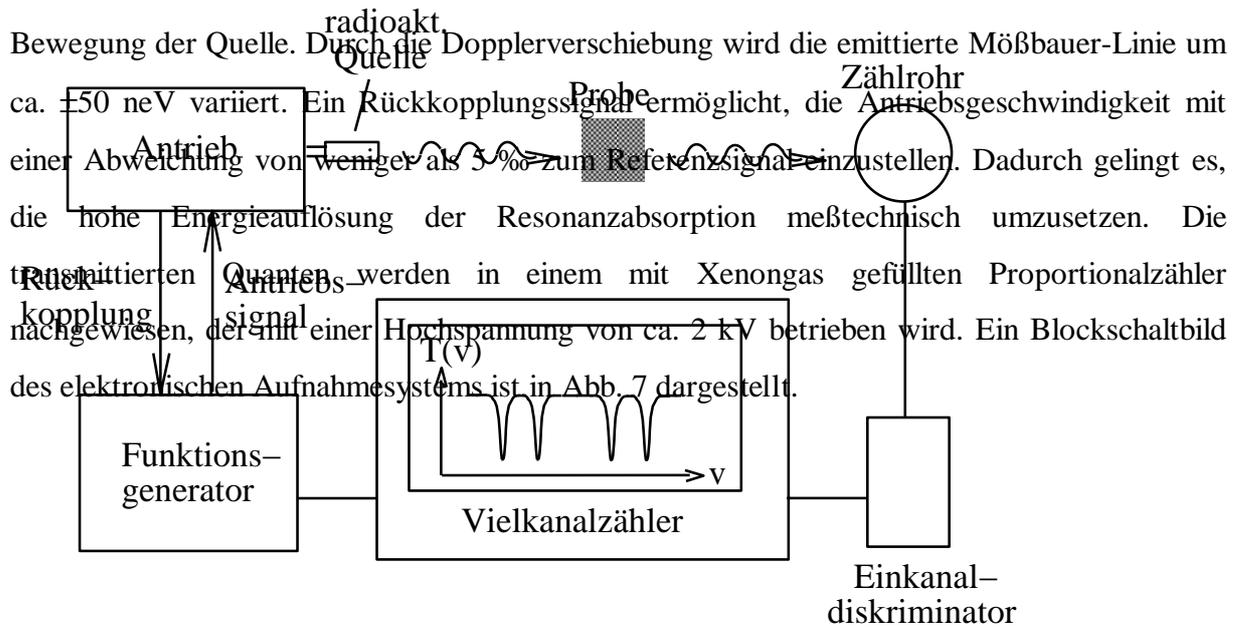


Abb. 7: Die Antriebs- und Registrierelektronik eines Mößbauer-Spektrometers ist im Blockschaltbild dargestellt. Der Funktionsgenerator liefert das Antriebssignal des Mößbauer-Antriebs, durch das die momentane Antriebsgeschwindigkeit der Quelle bzw. die Energie der emittierten Strahlung festgelegt wird. Mit Hilfe des Rückkopplungssignals kann die zu einer bestimmten Zeit vom Zählrohr detektierte Strahlung einer bestimmten Geschwindigkeit zugeordnet werden. Die Zuordnung der Zählrate zu einer bestimmten Antriebsgeschwindigkeit erfolgt dabei in dem Vielkanalzähler, der den Geschwindigkeitsbereich in 1024 Kanäle unterteilt. Mit Hilfe des Einkanaldiskriminators wird die resonante Mößbauer-Strahlung aus dem Spektrum des Compton-gestreuten Untergrundes und der diskreten Röntgenlinien ausgeblendet.

Das Signal der im Zählrohr registrierten Strahlung wird zunächst verstärkt. Im Einkanaldiskriminator wird dann überprüft, ob die Energie des detektierten Quants innerhalb eines vorgegebenen Intervalls mit der Energie des Mößbauer-Übergangs übereinstimmt. Signale, die von anderen Übergängen oder aus dem Untergrund stammen, werden so weitgehend ausgeblendet. Fällt die Strahlung in das Energiefenster, so gelangt das Signal in den Vielkanalanalysator. Mit Hilfe des Funktionsgenerators, der zusätzlich zu dem Antriebssignal synchronisierte Pulse an den Vielkanalanalysator leitet, wird dem detektierten

Quant die entsprechende Dopplergeschwindigkeit zugeordnet. Trägt man die insgesamt detektierten Quanten in Abhängigkeit von der Dopplergeschwindigkeit, d.h. der Energie der Strahlung auf, so erhält man das Mößbauer-Spektrum.

Vibrationen, die in den Mößbauer-Spektren zu Linienverbreiterungen führen, werden durch unterschiedliche Maßnahmen unterdrückt. Zum einen werden Vibrationen der Probenstange durch sogenannte Abstandshalter minimiert. Zum anderen werden Schwingungen des Pumpensystems durch in Beton gebettete Pumpschläuche unterdrückt. Der Kryostat ist außerdem über große Halterungen mit einer massiven Aluminiumplatte verbunden. Diese Aluminiumplatte wird von einem Stahlgestell getragen, das zusätzliche Querverstrebungen aufweist. Schließlich sind auch der Antrieb, der Kollimator und der Kryostat fest miteinander verbunden, so daß externe Vibrationen nur eine Bewegung des Gesamtsystems zur Folge haben. In der beschriebenen Anordnung können Relativbewegungen zwischen Quelle und Probe, welche die Mößbauer-Linien verbreitern würden, weitgehend unterdrückt werden.

3.2 Probenpräparation

Ausgangspunkt bei der Herstellung einer Mößbauer-aktiven Probe ist die Anreicherung mit ^{57}Fe , da der natürliche Isotopengehalt von ^{57}Fe mit 2 % in der Regel zu gering für Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen ist. Für die in dieser Arbeit verwendeten Myoglobin(Mb)-Proben wurde die Anreicherung mit ^{57}Fe nach der Butanon-Säure-Methode durchgeführt. Hierbei wird die Hämgruppe des natürlichen Mbmet chemisch ausgebaut und durch ^{57}Fe -haltiges Hämin ersetzt.

Im Anschluß an die ^{57}Fe -Anreicherung ist eine Reinigung des Proteins erforderlich. Vorliegend wurde das angereicherte Mbmet mit Hilfe der *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) gereinigt. Die sogenannte Ionenaustauschchromatographie erfolgte an einem Kationenaustauscher, an dem das Protein sowie Globin- und Häminreste bindeten. Anschließend ließ man eine Salzlösung (NaCl in 50 mM NaH_2PO_4 , pH = 6.0) mit einem Konzentrationsgradient von 0 M bis 1 M über den Kationenaustauscher fließen, so daß sich das Protein, Globin und Hämin entsprechend ihren isoelektrischen Punkten nacheinander von dem Kationenaustauscher lösten. Die abfließende Lösung wurde in einzelnen Fraktionen gesammelt. Die Mbmet enthaltenden Fraktionen wurden schließlich vereinigt, auf pH = 7.6

umgepuffert und mittels Druckfiltration konzentriert. Die vorliegende Menge an Mbmet wurde mit Hilfe einer optischen Absorptionsmessung aus dem molaren Extinktionskoeffizienten der Soret-Bande berechnet.

Mit Ausnahme der CO-ligandierten Mb-Probe, die in Trehalose getrocknet wurde, wurde Pottwal-Mb verwendet. Für das CO-ligandierte Mb in Trehalose kam Pferde-Mb zur Anwendung.

3.2.1 ^{57}Fe -MbCO in Glycerin

20 mg angereichertes und gereinigtes ^{57}Fe -Mbmet, das in 80 ml 0.1 M Natriumphosphatpuffer (NaH_2PO_4), pH = 6.8 gelöst wurde, wurde mit 240 ml Glycerin vermischt. Daraus ergab sich ein Volumenanteil von 75 % Glycerin. Da das Eisen in Mbmet als Fe^{3+} vorliegt, ist es zur Ligandierung mit CO erforderlich, das Eisen zu reduzieren. Vor der Reduktion wurde die Protein-Trehalose-Lösung mit CO-Gas gesättigt, um eine vollständige CO-Ligandierung zu gewährleisten. Die Reduktion erfolgte mit einem 10-fachen stöchiometrischen Überschuß an Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Die CO-Ligandierung wurde schließlich durch wiederholtes Einleiten von CO-Gas in die Lösung abgeschlossen. Die zähe Flüssigkeit wurde in einen Mößbauer-Probenhalter gefüllt. Wegen der durch Adhäsionskräfte gekrümmten Oberfläche der viskosen Flüssigkeit konnte der Mößbauer-Probenhalter nicht ganz gefüllt werden. Um in der Mitte des zylinderförmigen Probenhalters eine homogene Dicke zu erzielen, wurde die viskose Lösung beim Einfrieren waagrecht gelagert.

3.2.2 ^{57}Fe -MbCO in Trehalose

Für die Herstellung von CO-ligandiertem Mb in Trehalose wurde ca. 30 mg gereinigtes ^{57}Fe -Pferde-Mbmet verwendet. In 1.7 ml 50 mM NaH_2PO_4 -Puffer (pH = 7.6) gelöst, ergab dies eine 1 mM Mbmet-Lösung. Dieser 1 mM Mbmet-Lösung wurde 1 ml einer 1 M α,α -Trehalose-Wasser-Lösung ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) beigemischt, so daß das Verhältnis von Trehalose- zu Mbmet-Molekülen ungefähr 600:1 betrug. Eine homogene Einbettung der Mbmet-Moleküle in Trehalose ist bei diesem Molekülverhältnis gewährleistet. In dieser viskosen Lösung wurde das Eisen in der oben beschriebenen Weise ligandiert: nach Sättigung der Lösung mit CO-Gas wurde das Eisen mit einem 10-fachen Überschuß an Natriumdithionit reduziert und die Lösung

erneut mit CO-Gas versetzt. Das optische Absorptionsspektrum des CO-ligandierten Mb in Trehalose zeigte deutlich die charakteristischen Q-Banden von MbCO bei den Wellenlängen 540 nm bzw. 579 nm (siehe Abb. 50). Das Spektrum der MbCO-Trehalose-Lösung ist identisch dem einer MbCO-Wasser-Lösung (Kleinert, 1997).

Im nächsten Schritt wurde die Lösung getrocknet. In einem evakuierten Exikator bei Raumtemperatur trocknete die MbCO-Trehalose-Lösung nach vier Tagen vollständig aus. Eventuell noch vorhandenes Wasser wurde durch Ausheizen bei 70°C und für die Dauer von 20 Stunden in einem Trockenschrank entfernt. Die Probe lag nun als sehr hartes Glas vor. Die getrocknete und anschließend gemörserte Probe wurde pulverförmig in einen Mößbauer-Probenhalter eingefüllt.

3.2.3 ^{57}Fe -Mbmet in Trehalose

Die Mößbauer-Probe mit Mbmet in Trehalose resultierte aus einem Ansatz mit 65 mg gereinigtem ^{57}Fe -Mbmet in 3.7 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7.6). Dieser 1 mM Mbmet-Lösung wurde 3 ml einer 1 M Trehalose-Wasser-Lösung zugesetzt und die Lösungen miteinander vermischt. Die resultierende Lösung wurde in einem evakuierten Exikator bei 5°C getrocknet. In der getrockneten Form wurde das entstandene Glas gemörsert und in einen Mößbauer-Probenhalter gefüllt.

3.2.4 ^{57}Fe -MbCO-Kristalle

Um eine Probe aus ^{57}Fe -MbCO-Kristallen herzustellen, mußten zunächst einmal ^{57}Fe -Mbmet-Kristalle gezüchtet werden. Hierzu wurde ^{57}Fe -Mbmet in 50 mM Kaliumphosphat (KH_2PO_4) in einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst. Der Proteinlösung wurde ein Fällungsmittel bestehend aus 4 M Ammoniumphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$) und 50 mM Kaliumphosphat mit einem pH-Wert von 6.5 tropfenweise zugegeben, bis eine Molarität des Ammoniumphosphatpuffers von 2.8 M erreicht war. Anschließend wurden mit Hilfe eines Katzen-Schnurrhaares Kristallisationskeime hinzugefügt. An diesen Keimen kristallisierte das ^{57}Fe -Mbmet nach einigen Tagen aus. Würde man einen Mößbauer-Probenhalter ausschließlich mit ^{57}Fe -Mbmet-Kristallen füllen, wäre der Effekt in dem Mößbauer-Absorptionsspektrum unerwünscht hoch. Eine Verringerung des Effektes in dem Mößbauer-Absorptionsspektrum läßt sich dadurch

erzielen, daß man eine geringe Menge nativer Mb-Kristalle beimengt. Native Mbmet-Kristalle bilden sich, wenn natives Mbmet in 3 M Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) mit einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst und mit Kristallisationskeimen versetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Proben von CO-ligandierten Mb-Kristallen hergestellt, die sich lediglich in der verwendeten Menge an ⁵⁷Fe-Mb-Kristallen unterscheiden. Entsprechend dem Gehalt an Mößbauer-aktiven ⁵⁷Fe-Mb-Kristallen werden die beiden Proben als dünne bzw. dicke Probe von MbCO-Kristallen bezeichnet. Die Präparation der dicken und dünnen Probe wird im folgenden beschrieben.

Dünne Probe mit ⁵⁷Fe-MbCO-Kristallen

Für die dünne Probe wurden ca. 5 mg ⁵⁷Fe-Mb-Kristalle in einer Mutterlauge aus 15 µl 3.4 M Ammoniumsulfat und 50 mM Kaliumphosphat bei pH = 6.8 mit ca. 35 mg nativen Mb-Kristallen in 100 µl derselben Mutterlauge gemischt. Die Kristalle samt Mutterlauge wurden mit CO-Gas gespült und unter Zugabe eines 10-fachen Überschusses an Natriumdithionit reduziert. Nach der Reduktion von Mb wurde die Mutterlauge weitere Male mit CO-Gas gespült. Von den reduzierten und mit CO ligandierten Mb-Kristallen wurde die Mutterlauge abgesaugt, so daß die Kristalle nur mehr von einem dünnen Film Mutterlauge auf ihrer Oberfläche umgeben waren. In dieser Form wurden die MbCO-Kristalle bei -80°C eingefroren und als dünne Probe verwendet.

Dicke Probe mit ⁵⁷Fe-MbCO-Kristallen

Im Gegensatz zur dünnen Probe wurden anstelle von 5 mg ca. 30 mg ⁵⁷Fe-Mb-Kristalle verwendet. Die ⁵⁷Fe-Mb-Kristalle, die in einer Mutterlauge aus 15µl 3.4M Ammoniumsulfat und 50mM Kaliumphosphat bei pH=6.8 aufbewahrt wurden, wurden mit ca. 35 mg nativen Mb-Kristallen in 100 µl derselben Mutterlauge gemischt. Die folgenden Schritte, d.h. die Reduktion, die CO-Ligandierung sowie das Absaugen der Mutterlauge erfolgten in analoger Weise zu der Präparation der dünnen Probe von MbCO-Kristallen.

3.2.5 Mb-Einkristall mit eindiffundierter Trehalose-Lösung

Der im folgenden beschriebene Mb-Kristall, in den eine Trehalose-Lösung eindiffundiert wurde, wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie untersucht. Die Herstellung von Mb-Kristallen für die Röntgenkristallographie vereinfacht sich gegenüber der Präparation von Mb-Kristallen für die Mößbauer-Spektroskopie dadurch, daß die ^{57}Fe -Anreicherung entfällt und somit natives Mb verwendet werden kann. Zur Herstellung von Mb-Kristallen wurde 30 mg gefriergetrocknetes, natives Mb mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH = 6.5) gemischt und 5 Minuten bei 16000 G und 10°C zentrifugiert. Der abzentrifugierten Proteinlösung wurde ein Fällungsmittel aus 4 M Ammoniumsulfat und 50 mM Kaliumphosphat (pH = 6.5) tropfenweise zugegeben, bis eine 2.8 M Ammoniumsulfat-Konzentration vorlag. Mit einem Katzen-Schnurrhaar, das zuerst in eine Lösung mit Kristallisationskeimen getaucht wurde, wurde die Lösung mit Kristallisationskeimen angeimpft. Das Kristallwachstum an den Keimen war nach ca. 5 Tagen abgeschlossen. Der nächste Schritt war nun, die 1.2 ml Mutterlauge der Kristalle sukzessive durch eine Trehalose-haltige Mutterlauge zu ersetzen, um den Austausch von Kristallwasser mit Trehalose zu ermöglichen. Dazu wurde ein Puffer durch Sättigung des oben angegebenen Fällungsmittels mit Trehalose hergestellt. Dieser bestand aus 1.1 M Trehalose, 2.9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 36 mM KH_2PO_4 . Um Risse in den Kristallen durch abrupte Variation der Mutterlauge zu verhindern, wurde die ursprüngliche Mutterlauge schrittweise durch Trehalose-haltige Mutterlauge ersetzt, wobei sich die ausgetauschte Menge von anfangs 50 μl auf knapp 1.2 μl erhöhte. Aus den Mb-Kristallen mit eindiffundierter Trehalose-Lösung wurde ein für die Röntgenstrukturanalyse geeigneter Kristall, d.h. ein Kristall mit perfekter Struktur, unter dem Mikroskop ausgewählt.

3.2.6 Metastabiles Mb in Glyzerin

Metastabiles Mb in Glyzerin wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie untersucht. Bei der Probenherstellung konnte deshalb ebenfalls natives Mb verwendet werden. Zunächst wurden Glyzerin und Kaliumphosphatpuffer so gemischt, daß eine Glyzerinkonzentration von 75% (v/v) und eine 50 mM Pufferlösung resultierten. Dem Glyzerin/Wasser-Gemisch wurde Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und ein photoaktives Reduktionsmittel Tris(2,2'-bipyridin)-Ruthenium(II)chlorid ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) in

einer Konzentration von 100 mM (EDTA) bzw. 60 mM ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) beigemischt. Der Lösung, die einen pH von 6.6 aufwies, wurde schließlich 5 mM Mbmet zugesetzt. Die Proteinlösung wurde bei 20 K mit Laserblitzen bestrahlt, so daß der Elektronentransfer in dem photoaktiven Reduktionsmittel $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ einsetzen konnte. Bei der Herstellung eines metastabilen Zustands ist es notwendig, bei tiefen Temperaturen zu arbeiten. Würde man die Reduktion von Mbmet bei Raumtemperatur durchführen, würde sich das zentrale Eisenatom von Fe^{3+} bei gleichzeitiger Verdrängung des Wasserliganden an der sechsten Koordinationsstelle sofort in Fe^{2+} umwandeln. Das Protein läge dann unmittelbar nach der Reduktion in der Mbdesoxy-Form vor. Führt man das gleiche Experiment bei tiefen Temperaturen durch, kann das Protein nicht in den Gleichgewichtszustand, d.h. zu Mbdesoxy relaxieren, da hierzu die thermische Energie nicht ausreicht. Das hier bei 20 K reduzierte Mbmet ist folglich in einem metastabilen Zustand eingefroren.

4. Dynamikuntersuchungen von Myoglobin

4.1 Mößbauer-Spektroskopie an CO-ligandiertem Myoglobin in verschiedenen Medien

Die Proteindynamik von Mb-Kristallen, MbCO in Glycerin und MbCO in Trehalose wurde mit Hilfe der Mößbauer-Spektroskopie untersucht. Die Spektren wurden mit dem Transmissionsintegral ausgewertet. Die Linienformen von Quelle und Absorber wurden dabei als Lorentzförmig angenommen. Aufgrund von Schwingungen des Meßsystems und Inhomogenitäten der Materialien sind die Linienbreiten von Quelle und Absorber gegenüber der natürlichen Linienbreite der 14.4 keV-Strahlung verbreitert. Die Verbreiterung der Quellenlinie kann durch eine Eichmessung bei Raumtemperatur mit einem nahezu idealen Absorber bestimmt werden. Dazu wurde SNP (Sodiumnitroprussid) eingesetzt. Die mit der Eichmessung bestimmten Linienbreiten der Quellen sind in Tab. 12 angegeben. Die Verbreiterung der Absorberlinie resultiert aus der Anpassung der Spektren mit dem Transmissionsintegral. Die Linienbreiten sind zusammen mit den Hyperfeinparametern in Tab. 13 bis Tab. 15 dokumentiert. Die angepaßten Parameter sind mit Literaturwerten kompatibel (Franke, 1992).

Der Temperaturbereich der Spektren von MbCO-Kristallen erstreckt sich von 80 K bis 245 K. Die bei den Grenztemperaturen gemessenen Spektren von MbCO-Kristallen sind in Abb. 8 dargestellt. Das Spektrum von MbCO-Kristallen bei 80 K zeigt ein quadrupolaufgespaltes Dublett mit den für MbCO typischen Hyperfeinparametern (siehe Tab. 13). Das Spektrum kann mit einem einzigen Lorentz-Dublett sehr gut angepaßt werden. Im Gegensatz dazu ist das Spektrum bei 245 K nicht mit einem einzigen Lorentz-Dublett zu erklären. Dem schmalen Lorentz-Dublett ist eine sehr breites, nicht mehr auflösbares Lorentz-Dublett überlagert, das auf proteinspezifische Bewegung zurückzuführen ist (siehe Kap. 4.3). Das Spektrum bei hohen Temperaturen hat sich gegenüber dem Tieftemperatur-Spektrum jedoch nicht qualitativ verändert.

Die im gleichen Temperaturbereich wie die MbCO-Kristall-Probe gemessenen Mößbauer-Spektren von MbCO in Glycerin sind in Abb. 9 zu sehen. Die Mößbauer-Spektren von MbCO in Glycerin verändern sich im Vergleich zu den Spektren von MbCO-Kristallen sehr viel

stärker bei Erwärmung von 80 K auf 245 K. Bei 80 K läßt sich das MbCO-Glyzerin-Spektrum mit einem schmalen Lorentz-Dublett anpassen. Bei 245 K ist das schmale Lorentz-Dublett jedoch aufgrund der stark angestiegenen Linienbreite nicht mehr auflösbar. Diesem dominanten Dublett untergeordnet ist das breite, ebenfalls nicht auflösbare Lorentz-Dublett, das auf proteinspezifische Dynamik hinweist. Die Hyperfeinparameter von MbCO in Glyzerin sind in Tab. 14 aufgelistet.

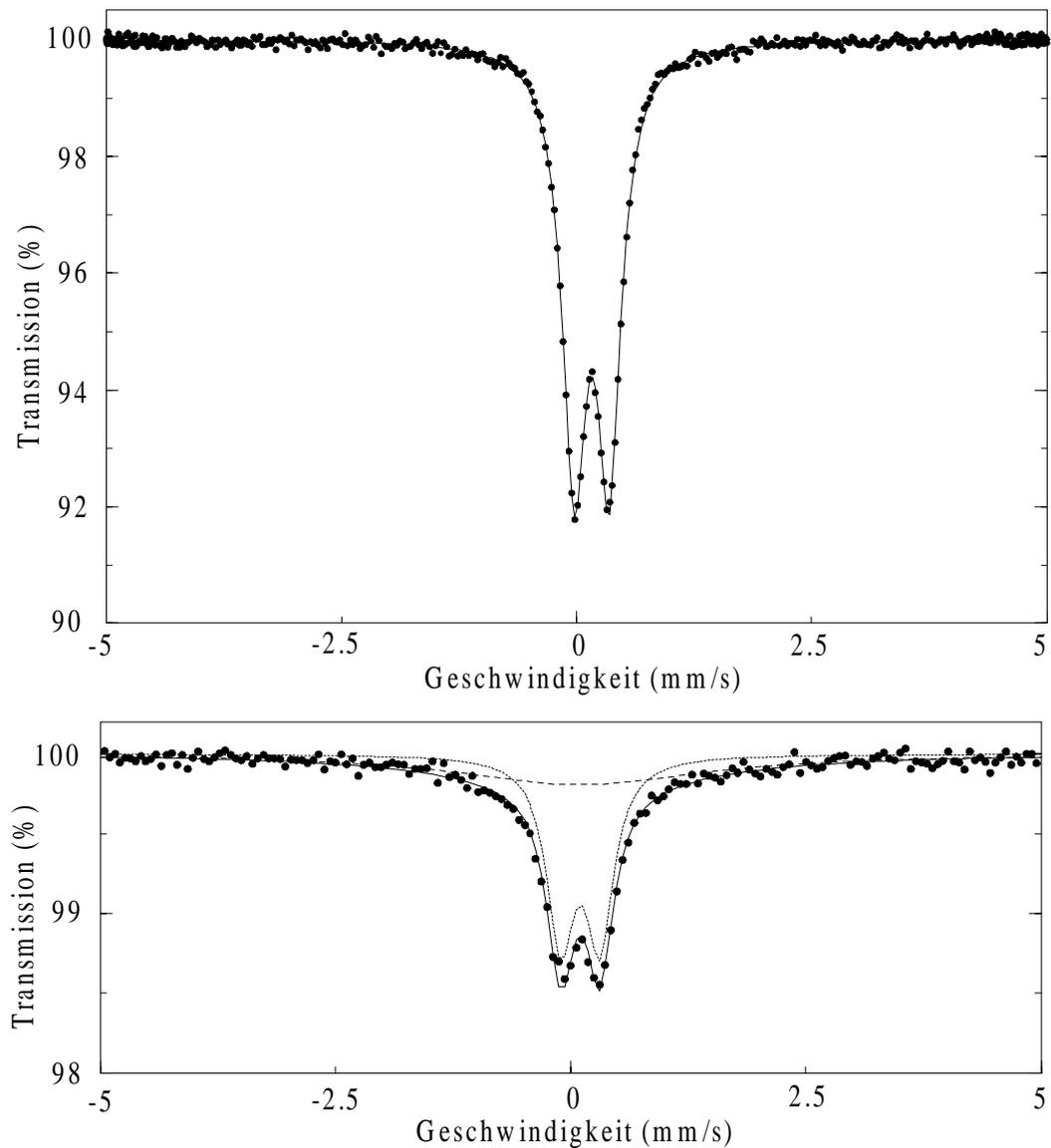


Abb. 8: Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen bei 80 K (oben) und 245 K (unten). Die Spektren sind mit Hilfe des Transmissionsintegrals angepaßt, wobei das breite Lorentz-Dublett bei 245 K phänomenologisch eingeführt ist. Punkte: Messung, durchgezogene Linie: Anpassung, gepunktete Linie: schmales Lorentz-Dublett, gestrichelte Linie: breites Lorentz-Dublett.

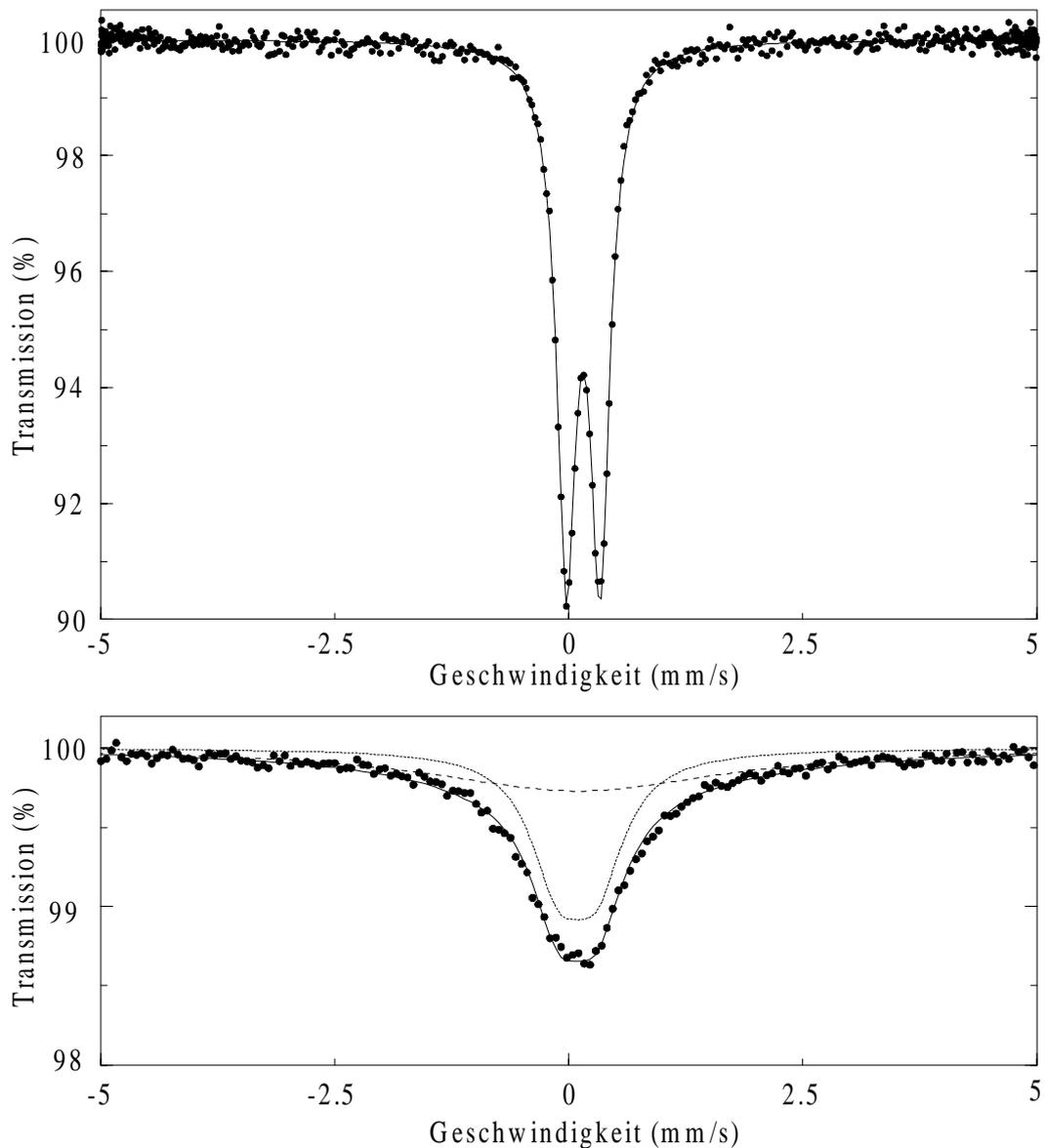


Abb. 9: Mößbauer-Spektren von MbCO in Glycerin bei 80 K (oben) und 245 K (unten). Die Spektren sind mit Hilfe des Transmissionsintegrals angepaßt, wobei das breite Lorentz-Dublett bei 245 K phänomenologisch eingeführt ist. Punkte: Messung, durchgezogene Linie: Anpassung, gepunktete Linie: schmales Lorentz-Dublett, gestrichelte Linie: breites Lorentz-Dublett.

Weitere temperaturabhängige Mößbauer-Spektren wurden an MbCO, das in Trehalose getrocknet wurde, zwischen 80 K und 320 K durchgeführt. Um die Spektren der verschiedenen MbCO-Proben besser untereinander vergleichen zu können, sind die MbCO-Trehalose-Spektren ebenfalls für die Temperaturen 80 K und ca. 245 K abgebildet (siehe Abb. 10). Abgesehen davon, daß der Effekt bei den MbCO-Trehalose-Spektren deutlich größer ist als bei den Spektren der MbCO-Kristalle und MbCO in Glycerin, fällt auf, daß sowohl das 80 K-Spektrum wie auch das 245 K-Spektrum nahezu mit einem einzigen Lorentz-Dublett

beschrieben werden können. Das 245 K-Spektrum enthält zwar einen kleinen Flächenanteil von dem breiten Lorentz-Dublett, der Anteil ist aber vergleichsweise gering.

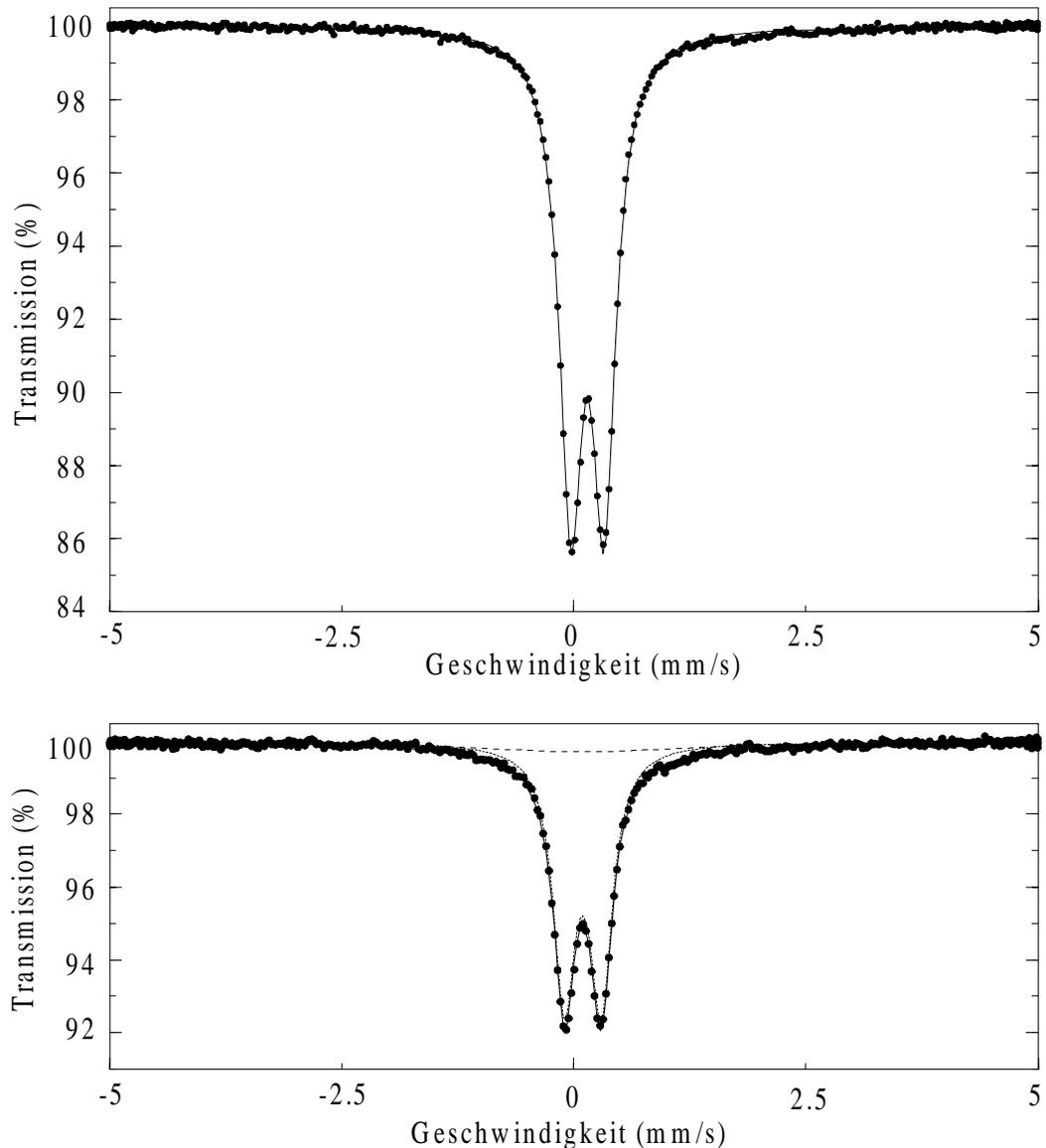


Abb. 10: Mößbauer-Spektren von MbCO, getrocknet in Trehalose, bei 80 K (oben) und 245 K (unten). Die Spektren sind mit Hilfe des Transmissionsintegrals angepaßt, wobei das breite Lorentz-Dublett bei 245 K phänomenologisch eingeführt ist. Punkte: Messung, durchgezogene Linie: Anpassung, gepunktete Linie: schmales Lorentz-Dublett, gestrichelte Linie: breites Lorentz-Dublett.

Aus den Absorptionsflächen der verschiedenen Spektren läßt sich der Lamb-Mößbauer-Faktor berechnen, der wiederum das für Dynamikuntersuchungen relevante mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ der Eisenatome liefert (Gln. (15) und (18)). Bei der Berechnung des mittleren Auslenkungsquadrates $\langle x^2 \rangle$ wird lediglich die Fläche des schmalen Lorentz-Dubletts berücksichtigt. In Abb. 11 sind die $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Eisenatome für MbCO-Kristalle, MbCO in

Glyzerin und MbCO in Trehalose zusammengefaßt. Die mittleren Auslenkungsquadrate nehmen für alle MbCO-Proben zunächst linear mit der Temperatur zu:

$$\langle x^2 \rangle(T) = m \cdot T \quad (58)$$

Die Steigung m der Regressionsgeraden stimmt mit einem Wert von $7.5 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^2/\text{K}$ für alle MbCO-Proben überein. Die mittleren Auslenkungsquadrate des Eisens lassen sich auch mit Hilfe der Normalmodenanalyse theoretisch berechnen. In Abb. 11 ist die aus der Normalmodenanalyse von MbCO gewonnene Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung des Eisens mit aufgenommen. Die $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Normalmodenanalyse sind in der klassischen Näherung, d.h. unter Vernachlässigung der Nullpunktsschwingungen, abgebildet. Die Temperaturabhängigkeit der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Normalmodenanalyse stimmt bei tiefen Temperaturen exakt mit den $\langle x^2 \rangle$ -Werten der Mößbauer-spektroskopischen Untersuchungen an MbCO in unterschiedlichen Medien überein.

Bei höheren Temperaturen weichen die $\langle x^2 \rangle$ -Werte der verschiedenen Proben von dem linearen Temperaturverlauf bei tiefen Temperaturen ab. Um diesen Verlauf qualitativ beschreiben zu können, werden die linear mit der Temperatur steigenden mittleren Auslenkungsquadrate von den $\langle x^2 \rangle$ -Werten separiert. Die linear mit der Temperatur steigenden mittleren Auslenkungsquadrate werden als $\langle x_v^2 \rangle$ bezeichnet. Die Differenz zwischen den $\langle x^2 \rangle$ -Werten und den linear mit der Temperatur steigenden $\langle x_v^2 \rangle$ -Werten heißt $\langle x_t^2 \rangle$. Bei hohen Temperaturen setzt sich die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ dann folgendermaßen zusammen (vgl. Abb. 11):

$$\langle x^2 \rangle = \langle x_v^2 \rangle + \langle x_t^2 \rangle \quad (59)$$

Untersucht man die Mößbauer-Spektren bei der Temperatur, bei der die $\langle x^2 \rangle$ -Werte zum ersten Mal von der Gerade abweichen, stellt man fest, daß nun erstmals breite Lorentz-Dubletts auftreten. Der Anstieg der $\langle x^2 \rangle$ -Werte ist also mit dem Auftreten von breiten Lorentz-Dubletts korreliert.

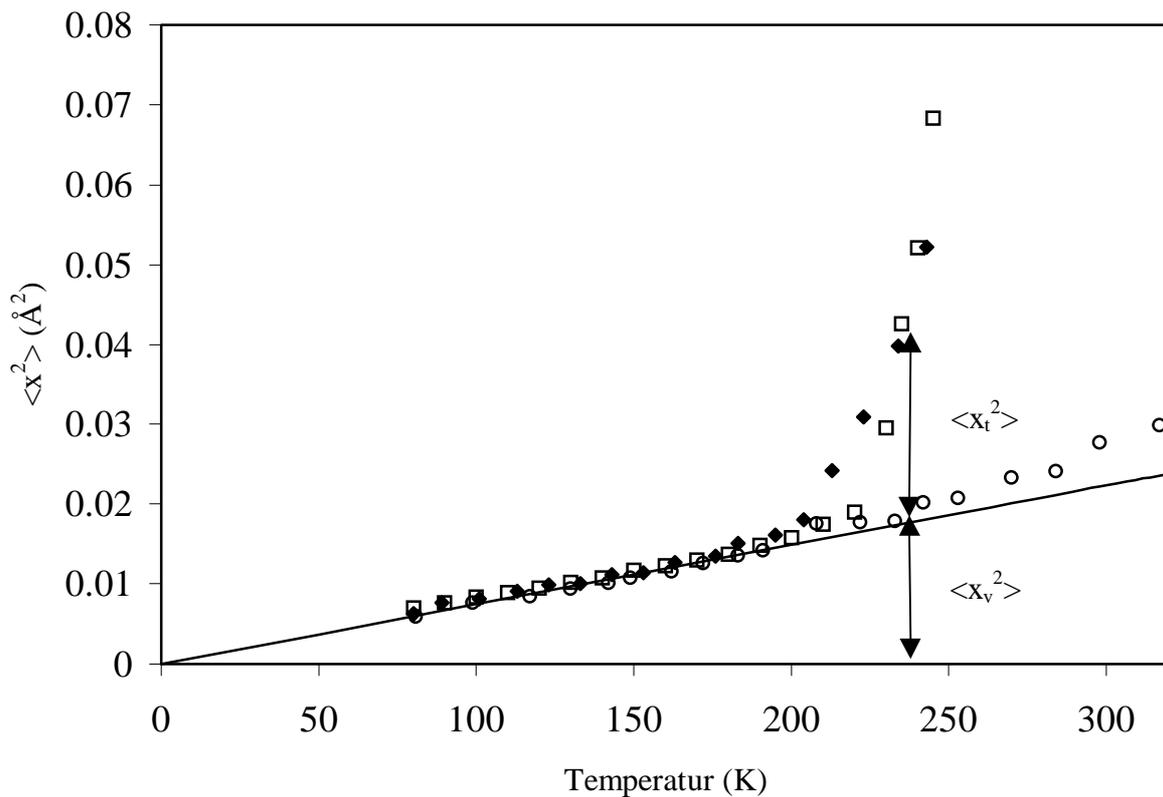


Abb. 11: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x^2 \rangle = \langle x_v^2 \rangle + \langle x_t^2 \rangle$ für MbCO in verschiedenen äußeren Medien: ausgefüllte Rauten: MbCO-Kristalle, Quadrate: MbCO in Glycerin, Kreise: MbCO in Trehalose, gestrichelte Linie: Steigung der $\langle x^2 \rangle$ -Werte in der Normalmodenanalyse.

Die Temperatur, bei der die $\langle x^2 \rangle$ -Werte vom linearen Temperaturverhalten abweichen, wird als charakteristische Temperatur T_C bezeichnet. Die charakteristische Temperatur von MbCO-Kristallen liegt bei $T_C = 190$ K und für MbCO in Glycerin bei $T_C = 210$ K. Die $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO in Trehalose weichen unterhalb von 300 K kaum von dem linearen Temperaturverhalten ab. Auch oberhalb von 300 K ist kein signifikanter Anstieg der $\langle x^2 \rangle$ -Werte mit der Temperatur zu erkennen. Die charakteristische Temperatur von MbCO in Trehalose ist deshalb nicht genau bestimmbar. Sie liegt in jedem Fall oberhalb von 300 K ($T_C > 300$ K).

4.2 Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen von Myoglobin-Kristallen in verschiedenen Ligandierungszuständen

Die lokale Struktur des aktiven Zentrums von Mb, d.h. des Eisens in der Hämgruppe, kann durch unterschiedliche Ligandierung verändert werden. In Abb. 37 (siehe Anhang) sind die vier möglichen Ligandierungszustände von Mb dargestellt. In MbCO, MbO₂ bzw. Mbmet ist der Ligand CO, O₂ bzw. H₂O, während Mbdesoxy keinen sechsten Ligand besitzt. In der vorliegenden Arbeit werden unter anderem die Ergebnisse aus Mößbauer-Messungen an MbCO-Kristallen mit bereits veröffentlichten Ergebnissen von Mbdesoxy-Kristallen (Chang et al., 1996) und Mbmet-Kristallen (Steyer, 1993) verglichen.

Auf die unterschiedlichen Hyperfeinparameter von Mb in verschiedenen Ligandierungszuständen wird hier nicht eingegangen, da sie bereits ausführlich in der Literatur diskutiert wurden (Eicher et al., 1974, Parak et al., 1977, Thomanek et al., 1977). Bei dem Vergleich der verschiedenen Kristallproben richtet sich das Hauptaugenmerk auf die mittlere quadratische Auslenkung, $\langle x^2 \rangle$, welche die Abnahme der Fläche unter der schmalen Linie widerspiegelt. In Abb. 12 sind die mittleren quadratischen Auslenkungen der Mb-Kristallproben in verschiedenen Ligandierungszuständen als Funktion der Temperatur aufgetragen. Mit in die Abbildung sind die Normalmoden von Mbmet und MbCO aufgenommen.

Bemerkenswert sind die Unterschiede der mittleren quadratischen Auslenkung bei tiefen Temperaturen. Die Regressionsgeraden der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte nehmen für die verschiedenen Mb-Kristallproben unterschiedliche Steigungen an. Die Steigungen der $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO und von Mbmet aus der Normalmodenanalyse stimmt wiederum relativ gut mit den Steigungen der Regressionsgeraden der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von MbCO- bzw. Mbmet-Kristallen überein. Die unterschiedlichen Steigungen für verschiedene Mb-Kristallproben sind in Tab. 1 dokumentiert. In Tab. 1 sind auch die berechneten Steigungen der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Normalmodenanalyse für MbCO und Mbmet enthalten.

	Mbdesoxy- Kristalle	MbCO- Kristalle	Mbmet- Kristalle
Steigung m der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus Mößbauer-Experimenten ($\text{\AA}^2/\text{K}$)	$9.4 \cdot 10^{-5}$	$7.9 \cdot 10^{-5}$	$5.4 \cdot 10^{-5}$
Steigung der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Normalmodenanalyse ($\text{\AA}^2/\text{K}$)	nicht bestimmt	$7.5 \cdot 10^{-5}$	$6.4 \cdot 10^{-5}$

Tab. 1: Steigung m der Regressionsgeraden der $\langle x^2 \rangle$ -Werte für $T < T_C$ aus Mößbauer-Experimenten und die Steigung der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Normalmodenanalyse für verschiedenen Ligandierungszuständen von Mb.

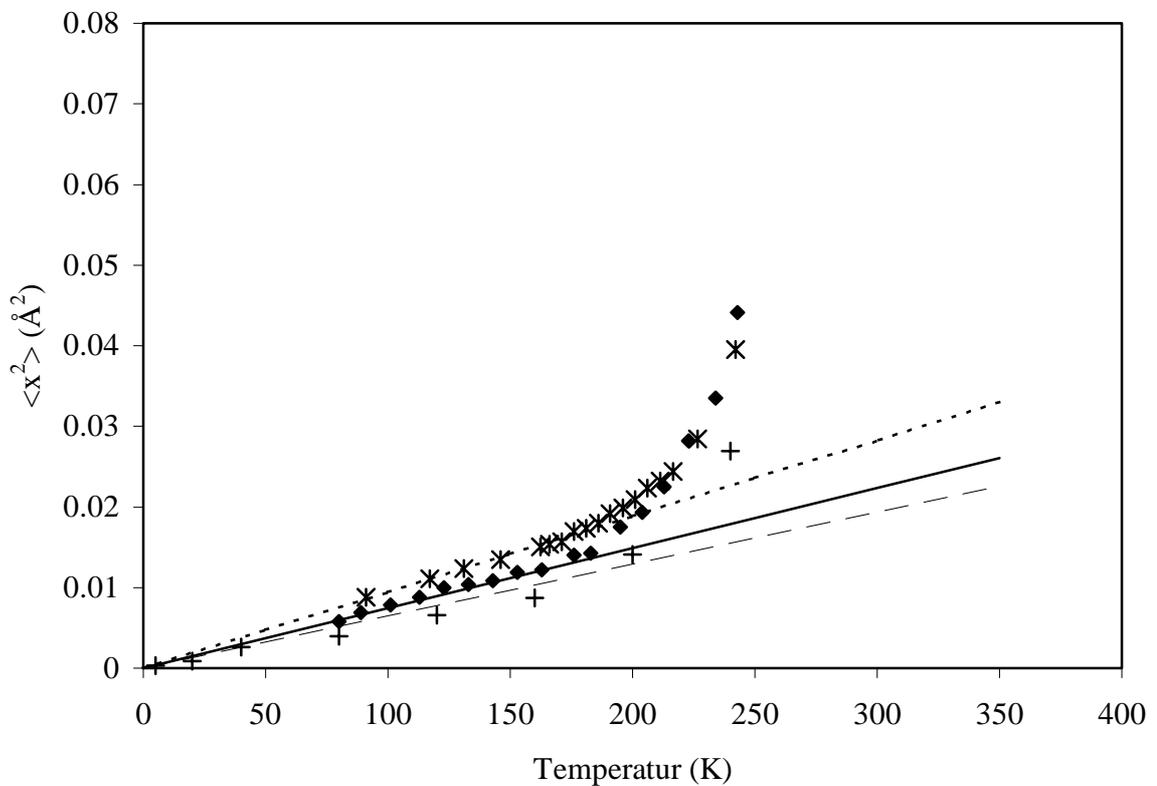


Abb. 12: Temperaturabhängigkeit der mittleren Auslenkungsquadrate von Mb-Kristallen in verschiedenen Ligandierungszuständen, Plus: Mbmet-Kristalle, lang-gestrichelte Linie: Normalmoden von Mbmet, Rauten: MbCO-Kristalle, durchgezogene Linie: Normalmoden von MbCO, Kreuze: Mbdesoxy-Kristalle, kurz-gestrichelte Linie: Ausgleichsgerade der $\langle x^2 \rangle$ -Werte von Mbdesoxy-Kristallen bei tiefen Temperaturen.

4.3 Interpretation der Mößbauer-Messungen mit Hilfe des Brownschen Oszillator-Modells

Um zu überprüfen, ob die Eisenbewegungen in Mb mit dem Brownschen Oszillator-Modell erklärt werden können, wurden Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen und MbCO in Glycerin im Temperaturbereich zwischen 80 K und 245 K mit der Transmissionsfunktion in Gl.(36) angepaßt. Als freie Parameter gehen in die Transmissionsfunktion die Hyperfeinparameter, die Linienbreite des schmalen Lorentz-Dubletts, die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x_v^2 \rangle$ und die Linienverbreiterung der breiten Lorentz-Dubletts α_t ein. Den Anpassungen liegt außerdem die Annahme zugrunde, daß der Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers $f_a(T)$ exponentiell von dem mittleren Auslenkungsquadrat $\langle x_v^2 \rangle$ abhängt:

$$f_a = e^{-k^2 \langle x_v^2 \rangle} \quad (60)$$

MbCO-Kristalle

Die Steigung m der Regressionsgeraden der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen wurde aus der Anpassung der Temperaturreihe mit der Transmissionsfunktion in der dünnen Absorbernäherung berechnet, in der das breite Lorentz-Dublett phänomenologisch eingeführt wurde. Aus dieser Anpassung wurde ebenfalls die Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} ermittelt:

	MbCO-Kristalle
Steigung m der Regressionsgeraden ($\text{Å}^2/\text{K}$)	$6.4 \cdot 10^{-5}$
Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} (cm^{-2})	$3.79 \cdot 10^{17}$

Tab. 2: Steigung m der Regressionsgeraden der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen und die Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} .

In Abb. 13 sind die mit dem Brownschen Oszillator-Modell angepaßten Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen bei 80 K und 245 K dargestellt. Mit Hilfe der Transmissionsfunktion des überdämpften Brownschen Oszillators (Gl.(36)) kann das 80 K-Spektrum mit einem Lorentz-Dublett sehr gut angepaßt werden. Die Summe über N Lorentz-Dubletts mit steigender Breite leistet in dem unteren Temperaturbereich keinen Beitrag. In dem Spektrum bei 245 K ist dem schmalen Lorentz-Dublett eine sehr breites Lorentz-Dublett überlagert. Das breite Lorentz-

Dublett stellt die Summe über N Lorentz-Dubletts dar, deren Linienbreite mit N zunimmt. Wie auch für das Spektrum bei 80 K ist die Übereinstimmung zwischen dem Spektrum bei 245 K und der Simulation überzeugend.

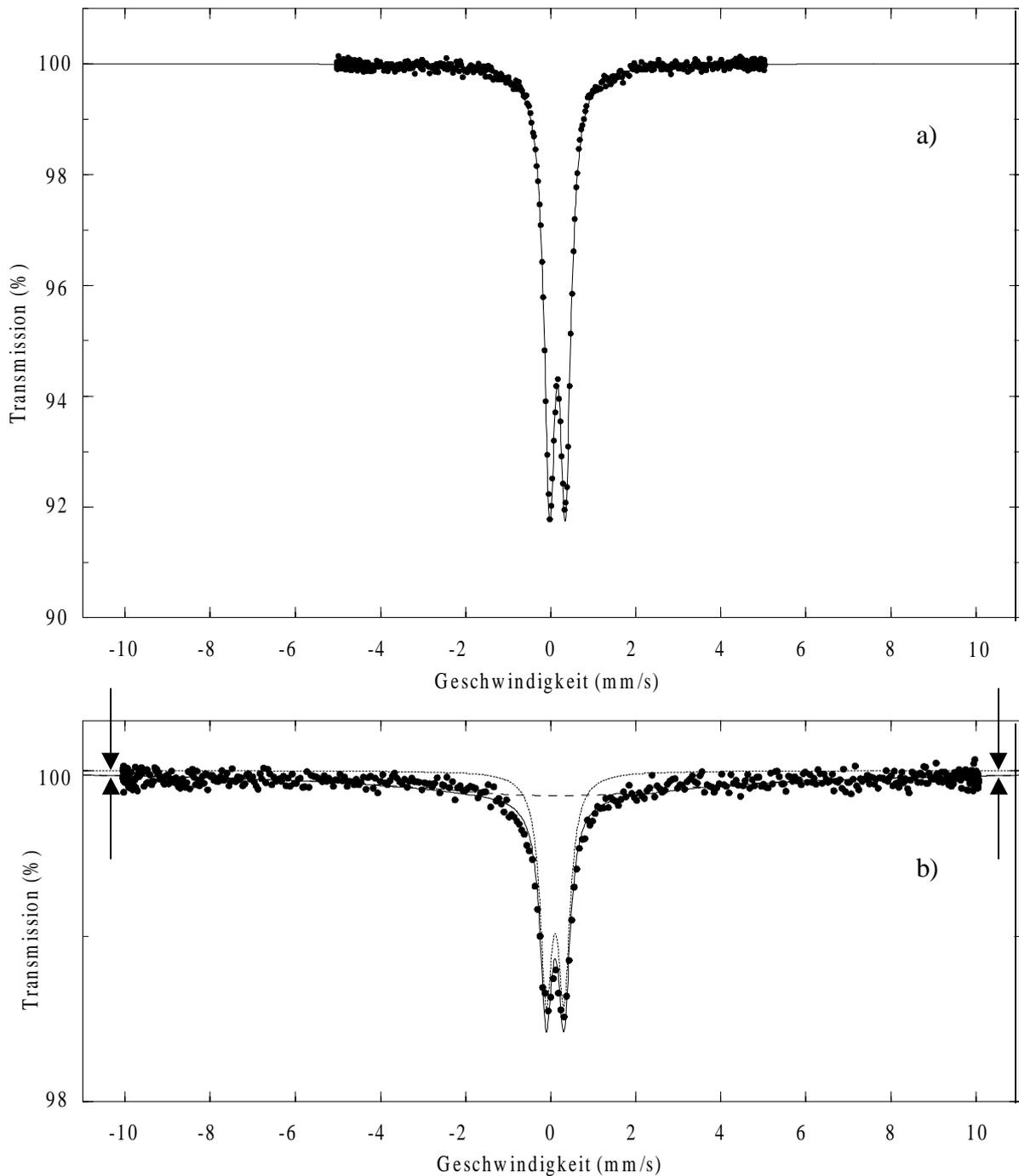


Abb. 13: Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen (80 K, 245 K), die mit dem Brownschen Oszillator-Modell angepaßt sind; a) Kreise: Meßspektrum der MbCO-Kristalle bei 80 K, Linie: Anpassung mit einem schmalen Lorentz-Dublett b) Kreise: Meßspektrum der MbCO-Kristalle bei 245 K; gepunktete Linie: schmales Lorentz-Dublett; gestrichelte Linie: Summe aus N breiten Lorentz-Dubletts; durchgezogene Linie: Summe aus gepunkteter und gestrichelter Linie.

Aus der Transmissionsfunktion des Brownschen Oszillators in Gl.(36) kann direkt die mittlere quadratische Auslenkung der Brownschen Oszillation $\langle x_t^2 \rangle$ bestimmt werden. Das mittlere Auslenkungsquadrat einer harmonisch oszillierenden Masse m ist proportional zur Erwärmungstemperatur T :

$$\langle x^2 \rangle_{\text{Oszillation}} = \frac{k_B T}{m\omega^2} \quad (61)$$

Vorliegend nehmen die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte der Brownschen Oszillationsbewegung jedoch nicht linear mit der Temperatur zu, sondern steigen stärker als linear mit der Temperatur an. Der Grund hierfür könnte eine komplizierte Potentiallandschaft von Proteinen sein. In Kap. 4.3 wird ein Potentialbild für Proteine beschrieben, mit dem die Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte erklärt werden kann.

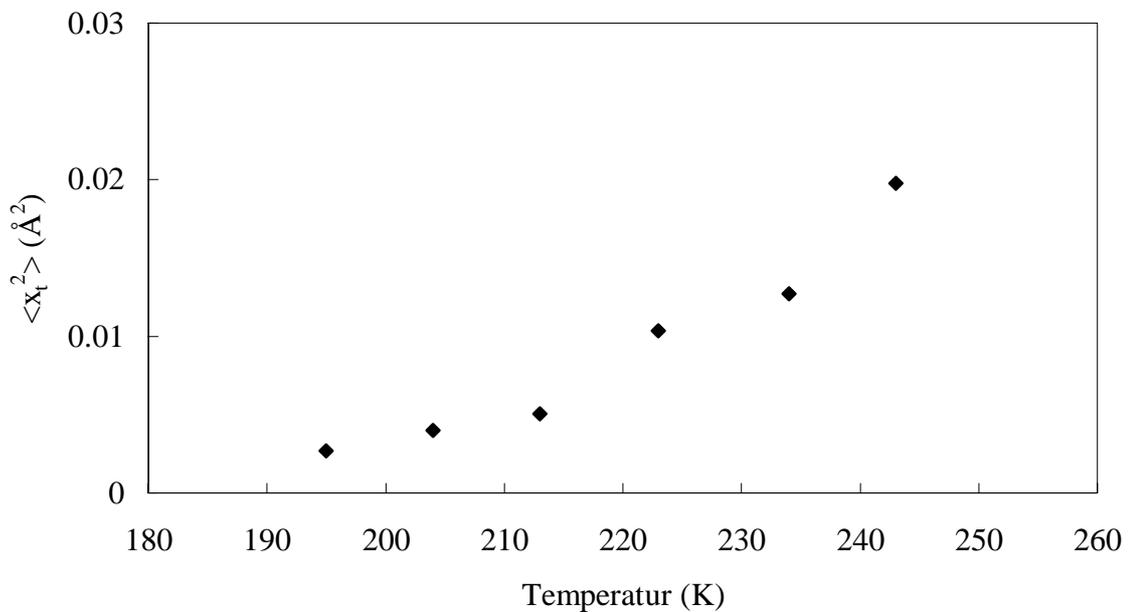


Abb. 14: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ von MbCO-Kristallen.

Als weiterer freier Parameter wird in der Transmissionsfunktion des Brownschen Oszillators die Linienverbreiterung α_t angepaßt. Die Anpassung der α_t -Werte in der Transmissionsfunktion bereitet jedoch große Schwierigkeiten. Grund hierfür sind die bei Temperaturen mit geringer Brownscher Oszillation, d.h. knapp oberhalb von T_C , nur schwer zu separierenden zusätzlichen breiten Linien. Werden die Spektren mit Temperaturen knapp oberhalb von T_C mit variablem α_t angepaßt, führt dies auf artifizuell hohe α_t -Werte. Unter Verwendung der Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte, die in dem erwähnten Potentialbild für Proteine die gleiche Temperaturabhängigkeit wie die α_t -Werte besitzen, können die

ungenau definierten α_t -Werte berechnet werden. Ausgehend von α_t -Werten der Spektren bei 235 K und 245 K werden die α_t -Werte der Spektren knapp oberhalb von T_C unter Verwendung von (Gl.(75), siehe S.86) berechnet. Zum Vergleich sind die so berechneten α_t -Werte mit den bei freier Anpassung erhaltenen α_t -Werten in Abb. 15 dargestellt. Die berechneten α_t -Werte nehmen mit der Temperatur zu, während letztere ein Minimum durchlaufen. Physikalisch sinnvoller ist der monoton mit der Temperatur steigende Verlauf für α_t , da bei größeren Temperaturen größere Bewegungsamplituden auftreten, die wiederum in breiter werdenden Linien resultieren. Für die Anpassung der Spektren wurden im folgenden deshalb die berechneten α_t -Werte verwendet.

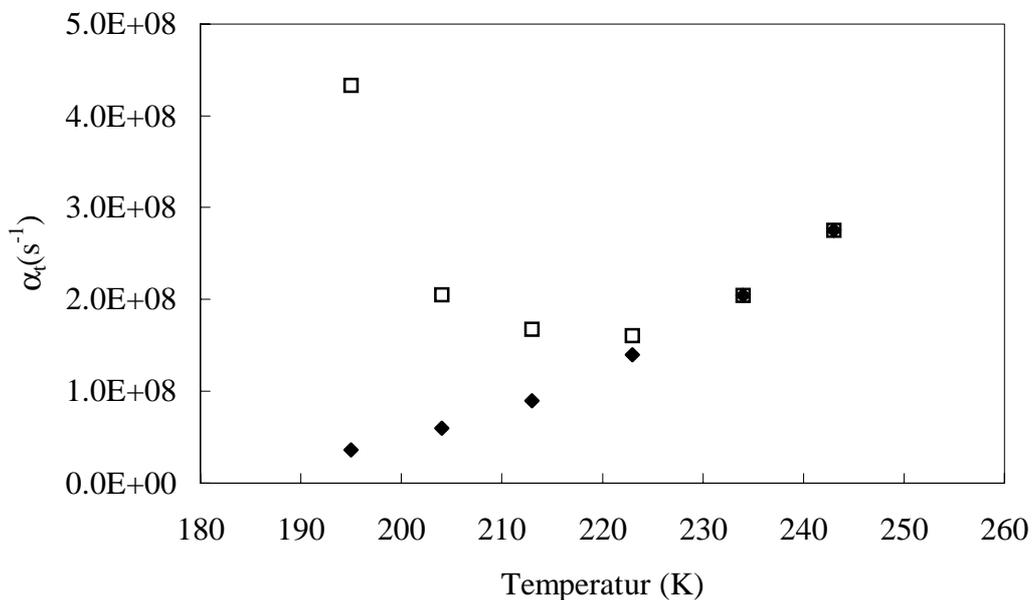


Abb. 15: Temperaturabhängigkeit der Linienverbreiterung α_t aus der Anpassung der Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen (Quadrate) und die unter Verwendung der Temperaturabhängigkeit von $\langle x_t^2 \rangle$ in Gl.(75) berechneten α_t -Werte (ausgefüllte Rauten).

Ein Vergleich der Anpassung mit variablen α_t -Werten und derjenigen, die unter Verwendung der berechneten α_t -Werte durchgeführt wurde, zeigt keine wesentlichen Unterschiede. In Abb. 16 ist dies anhand der Anpassung des Mößbauer-Spektrums der MbCO-Kristalle bei $T = 195$ K mit den verschiedenen α_t -Werte zu sehen. Aufgrund des kleineren α_t -Wertes ist bei dem Spektrum mit festgehaltenem α_t (unteres Bild in Abb. 16) das breite Lorentz-Dublett etwas besser zu erkennen. Die an das Gesamtspektrum angepaßten Kurven unterscheiden sich jedoch nur unwesentlich voneinander.

Eine Aufstellung der aus der Anpassung gewonnenen temperaturabhängigen Hyperfeinparameter und Linienbreite des schmalen Dubletts findet sich in Tab. 16.

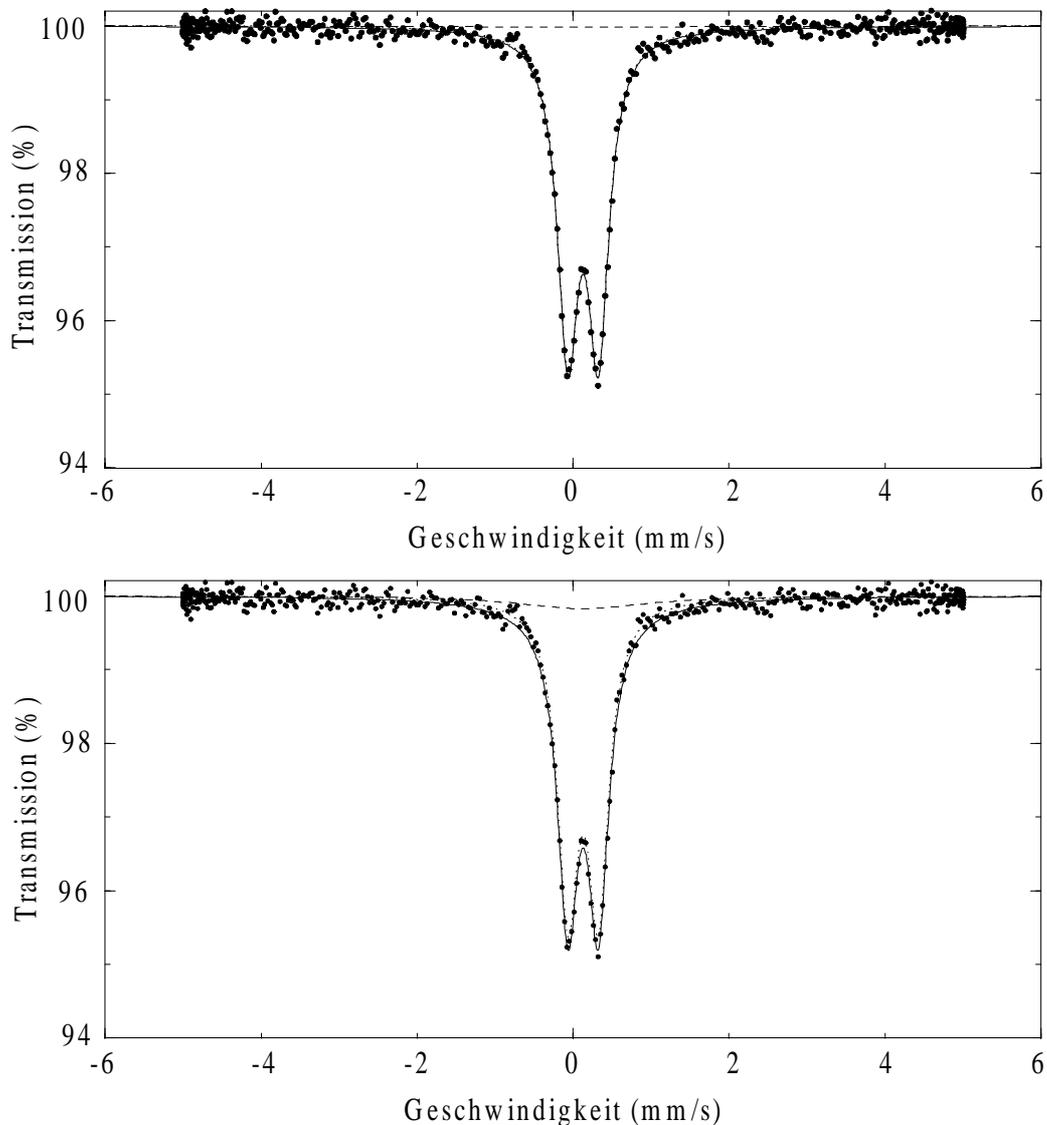


Abb. 16: Vergleich der Anpassung des Mößbauer-Spektrums von MbCO-Kristallen bei 195K mit variablem α_t (oben) und mit festgehaltenem α_t (unten).

Aus den Absorptionsflächen des schmalen Dubletts bzw. des schmalen und des breiten Dubletts werden die mittleren quadratischen Auslenkungen $\langle x^2 \rangle$ bzw. $\langle x_v^2 \rangle$ berechnet. In Abb. 17 ist die Temperaturabhängigkeit von $\langle x^2 \rangle$ und $\langle x_v^2 \rangle$ für MbCO-Kristalle dargestellt. Die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte der MbCO-Kristalle zeigen einen exakt linearen Temperaturanstieg im gesamten Temperaturbereich. Die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ weicht bei der für MbCO-Kristalle charakteristischen Temperatur $T_C = 190$ K von der Geraden ab und steigt signifikant an.

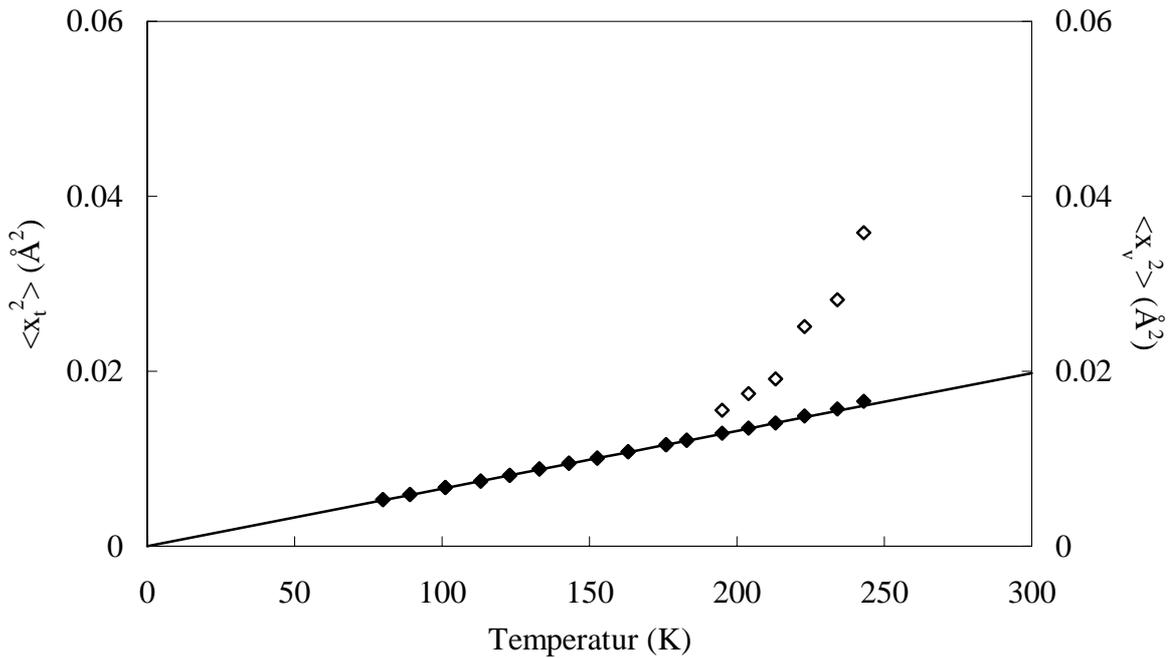


Abb. 17: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_v^2 \rangle$ (ausgefüllte Rauten) und $\langle x_1^2 \rangle$ (nicht ausgefüllte Rauten) für MbCO-Kristalle.

MbCO in Glycerin

Bei der Anpassung der temperaturabhängigen Mößbauer-Spektren von MbCO in Glycerin wurde in analoger Weise verfahren wie bei der Anpassung der Spektren von MbCO-Kristallen. Der Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers ergibt sich entsprechend Gl.(60) über die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x_v^2 \rangle$. Die Steigung m der Regressionsgeraden der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte wurde dabei aus der Anpassung der Spektren von MbCO in Glycerin bestimmt, die mit der Transmissionsfunktion in der dünnen Absorbernäherung und dem phänomenologisch eingeführten breiten Lorentz-Dublett angepaßt wurden. Die Auswertung der Spektren in der dünnen Absorbernäherung liefert ebenfalls die Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} (vgl. Tab. 3).

	MbCO in Glycerin
Steigung m der Regressionsgeraden ($\text{\AA}^2/\text{K}$)	$6.5 \cdot 10^{-5}$
Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} (cm^{-2})	$3.60 \cdot 10^{17}$

Tab. 3: Steigung m der Regressionsgeraden der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte und die Flächendichte der ^{57}Fe -Kerne n_{Fe} von MbCO in Glycerin.

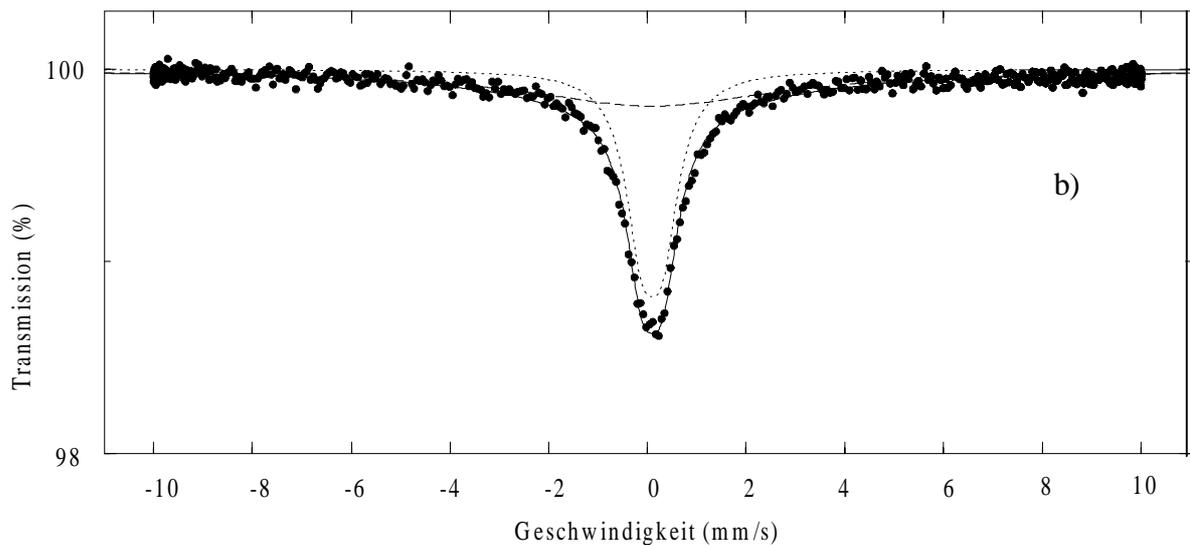
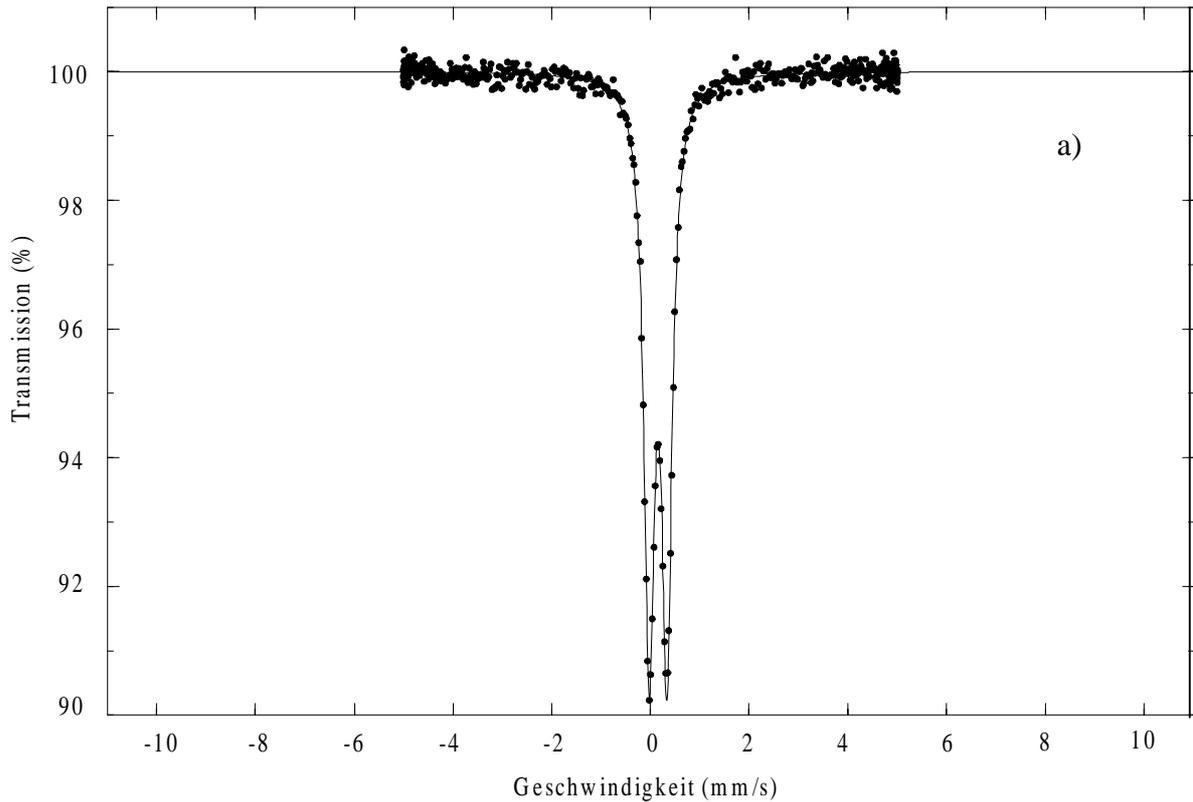


Abb. 18: Mößbauer-Spektren von MbCO in Glyzerin (80 K, 245 K), die mit dem Brownschen Oszillator-Modell angepaßt sind; a) Kreise: Meßspektrum von MbCO in Glyzerin bei 80 K, Linie: schmales Lorentz-Dublett b) Kreise: Meßspektrum von MbCO in Glyzerin bei 245 K; gepunktete Linie: schmales Lorentz-Dublett; gestrichelte Linie: Summe aus N breiten Lorentz-Dubletts; durchgezogene Linie: Summe aus gepunkteter und gestrichelter Linie.

In Abb. 18 sind die bei 80 K bzw. 245 K gewonnenen Mößbauer-Spektren von MbCO in Glyzerin zusammen mit den Anpassungen dargestellt. Das Spektrum von MbCO in Glyzerin bei 80 K enthält ebenso wie das Spektrum von MbCO-Kristallen bei 80 K ein einziges Lorentz-

Dublett. Bei 245 K tritt wiederum ein zusätzliches Lorentz-Dublett auf, das sich aus der Summe über N breite Lorentz-Dubletts zusammensetzt. Wie im Falle von MbCO-Kristallen stimmen die gemessenen Spektren von MbCO in Glycerin mit den theoretisch berechneten Spektren sehr gut überein. Die aus der Anpassung der temperaturabhängigen Spektren gewonnenen Hyperfeinparameter und die Linienbreite des schmalen Lorentz-Dubletts sind in Tab. 17 zusammengefaßt.

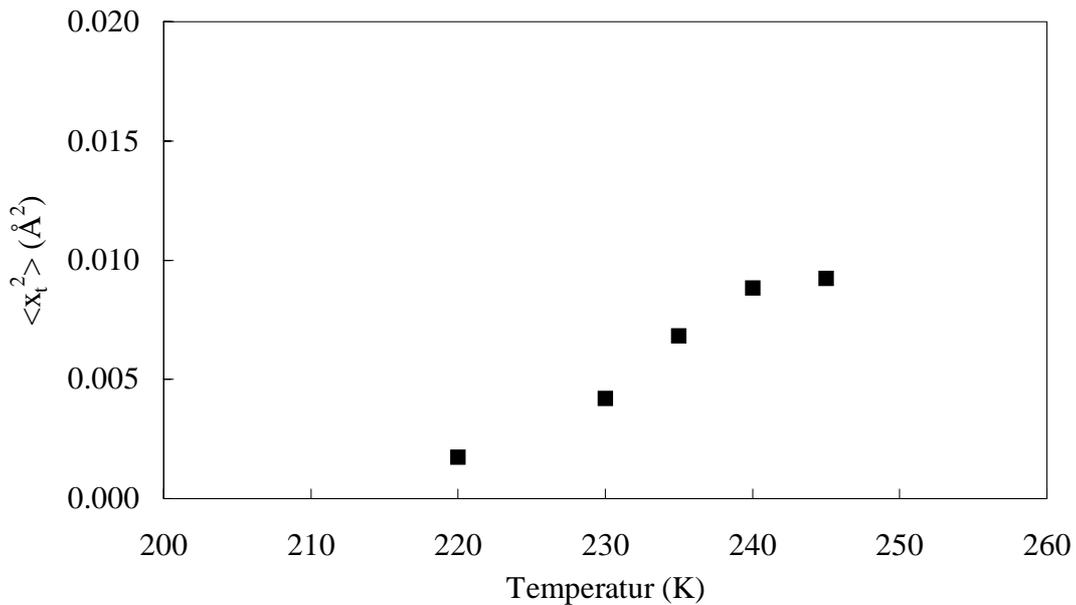


Abb. 19: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ von MbCO in Glycerin.

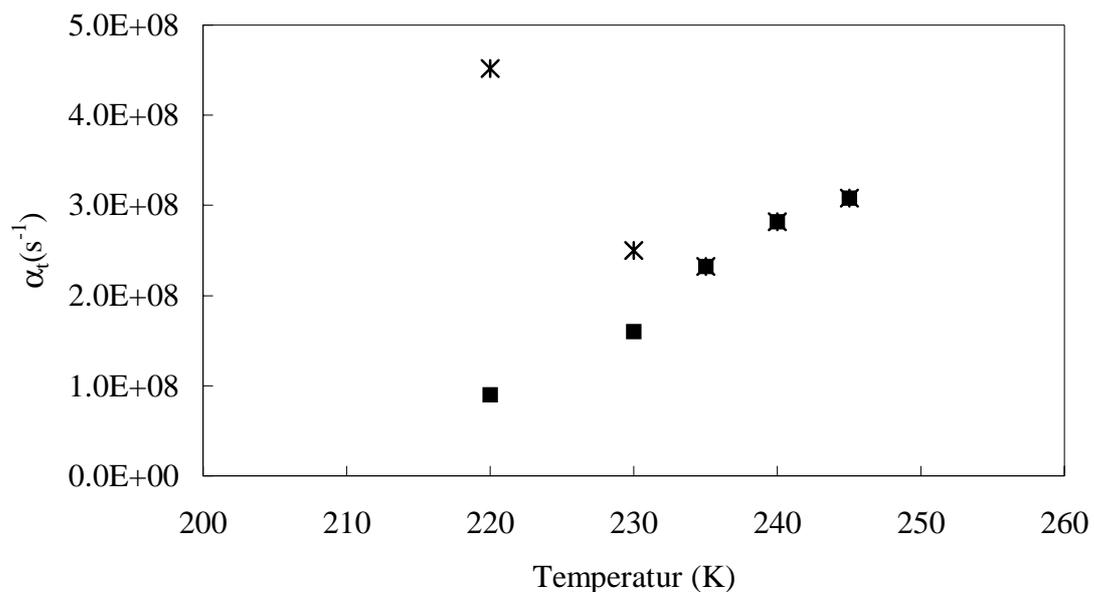


Abb. 20: Temperaturabhängigkeit der Linienverbreiterung α_t aus der Anpassung der Mößbauer-Spektren von MbCO in Glycerin (Sterne) und die unter Verwendung der Temperaturabhängigkeit von $\langle x_t^2 \rangle$ in Gl.(75) berechneten α_t -Werte (ausgefüllte Quadrate).

Die in Abb. 19 dargestellte Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte zeigt auch für MbCO in Glycerin kein lineares Verhalten. Wie bereits erwähnt, wird die Abweichung vom linearen Temperaturverlauf mit Hilfe eines Potentials für Proteine erklärt. Die hieraus resultierende Temperaturabhängigkeit wird wiederum dazu verwendet, um die bei geringer Brownscher Oszillation nicht genau definierte Linienverbreiterung α_t zu berechnen.

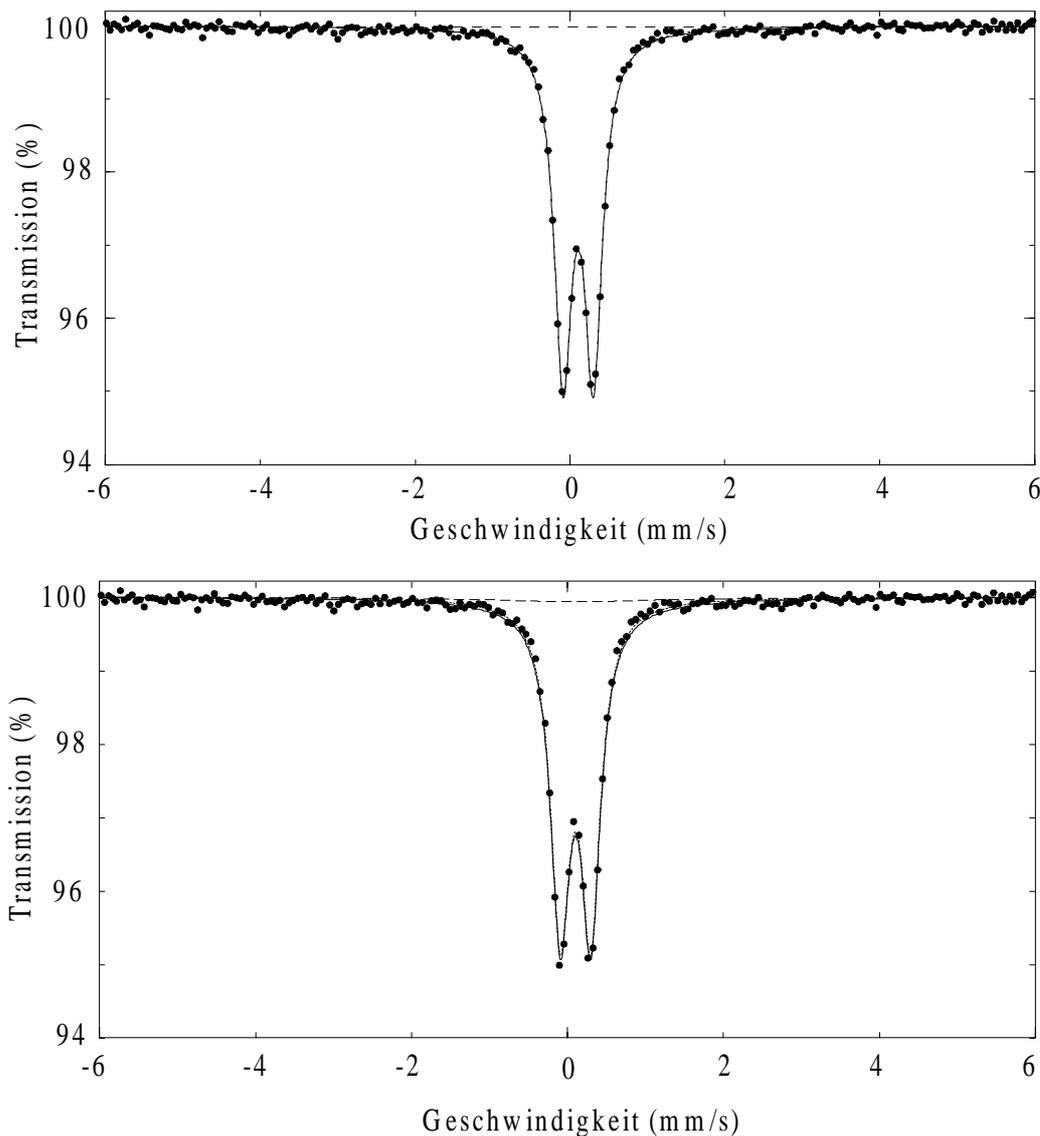


Abb. 21: Vergleich der Anpassung des Mößbauer-Spektrums von MbCO in Glycerin bei 220 K mit variablem α_t (oben) und mit festgehaltenem α_t (unten).

In Abb. 20 werden die aus der freien Anpassung erhaltenen α_t -Werte mit den berechneten α_t -Werten verglichen. Das Festhalten der α_t -Werte hat auch auf die Mößbauer-Spektren von MbCO in Glycerin keinen starken Einfluß. In Abb. 21 sind die Mößbauer-Spektren bei 220 K mit freier Anpassung von α_t und festgehaltenem α_t gegenübergestellt.

Die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte, welche die Gesamtfläche der Spektren wiedergeben, sind für MbCO in Glycerin in Abb. 22 zu sehen. Sie zeigen einen exakt linearen Temperaturanstieg. Die $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO in Glycerin, die der Fläche unter dem schmalen Lorentz-Dublett entsprechen, weichen bei einer Temperatur $T_C = 210$ K von der Geraden ab und steigen signifikant an. Dieses Verhalten entspricht qualitativ dem Temperaturverlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen. Der Unterschied zwischen den $\langle x^2 \rangle$ -Werten von MbCO in Glycerin und von MbCO-Kristallen besteht jedoch darin, daß erstere ab 210 K drastisch ansteigen, während letztere bereits bei 190 K von den $\langle x_v^2 \rangle$ -Werten abweichen.

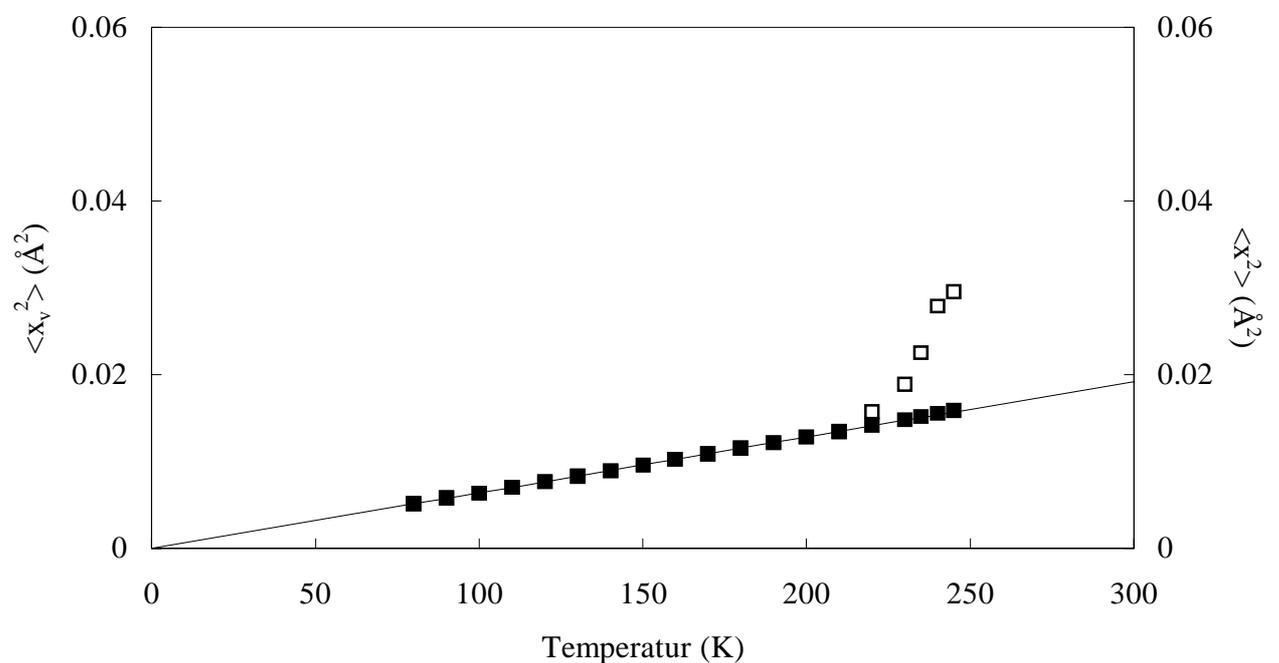


Abb. 22: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_v^2 \rangle$ (ausgefüllte Quadrate) und $\langle x^2 \rangle$ (offene Quadrate) für MbCO in Glycerin.

4.4 Optische Absorptionsspektren eines metastabilen Zustands von Myoglobin

Metastabiles Mb in 75 % (v/v) Glycerin/Wasser wurde temperaturabhängig mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie untersucht. Der genaue Temperaturablauf der optischen Absorptionsspektren ist in Abb. 23 dargestellt. Im Anschluß an die photoinduzierte Reduktion von Mbmet bei 20 K wurde die metastabile Probe auf eine Temperatur von 80 K erwärmt und wieder abgekühlt. Dadurch sollte die Rückbindung von photodissoziiertem Wasser sowie eine weitere Reduktion durch immobilisierte Elektronen ermöglicht werden. Die metastabile Probe wurde daraufhin in drei Erwärmungszyklen mit jeweils steigender Endtemperatur (150 K, 170 K, 180 K) gemessen, wobei die Aufnahme der Spektren in 10 K-Schritten erfolgte. Auf eine fünfminütige Temperaturerwärmung um jeweils 10 K folgte eine 30-minütige Equilibrierungsphase, die eine homogene Erwärmung der Probe gewährleistete.

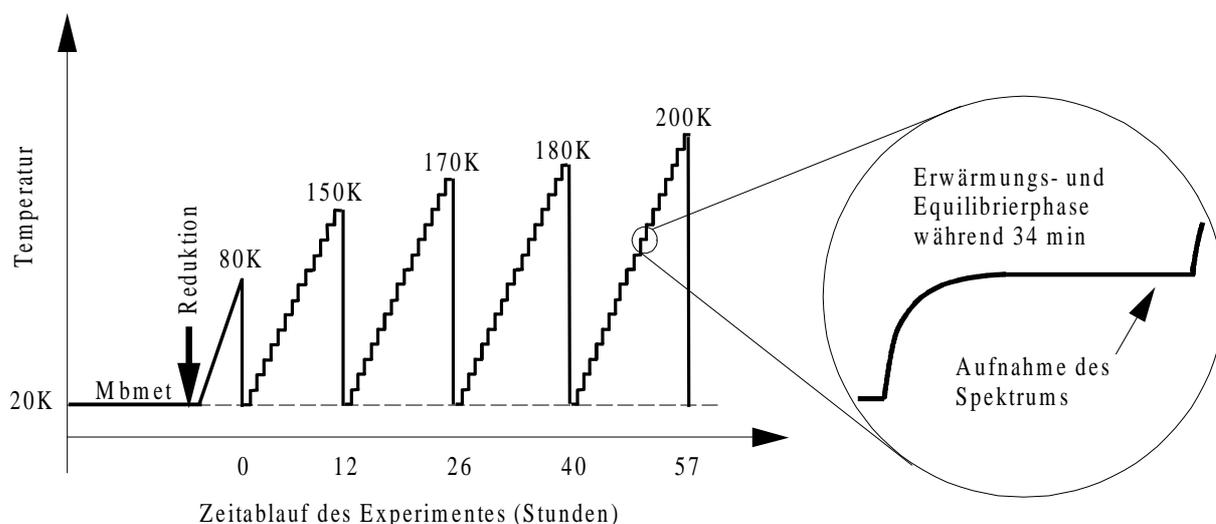


Abb. 23: Temperaturprotokoll der Messungen am metastabilen Zustand mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie. Im Anschluß an die Reduktion wurde die bestrahlte Probe auf 80 K erwärmt, um die Rückbindung von photodissoziiertem Wasser zu ermöglichen und die Reduktion durch immobilisierte Elektronen zu vervollständigen.

Die Spektren enthielten neben dem Spektrum des metastabilen Zustandes noch Beiträge von nichtreduziertem Mbmet, von Mbdesoxy und von dem Reduktionsmittel selbst. Die Extraktion

des Spektrums des metastabilen Zustandes von dem Gesamtspektrum ist in Engler et al. (1999) beschrieben.

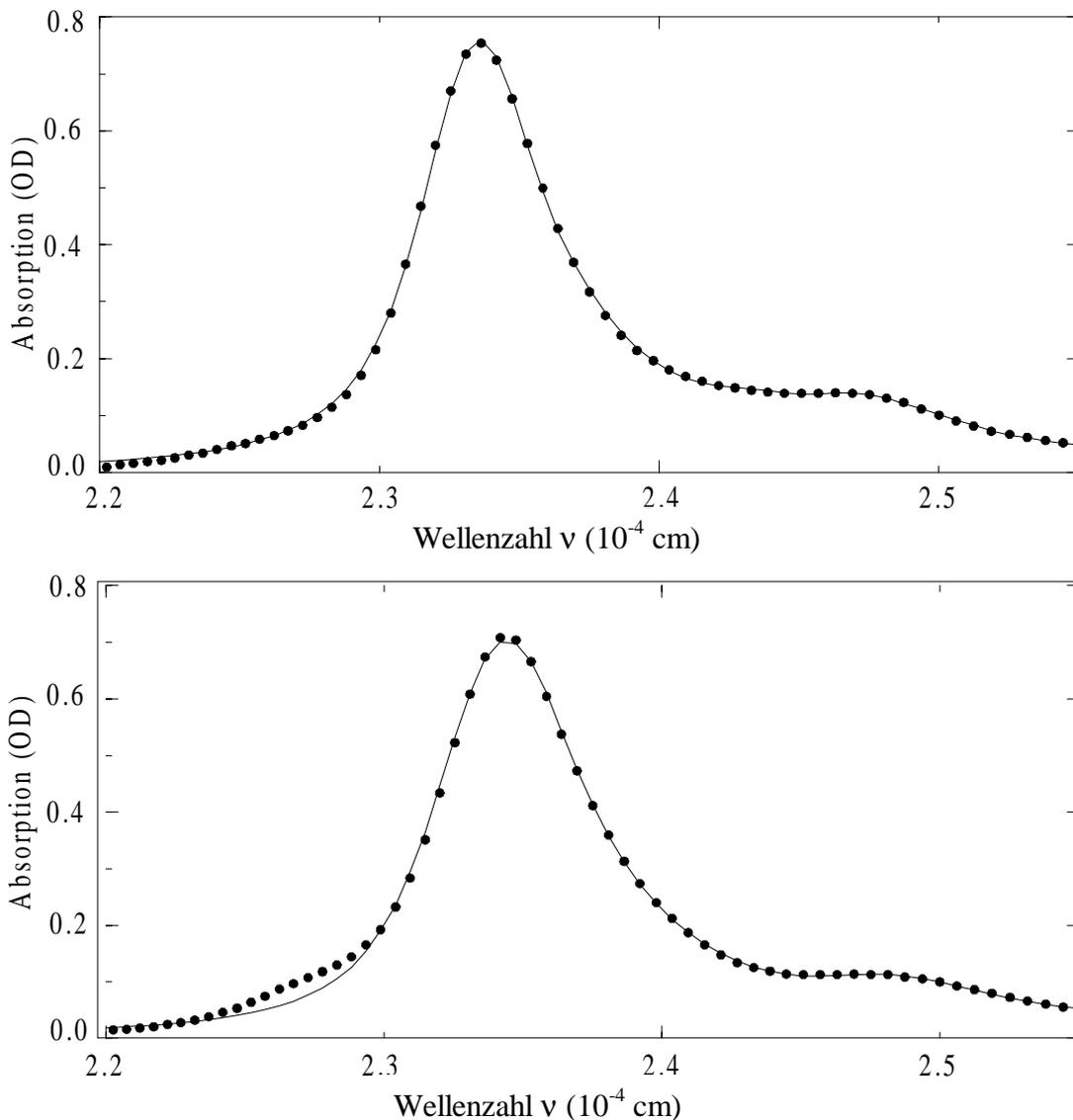


Abb. 24: Optische Absorptionsspektren der Soret-Bande des metastabilen Zustands von Mb bei 20 K im ersten Temperaturzyklus (oben) und bei 150 K im dritten Temperaturzyklus (unten).

Durch die Kopplung von Vibrationen an den elektronischen Übergang der Soret-Bande wird diese temperaturabhängig. In Abb. 24 sind die optischen Absorptionsspektren im Bereich der Soret-Bande des metastabilen Zustands bei 20 K und 150 K dargestellt. Nach der in Kap.2.2 beschriebenen Theorie ist die Linienform der Soret-Bande gemäß Gl.(53) eine Voigt-Kurve, d.h. eine Faltung einer Lorentz-Kurve mit einer Gauß-Kurve. Entscheidenden Einfluß auf die Linienform nimmt die Ligandierung. Während in fünffach ligandierten Hämproteinen wie z.B. im Falle von Mbdesoxy die Spektren einer asymmetrischen Gaußverbreiterung unterliegen,

sind die Soret-Banden von sechsfach ligandierten Hämproteinen (wie z.B. MbCO) symmetrisch. Die Linienform der Soret-Bande des metastabilen Zustands ist auf den ersten Blick derjenigen von MbCO ähnlicher als der von Mbdesoxy (siehe Abb. 50 im Anhang). Wie bei MbCO ist die Linienform der Soret-Bande von metastabilem Mb symmetrisch. Dies legt die Vermutung nahe, daß auch der metastabile Zustand von Mb sechsfach ligandiert ist.

Bestätigt wurde diese Vermutung durch die Röntgenstruktur eines Mb-Kristalls im metastabilen Zustand (Engler et al., 1999). Die Röntgenstruktur dieses Kristalls, der durch Röntgenbestrahlung eines Mbmet-Kristalls bei 80 K erzeugt wurde, belegt die weitgehende Übereinstimmung der Strukturen von Mb im metastabilen Zustand und von Mbmet (siehe Abb. 25).

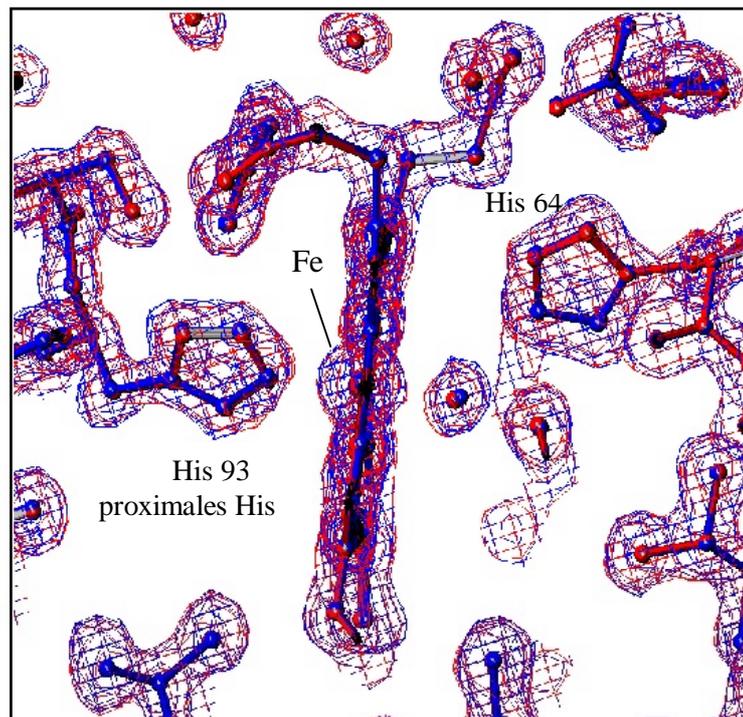


Abb. 25: Die Röntgenstruktur von Mbmet (blau) und metastabilem Mb (rot) bei 115 K in einer $(2F^0 - F_{\text{omit}}^c)$ -Elektronendichte. Auf der Seite des distalen Histidins (His 64) ist in beiden Strukturen der Sauerstoff des Wasser-Moleküls an der sechsten Koordinationsstelle zu erkennen.

In der Omit-Elektronendichte in Abb. 25 ist zu erkennen, daß sowohl der Mbmet-Kristall als auch der reduzierte Kristall ein Wassermolekül an der sechsten Koordinationsstelle von Eisen besitzen. Die Reduktion des Eisenatoms wurde dabei an demselben Kristall durch Mößbauer-Experimente überprüft. Aufgrund der strukturellen Identität von Mbmet und Mb im metastabilen Zustand wurden die optischen Absorptionsspektren mit der für sechsfach ligandierte Hämproteine entwickelten Theorie ausgewertet (Cupane et al. 1995). Der metastabile Zustand wird außerdem in Hinblick auf die strukturelle Identität mit Wasserligandiertem Mb als $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ bezeichnet.

Der Auswertung der optischen Absorptionsspektren liegen die durch Resonanz-Raman-Spektroskopie gewonnenen hochfrequenten Moden von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ zugrunde. Vorliegend wurden die vier völlig symmetrischen Raman-Moden mit Frequenzen von 372 cm^{-1} , 673 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} bzw. 1605 cm^{-1} als hochfrequente Moden verwendet. Eine fünfte hochfrequente Mode mit der Frequenz 1000 cm^{-1} wurde hinzugenommen, um mehrere in diesem Frequenzbereich nahe beieinander liegende Moden zu berücksichtigen. Diese fünf hochfrequenten Moden gehen in die Lorentz-Funktion in Gl.(54) ein. Bei der Kopplung der Vibrationsmoden an den elektronischen Übergang gehen jedoch nur Zwei-Phononen-Anregungen der hochfrequenten Moden ein (Summationsindex $m_{i,\max} = 2$). Durch die hochfrequenten Moden wird die Energie des elektronischen Übergangs der Soret-Bande um die Modenfrequenzen bzw. deren additiven Kombinationen verschoben.

Typische Anpassungen der optischen Absorptionsspektren des metastabilen Zustands von Mb sind in Abb. 24 gezeigt. In Abb. 24 oben ist die Anpassung eines 20 K-Spektrums des metastabilen Zustands aus dem ersten Temperaturzyklus und darunter die eines 150 K-Spektrums aus dem dritten Temperaturzyklus dargestellt. Das 20 K-Spektrum kann sehr gut angepaßt werden. In dem 150 K-Spektrum ist eine kleine Schulter auf der niederenergetischen Seite der Hauptlinie sichtbar, die theoretisch nicht angepaßt werden kann. Sie kommt dadurch zustande, daß es bei höheren Temperaturen nicht möglich ist, den gesamten Mbdesoxy-Anteil aus den Rohdaten abzuziehen. Um eine artifizielle Linienverbreiterung aufgrund der Mbdesoxy-Verunreinigung zu vermeiden, wird bei der Auswertung der Spektren deshalb die Linienbreite der Lorentz-Kurve bei ihrem Tieftemperaturwert von $\Gamma(T = 20\text{K}) = 195\text{ cm}^{-1}$ fixiert. Diese Vorgehensweise wird durch Resultate an MbCO gerechtfertigt, die belegen, daß die Lorentz-Linienbreite der Soret-Bande von MbCO in dem gemessenen Temperaturbereich

konstant bleibt (Di Pace et al., 1992). Im Vergleich der Lorentz-Linienbreiten von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$, MbCO und Mbdesoxy liegt die Lorentz-Linienbreite von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ ($\Gamma_{\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}} = 195 \text{ cm}^{-1}$) genau zwischen der Lorentz-Linienbreite von MbCO ($\Gamma_{\text{MbCO}} = 180 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$) und Mbdesoxy ($\Gamma_{\text{Mbdesoxy}} = 211 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$).

Aus der Anpassung der Spektren gewinnt man die elektronische Übergangsfrequenz des metastabilen Zustands (siehe Gl.(54)). Die elektronische Übergangsfrequenz $\nu_0(T)$ ist in Abb. 26 für alle vier Temperaturzyklen als Funktion der Erwärmungstemperatur aufgetragen. Unterhalb von 100 K entspricht die Frequenzverschiebung derjenigen von Mb im Gleichgewichtszustand (Cupane et al., 1993). Über 100 K ist eine deutliche Frequenzverschiebung im ersten Temperaturzyklus (Endtemperatur 150 K) zu erkennen, die irreversibel ist. Bei Abkühlung auf 20 K geht die Übergangsfrequenz nicht wieder auf ihren Ausgangswert zurück. Die Übergangsfrequenz behält vielmehr den zuletzt eingenommenen Wert bei ($\nu_0(150 \text{ K})$) bei. In den nächsten beiden Temperaturzyklen (Endtemperatur 170 K und 180 K) ändert sich die Frequenz erst wieder bei Überschreitung der maximalen Temperatur des vorangegangenen Zyklus (150 K bzw. 170 K). In dem vierten Temperaturzyklus verändert sich die Übergangsfrequenz nur geringfügig.

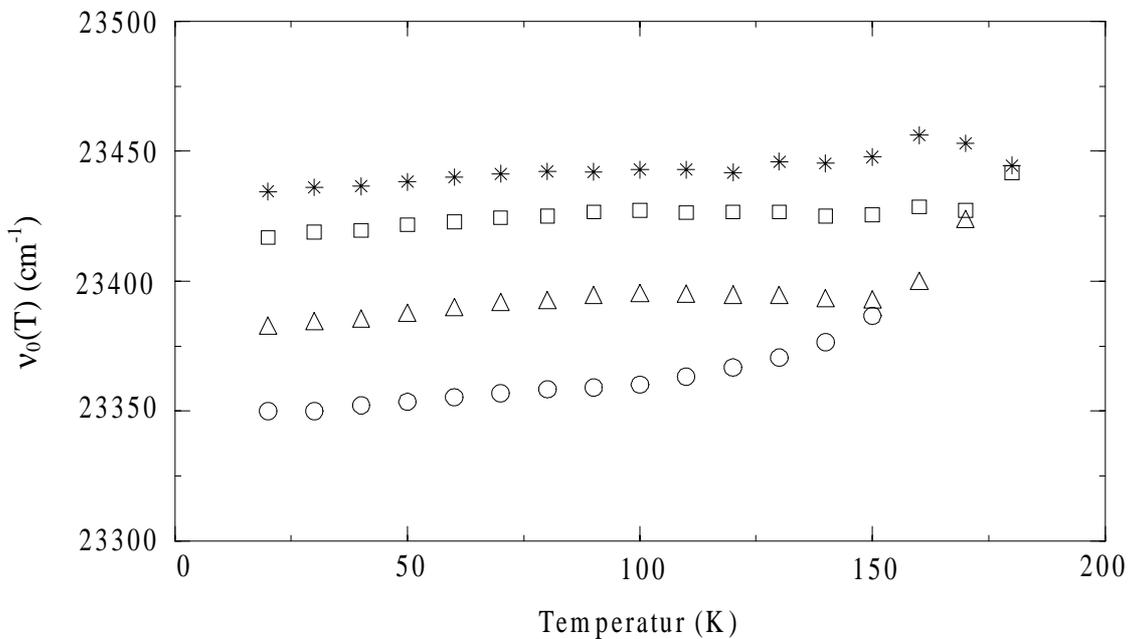


Abb. 26: Temperaturabhängigkeit der elektronischen Übergangsfrequenz $\nu_0(T)$ des metastabilen Zustands in den verschiedenen Zyklen mit steigenden Endtemperaturen, Kreise: Endtemperatur 150 K, Dreiecke: Endtemperatur 170 K, Quadrate: Endtemperatur 180 K, Sterne: Endtemperatur 200 K.

Neben der Übergangsfrequenz spielen die linearen Kopplungsparameter der Vibrationen eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Spektren. Mit Ausnahme der linearen Kopplungskonstante S_{h3} der hochfrequenten Mode ν_{h3} bei 1000 cm^{-1} sind die Kopplungskonstanten nahezu temperaturunabhängig. Die Parameter werden deshalb über alle Temperaturzyklen gemittelt. Die Durchschnittswerte sind zusammen mit den Standardwerten in Tab. 4 zusammengefaßt. Zum Vergleich sind auch die Kopplungskonstanten von MbCO und Mbdesoxy inklusive der jeweiligen Frequenzen mit aufgenommen. Die veränderliche Kopplungskonstante der Mode ν_{h3} von Fe(II)MbH₂O zeigt das gleiche Temperaturverhalten wie die Übergangsfrequenz $\nu_0(T)$. Ihr dimensionsloser Wert nimmt in dem ersten Temperaturzyklus von anfangs 0.065 bis auf 0.02 ab, ändert sich aber in den folgenden Zyklen nicht mehr wesentlich.

Hochfrequente Mode					
(siehe Gl.(54))	ν_{h1}	ν_{h2}	ν_{h3}	ν_{h4}	ν_{h5}
Fe(II)MbH ₂ O					
Frequenz (cm^{-1})	372	673	1000	1362	1605
Kopplungskonstante					
S_{hj}	0.143 ± 0.026	0.047 ± 0.015	veränderlich	0.075 ± 0.006	0.026 ± 0.003
MbCO					
Frequenz (cm^{-1})	350	676	1100	1374	-
Kopplungskonstante					
S_{hj}	0.12 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.008	0.09 ± 0.01	-
Mbdesoxy					
Frequenz (cm^{-1})	370	674	1100	1357	-
Kopplungskonstante					
S_{hj}	0.32 ± 0.02	0.24 ± 0.02	< 0.01	0.10 ± 0.01	-

Tab. 4: Lineare Kopplungskonstanten S_{hj} der fünf hochfrequenten Moden ν_{hj} aus der Anpassung der Soret-Bande des metastabilen Zustands von Mb. Die Kopplungskonstanten sind über alle Temperaturzyklen gemittelt und zusammen mit den Standardabweichungen aufgelistet. Zum Vergleich sind neben den Kopplungskonstanten des metastabilen Zustands auch diejenigen von MbCO und Mbdesoxy angegeben.

In Abb. 27 ist das Quadrat der Gaußverbreiterung σ^2 von Fe(II)MbH₂O als Funktion der Temperatur aufgetragen. Da die Temperaturabhängigkeit der Gaußverbreiterung in den vier Temperaturzyklen die gleiche ist, wurden die σ^2 -Werte einer Temperatur für die verschiedenen Zyklen gemittelt. Die σ^2 -Werte von Fe(II)MbH₂O werden in Abb. 27 mit den σ^2 -Werten von MbCO und Mbdesoxy verglichen. Die σ^2 -Werte von MbCO und Mbdesoxy wurden dabei vertikal verschoben, so daß die Temperaturabhängigkeiten der verschieden ligandierten Mb-Proben besser vergleichen werden können. Die additive Konstante der σ^2 -Werte, d.h. die inhomogene Gaußverbreiterung, die auf die Verteilung von Konformationssubzuständen zurückzuführen ist, spielt bei dem Vergleich der Temperaturabhängigkeit keine Rolle. Auf sie wird im folgenden nicht näher eingegangen.

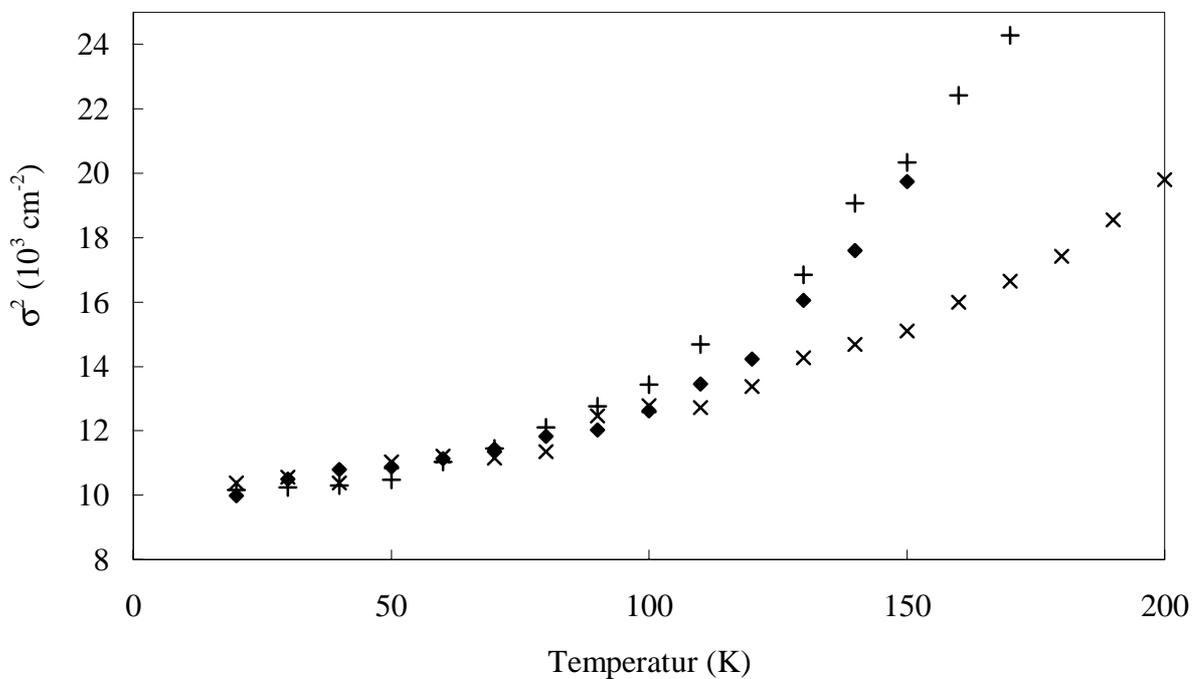


Abb. 27: Quadrat der Gaußverbreiterung σ^2 als Funktion der Temperatur. Die Werte stellen Mittelwerte der verschiedenen Temperaturzyklen dar. Die σ^2 -Werte von MbCO und Mbdesoxy wurden dabei vertikal verschoben, um die Temperaturabhängigkeiten der verschieden ligandierten Mb-Proben besser vergleichen zu können.

5. Myoglobin in Trehalose

5.1 Röntgenstruktur eines Myoglobin-Einkristalls mit eindiffundierter Trehalose-Lösung

In einem Proteinkristall findet ein regelmäßiger Austausch zwischen Kristallwasser und Aufbewahrungslösung statt. Löst man in der Aufbewahrungslösung Stoffe wie z.B. Trehalose, können diese ausgetauscht werden. Für den Fall, daß es eine Protein-Trehalose-Wechselwirkung in Lösung gibt, ist davon auszugehen, daß Trehalose-Moleküle Bindungen zu dem Protein ausbilden. Um dies herauszufinden, wurde ein Mbmet-Kristall der Raumgruppe P_{21} , in den Trehalose aus einer gesättigten Lösung eindiffundiert wurde, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse untersucht¹.

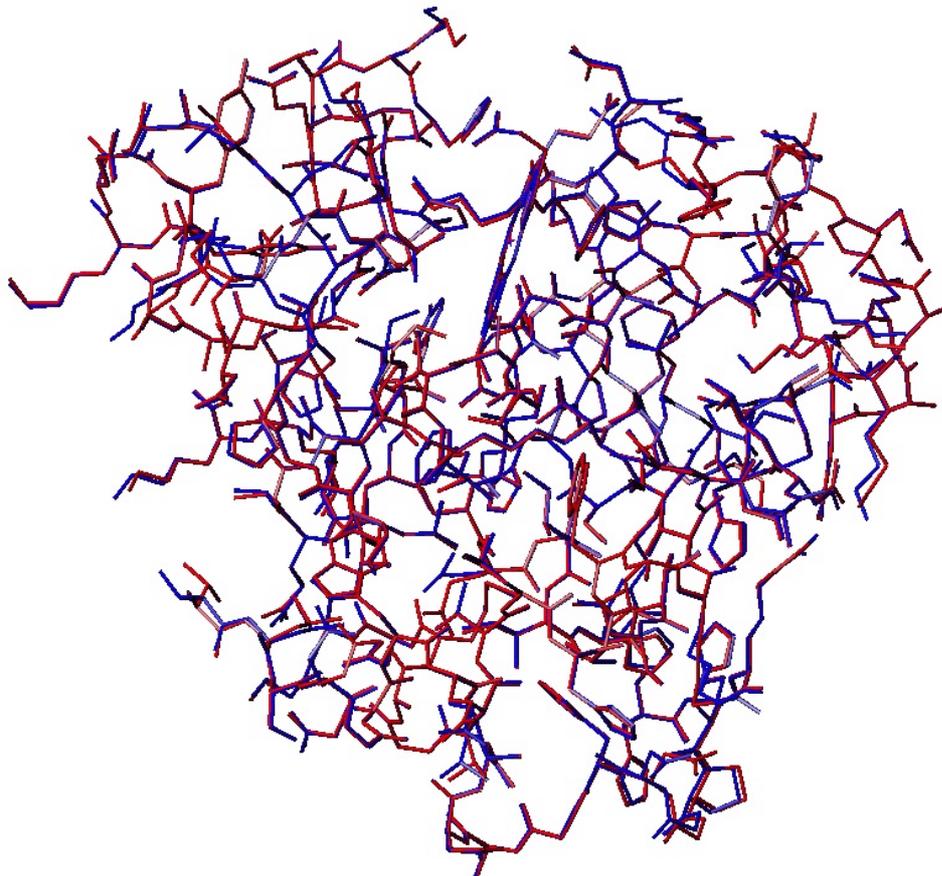


Abb. 28: Röntgenstruktur eines Mbmet-Kristalls (blau) und eines Mbmet-Kristalls mit eindiffundierter Trehalose-Lösung (rot) bei 300 K.

¹ Für ein Studium der Röntgenstrukturanalyse sei auf die Spezialliteratur verwiesen (Drenth, 1994; Wölfel, 1987; Schmidt, 1996).

Diese Struktur wird in Abb. 28 mit der Struktur eines Mbmet-Kristalls verglichen, der ohne Trehalose präpariert wurde (Ostermann, 1999b). Ein Überblick über die Datensammlung und Verfeinerung der Struktur des Mbmet-Trehalose-Kristalls ist im Anhang gegeben. Aus dem Vergleich der Röntgenstrukturen ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Mbmet-Kristall mit eindiffundierter Trehalose-Lösung und dem Referenz-Kristall von Mbmet. Zur Kontrolle wurde eine Differenzabstandsmatrix der beiden Strukturen bestimmt, die minimale Unterschiede zwischen verschiedenen Proteinstrukturen aufzeigt. Zur Berechnung der Differenzabstandsmatrix werden zunächst die Abstände der C_{α} -Kohlenstoffatome voneinander für jede Struktur separat berechnet. Die Abstände werden in Matrixform geschrieben, wobei das Matrixelement ij dem Abstand zwischen dem i -ten und j -ten C_{α} -Atom entspricht. Die Abstandsmatrizen der beiden Strukturen werden dann voneinander subtrahiert und das Ergebnis in der Differenzabstandsmatrix abgelegt. Unterscheidet sich die relative Lage von zwei Atomen i und j nicht, ist das Matrixelement der Differenzabstandsmatrix Null. Werte ungleich Null zeigen mehr oder weniger ausgeprägte Unterschiede in den Strukturen an. In Abb. 29 ist die Differenzabstandsmatrix der Röntgenstrukturen eines Mbmet-Kristalls und des Mbmet-Kristalls mit eindiffundierter Trehalose-Lösung zu sehen. Unterschiede zwischen den Strukturen von Mbmet und Mbmet in Trehalose finden sich hauptsächlich in den Bereichen um die Aminosäuren Lysin 50 und Glycin 120. Hier weichen die Abstände der C_{α} - C_{α} -Atome bis zu 0.3 Å bzw. bis zu 0.7 Å voneinander ab. Bei den C-terminalen Aminosäuren zeigen sich ebenfalls sehr hohe Differenzabstände. Diese beruhen jedoch nicht auf Lösungsmittelleffekten, sondern auf der großen Flexibilität des C-Terminus und werden deswegen im folgenden nicht weiter diskutiert.

Neben den Kristallstrukturen wurden auch die Wasserstrukturen des Mbmet-Trehalose-Kristalls und des Mbmet-Kristalls miteinander verglichen. In dem Mbmet-Trehalose-Kristall wurden 99 Wasser-Moleküle mit B-Faktoren kleiner gleich 50 gefunden. Von diesen stimmen die Koordinaten bei 79 Wasser-Molekülen sehr gut mit den Koordinaten der entsprechenden Wasser-Moleküle in der Mbmet-Struktur überein. In Abb. 30 sind die Abstände von den Wassermolekülen in der Mbmet-Trehalose-Struktur und den entsprechenden Wassermolekülen in der Mbmet-Struktur dargestellt. Von zwei Ausnahmen abgesehen sind die Wasserabstände kleiner als 0.5Å.

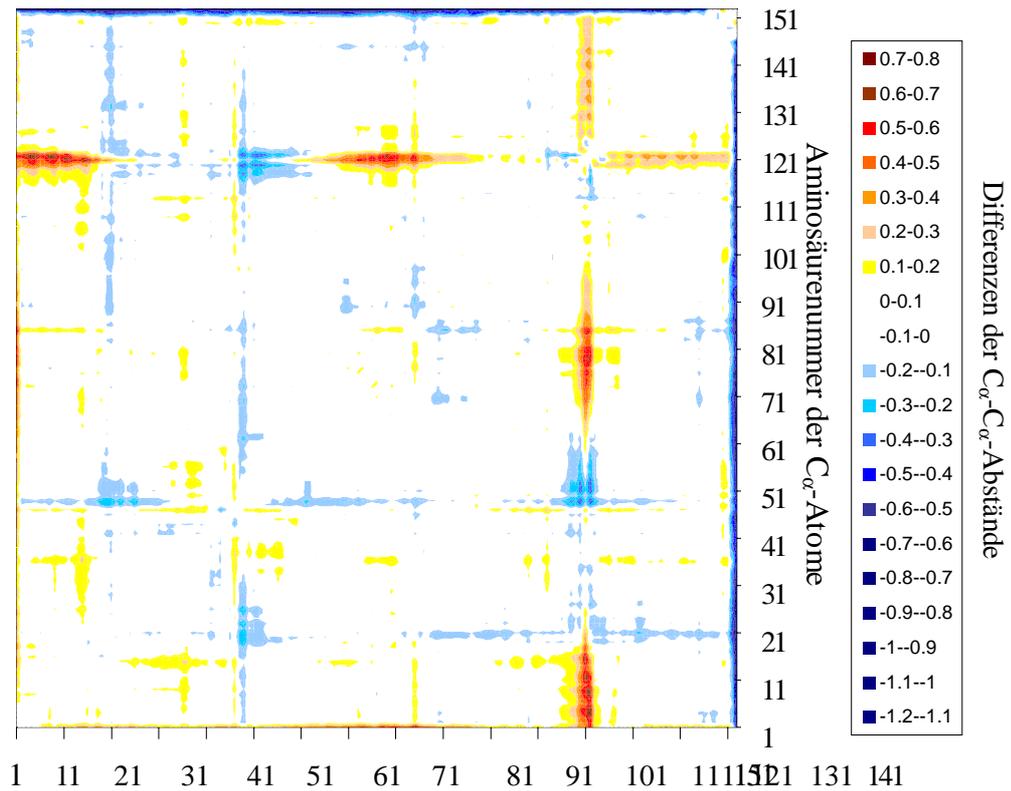


Abb. 29: C_{α} - C_{α} -Differenzabstandsmatrix der Röntgen-Strukturen von Mbmet und Mbmet mit eindiffundierter Trehalose-Lösung. Die Differenzen der C_{α} - C_{α} -Abstände sind in Intervalle unterteilt, wobei die betragsmäßig größten Differenzen mit dunkelroter (Differenzen < 0) bzw. dunkelblauer Farbe (Differenz > 0) gekennzeichnet sind. Weiße Stellen kennzeichnen Abstände kleiner 0.1 \AA .

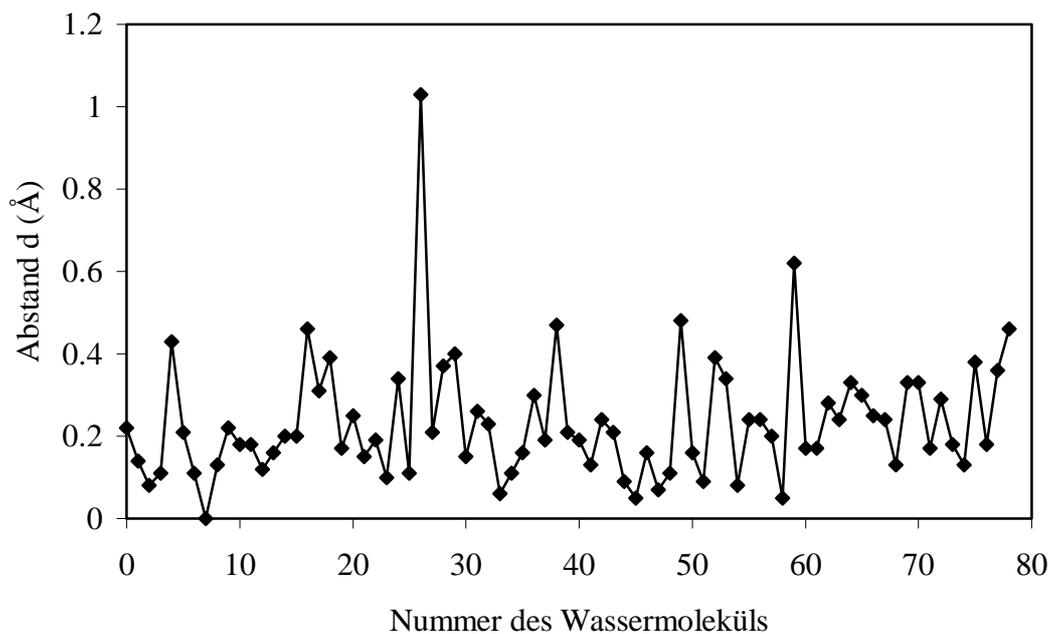


Abb. 30: Abstände zwischen den Wassermolekülen der Mbmet-Struktur und den entsprechenden Wassermolekülen in der Mbmet-Trehalose-Struktur.

5.2 Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen von röntgenbestrahltem Myoglobin in Trehalose

Um die Relaxation einer röntgenbestrahlten Probe schrittweise untersuchen zu können, wurde folgendes in der Literatur beschriebene Experiment (Prusakov et al., 1995) durchgeführt. Von Mbmet, im vorliegenden Fall in Trehalose getrocknet, wurde bei 80 K ein Mößbauer-Spektrum aufgenommen (siehe Abb. 31). Es zeigte ein asymmetrisches Dublett, das typisch für ein Fe^{3+} -Häm in einem schwachen externen Magnetfeld ist (Thomanek et al., 1977).

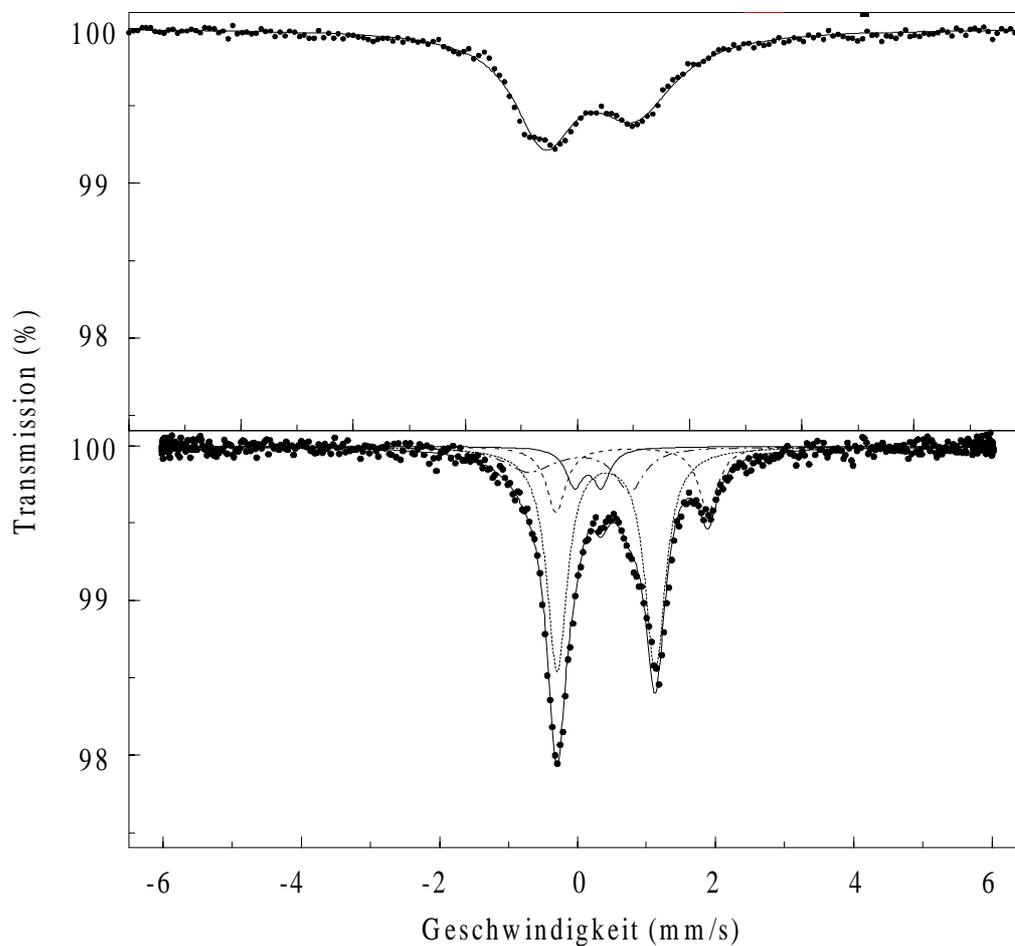


Abb. 31: Mößbauer-Spektren der Mbmet-Trehalose-Probe bei 80 K vor und nach der Röntgenbestrahlung. Im oberen Bild ist das asymmetrische Mbmet-Spektrum zu sehen. Im unteren Bild ist das deutlich veränderte Spektrum der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe abgebildet: durchgezogene Linie entlang der Meßpunkte: Fit; gepunktete Linie: metastabiler Zustand von Mb; gestrichelte Linie: Mbdesoxy; durchgezogene Linie mit kleinem Effekt: MbCO; strichpunktierte Linie: Hämochrom.

Nach Aufnahme des Mößbauer-Spektrums wurde die Mbmet-Trehalose-Probe intensiver Röntgenstrahlung bei 80 K für insgesamt 12 Tage ausgesetzt. Die bestrahlte Mbmet-Trehalose-Probe wurde bei 80 K aus der Bestrahlungsapparatur ausgebaut und erneut in ein Mößbauer-Spektrometer eingebaut. Beim Aus- und Einbau der Probe wurde sehr genau darauf geachtet, daß sich die Probe stets in flüssigem Stickstoff befand, so daß eine Erwärmung der bestrahlten Probe ausgeschlossen werden kann. Die Röntgenbestrahlung führte zu einer drastischen Änderung des Mößbauer-Spektrums, das sich nun mit drei symmetrischen Dubletts und einem asymmetrischen Dublett anpassen ließ (siehe Abb. 31 unten). Neben einem dominanten asymmetrischen Dublett tritt mit jeweils kleiner werdender Absorptionsfläche ein weiteres asymmetrisches Dublett, ein symmetrisches Dublett mit großer Quadrupolaufspaltung und ein symmetrisches Dublett mit kleiner Quadrupolaufspaltung auf. Das dominante Dublett, das ca. 60 % der Gesamtfläche einnimmt, wird Fe(II)MbH₂O genannt. Als Hämochrom wird das asymmetrische Dublett mit einem Flächenanteil von 20% bezeichnet. Das symmetrische Dublett mit großer Quadrupolaufspaltung ist Mbdesoxy, während das symmetrische Dublett mit kleiner Quadrupolaufspaltung MbCO ist. Diese Zuordnungen werden im Detail in Kap. 5.2 diskutiert. Die Hyperfeinparameter der vier Spezies, die bei 80 K im Mößbauer-Spektrum der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe zu erkennen sind, sind neben den Hyperfeinparametern von Mbdesoxy in Tab. 5 aufgeführt.

Im weiteren Versuchsablauf wurde die bestrahlte Mbmet-Trehalose-Probe schrittweise erwärmt und wieder abgekühlt, um die Veränderungen mit steigender Erwärmungstemperatur mit Hilfe von Mößbauer-Spektren bei 80 K beobachten zu können. Die bestrahlte Probe wurde hierzu für jeweils 20 Stunden auf eine Temperatur T_i erwärmt und anschließend auf 80 K abgekühlt. Bei 80 K wurde dann ein Mößbauer-Spektrum aufgenommen, dessen Meßzeit ca. drei Tage betrug. Im Anschluß an die Messung wurde die Probe auf die nächste Erwärmungstemperatur gebracht und nach 20 Stunden erneut auf 80 K abgekühlt, um ein Mößbauer-Spektrum aufzunehmen. Diese Vorgehensweise wiederholte sich bei schrittweiser Erhöhung der Erwärmungstemperatur T_i von 120 K auf 260 K. Während die ersten zwei Temperaturschritte 40 K und 30 K betragen, waren die Temperaturunterschiede zwischen den nächsten Erwärmungsschritten lediglich 10 K. Ab 200 K wurden die Temperaturschritte wieder auf 30 K erhöht. Die nach jeder Erwärmung aufgenommenen Mößbauer-Spektren bei 80 K sind in Abb. 32 dargestellt.

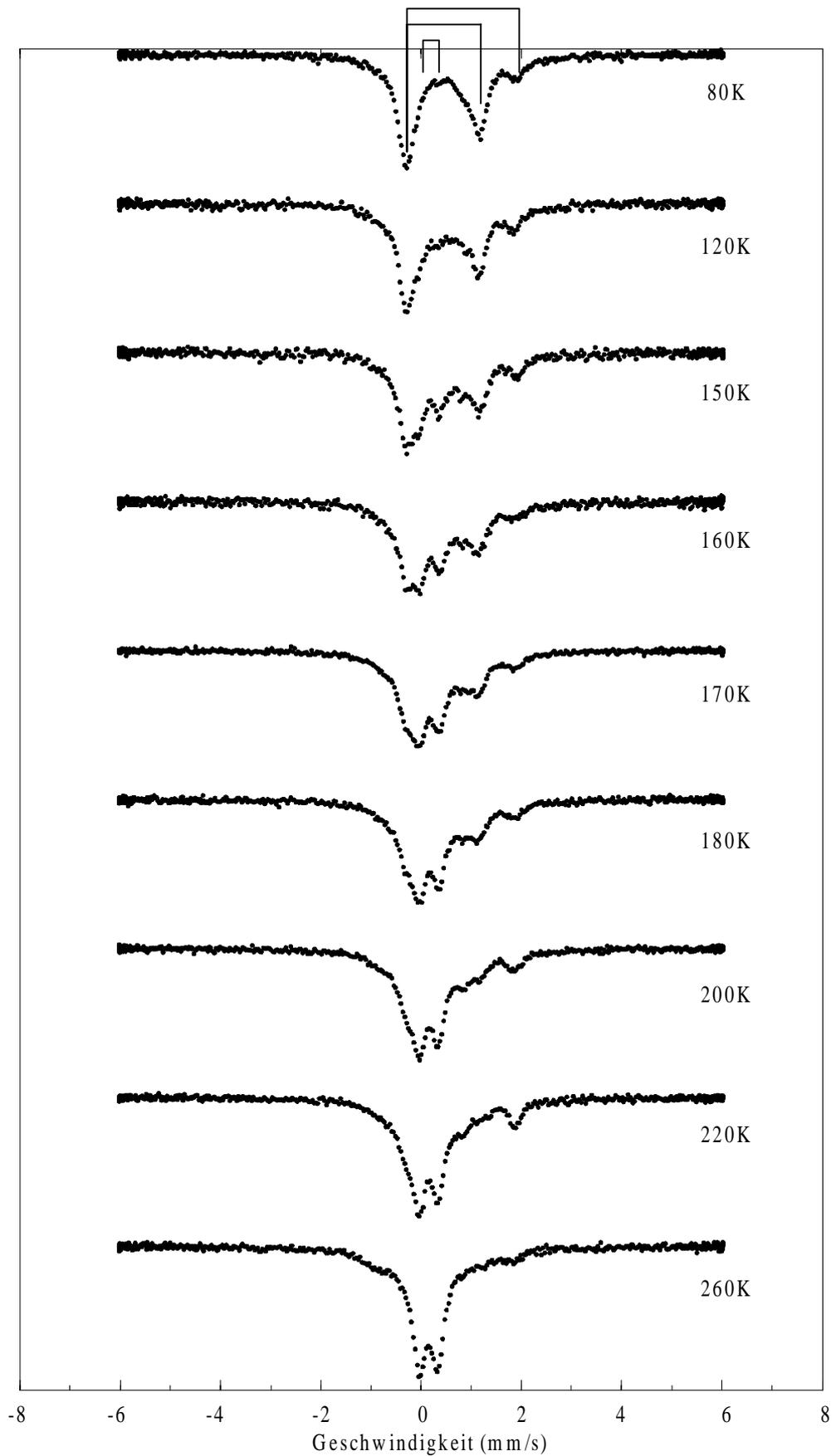


Abb. 32: Die bei jeweils 80 K aufgenommenen Mößbauer-Spektren der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe vor Erwärmung bzw. nach Erwärmung von 120 K auf 260 K. Bei dem Ausgangsspektrum (vor Erwärmung bei 80 K) ist die elektrische Quadrupolaufspaltung von MbCO ($EQ = 0.39 \text{ mm/s}$), von Mb im metastabilen Zustand ($EQ = 1.42 \text{ mm/s}$) und von Mbdesoxy ($EQ = 2.2 \text{ mm/s}$) mit eingezeichnet.

Hyperfeinparameter	Fe(II)MbH ₂ O	MbCO	Mbdesoxy	Hämochrom	Mboxy
EQ (mm/s)	1.42	0.39	2.20	1.46	2.20
IS (mm/s)	0.53	0.27	0.90	0.14	0.25
LBR (mm/s)	0.36	0.30	0.34	0.9 und 0.5	0.34

Tab. 5: Die Hyperfeinparameter und die Linienbreite der verschiedenen Mb-Spezies in der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe: Elektrische Quadrupolaufspaltung EQ, Isomerieverschiebung IS, Linienbreite LBR.

Veränderungen der Spektren mit zunehmender Erwärmungstemperatur sind deutlich zu erkennen. Die Fläche von Fe(II)MbH₂O, dem dominierenden asymmetrischen Dublett bei 80 K, nimmt mit steigender Temperatur ab. Nach Erwärmung der bestrahlten Probe auf 160 K sind die Flächen der vier Spezies in etwa gleich groß. In dem Spektrum nach Erwärmung auf 260 K ist Fe(II)MbH₂O nicht mehr zu erkennen. Das Spektrum wird von dem MbCO-Dublett mit geringer Quadrupolaufspaltung dominiert. Dies bedeutet, daß bei Erhöhung der Erwärmungstemperatur auf 260 K die Spezies Fe(II)MbH₂O von MbCO verdrängt wird. Weiterhin ist zu erwähnen, daß bei einer Erwärmung der Probe auf 240 K und 260 K Mboxy entsteht. Mboxy ist in dem Spektrum, das im Anschluß an die Erwärmung auf 260 K aufgenommen wurde, rein optisch nicht zu erkennen, da es in den breiten Flanken des zentralen Dubletts enthalten ist. Um die Veränderungen aller Spezies quantitativ angeben zu können, sind deren prozentuale Flächenanteile in Abb. 33 dargestellt.

Der Flächenanteil von Fe(II)MbH₂O in der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe nimmt monoton von 80 K bis 260 K ab. Der Flächenanteil von MbCO verläuft entgegengesetzt zu dem Flächenanteil von Fe(II)MbH₂O. Fe(II)MbH₂O wird nahezu vollständig in MbCO umgewandelt. Die Konzentration von Mbdesoxy und Hämochrom ist relativ konstant. Der Flächenanteil von Mboxy steigt erst bei 220 K auf einen geringen Wert von 10 % an.

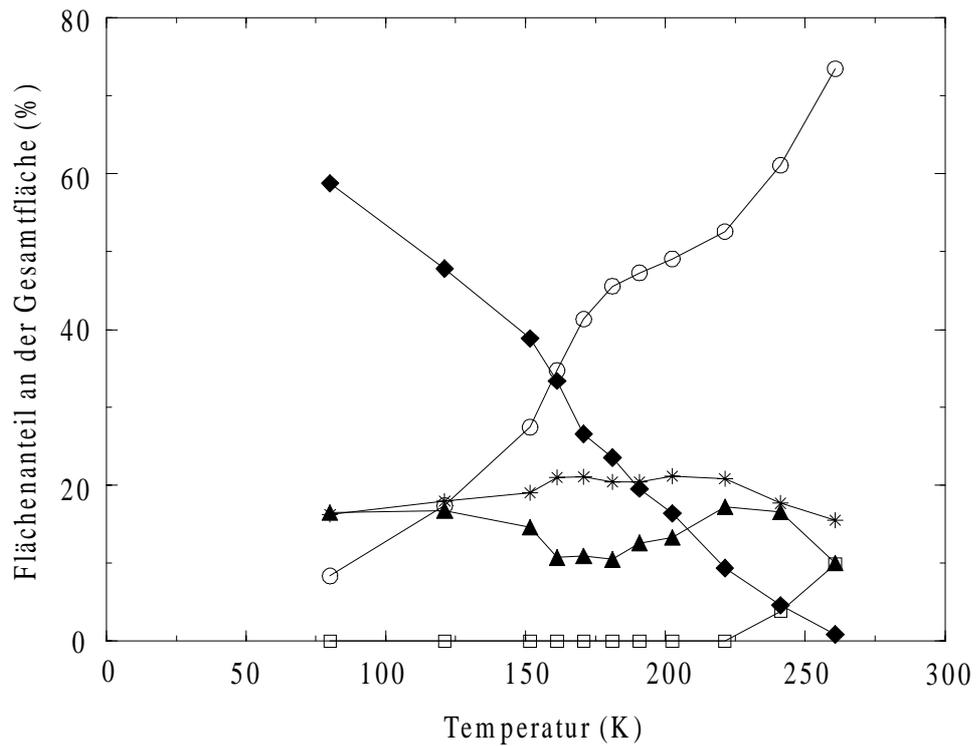


Abb. 33: Prozentuale Flächenanteile der in der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe auftretenden Spezies in Abhängigkeit von der Erwärmungstemperatur. Rauten: Metastabiler Zustand von Mb; Kreise: MbCO; Sterne: Hämochrom; Dreiecke: Mbdesoxy; Quadrate: Mboxy.

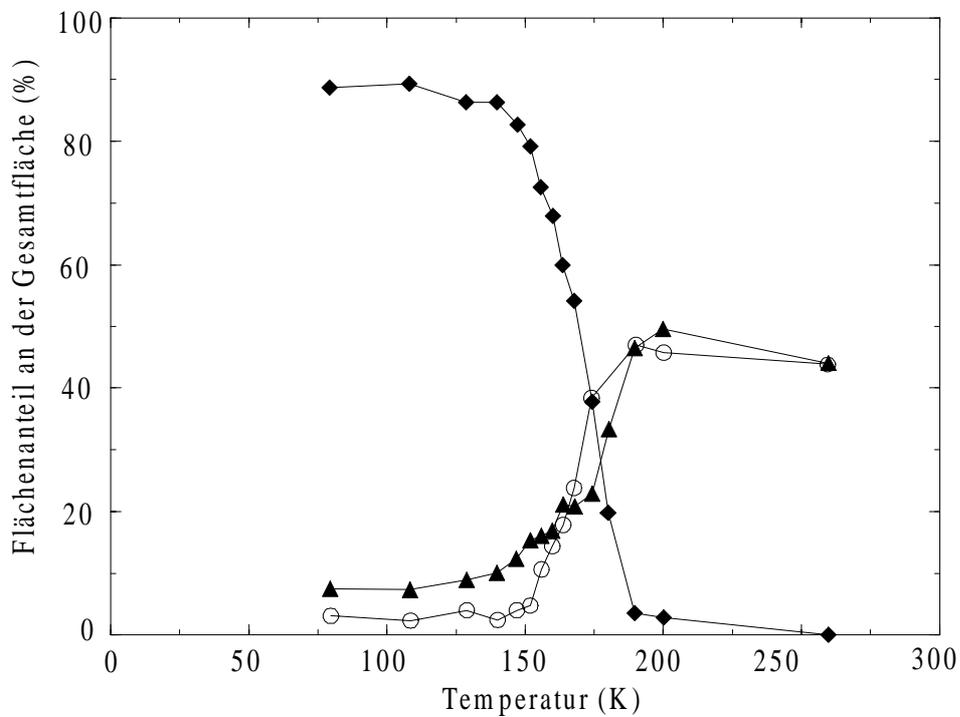


Abb. 34: Prozentuale Flächenanteile der in der bestrahlten Mbmet-Glycerin-Probe auftretenden Spezies in Abhängigkeit von der Erwärmungstemperatur. Rauten: Metastabiler Zustand von Mb; Kreise: MbCO; Dreiecke: Mbdesoxy.

Den Ergebnissen der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe werden die Ergebnisse aus einem analogen Bestrahlungsexperiment an Mbmet in Glycerin gegenübergestellt (Prusakov et al., 1995). Eine Abb. 33 entsprechende Darstellung der Mb-Spezies von bestrahltem Mbmet in Trehalose ist in Abb. 34 für MbCO in Glycerin zu sehen. Die Fläche von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ in der bestrahlten Mbmet-Glycerin-Probe nimmt im Temperaturbereich von 150 K bis 190 K nahezu auf Null ab. Der MbCO-Flächenanteil steigt im gleichen Temperaturbereich jedoch nur auf maximal 40 % an. Ein dem MbCO-Flächenanteil paralleles Verhalten zeigt der Flächenanteil von Mbdesoxy. In der bestrahlten Mbmet-Glycerin-Probe wird also bei maximaler Erwärmungstemperatur $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ zu gleichen Teilen in MbCO und Mbdesoxy umgewandelt.

6. Diskussion

Die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ ist ein Maß für die Beweglichkeit eines absorbierenden Mößbauer-Kerns und damit ein wichtiger Parameter für die Untersuchung der Dynamik von Proteinen. Die Temperaturabhängigkeit der $\langle x^2 \rangle$ -Werte von Mb läßt sich in zwei verschiedene Bereiche unterteilen: bei tiefen Temperaturen nehmen die $\langle x^2 \rangle$ -Werte linear mit der Temperatur zu, während sie bei höheren Temperaturen überproportional mit der Temperatur ansteigen. Die Grenztemperatur zwischen diesen nicht exakt trennbaren Bereichen wird als charakteristische Temperatur T_C bezeichnet.

Die lineare Zunahme der $\langle x^2 \rangle$ -Werte bei tiefen Temperaturen ist durch harmonische Bewegungen zu erklären. Das mittlere Auslenkungsquadrat einer harmonischen Bewegung ist aufgrund des parabelförmigen Potentials immer proportional zu der Temperatur T:

$$\langle x_v^2 \rangle = \frac{k_B T}{m\omega^2} \quad (62)$$

Dabei ist k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, m die Masse und ω die Schwingungsfrequenz des Atoms oder Moleküls. Die linear mit der Temperatur steigenden $\langle x^2 \rangle$ -Werte werden mit dem Index v für *vibrational modes* (= Festkörperschwingungen) gekennzeichnet.

Oberhalb der Grenztemperatur T_C weichen die mittleren Auslenkungsquadrate von dem linearen Verhalten der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte ab. Die Bewegung der Eisenatome läßt sich nun nicht mehr alleine durch harmonische Festkörperschwingungen erklären. Hier tragen neue Bewegungsmoden zur mittleren quadratischen Auslenkung bei. Da diese nur bei Proteinen, nicht aber bei kleinen Molekülen beobachtbar sind, spricht man vom Einsetzen der proteinspezifischen Dynamik. Im oberen Temperaturbereich tragen proteinspezifische Bewegungen und harmonischen Festkörperschwingungen zur mittleren quadratischen Auslenkung des Eisenatoms bei:

$$\langle x^2 \rangle = \langle x_v^2 \rangle + \langle x_t^2 \rangle \quad (63)$$

wobei die aus der proteinspezifischen Dynamik resultierende mittlere quadratische Auslenkung als $\langle x_t^2 \rangle$ bezeichnet wird. In den Mößbauer-Spektren ist die proteinspezifische Dynamik als

zusätzliche breite Linien beobachtbar. Die breiten Linien deuten auf Bewegungen mit größeren Amplituden hin (Craig und Sutin, 1963; Shaitan und Rubin, 1980; Mayo et al., 1981; Parak et al., 1982; Parak und Knapp, 1984; Nowik et al., 1985).

Ein anschauliches Bild von proteinspezifischer Dynamik lieferten Untersuchungen einer Mutante eines mit CO ligandierten Mb-Kristalls mit Hilfe der Röntgenkristallographie (Ostermann et al., 1999a). Als Mutante wurde MbCO L29W verwendet, bei welcher die Aminosäure Leucin 29 gegen Tryptophan ausgetauscht wurde. Von dieser Mutante wurde die temperaturabhängige Struktur gemessen, bei der mittels Laseranregung der CO-Ligand photodissoziiert wurde. Durch die langsamere Rückbindung des CO-Liganden bei der Mutante im Vergleich zu nativem Mb wird die Untersuchung der photodissoziierten Struktur erleichtert. Wird der CO-Ligand mittels Laseranregung bei Temperaturen unterhalb von $T_C = 180$ K dissoziiert, wird die Bindung zum Hämeisen gebrochen, der Ligand verbleibt jedoch in der distalen Hämtasche. Neben der Verschiebung der Hämgruppe um ≈ 0.2 Å und des Hämeisens um ≈ 0.3 Å aus der Hämebene in Richtung des proximalen Histidins treten nur geringe strukturelle Änderungen gegenüber der Ausgangsstruktur auf. Führt man die Photodissoziation des CO-Liganden bei höheren Temperaturen als T_C durch, ändert sich die Struktur wesentlich. In den Bereichen der B-, C-, und E-Helix, die sich bezüglich der Hämebene auf der Seite der CO-Bindungsstelle befinden, sind sehr große Verschiebungen zu beobachten. Beispielsweise schwingt das distale Histidin der E-Helix in Richtung der CO-Bindungsstelle und das Tryptophan der B-Helix (Trp B29) dreht sich in die Ebene parallel zur Hämebene. Bemerkenswert an der photodissoziierten Struktur ist ferner die Position des CO-Liganden. Der CO-Ligand befindet sich im Gegensatz zu der bei tiefen Temperaturen photodissoziierten Struktur nicht mehr auf der distalen Seite der Hämtasche, sondern auf der proximalen Seite. Der Weg zur proximalen Hämtasche führt an der Hämebene vorbei und stellt einen der vier möglichen Fluchtwege des Eisenliganden dar, die durch Molekular-Dynamik-Simulationen vorhergesagt wurden (Elber und Karplus, 1990). Bei höheren Temperaturen ist somit ein Weg des Liganden aus dem Proteinmolekül möglich. In ähnlicher Weise kann auch die Rückbindung des Liganden an das Hämeisen untersucht werden. Hierzu wurde die photodissoziierte Struktur bei Temperaturen weit unter der charakteristischen Temperatur eingefroren und die Rückbindung des Liganden an das Hämeisen bei abgedunkelter Meßapparatur beobachtet. Als Ergebnis wird festgestellt, daß der CO-Ligand erst oberhalb von T_C an das Hämeisen rückbinden kann. Die für die Funktion wichtigen Bewegungen, wie die Ligandenabgabe bzw.

die Ligandenbindung, sind also erst bei Temperaturen über der charakteristischen Temperatur möglich. Die Einteilung des Temperaturverlaufs der mit Hilfe der Mößbauer-Experimente bestimmten $\langle x^2 \rangle$ -Werte in einen unteren Temperaturbereich, in dem lediglich harmonische Festkörperschwingungen auftreten, und in einen oberen Temperaturbereich, in dem die proteinspezifische Dynamik sichtbar wird, stimmt mit den Ergebnissen der Röntgenstrukturuntersuchung an photodissoziiertem MbCO L29W vollkommen überein.

6.1 Die Abhängigkeit der Proteindynamik von der Ligandierung und der äußeren Umgebung

Betrachtet man nochmals Abb. 11, so erkennt man, daß unterhalb 190 K die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von MbCO in verschiedenen äußeren Medien übereinstimmen. Die aus Mößbauer-Experimenten erhaltenen $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte sind für MbCO-Kristalle, MbCO in Glycerin und in Trehalose getrocknetes MbCO dargestellt. Da die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte die harmonischen Festkörperschwingungen der Eisenatome repräsentieren, bedeutet dies, daß die harmonischen Bewegungen unabhängig von der Proteinumgebung sind.

Der lineare Anstieg der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte aus den Mößbauer-Experimenten von MbCO stimmt ferner mit den aus der Normalmodenanalyse von MbCO gewonnenen $\langle x^2 \rangle$ -Werten überein. In der Normalmodenanalyse wird eine Proteinstruktur mit minimaler Energie berechnet. Unter der Annahme harmonischer Potentiale werden aus der energieminierten Struktur die Eigenfrequenzen und die zugehörigen Eigenvektoren bestimmt. Für ein Molekül aus n Atomen ergeben sich $3n$ Eigenfrequenzen. Jeder Eigenfrequenz können n dreispaltige Eigenvektoren zugeordnet werden, wobei der Eigenvektor $\vec{d}_i^k = (d_{i1}^k, d_{i2}^k, d_{i3}^k)$ die Schwingung des Atoms i mit der Eigenfrequenz k beschreibt. Da die Eigenvektoren ein orthogonales System bilden, werden die Schwingungen als Normalmoden bezeichnet. Aufgrund der Annahme harmonischer Potentiale beschreiben die Normalmoden harmonische Schwingungen. Aus den Normalmoden und deren Eigenvektoren resultiert die mittlere quadratische Auslenkung einer Schwingung.

Der allgemeine Ausdruck für die mittlere quadratische Auslenkung eines Atoms i bezüglich der Normalmode k lautet:

$$\left\langle \left(\bar{r}_i^k \right)^2 \right\rangle = \left[\sigma_i^k(T) \right]^2 \cdot (\bar{d}_i^k)^2 \quad (64)$$

wobei $[\sigma_i^k(T)]^2$ das Quadrat der Schwingungsamplitude des Atoms i in der klassischen Näherung ist:

$$[\sigma_i^k(T)]^2 = \frac{k_B T}{m \omega^2} \quad (65)$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B , der Temperatur T , der Masse m und der Schwingungsfrequenz ω der Normalmode k . Führt man in Gl.(64) die Summation über alle Normalmoden durch, ergibt sich daraus die mittlere quadratische Auslenkung des Atoms i :

$$\left\langle \left(\bar{r}_i \right)^2 \right\rangle = \sum_{k=1}^{3n} \left\langle \left(\bar{r}_i^k \right)^2 \right\rangle \quad (66)$$

In einer amorphen Probe ist die mittlere quadratische Auslenkung in jeder Richtung gleich:

$$\left\langle x^2 \right\rangle = \frac{1}{3} \left\langle \left(\bar{r}_i \right)^2 \right\rangle \quad (67)$$

Die Übereinstimmung der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Normalmodenanalyse mit den $\langle x_v^2 \rangle$ -Werten aus den Mößbauer-Experimenten belegt, daß Normalmoden die Bewegungen des Eisens bei Temperaturen unterhalb von T_C sehr gut beschreiben können. Die auf der Grundlage harmonischer Potentiale berechneten Normalmoden bestätigen darüber hinaus die Harmonizität der Festkörperschwingungen des Eisens bei tiefen Temperaturen.

Oberhalb von 190 K verhalten sich die $\langle x^2 \rangle$ -Werte der MbCO-Proben in verschiedenen Medien sehr unterschiedlich. Aus Abb. 11 ist ersichtlich, daß die $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen und MbCO in Glycerin oberhalb von 190 K bzw. 210 K deutlich vom linearen Temperaturverlauf abweichen. Entsprechend große Werte nehmen die mittleren Auslenkungsquadrate $\langle x_t^2 \rangle$ von MbCO-Kristallen bzw. MbCO in Glycerin an. Die $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO in Trehalose hingegen steigen unterhalb von 300 K nur wenig stärker als linear mit der Temperatur an. Bei 245 K sind die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen und MbCO in Glycerin mehr als doppelt so groß wie die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte. Im Vergleich dazu sind die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte von MbCO in Trehalose verschwindend klein. Die Proteinumgebung hat offensichtlich sehr starken Einfluß auf die proteinspezifische Dynamik. Da sich auch die charakteristische Temperatur T_C in den verschiedenen MbCO-Proben unterscheidet, beeinflußt die

Proteinumgebung nicht nur den Anteil proteinspezifischer Bewegung an der Gesamtbewegung, sondern auch die Temperatur T_C , bei der proteinspezifische Dynamik einsetzt. MbCO wurde in den glasbildenden Flüssigkeiten Glycerin und Trehalose gemessen. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß der Verlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte mit dem Glasübergang der äußeren Medien zusammenhängt. Fraglich ist, ob der Verlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte in MbCO-Kristallen ebenfalls mit einem Glasübergang in Zusammenhang gebracht werden kann. Mit Mikrowellenmessungen konnte gezeigt werden, daß die dielektrische Relaxationsrate von Kristallwasser in dem Temperaturbereich von 300 K bis 220 K kontinuierlich abnimmt, während in freiem Wasser bzw. Eis ein Sprung der dielektrischen Relaxationsrate bei $T = 273$ K auftritt (Singh et al., 1981). Dies bedeutet, daß in Kristallwasser im Gegensatz zu freiem Wasser kein Phasenübergang 1. Ordnung auftritt. Kristallwasser gefriert folglich nicht bei 0°C . Untersuchungen an Mb-Kristallen mit Hilfe von Kalorimetrie-Messungen haben zusätzlich ergeben, daß Eisbildung zwischen 180 K und 270 K ausgeschlossen werden kann (Doster et al., 1986). Da jede Flüssigkeit, die nicht kristallisiert, einen Glasübergang macht, kann auch dem Kristallwasser eine Glastemperatur zugeordnet werden. Der Temperaturverlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen kann folglich ebenfalls mit der Glastemperatur des Kristallwassers verglichen werden.

Der Glasübergang ist ein kinetisch definierter Übergang, bei dem sich eine Flüssigkeit in starres Glas umwandelt und umgekehrt. Die nichtkristalline, starre Struktur von Gläsern entspricht derjenigen einer eingefrorenen Flüssigkeit. Die Struktur eines Glases ist aber nur insofern starr, als die für strukturelle Änderungen erforderliche Zeit wesentlich größer als die experimentelle Beobachtungsdauer ist. Der Glasübergang ist deshalb auch kein echter Phasenübergang zwischen einer flüssigen und einer festen Phase, sondern vielmehr ein Relaxationsprozeß, der eine schnell relaxierende Flüssigkeit in ein langsam relaxierendes Glas verwandelt. Als Temperatur des Glasübergangs (Glastemperatur) wird die Temperatur definiert, bei der die Viskosität 10^{13} Poise erreicht. Die Glastemperatur von Wasser kann experimentell nicht gemessen werden. Sie wurde deshalb aus den Glastemperaturen von binären wäßrigen Lösungen für verschwindende Konzentrationen des Gelösten extrapoliert (Huck und Bondeau, 1987; Angell und Sore, 1970; Rasmussen und MacKenzie, 1968). Für die Glastemperatur von Wasser wurde auf diese Weise ein Wert von $T_G = 138 \pm 2$ K erhalten. Für das verwendete Glycerin/Wasser-Gemisch (75 % v/v) beträgt die Glastemperatur 170 K (Huck et al., 1988b), für wasserfreie Trehalose liegt sie bei 387 K (Crowe et al., 1996).

Die charakteristischen Temperaturen T_C der verschiedenen MbCO-Proben fallen nicht mit den Glastemperaturen der umgebenden Medien zusammen. In MbCO-Kristallen und in MbCO in Glycerin zum Beispiel ist die charakteristische Temperatur um 40 K bzw. 50 K höher als der entsprechende Glasübergang des umgebenden Mediums. Die Diskrepanz zwischen der charakteristischen Temperatur und der Glastemperatur läßt sich möglicherweise durch die Unschärfe des Glasübergangs erklären. Da in einer Flüssigkeit verschiedene Relaxationsprozesse zu dem Glasübergang führen, hängt die bestimmte Glastemperatur wesentlich von der typischen Zeitkonstante des Experimentes ab. Die Zeitkonstante τ eines Experimentes ist die Zeit, in der die Meßgröße auf Bewegungen mit Frequenzen von $\nu = 1/\tau$ sensitiv reagiert. Bestimmt man den Glasübergang mit Hilfe eines Experimentes, das eine relativ kurze Zeitkonstante besitzt, erscheint die Flüssigkeit bereits bei höheren Temperaturen als starres Glas, da Bewegungen mit kleinen Frequenzen nicht erfaßt werden. Der Glasübergang kann deshalb in Abhängigkeit von seiner Bestimmung über einen Temperaturbereich von mehr als 30°C variieren (Gregory, 1995).

Unabhängig von der Breite des Glasübergangs läßt sich aus dem Vergleich der charakteristischen Temperaturen mit den Glastemperaturen eine Systematik ablesen. Je höher der Glasübergang des umgebenden Mediums ist, desto höher ist auch die charakteristische Temperatur des Proteins. Bei genauer Betrachtung der thermodynamischen Parameter, die sich beim Glasübergang ändern, wird der Zusammenhang zwischen dem Glasübergang des äußeren Mediums und der proteinspezifischen Dynamik deutlich. Beim Glasübergang ändert sich die Steigung der Enthalpie bzw. des spezifischen Volumens als Funktion der Temperatur. Gleichzeitig nimmt die Wärmekapazität bzw. der thermische Ausdehnungskoeffizient sprunghaft zu. Diese Parameteränderungen sind gleichbedeutend mit einer Zunahme des freien Volumens oberhalb der Glastemperatur. Die Zunahme des freien Volumens mit der Temperatur ist wiederum Voraussetzung für Bewegungen mit größeren Amplituden. Oberhalb der Glastemperatur können folglich Bewegungsmoden mit größeren Amplituden angeregt werden. Unterhalb des Glasübergangs ist das freie Volumen konstant. Die Atome können lediglich harmonische Festkörperschwingungen ausführen. Die Bewegungen der Atome des Glases entsprechen den Bewegungen des Hämeisens. Wie bereits oben ausgeführt, führt das Hämeisen unterhalb von T_C harmonische Festkörperschwingungen aus, während oberhalb von T_C Bewegungen mit größeren Amplituden angeregt werden.

Proteinspezifische Dynamik und Bewegungen in der Proteinumgebung sind somit sehr stark korreliert. Proteine bilden ein gekoppeltes System mit den äußeren Medien. Durch das äußere Medium werden die Bewegungen des Proteins bestimmt. Wenn das äußere Medium größere Bewegungsfreiheit erlangt, sind Proteinbewegungen mit größeren Amplituden bzw. proteinspezifische Dynamik möglich. In glasbildenden Medien ist dies der Fall, wenn bei dem Glasübergang das freie Volumen zunimmt.

Die Eigenschaft einer sehr hohen Glastemperatur macht Trehalose für die Konservierung von Mb oder Hämoglobin so wertvoll, da die proteinspezifische Dynamik, die bei Raumtemperatur letztlich zur Denaturierung der Proteine führt, fast vollständig unterdrückt werden kann (Cordone et al., 1998).

Mb in verschiedenen Ligandierungszuständen

Die Steigung der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte ist für Mb-Kristalle in verschiedenen Ligandierungszuständen (siehe Abb. 12) unterschiedlich. Am stärksten steigen die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von Mbdesoxy-Kristallen mit der Temperatur. Die Steigung der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen liegt etwas darunter. Die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von Mbmet-Kristallen zeigen schließlich die flachste Steigung. Ursache hierfür könnten die strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen ligandierten Mb-Kristallen sein. Der auffälligste Unterschied von Mbdesoxy-Kristallen gegenüber MbCO- und Mbmet-Kristallen ist die unbesetzte Bindungsstelle auf der Seite des distalen Histidins. Das Hämeisen in Mbdesoxy ist in Richtung des proximalen Histidins verschoben, während bei sechsfach koordiniertem Mbmet bzw. MbCO das Hämeisen nahezu in der Mitte der Hämebene liegt. Aus Neutronenstreuexperimenten ist darüber hinaus bekannt, daß in Mbmet der Wasserligand durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N^e-Atom des distalen Histidins verbunden ist (Cheng und Schoenborn, 1991), wohingegen der CO-Ligand in MbCO keine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N^e-Atom eingehen kann.

Die Steigung der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von Mbdesoxy-Kristallen ist ca. 15 % größer als die Steigung der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte von MbCO-Kristallen. Größere $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte weisen auf stärkere Festkörperschwingungen hin. Eine plausible Erklärung für die stärkeren Festkörperschwingungen in Mbdesoxy-Kristallen ist das Fehlen eines sechsten Liganden. Die vakante sechste Koordinationsstelle in Mbdesoxy führt zu einer Bindungsasymmetrie, die

größere Amplituden der an das Eisen ankoppelnden Schwingungen zuläßt. Die größeren Schwingungsamplituden resultieren schließlich in größeren mittleren Auslenkungsquadraten. Eine größere Beweglichkeit von Eisen in Mbdesoxy schlägt sich in der optischen Absorptionsspektroskopie in einer breiteren Ortsverteilung des Eisens relativ zur Hämebene nieder (Cupane et al., 1995). Ginge man davon aus, daß allein die Ligandierung die $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte beeinflusst, wäre die Diskrepanz zwischen den $\langle x_v^2 \rangle$ -Werten der sechsfach-ligandierten Mb-Proben, MbCO und Mbmet, nicht erklärbar. Hier muß ein weiterer Effekt eine Rolle spielen. In MbCO bildet der CO-Ligand im Gegensatz zu dem Wasser-Liganden in Mbmet keine Wasserstoffbrückenbindung zum distalen Histidin aus. Wasserstoffbrückenbindungen tragen jedoch wesentlich zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen bei. Die Hämgruppe ist in Mbmet deshalb besser stabilisiert als in MbCO. Das Hämeisen in Mbmet zeigt folglich die geringste Beweglichkeit bzw. die kleinsten $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte.

Die Temperaturabhängigkeit der harmonischen Festkörperschwingungen von Mb läßt sich somit sehr anschaulich mit Hilfe der Hämgeometrie der verschiedenen Ligandierungsformen erklären.

6.2 Diskussion des Brownschen Oszillators

Temperaturabhängige Mößbauer-Spektren wurden bereits mit einer Reihe unterschiedlicher Modelle interpretiert. Zu diesen zählen das klassische Diffusionsmodell (Craig und Sutin, 1963), Modelle, welche die Diffusion in einem begrenzten Raum beschreiben (Parak und Frolov, 1981; Mayo et al., 1981), Kombinationen aus Diffusions- und Sprungdiffusionsmodellen (Johari, 1973) sowie Sprungmodelle mit verschiedenen Sprungzeitverteilungen (Chang et al., 1996). Darüber hinaus fand das Brownsche Oszillator-Modell bzw. das Brownsche Oszillator-Modell in Verbindung mit dem Diffusionsmodell bereits mehrfach Anwendung bei der Anpassung von Mößbauer-Spektren (Shaitan und Rubin, 1980, Nowik et al., 1985; Parak et al., 1982; Knapp et al., 1982, Knapp et al., 1983). Mit Hilfe der verschiedenen Modelle konnte die temperaturabhängige Linienform der Mößbauer-Spektren sowie die Temperaturabhängigkeit der Absorptionsflächen zum Teil sehr gut beschrieben werden. Mit Ausnahme der Sprungmodelle, deren charakteristische Sprungzeiten

einer Verteilung unterliegen, konnte jedoch nicht die Gesamtfläche der Absorptionsflächen richtig wiedergegeben werden.

Die Gesamtfläche der Mößbauer-Absorptionsspektren nimmt aufgrund von Phononenwechselwirkungen mit steigender Temperatur ab, da die Mößbauer-Kerne durch Phononenanregung oder -vernichtung Energie im meV-Bereich verlieren oder gewinnen. Im Vergleich dazu beträgt das Energiefenster der Mößbauer-Spektroskopie lediglich 50 - 100 neV. Die Absorption von Eisenkernen, die mit Phononen wechselwirken, liegt somit weit außerhalb des meßbaren Energiebereichs der Mößbauer-Spektroskopie und führt zur Abnahme der Absorptionsfläche. Das aus der Gesamtfläche berechnete mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x_v^2 \rangle$ nimmt infolge der Phononenwechselwirkungen linear mit der Temperatur zu. Eine stärkere als lineare Zunahme der $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte zeigt an, daß nicht die gesamte Absorptionsfläche erfaßt wird. Die temperaturabhängige Gesamtfläche der hier ausgewerteten Mößbauer-Spektren wird also nur dann vollständig erklärt, wenn das zugrunde liegende mittlere Auslenkungsquadrat linear mit der Temperatur zunimmt.

Den Anpassungen der Spektren mit dem hier verwendeten Brownschen Oszillator-Modell liegt die Annahme zugrunde, daß der Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers f_a exponentiell mit zunehmendem mittleren Auslenkungsquadrat $\langle x_v^2 \rangle$ abnimmt. Die Abnahme von f_a mit linear steigendem mittleren Auslenkungsquadrat $\langle x_v^2 \rangle$ ist dabei gleichbedeutend mit der Abnahme der Gesamtfläche aufgrund von Phononenwechselwirkungen. In den Sprungmodellen mit verschiedenen Sprungzeitverteilungen nimmt das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x_v^2 \rangle$ linear mit der Temperatur zu. Diese Modelle können folglich die gesamte Absorptionsfläche richtig erklären. Der Nachteil der Sprungmodelle ist jedoch, daß die Zeit, in der das Protein von einem Zustand in den anderen springt gegenüber der Aufenthaltszeit in einem Zustand vernachlässigt wird. Da die Sprungzeit selbst nicht experimentell oder theoretisch bestimmt werden kann, läßt sich auch keine genaue Aussage über die Genauigkeit dieser Näherung treffen. Umgangen werden kann dieses Problem mit Hilfe des Brownschen Oszillator-Modells, in das anstelle von Sprungzeiten die Bewegungsgleichung des Eisenatoms eingeht. Die bisherigen Auswertungen von Mößbauer-Spektren mit dem Brownschen Oszillator-Modell konnten die Gesamtfläche der Absorptionsfläche jedoch nicht in der oben beschriebenen Weise wiedergeben, weil zum einen die Spektren nicht die erforderliche Meßgenauigkeit aufwiesen und zum anderen die in Gl.(36) enthaltene Summe über $N = 0$ bis ∞ bereits nach $N = 1$ abgebrochen wurde. Aus diesem Grund

wurde ein Teil der Absorptionsfläche vernachlässigt, so daß die das aus der Gesamtfläche berechnete mittlere Auslenkungsquadrat nicht linear, sondern stärker als linear mit der Temperatur zunahm. Unter Verwendung obiger Annahme, daß der Lamb-Mößbauer-Faktor f_a exponentiell mit linear zunehmendem $\langle x_v^2 \rangle$ abnimmt, wird das Brownsche Oszillator-Modell auf Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen und MbCO in Glycerin angewendet, um die Temperaturabhängigkeit der gesamten Absorptionsfläche vollständig und konsistent zu erklären (Parak et al., 1999).

MbCO-Kristalle

In dem Brownschen Oszillator-Modell, in dem die proteinspezifische Dynamik als überdämpfte Brownsche Oszillation beschrieben wird, ist die mittlere quadratische Auslenkung der proteinspezifischen Bewegung $\langle x_t^2 \rangle$ und die Linienverbreiterung α_t unterhalb der charakteristischen Temperatur $T_c = 190$ K gleich Null. Die Amplitude der überdämpften Schwingung verschwindet folglich bei tiefen Temperaturen. Dies stimmt mit der Beschreibung der Bewegungen des Hämeisens als harmonische Festkörperschwingungen überein. Oberhalb der charakteristischen Temperatur nehmen die Parameter $\langle x_t^2 \rangle$ und α_t endliche Werte an, so daß zusätzliche breite Lorentz-Dubletts in den Mößbauer-Spektren auftreten. Infolge dieser sehr breiten Lorentz-Dubletts fällt die Absorptionskurve für höhere Geschwindigkeiten sehr langsam ab. An dem Mößbauer-Spektrum von MbCO-Kristallen bei 245 K ist zu erkennen, daß bei der Maximalgeschwindigkeit von ca. ± 11 mm/s nicht 100 % der Strahlung transmittiert werden. Es tritt somit auch noch bei der Maximalgeschwindigkeit Resonanzabsorption auf. Die Maximalgeschwindigkeit des Mößbauer-Experiments reicht also nicht aus, um die sehr langsam abfallende Absorptionskurve vollständig zu erfassen. Indem die Temperaturabhängigkeit der Absorptionsfläche durch den Lamb-Mößbauer-Faktor f_a festgelegt ist, kann die außerhalb des Meßspektrums auftretende Resonanzabsorption jedoch simuliert werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber herkömmlichen Auswertungsmethoden, in denen diese Fläche unberücksichtigt bleibt und zu einer Verfälschung der Gesamtfläche und damit der mittleren quadratischen Auslenkung führt. Das Modell des Brownschen Oszillators ermöglicht also, die gesamte Absorptionsfläche richtig wiederzugeben, die allein aufgrund von Phononenwechselwirkungen abnimmt. Aus der guten Übereinstimmung der theoretischen Kurven des Brownschen Oszillators mit den gemessenen MbCO-Kristall-Spektren kann geschlossen werden, daß sich die proteinspezifische Bewegung tatsächlich als überdämpfte Brownsche Oszillation beschreiben läßt.

Wie bereits im experimentellen Teil dargestellt, nehmen die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte nicht wie im Falle einer gedämpften harmonischen Oszillation proportional mit der Temperatur zu, sondern weichen von der linearen Temperaturabhängigkeit ab. Ursache hierfür könnte das komplizierte Potential der Proteine sein. Parak et al. (1992) haben ein Potential für Proteine entwickelt, das es erlaubt, die Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte zu erklären. Dieses Potential wurde bereits auf das Brownsche Oszillator-Modell in Verbindung mit dem Diffusionsmodell angewendet (Parak et al., 1982). In diesem Potential treten Konformationssubzustände (c) als tiefe Potentialmulden und Übergangszustände (t) als Vielzahl von energetisch hoch liegenden kleinen Potentialmulden auf (siehe Abb. 35). Bei Temperaturen unterhalb von T_C sind Proteine in den Konformationssubzuständen eingefroren. Die Wahrscheinlichkeit $p_i(T)$, sich in einem Übergangszustand aufzuhalten, geht gegen Null. Das parabelförmige Potential der Konformationssubzustände beschreibt dabei die harmonischen Festkörperschwingungen, die das Protein bei tiefen Temperaturen ausführt.

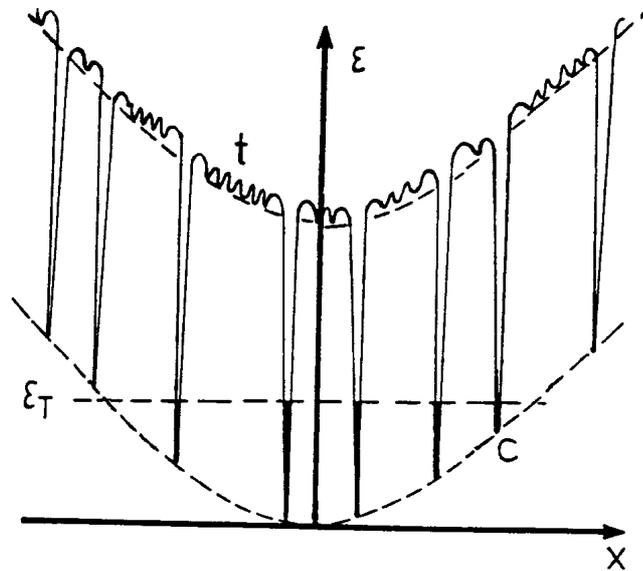


Abb. 35: Eindimensionales Potentialbild zur Erklärung der Dynamik eines Mb-Moleküls. Die tiefen Potentialmulden (c) stellen Konformationssubzustände dar, die flachen Potentialminima im sogenannten Übergangszustand (t) repräsentieren die Reibung im Modell des Brownschen Oszillators. Bei der Temperatur T sind alle Konformationssubzustände bis zu der Energie ϵ_T besetzt.

Übersteigt die Temperatur in der Probe die charakteristische Temperatur T_C können Übergangszustände besetzt werden. Die Übergangszustände sind von den Konformationssubzuständen durch eine große Potentialbarriere getrennt. Die Überwindung der Potential-

barriere gelingt aufgrund der Erniedrigung der Gibbschen Freien Energie. Die kleinen Potentialmulden der Übergangszustände stellen die Dämpfung β_t im Modell des Brownschen Oszillators dar. Die Einhüllende der Übergangszustände wird als Parabel angenommen, welche die harmonische rücktreibende Kraft der Brownschen Oszillationsbewegung gewährleistet. Neben den harmonischen Festkörperschwingungen tritt somit bei höheren Temperaturen eine gedämpfte Brownsche Oszillation auf. Durch die Besetzung sowohl des Konformations- subzustandes als auch des Übergangszustandes weicht das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x_t^2 \rangle$ von der linearen Temperaturabhängigkeit ab. Um die Temperaturabhängigkeit angeben zu können, müssen die Sprungraten zwischen den Zuständen berechnet werden. Die Häufigkeit, mit der Sprünge von einem Konformationssubzustand in einen Übergangszustand und umgekehrt stattfinden, wird durch die Sprungraten R_{ct} bzw. R_{tc} beschrieben:

$$R_{ct} = A_{ct} \cdot e^{-\frac{\epsilon_{ct}}{k_B T}} \quad (68)$$

$$R_{tc} = A_{tc} \cdot e^{-\frac{\epsilon_{tc}}{k_B T}} \quad (69)$$

Die Faktoren A_{ct} und A_{tc} sind ein Maß für die Entropieänderung des Systems. Um von einem Übergangszustand in einen Konformationssubzustand gelangen zu können, benötigt das Protein die Energie ϵ_{tc} , während es eine wesentlich höhere Energie ϵ_{ct} aufbringen muß, um von einem Konformationssubzustand in einen Übergangszustand zu wechseln. Aus den Raten R_{ct} und R_{tc} errechnet sich die Wahrscheinlichkeit $p_t(T)$, das Protein in einem Übergangszustand anzutreffen:

$$p_t(T) = \left[1 + \frac{A_{tc}}{A_{ct}} e^{-\frac{\epsilon_{ct} - \epsilon_{tc}}{k_B T}} \right]^{-1} \quad (70)$$

wobei A_{tc}/A_{ct} proportional zu $\exp(-\Delta S_{ct})$ ist. ΔS_{ct} ist die Entropieänderung zwischen Konformationssubzustand und Übergangszustand. Unter Verwendung der Gibbschen Freien Energiedifferenz ΔG , die mit der Differenz der Aktivierungsenergien $\Delta \epsilon$ und dem Entropieunterschied ΔS in folgender Beziehung steht:

$$\Delta G = \Delta \epsilon - \Delta S \cdot T \quad (71)$$

läßt sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ in vereinfachter Form schreiben:

$$p_t(T) = \left[1 + e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}} \right]^{-1} \quad (72)$$

Die Wahrscheinlichkeit $p_t(T)$ bestimmt die Temperaturabhängigkeit aller Parameter des Brownschen Oszillator-Modells. Die Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte ergibt sich durch Multiplikation von $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ mit der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$:

$$\langle x_t^2 \rangle = \langle x_{t_0}^2 \rangle \cdot p_t(T) \quad (73)$$

Der Parameter $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ nimmt dabei entsprechend Gl.(61) linear mit der Temperatur zu:

$$\langle x_{t_0}^2 \rangle = c \cdot T \quad (74)$$

Der Proportionalitätsfaktor c wird aus der Steigung zwischen den $\langle x_t^2 \rangle$ -Werten bei 245 K bzw. 235 K berechnet. Um den Einfluß des Proportionalitätsfaktors $c = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$ auf die Parameter des Brownschen Oszillators deutlich zu machen, wird neben dieser Steigung eine doppelt so große und eine halb so große Steigung verwendet.

In Abb. 36 ist die Anpassung der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte mit Hilfe von Gl.(73) für die drei verschiedenen Steigungen c_i dargestellt. Die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte liegen innerhalb der Fehlergrenzen auf den theoretisch berechneten Kurven. Daraus läßt sich folgern, daß das postulierte Potential für Proteine die Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung im Modell des Brownschen Oszillators erklären kann.

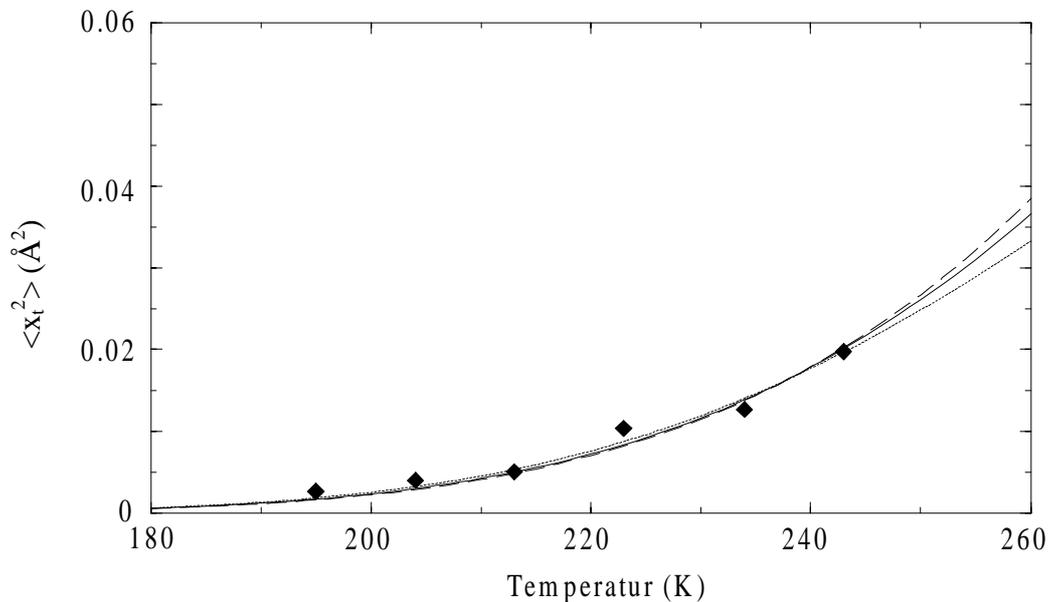


Abb. 36: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ von MbCO-Kristallen (ausgefüllte Rauten). Die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte sind mit Hilfe von Gl.(73) für drei verschiedene Steigungen c_i von $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ angepaßt ($\langle x_{t_0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): gepunktete Linie: $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$, durchgezogene Linie: $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$, gestrichelte Linie: $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$.

Die drei angepaßten Wahrscheinlichkeitsverteilungen, denen unterschiedliche Steigungen c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte zugrunde liegen, geben dabei die Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte im gemessenen Temperaturbereich bis 245 K gleich gut wieder. Dies ist insofern überraschend, als verschiedene Steigungen c_i auf unterschiedliche Gibbsche Freie Energiedifferenzen ΔG in den Wahrscheinlichkeitsverteilungen $p_i(T)$ führen. Die aus ΔG erhaltenen Werte für die Differenz der Aktivierungsenergien $\Delta \epsilon$ und den Entropieunterschied ΔS sind für die verschiedenen Steigungen c_i in Tab. 6 zusammengefaßt. Daß die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte mit verschiedenen Parameterwerten $\Delta \epsilon$ und ΔS in der Wahrscheinlichkeitsverteilung gleich gut angepaßt werden können, bedeutet, daß die Parameterwerte von $\Delta \epsilon$ und ΔS nicht eindeutig bestimmt werden können. Dies gilt zumindest für die Entropiedifferenz ΔS , die sich bei Variation der Steigung c_i ebenfalls ändert. Für ΔS kann lediglich eine untere Grenze von $0.91 \cdot 10^{-22}$ J/K angegeben werden, da mit kleineren ΔS -Werten der Temperaturverlauf von $\langle x_t^2 \rangle$ nicht richtig beschrieben werden kann. Vergleicht man die Parameterwerte $\Delta \epsilon$ und ΔS des Brownschen Oszillator-Modells mit denjenigen des modifizierten Brownschen Oszillator-Modells (Knapp et al., 1993), wird deutlich, daß diese sehr ähnliche Werte annehmen. Die Größenordnung der Parameterwerte von $\Delta \epsilon$ und ΔS erscheint deshalb als sinnvoll.

MbCO-Kristalle	$\Delta \epsilon$ (10^{-20} J)	ΔS (10^{-22} J/K)
Brownsches Oszillator-Modell Steigung $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$	3.17	1.12
Brownsches Oszillator-Modell Steigung $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$	3.17	1.01
Brownsches Oszillator-Modell Steigung $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$	3.17	0.906
modifiziertes Brownsches Oszillator-Modell (Knapp et al., 1993)	3.20	1.28

Tab. 6: Die Parameter der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_i(T)$ für verschiedene Steigungen c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte im Modell des Brownschen Oszillators ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): $\Delta \epsilon$ ist die Differenz der Aktivierungsenergien, die erforderlich ist, um vom Konformationssub- in den Übergangszustand bzw. vom Übergangs- in den Konformationssubzustand zu gelangen ($\epsilon_{ct} - \epsilon_{tc}$), ΔS ist die Entropieänderung zwischen Konformationssub- und Übergangszustand. In die Tabelle sind die Parameter aus dem modifizierten Brownschen Oszillator-Modell mit aufgenommen (Knapp et al., 1993).

Die Linienverbreiterung α_t nimmt in dem beschriebenen Potential folgende Form an:

$$\alpha_t = \alpha_{t0} \cdot p_t(T) \quad (75)$$

wobei α_{t0} ein konstanter Wert ist, welcher der Linienverbreiterung für den Fall entspricht, daß sich das Protein ausschließlich im Übergangszustand befindet (siehe Tab. 9). In diesem Fall wäre die Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ gleich eins. Die Temperaturabhängigkeit der α_t -Werte ist in Abb. 37 zu sehen. Zu beachten ist, daß nur die α_t -Werte bei 234 K und 245 K aus der Anpassung der Mößbauer-Spektren resultieren. Die α_t -Werte bei tieferen Temperaturen wurden aus der Anpassung von $\alpha_t(234 \text{ K})$ und $\alpha_t(243 \text{ K})$ mit Hilfe von Gl.(75) berechnet und bei der Auswertung der Mößbauer-Spektren festgehalten. Eine Anpassung der α_t -Werte bei tieferen Temperaturen ist aufgrund der geringen Fläche unter den zusätzlichen Linien nicht möglich.

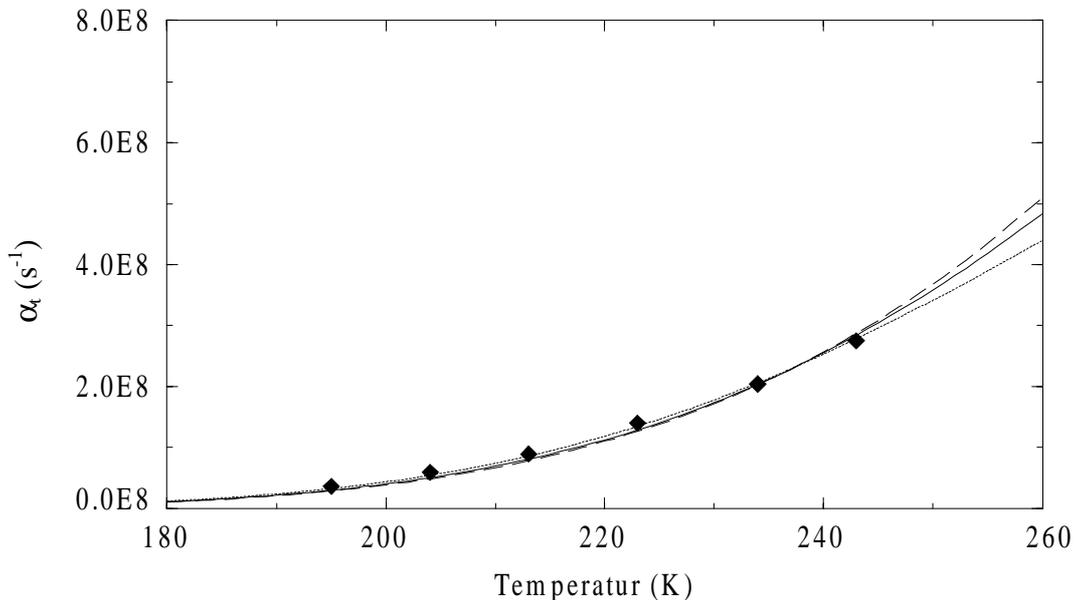


Abb. 37: Temperaturabhängigkeit der Linienverbreiterung α_t (ausgefüllte Rauten) von MbCO-Kristallen. Die α_t -Werte sind unter Verwendung von Gl.(75) für die drei verschiedenen Parametersätze von $\Delta\varepsilon$ und ΔS in Tab. 6 angepaßt. In Analogie zu der Anpassung der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte beziehen sich dabei die Linien auf die zu folgenden Steigungen c_i gehörenden Parametersätze ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): gepunktete Linie: $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$, durchgezogene Linie: $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$, gestrichelte Linie: $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$.

Die in Gl.(75) eingesetzten Parameter $\Delta\varepsilon$ und ΔS , welche die Temperaturabhängigkeit der α_t -Werte für verschiedene Steigungen c_i wiedergeben, entsprechen den in Tab. 6 angegebenen Werten aus der Anpassung von $\langle x_t^2 \rangle$. Wie bereits bei der Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte festgestellt, ist der Temperaturverlauf der berechneten Kurven für α_t nicht sehr sensitiv

auf die Parameterwerte von $\Delta\varepsilon$ und ΔS . Die bei tieferen Temperaturen festgehaltenen α_t -Werte sind somit jedoch eindeutig definiert.

Ausgehend von der linear mit der Temperatur steigenden mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_{t0}^2 \rangle$ und der Linienverbreiterung α_t können die weiteren Parameter der überdämpften Schwingung, die Viskosität η_t und die Dämpfungskonstante β_t , bestimmt werden. Nach der Stokes-Einstein-Gleichung ist der Diffusionskoeffizient D indirekt proportional zur Viskosität η :

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r} \quad (76)$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur und r der Radius des diffundierenden Teilchens ist. Die Diffusionskonstante D läßt sich wiederum als Funktion der Dämpfungskonstante β schreiben:

$$D = k_B T / 2m\beta \quad (77)$$

Setzt man Gl.(77) in Gl.(76) ein, ergibt sich ein Ausdruck für die Viskosität η_t in Abhängigkeit von der Dämpfungskonstante β_t :

$$\eta_t = \frac{m_t \beta_t}{6\pi r} \quad (78)$$

wobei m_t die Masse des überdämpft schwingenden Teilchens ist. Unter Verwendung von Gln. (35) und (61) kann das Produkt $m_t \beta_t$ durch die bekannten Parameter α_t und $\langle x_{t0}^2 \rangle$ ersetzt werden:

$$\eta_t = \frac{k_B T}{12\pi r \alpha_t \langle x_{t0}^2 \rangle} \quad (79)$$

Der Radius r des Teilchens entspricht im vorliegenden Fall in etwa dem Radius der Hämgruppe. Bei der weiteren Berechnung wird für r deshalb ein Wert von 5 \AA verwendet. Die Temperaturabhängigkeit der η_t -Werte wird ebenfalls durch die Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ beschrieben:

$$\eta_t = \eta_{t0} / p_t(T) \quad (80)$$

wobei η_{t0} die temperaturunabhängige Viskosität ist, die sich für den Fall einstellt, daß sich das Protein ausschließlich im Übergangszustand befindet, so daß $p_t(T)$ gleich eins ist. Die mit Hilfe von Gl.(79) berechneten η_t -Werte sind indirekt proportional zu $\langle x_{t0}^2 \rangle$. Die verschiedenen Steigungen c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte ergeben folglich unterschiedliche Viskositätswerte. In Abb. 38

sind die für die drei verschiedenen Steigungen c_i jeweils berechneten Viskositätswerte von MbCO-Kristallen als Funktion der Temperatur dargestellt. Die erhaltenen Viskositätswerte sind mit Hilfe von Gl.(80) angepaßt. Dabei wurden jeweils die für die verschiedenen Steigungen c_i erhaltenen Parameter $\Delta\varepsilon$ und ΔS (siehe Tab. 6) in $p_t(T)$ eingesetzt. Die angepaßten η_{t0} -Werte sind in Tab. 9 angegeben.

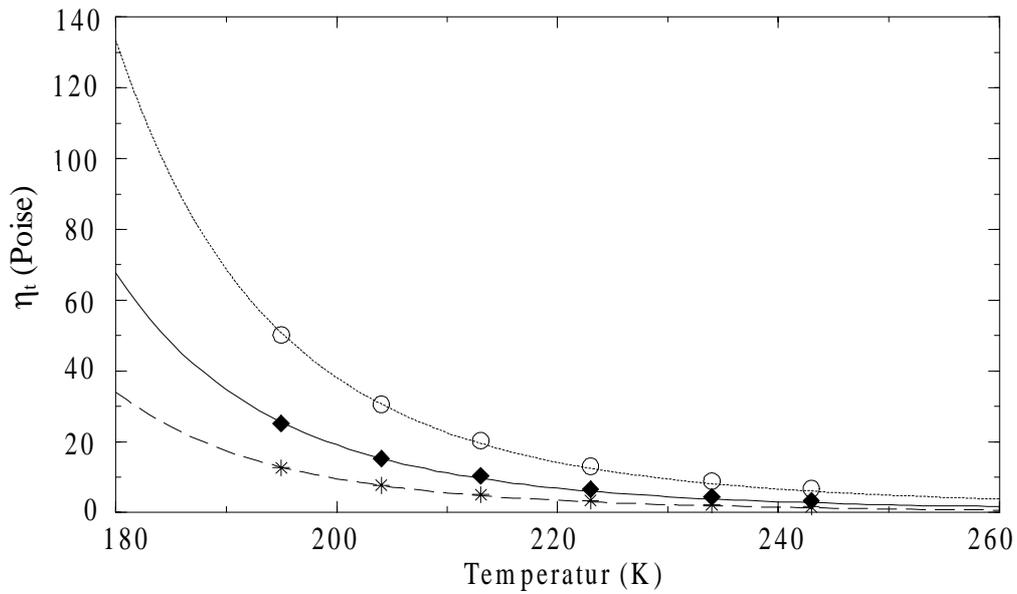


Abb. 38: Viskosität η_t für MbCO-Kristalle als Funktion der Temperatur für drei verschiedene Steigungen c_i von $\langle x_{t0}^2 \rangle$ ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): offene Kreise: $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$, ausgefüllte Rauten: $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$, Sterne: $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$. Die Linien kennzeichnen die jeweilige Anpassung der Viskosität unter Verwendung von Gl.(75) und den Parametern $\Delta\varepsilon$ und ΔS aus Tab. 6 bzw. dem Parameter η_{t0} aus Tab. 9.

Die Viskosität nimmt in allen drei Fällen mit steigender Temperatur ab. Die aus der kleinsten Steigung $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$ resultierende Viskosität ist dabei am größten. Da die Steigung c_1 bzw. der zugehörige Wert der Entropieänderung ΔS eine untere Grenze bilden, nimmt die aus c_1 berechnete Viskosität Maximalwerte an. Diese Viskositätswerte definieren somit eine obere Grenze für die Viskosität in MbCO-Kristallen.

Ein Vergleich mit der Viskosität von Gläsern könnte Aufschluß darüber geben, ob Proteine und Gläser gleiche Eigenschaften besitzen. Proteine haben auf den ersten Blick wenig gemeinsam mit Gläsern, da sie Makromoleküle mit einer definierten Struktur sind, während Gläser eingefrorene Flüssigkeiten sind. Andererseits können sowohl Proteine als auch Gläser eine Vielzahl von nahezu isoenergetischen, d.h. energetisch gleichen, Konformationssubzuständen besetzen. Durch Infrarot-Studien der CO-Streckschwingung in

MbCO konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Proteine und Gläser unterhalb einer bestimmten Temperatur, die bei Gläsern die Glastemperatur ist, metastabil sind (Iben et al., 1996). Die Ähnlichkeit zwischen Proteinen und Gläsern wird weiterhin dadurch unterstrichen, daß in beiden Materialien bei höheren Temperaturen ein Relaxationsprozeß auftritt, der durch großräumige Bewegungen dominiert wird. Der Relaxationsprozeß, der in Gläsern als sogenannte α -Relaxation bezeichnet wird und in Proteinen durch „*functionally important motions*“ (= Bewegungen, die für die Funktion des Proteins bedeutsam sind) beschrieben wird, zeichnet sich durch eine nicht-exponentielle Zeitabhängigkeit aus (Iben et al., 1996).

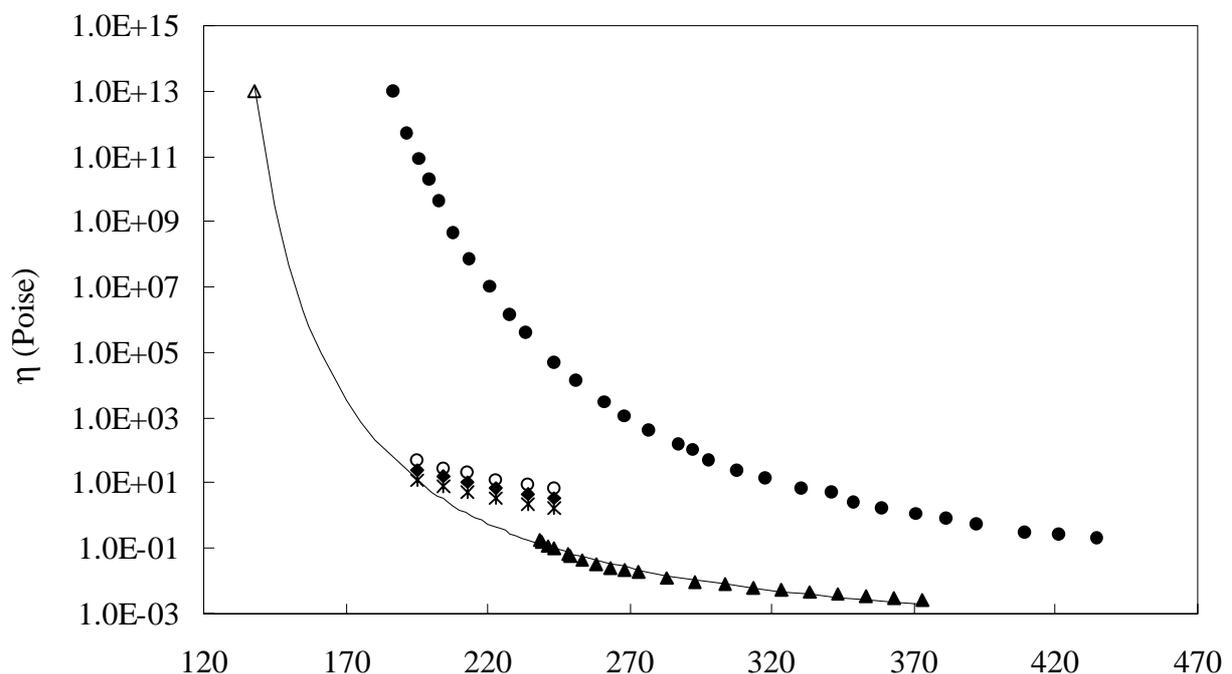


Abb. 39: Viskosität η_t für Glycerin (Huck et al., 1988a) (ausgefüllte Kreise), unterkühltes Wasser (Hallet, 1963; Bondarenko et al., 1977) (ausgefüllte Dreiecke) und MbCO-Kristalle für drei verschiedene Steigungen c_i von $\langle x_{t0}^2 \rangle$ ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): offene Kreise: $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$, ausgefüllte Rauten: $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$, Sterne: $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$. Das nicht-ausgefüllte Dreieck zeigt die Viskosität von unterkühltem Wasser beim Glasübergang $T_G = 138 \text{ K}$, bei dem die Viskosität definitionsgemäß 10^{13} Poise beträgt.

Anhand eines wesentlichen Glasparameters, der Viskosität, wird im folgenden überprüft, ob die gezogenen Parallelen zwischen Proteinen und Gläsern in dem Brownschen Oszillator-Modell bestätigt werden können. Hierzu wird die Viskosität von MbCO-Kristallen mit dem typischen Glasbildner Glycerin verglichen. Die Viskositätswerte von MbCO-Kristallen liegen in der Größenordnung von 10 Poise. Im Gegensatz dazu nimmt die Viskosität von Glycerin im gleichen Temperaturbereich um mehr als sechs Größenordnungen ab (siehe Abb. 39). Die

ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Viskosität in Glycerin steht einer vergleichsweise schwachen Temperaturabhängigkeit der Viskosität von MbCO-Kristallen gegenüber. Die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit von MbCO-Kristallen und Glycerin könnte dadurch zustande kommen, daß das Kristallwasser eine andere Glasübergangstemperatur besitzt als Glycerin. Wie bereits oben erläutert, ist die proteinspezifische Dynamik mit dem Glasübergang des umgebenden Mediums korreliert. Es ist folglich nicht auszuschließen, daß auch die Viskosität des Proteins von dem Glasübergang des umgebenden Mediums abhängt. Die Glasübergangstemperatur von Glycerin liegt bei 180 K, während Wasser eine Glasübergangstemperatur von $T_G = 138$ K besitzt. Um eine Diskrepanz der temperaturabhängigen Viskosität zwischen MbCO-Kristallen und Glycerin allein aufgrund der unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen auszuschließen, wird die Viskosität von MbCO-Kristallen mit derjenigen von unterkühltem Wasser verglichen. Die Viskosität von unterkühltem Wasser wurde von Hallett (1963) bis zu einer minimalen Temperatur von 238 K gemessen. Die Viskositätswerte von unterkühltem Wasser sind zusammen mit der Viskosität von Wasser beim Glasübergang, die definitionsgemäß 10^{13} Poise beträgt, in Abb. 39 eingezeichnet. Die Viskosität von Wasser ist dabei unter Verwendung von Gl.(81) angepaßt worden. Der Zusammenhang zwischen der Viskosität η und der Relaxationsrate τ_s in Gl.(81) wurde aus Maxwell's viskoelastischer Theorie (Scherer, 1986) gewonnen:

$$\eta(T) = G_\infty \tau_s = g_\infty T \tau_{vf} \exp\left(\frac{A_{vf}}{T - T_{vf}}\right) \quad (81)$$

Die Viskosität η ist dabei gleich dem Produkt aus dem linear mit der Temperatur steigenden Hochfrequenzlimit des Schermodulus G_∞ (Schofield, 1966) und der Relaxationsrate τ_s , die mit Hilfe der Vogel-Fulcher-Tamman-Gleichung parametrisiert wird (Cohen und Turnbull, 1959; Cohen und Grest, 1979):

$$\tau_s = \tau_{vf} \exp\left(\frac{A_{vf}}{T - T_{vf}}\right) \quad (82)$$

wobei τ_{vf} die Vogel-Fulcher-Relaxationszeit, T_{vf} die Vogel-Fulcher-Temperatur und $k_B \cdot A_{vf}$ die Vogel-Fulcher-Aktivierungsenergie ist. Die Anpassung der Viskosität von unterkühltem Wasser nach Gl.(81) führt auf die in Tab. 7 zusammengefaßten Werte:

g_∞ (P/Ks)	τ_{vf} (s)	A_{vf} (K)	T_{vf} (K)
$9.0 \cdot 10^7$	$7.0 \cdot 10^{-16}$	1170	110

Tab. 7: Parameter für die Anpassung der Viskosität von unterkühltem Wasser nach Gl.(81): Proportionalitätskonstante des linear mit der Temperatur steigenden Schermodulus g_∞ , die Vogel-Fulcher-Relaxationsrate τ_{vf} , die Vogel-Fulcher-Aktivierungsenergie (geteilt durch k_B) A_{vf} und die Vogel-Fulcher-Temperatur T_{vf} .

Die Anpassung der Viskosität von Wasser zwischen 170 K und 340 K führt auf eine ähnlich starke Temperaturabhängigkeit wie für Glycerin. In dem Temperaturbereich von 195 K und 245 K nimmt die Viskosität um zwei Größenordnungen ab. Im Vergleich dazu ist die Viskosität von MbCO-Kristallen bei 245K nur auf ein Drittel ihres Wertes bei 195 K zurückgegangen. Die Viskosität von MbCO-Kristallen hat also eine von ihrer Umgebung verschiedene Temperaturabhängigkeit.

Mit dem Brownschen Oszillator-Modell können folglich keine Parallelen zwischen der Viskosität von MbCO-Kristallen und Gläsern gezogen werden.

Ein direkter Vergleich zwischen dem typischen Glasbildner Glycerin und MbCO in Glycerin wird weiter unten im Rahmen der Interpretation der Mößbauer-Messungen von MbCO in Glycerin mit Hilfe des Brownschen Oszillator-Modells gezogen.

Die Berechnung der Dämpfungskonstante β_t erfordert die Kenntnis der Schwingungsfrequenz ω_t der Brownschen Oszillationsbewegung. Die Schwingungsfrequenz ω_t ist in der Steigung der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte enthalten (Gl. (62)), in die darüber hinaus die Masse m_t des Segments eingeht, das die Brownsche Oszillation durchführt. Eine obere Grenze für die Masse m_t ist durch die Proteinmasse von 17800 Dalton gegeben, was dem Fall der intermolekularen Bewegung entspräche. Da proteinspezifische Bewegungen jedoch intramolekulare Bewegungen sind, muß die Masse m_t geringer sein (Parak et al., 1981). Als untere Grenze für die Masse m_t kann die Masse des Hämeisens angegeben werden. Da das Hämeisen in MbCO eine koordinative Bindung mit dem Porphyrinring, dem proximalen Histidin und dem CO-Ligand eingeht, ist die Masse des Schwingers allerdings größer als die des Hämeisens. Zur genaueren Bestimmung der Masse wird auf Erkenntnisse aus der Normalmodenanalyse zurückgegriffen. Aus der Normalmodenanalyse ist bekannt, daß Schwingungen der gesamten Hämgruppe den größten Beitrag zum mittleren Auslenkungsquadrat bei tiefen Temperaturen liefern (Melchers et al., 1996). Die Masse der Hämgruppe inklusive des zentralen Eisens beträgt ca. 620 Dalton. Da die koordinative Bindung zwischen der Hämgruppe und dem proximalen Histidin der F-Helix nicht ganz vernachlässigt werden kann, wird eine etwas größere Masse angenommen, wobei eine Masse von 1000 Dalton als sinnvoller Wert erscheint. Unter der Annahme einer Masse von $m_t = 1000$ Dalton errechnen sich die in Tab. 8 angegebenen Schwingungsfrequenzen ω_t für die verschiedenen Steigungen c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte.

Steigung c_i ($\text{\AA}^2/\text{K}$)	Schwingungsfrequenz ω_t (s^{-1})
0.0004	$1.44 \cdot 10^{12}$
0.0008	$1.02 \cdot 10^{12}$
0.0016	$0.72 \cdot 10^{12}$

Tab. 8: Schwingungsfrequenz ω_t für MbCO-Kristalle als Funktion der Steigung c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte im Brownschen Oszillator-Modell ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$). Als Masse m_t der Brownschen Oszillation wurde für die Berechnung der Schwingungsfrequenz ein Wert von 1000 Dalton eingesetzt.

Setzt man diese Werte für die Schwingungsfrequenz ω_t und die Linienverbreiterung α_t in Gl.(35) ein, so kann die Dämpfungskonstante β_t als Funktion der Temperatur berechnet werden. Die in Abb. 40 dargestellte Dämpfungskonstante β_t ist unter der Annahme einer Masse von $m_t = 1000$ Dalton und unter Verwendung der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte berechnet, welche die oben angegebene Proportionalität c_i zur Temperatur aufweisen. In Abb. 40 ist eine Graphik eingelegt, in der die Masse m_t der aus der Steigung $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$ erhaltenen β_t -Werte in dem maximal möglichen Bereich von $m_t = 57$ Dalton (Masse des Hämeisens allein) und $m_t = 17800$ Dalton (Masse des gesamten Proteins) variiert wird. Die β_t -Werte, die aus den $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werten mit der kleinsten möglichen Steigung c_1 berechnet wurden, nehmen die größten Viskositätswerte an. Indem die Masse m_t für die größten β_t -Werte variiert wird, kann eine obere Grenze für die Dämpfungskonstante angegeben werden. Die Viskosität von MbCO-Kristallen kann demnach Werte bis zu $5 \cdot 10^{17} \text{ s}^{-1}$ annehmen. Diese Maximalwerte würden jedoch nur dann auftreten, wenn die Brownsche Oszillationsbewegung des Hämeisens als Bewegung eines isolierten Atoms betrachtet werden könnte.

Die Temperaturabhängigkeit der β_t -Werte, die unter Verwendung der oben abgeschätzten Masse $m_t = 1000$ Dalton berechnet wurden, wurde mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ angepaßt:

$$\beta_t = \beta_{t0}/p_t(T) \quad (83)$$

Für die Anpassung von β_t wurden die gleichen Werte der Gibbschen Freien Energiedifferenz $\Delta\epsilon$ und des Entropieunterschiedes ΔS verwendet wie bereits bei der Anpassung von $\langle x_t^2 \rangle$, α_t und η_t mit verschiedenen Steigungen c_i (siehe Tab. 6). Die resultierenden β_{t0} -Werte sind in Tab. 9 angegeben. Wie in Abb. 40 zu erkennen ist, nehmen die β_t -Werte von MbCO-Kristallen mit steigender Temperatur ab. Im Modell des Brownschen Oszillators bedeutet dies, daß die

Dämpfung bei höheren Temperaturen schwächer wird. Bei schwächerer Dämpfung wird die Amplitude der überdämpften Oszillation größer. Die größere Amplitude spiegelt sich wiederum in der mit der Temperatur stark anwachsenden mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ der überdämpften Schwingung wieder. Das Temperaturverhalten der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ sowie der Dämpfungskonstante β_t ist somit konsistent.

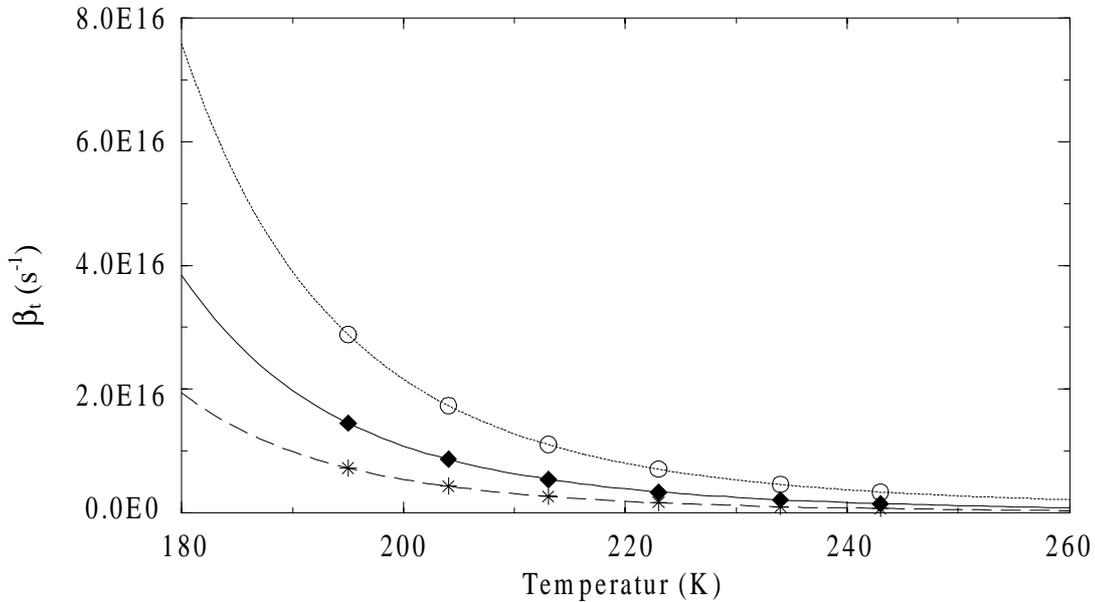


Abb. 40: Dämpfungskonstante β_t von MbCO-Kristallen als Funktion der Temperatur und der Steigung c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): offene Kreise: $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$, ausgefüllte Rauten: $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$, Sterne: $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$. Die β_t -Werte sind mit Hilfe von Gl.(83) angepaßt, wobei die Parameterwerte $\Delta\epsilon$ und ΔS der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ Tab. 6 entnommen sind. Die β_{t0} -Werte sind Tab. 9 zu entnehmen. In der eingelegten Abbildung sind neben der Dämpfungskonstante, die unter Annahme einer Masse $m_t = 1000$ Dalton und den drei verschiedenen Steigungen c_i berechnet wurde auch die Dämpfungskonstante für die kleinste Steigung c_1 mit einer Masse $m_t = 57$ Dalton (Masse des Hämeisens) als nicht ausgefüllte Quadrate und mit einer Masse $m_t = 17800$ Dalton (Masse von Mb) als ausgefüllte Quadrate eingezeichnet.

MbCO-Kristalle	$\alpha_{t0} (10^9 \text{ s}^{-1})$	η_{t0} (Poise)	$\beta_{t0} (10^{14} \text{ s}^{-1})$
Steigung $c_1 = 0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$	1.37	1.22	6.95
Steigung $c_2 = 0.0008 \text{ \AA}^2/\text{K}$	2.75	0.28	1.61
Steigung $c_3 = 0.0016 \text{ \AA}^2/\text{K}$	5.51	0.07	0.39

Tab. 9: Angepaßte Werte für die Linienverbreiterung α_{t0} , die Viskosität η_{t0} und die Dämpfungskonstante β_{t0} von MbCO-Kristallen bei verschiedenen Steigungen c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$). Die aus den verschiedenen Steigungen c_i resultierenden Parameter der Wahrscheinlichkeit $p_t(T)$, welche die Temperaturabhängigkeit obiger Werte festlegt, ist Tab. 6 zu entnehmen.

MbCO in Glyzerin

Das oben beschriebene Potentialmodell, das die Temperaturabhängigkeit der Parameter des Brownschen Oszillators im Falle von MbCO-Kristallen erklären konnte, wird ebenfalls auf die Daten von MbCO in Glyzerin angewendet. Die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte von MbCO in Glyzerin sind in Abb. 41 dargestellt. Wie bereits erörtert, ist die Steigung c der $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ -Werte bei der Anpassung der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte nach Gl.(73) nicht genau definiert. Die Steigung wird deshalb in einem gewissen Bereich variiert. Ausgehend von der stärksten Steigung der $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ -Werte zwischen 235 K und 240 K wird eine halb bzw. doppelt so große Steigung verwendet. Die mit diesen Steigungen erhaltenen Parameterwerte $\Delta\varepsilon$ und ΔS der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ sind in Tab. 10 zusammengefaßt. Die Steigung c_1 , die kleinste der drei Steigungen, ist gleichzeitig die kleinste Steigung, mit der eine Anpassung der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte möglich ist. Der Bereich der möglichen Parametersätze wird somit durch diese Steigung nach unten hin begrenzt.

MbCO in Glyzerin	$\Delta\varepsilon$ (10^{-20}J)	ΔS (10^{-22}J/K)
Steigung $c_1 = 0.000262 \text{ \AA}^2/\text{K}$	4.416	1.56
Steigung $c_2 = 0.000524 \text{ \AA}^2/\text{K}$	4.416	1.46
Steigung $c_3 = 0.001048 \text{ \AA}^2/\text{K}$	4.416	1.36

Tab. 10: Die Parameter der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ für MbCO in Glyzerin für verschiedene Steigungen c_i der $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ -Werte im Modell des Brownschen Oszillators ($\langle x_{t_0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): $\Delta\varepsilon$ ist die Differenz der Aktivierungsenergien und ΔS die Entropieänderung zwischen Konformationssub- und Übergangszustand.

Die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte von MbCO in Glyzerin können wie bereits im Falle von MbCO-Kristallen sehr gut mit Hilfe von Gl.(73) angepaßt werden. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ kann somit für verschiedene Proben die Temperaturabhängigkeit der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte wiedergeben. Dies ist ein weiterer Beweis für die Gültigkeit des der Wahrscheinlichkeitsverteilung zugrunde liegenden Potentials für Proteine, das Konformationssub- und Übergangszustände in einem Bild vereint.

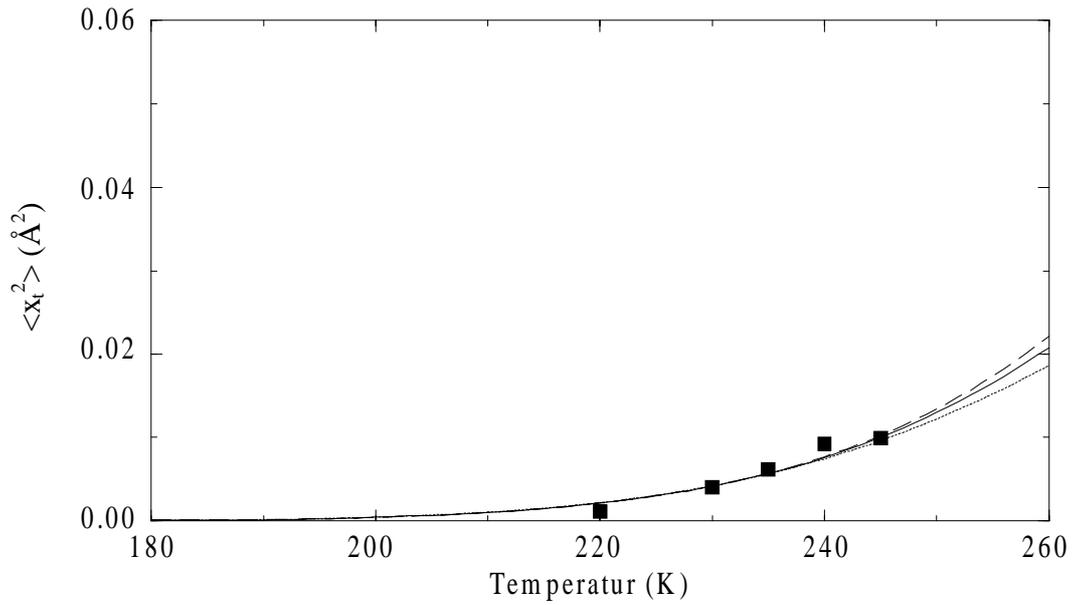


Abb. 41: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ von MbCO in Glycerin (Quadrate). Die $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte sind mit Hilfe von Gl.(73) für drei verschiedene Steigungen c_i von $\langle x_{t_0}^2 \rangle$ angepaßt ($\langle x_{t_0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): gepunktete Linie: $c_1 = 0.000262 \text{ \AA}^2/\text{K}$, durchgezogene Linie: $c_2 = 0.000524 \text{ \AA}^2/\text{K}$, gestrichelte Linie: $c_3 = 0.001048 \text{ \AA}^2/\text{K}$. Die Parameter $\Delta\varepsilon$ und ΔS der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ sind Tab. 10 zu entnehmen.

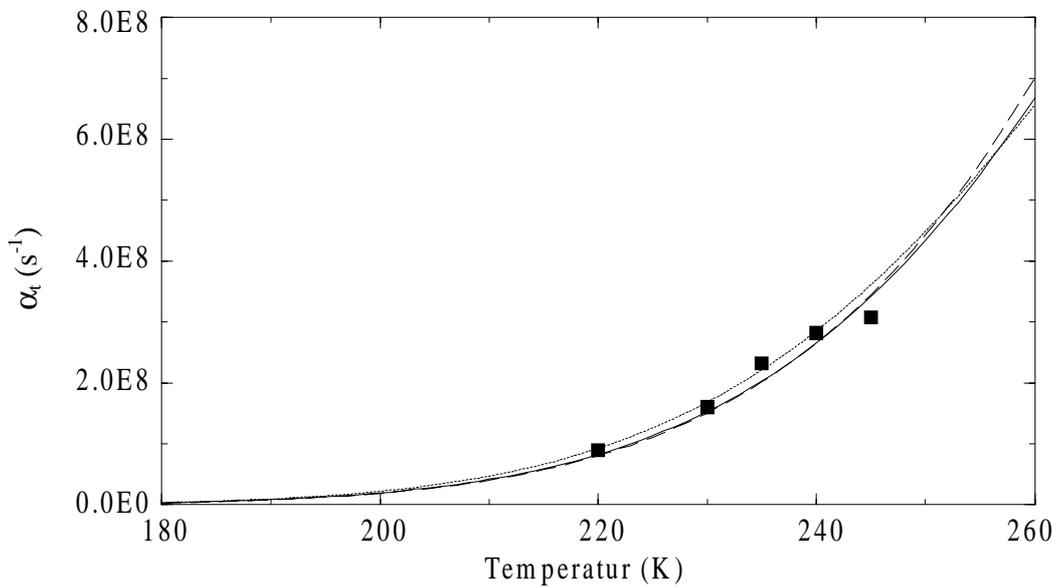


Abb. 42: Temperaturabhängigkeit der α_t -Werte von MbCO in Glycerin (Quadrate). Die α_t -Werte sind unter Verwendung von Gl.(75) für die drei verschiedenen Parametersätze von $\Delta\varepsilon$ und ΔS in Tab. 10 angepaßt. In Analogie zu der Anpassung der $\langle x_t^2 \rangle$ -Werte beziehen sich dabei die Linien auf die zu folgenden Steigungen c_i gehörenden Parametersätze ($\langle x_{t_0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): gepunktete Linie: $c_1 = 0.000262 \text{ \AA}^2/\text{K}$, durchgezogene Linie: $c_2 = 0.000524 \text{ \AA}^2/\text{K}$, gestrichelte Linie: $c_3 = 0.001048 \text{ \AA}^2/\text{K}$.

Bei der Linienverbreiterung α_t , die in Abb. 42 dargestellt ist, ist zu beachten, daß die α_t -Werte bei 220 K und 230 K aus der Temperaturabhängigkeit der restlichen α_t -Werte nach Gl.(75) extrapoliert und für die Anpassung der Mößbauer-Spektren festgehalten wurden. Die für die verschiedenen Steigungen c_i erhaltenen α_{t0} -Werte sind in Tab. 11 angegeben.

Ausgehend von der linear mit der Temperatur steigenden mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x_{t0}^2 \rangle$ und der Linienverbreiterung α_t können nun auch für MbCO in Glyzerin die Viskosität η_t (Gl.(79)) und die Dämpfungskonstante β_t (Gl.(35)) bestimmt werden. Die in Abb. 43 dargestellte Anpassung der η_t -Werte erfolgte unter Verwendung von Gl.(80). Die Anpassung der η_t -Werte nach Gl.(80) gelingt mit den Parametersätzen aus Tab. 10. und Tab. 11.

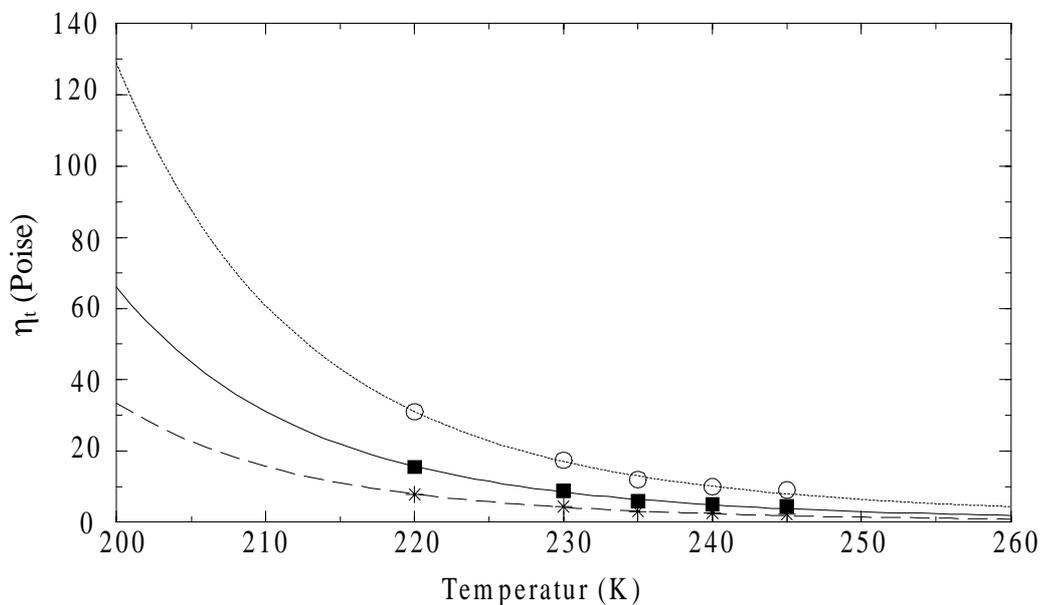


Abb. 43: Viskosität η_t von MbCO in Glyzerin als Funktion der Temperatur für drei verschiedene Steigungen c_i von $\langle x_{t0}^2 \rangle$ ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): offene Kreise: $c_1 = 0.000262 \text{ \AA}^2/\text{K}$, ausgefüllte Quadrate: $c_2 = 0.000524 \text{ \AA}^2/\text{K}$, Sterne: $c_3 = 0.001084 \text{ \AA}^2/\text{K}$. Die Linien kennzeichnen die jeweilige Anpassung der Viskosität unter Verwendung von Gl.(75) und den Parametern $\Delta\varepsilon$ und ΔS aus Tab. 10 bzw. dem Parameter η_{t0} aus Tab. 11.

Die verschiedenen Viskositäten als Funktion der Temperatur resultieren aus den unterschiedlichen Steigungen für $\langle x_{t0}^2 \rangle$. Die Viskosität η_t ist gemäß Gl.(79) indirekt proportional zu $\langle x_{t0}^2 \rangle$ bzw. zu der Steigung c der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte. Die Viskositätswerte von MbCO in Glyzerin können deshalb keine größeren Werte annehmen als die größten η_t -Werte in Abb. 43 (Kreise), die für die kleinstmögliche Steigung c_1 der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte berechnet wurden. Die Viskosität von MbCO in Glyzerin nimmt Werte zwischen maximal 30 P bei 220 K und

maximal 10 P bei 245 K an. Die Viskosität von MbCO in Glycerin und von MbCO-Kristallen liegt damit in der gleichen Größenordnung.

Die Viskosität im Brownschen Oszillator-Modell ist folglich nicht sehr sensitiv auf die Proteinumgebung.

Im weiteren wird anhand eines direkten Vergleichs der Viskosität von MbCO in Glycerin und der Viskosität von Glycerin untersucht, ob das in einem Glas befindliche Protein Glaseigenschaften annimmt. In Abb. 44 ist die Viskosität von MbCO in Glycerin, dessen Volumenanteil an Glycerin 75 % beträgt, zusammen mit der Viskosität von reinem Glycerin (Huck et al., 1988a) und von einem 75 % (v/v) Glycerin/Wasser-Gemisch (Leyse, 1994) eingezeichnet.

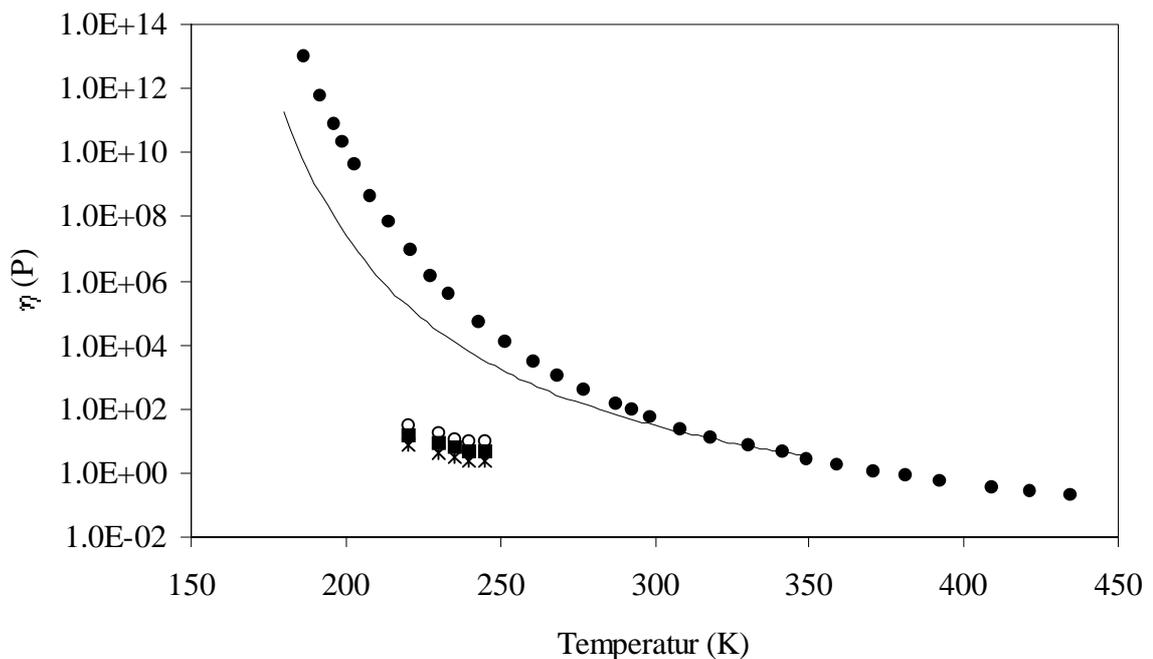


Abb. 44: Viskosität η_t für reines Glycerin (Huck et al., 1988a) (ausgefüllte Kreise) und für 75 % (v/v) Glycerin/Wasser (Leyser, 1994) (durchgezogene Linie), sowie für MbCO in Glycerin, dessen Volumenanteil an Glycerin ebenfalls 75 % beträgt. Die Viskosität von MbCO in Glycerin ist für drei verschiedene Steigungen c_i von $\langle x_{t0}^2 \rangle$ dargestellt ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): offene Kreise: $c_1 = 0.000262 \text{ \AA}^2/\text{K}$, ausgefüllte Quadrate: $c_2 = 0.000524 \text{ \AA}^2/\text{K}$, Sterne: $c_3 = 0.001048 \text{ \AA}^2/\text{K}$.

Bezogen auf die maximalen Viskositätswerte von MbCO in Glycerin sind die Viskositätswerte von 75 % Glycerin/Wasser um zwei bis drei Größenordnungen größer. Zudem nimmt die

Viskosität von MbCO in Glyzerin mit steigender Temperatur nur um einen Faktor drei ab, während die Viskosität von 75 % Glyzerin/Wasser im gleichen Temperaturbereich um zwei Größenordnungen abfällt. Damit stimmt weder die Größenordnung der Viskosität von MbCO in Glyzerin noch deren Abnahme mit steigender Temperatur mit den Werten von 75 % Glyzerin/Wasser überein.

Das Brownsche Oszillator-Modell unterstützt folglich nicht die in früheren Arbeiten getroffene Annahme, daß Proteine mit Gläsern vergleichbar seien.

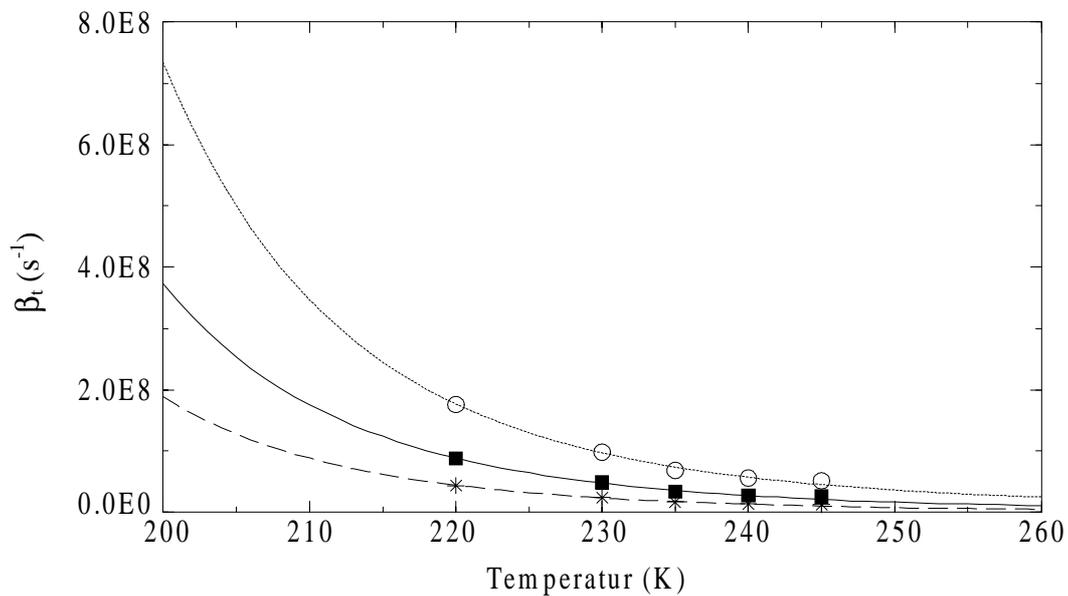


Abb. 45: Dämpfungskonstante β_t von MbCO in Glyzerin als Funktion der Temperatur und der Steigung c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$): offene Kreise: $c_1 = 0.000262 \text{ \AA}^2/\text{K}$, ausgefüllte Quadrate: $c_2 = 0.000524 \text{ \AA}^2/\text{K}$, Sterne: $c_3 = 0.001048 \text{ \AA}^2/\text{K}$. Die β_t -Werte sind mit Hilfe von Gl.(83) angepaßt, wobei die Parameterwerte $\Delta\varepsilon$ und ΔS der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_t(T)$ Tab. 10 entnommen sind. Die angepaßten β_{t0} -Werte sind Tab. 11 zu entnehmen. In der eingelegten Abbildung sind neben der Dämpfungskonstante, die unter Annahme einer Masse $m_t = 1000$ Dalton und den drei verschiedenen Steigungen c_i berechnet wurde, auch die Dämpfungskonstante für die kleinste Steigung c_1 mit einer Masse $m_t = 57$ Dalton (Masse des Hämeisens) als nicht ausgefüllte Quadrate und mit einer Masse $m_t = 17800$ Dalton (Masse von Mb) als ausgefüllte Quadrate eingezeichnet.

In Abb. 45 sind die β_t -Werte von MbCO in Glyzerin zu sehen. In analoger Vorgehensweise wie bei der Berechnung der β_t -Werte von MbCO-Kristallen werden die β_t -Werte zunächst für eine Masse $m_t = 1000$ Dalton sowie für die verschiedenen Steigungen c_i (siehe Tab. 10) bestimmt. Die Dämpfungskonstante β_t von MbCO in Glyzerin nimmt wie bei MbCO-Kristallen mit steigender Temperatur ab. Die Dämpfung der Brownschen Oszillation wird also auch für

MbCO in Glyzerin mit steigender Temperatur schwächer. Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen $p_i(T)$ der verschiedenen Steigungen c_i geben den Temperaturverlauf der Dämpfungskonstante β_t sehr gut wieder. Dies unterstreicht wiederum die Gültigkeit des Potentialmodells für Proteine.

MbCO in Glyzerin	α_{t0} (10^9 s^{-1})	η_{t0} (Poise)	β_{t0} (10^{14} s^{-1})
Steigung $c_1 = 0.000262$ $0.0004 \text{ \AA}^2/\text{K}$	2.40	1.20	6.83
Steigung $c_2 = 0.000524$ $\text{\AA}^2/\text{K}$	4.38	0.29	1.67
Steigung $c_3 = 0.001048$ $\text{\AA}^2/\text{K}$	8.64	0.07	0.41

Tab. 11: Angepaßte Werte für die Linienverbreiterung α_{t0} , die Viskosität η_{t0} und die Dämpfungskonstante β_{t0} von MbCO in Glyzerin bei verschiedenen Steigungen c_i der $\langle x_{t0}^2 \rangle$ -Werte ($\langle x_{t0}^2 \rangle = c_i \cdot T$). Die aus den verschiedenen Steigungen c_i resultierenden Parameter der Wahrscheinlichkeit $p_i(T)$, welche die Temperaturabhängigkeit obiger Werte festlegt, ist Tab. 6 zu entnehmen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Brownsche Oszillator-Modell die Temperaturabhängigkeit der Gesamtfläche der Mößbauer-Spektren vollständig erklären kann und eine mittlere quadratische Auslenkung der Brownschen Oszillationsbewegung $\langle x_t^2 \rangle$ liefert, welche die Berechnung der Viskosität und Dämpfungskonstante für MbCO-Kristalle als auch für MbCO in Glyzerin ermöglicht. Aus dem Vergleich der Viskosität des Proteins mit der Viskosität der Kristallwasser- bzw. Glasumgebung läßt sich in dem Brownschen Oszillator-Modell keine Ähnlichkeit zwischen Proteinen und Gläsern erkennen. Die Temperaturabhängigkeiten der Parameter des Brownschen Oszillator-Modells können schließlich mit Hilfe des beschriebenen Potentialmodells für Proteine einheitlich erklärt werden.

6.3 Diskussion der optischen Absorptionsspektren eines metastabilen Zustands von Myoglobin

Hier wird die Relaxation von Myoglobin innerhalb des metastabilen Zustands beobachtet. Diese ist von der Relaxation von Mb zu Mbdesoxy zu unterscheiden, die von unserer Gruppe bereits eingehend untersucht wurde (Lamb et al., 1998). Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es, die durch Erwärmung einsetzende Relaxation des metastabilen Zustands mit Hilfe der Soret-Bande zu untersuchen und über die Kopplung des elektronischen Übergangs mit den Vibrationen Kenntnisse über die dynamischen Eigenschaften des metastabilen Zustands von Mb zu gewinnen.

Informationen über den metastabilen Zustand liefern die strukturellen und dynamischen Parameter der optischen Absorptionsspektroskopie. Zu diesen zählen die linearen Kopplungskonstanten S_{hj} , die elektronische Übergangsfrequenz $\nu_0(T)$ und die Gaußverbreiterung $\sigma(T)$. Während erstere strukturelle Informationen liefern, sind in der Gaußverbreiterung dynamische Informationen enthalten.

Die linearen Kopplungskonstanten der hochfrequenten Moden, S_{hj} , sind von der Struktur des metastabilen Zustands abhängig. Sie sind proportional zu dem Parameter Δ_j , der die Verschiebung der Gleichgewichtspositionen beim optischen Übergang vom Grund- in den Anregungszustand anzeigt. Verändert sich lokal die Struktur von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$, ändern sich auch die Gleichgewichtspositionen und somit die linearen Kopplungskonstanten. Andererseits gibt die Stärke der Kopplung bzw. die Größe der linearen Kopplungskonstanten Aufschluß über die Struktur des metastabilen Zustands. Temperaturabhängige Veränderungen der metastabilen Struktur zeigen dabei eine Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands auf. Die linearen Kopplungskonstanten der hochfrequenten Moden sind, abgesehen von der Kopplungskonstante S_{h3} der Mode ν_{h3} bei 1000cm^{-1} , die mit steigender Temperatur kleiner wird, temperaturunabhängig. Die interne Relaxation oberhalb von 100 K betrifft somit nur die Kopplungskonstante S_{h3} , alle anderen Kopplungskonstanten werden davon nicht berührt. Mit Hilfe von S_{h3} wird die Kopplung der Vibrationen ν_{h3} an den $\pi\pi^*$ -Übergang beschrieben. Der Mode ν_{h3} werden mehrere Streck- und Biegeschwingungen von Vinyl-Substituenten des Protoporphyrin-Rings zugeordnet (siehe Abb. 48) (Hu et al., 1996). Es erscheint deshalb

wahrscheinlich, daß sich bei der internen Relaxation die lokale Struktur in der Hämumgebung geringfügig verändert. Die Kopplungskonstante S_{h2} der Mode ν_{h2} bei 673 cm^{-1} ist temperaturunabhängig. Die Kopplungskonstante S_{h2} gibt jedoch über ihre Größe Aufschluß über die Struktur von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ (Cupane et al., 1996). Die Mode ν_{h2} ist eine Kombination aus $C_\alpha\text{N}$ -Streck- und $C_\alpha C_m C_\alpha$ -Biegeschwingung (die Bezeichnung der Kohlenstoffatome ist in Abb. 48 erläutert) (Li et al., 1990). Der Wert der zugehörigen Kopplungskonstante S_{h2} ist infolge der räumlichen Nähe zum zentralen Eisen proportional zu der Auslenkung des Eisenatoms aus der Hämebene. Je stärker das Eisenatom ausgelenkt ist, desto größer ist die Kopplungskonstante von ν_{h2} . Die Auslenkung des Eisenatoms wiederum hängt von der Ligandierung ab. In fünffach ligandiertem Eisen ist die Auslenkung sehr viel stärker als in sechsfach ligandiertem Eisen. Da aus der Röntgenstrukturanalyse bekannt ist, daß $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ sechsfach ligandiert ist, ist eine kleine Auslenkung und damit auch eine kleine Kopplungskonstante der Mode ν_{h2} zu erwarten. In der Tat ist die Kopplungskonstante von ν_{h2} sehr klein und mit der entsprechenden Kopplungskonstante von MbCO , das ebenfalls sechsfach ligandiertes Eisen enthält, vergleichbar. Die Kopplungskonstante von ν_{h2} ist auch deutlich kleiner als die Kopplungskonstante von Mbdesoxy , dessen zentrales Eisen fünffach koordiniert ist. Dies läßt folglich den Schluß zu, daß das Eisen in $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ nahezu vollständig in der Hämebene liegt. Die Übereinstimmung zu der Röntgenstruktur des metastabilen Zustands spiegelt sich somit auch in der Kopplungskonstante der Mode ν_{h2} wieder. Auch die Kopplungskonstanten der Moden ν_{h1} und ν_{h4} bei den Frequenzen 372 cm^{-1} und 1362 cm^{-1} sind mit den entsprechenden Kopplungskonstanten von MbCO vergleichbar, während sie sich von den Mbdesoxy -Werten deutlich unterscheiden. Die Kopplungskonstanten von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ liegen folglich insgesamt näher bei den Kopplungskonstanten von sechsfach ligandiertem Mb als bei denjenigen von fünffach ligandiertem Mb. Die Ergebnisse der optischen Absorptionsspektroskopie sind somit ein weiterer Beleg für die sechsfache Ligandierung des Eisens im metastabilen Zustand. Alle bisherigen Parameter passen somit zu dem Bild des metastabilen Zustands als einer eingefrorenen Struktur von Mbmet , dessen Eisen reduziert ist.

Bei Erhöhung der Temperatur des mit Hilfe der optischen Absorptionsspektroskopie gemessenen metastabilen Zustands verändert sich die elektronische Übergangsfrequenz $\nu_0(T)$. Frequenzverschiebungen der Soret-Bande werden ganz allgemein auf strukturelle Veränderungen in der Nähe der Hämgruppe zurückgeführt (Kushkuley und Stavrov, 1996). Dies folgt aus den durch geringfügige strukturelle Verschiebungen hervorgerufenen

Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen, die das π -Elektronensystem der Hämgruppe und damit die Soret-Bande beeinflussen. Die irreversiblen Frequenzverschiebungen in $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$, die über die temperaturabhängigen Gleichgewichtsverschiebungen in Mb im Gleichgewichtszustand hinausgehen, deuten auf irreversible Veränderungen in der Struktur der Hämtasche hin (vgl. Franzen und Boxer, 1977). Diese können nur mit einer Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands erklärt werden. Eine Relaxation von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ zu Mbdesoxy kann ausgeschlossen werden, da diese nur als Flächenabnahme in dem Spektrum von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ zu erkennen wäre. Eine Frequenzverschiebung von $\nu_0(T)$, die über die Frequenzverschiebung im Gleichgewichtszustand hinaus geht, kennzeichnet somit die Relaxation innerhalb von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$. Da die Frequenzverschiebung von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ erst oberhalb von 100 K von derjenigen in Mb im Gleichgewichtszustand abweicht, kann daraus gefolgert werden, daß die Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands ab 100 K einsetzt. Es stellt sich nun die Frage nach den möglichen strukturellen Auswirkungen der Relaxation innerhalb von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$. Da die strukturellen Veränderungen der Relaxation innerhalb von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ in den strukturellen Veränderungen zwischen Mbmet und Mbdesoxy enthalten sein müssen, könnte ein Vergleich der Röntgenstrukturen von Mbmet und Mbdesoxy hier weiter helfen. Insgesamt bestehen zwischen den Röntgenstrukturen von Mbmet und Mbdesoxy bei nahezu atomarer Auflösung nur sehr geringe Unterschiede. Ein kleiner, aber sehr wesentlicher Unterschied zwischen beiden Strukturen besteht in der Position des Häms. Das Häm in Mbdesoxy ist gegenüber dem Häm in Mbmet verschoben. Als mögliche Relaxation in $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ wird deshalb eine geringfügige Verschiebung des Häms in Richtung der Position in Mbdesoxy postuliert. Eine geringfügige Verschiebung des Häms in $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ würde in einer leicht veränderten Hämumgebung resultieren, die wiederum die Verschiebung der elektrischen Übergangsfrequenz bewirken würde.

In Hinblick auf die dynamischen Eigenschaften des metastabilen Zustands ist die Gaußverbreiterung von Interesse. Vorausgeschickt sei, daß sich die Temperaturabhängigkeit der Gaußverbreiterung $\sigma(T)$ in den verschiedenen Temperaturzyklen wiederholt. Die bei der elektronischen Übergangsfrequenz gemessene Irreversibilität tritt also bei der Gaußverbreiterung nicht auf. Dies bedeutet, daß die Relaxation innerhalb des metastabilen Zustands keinen Einfluß auf die Gaußverbreiterung nimmt. Erklären läßt sich diese Tatsache dadurch, daß die betroffenen Atome oder Atomgruppen durch die interne Relaxation zwar geringfügig andere Positionen einnehmen, aber dadurch nicht die niederfrequenten Moden

bzw. deren Kopplung an den elektronischen Übergang beeinflusst werden. Die Temperaturabhängigkeit von $\sigma^2(T)$ des metastabilen Zustands stimmt wesentlich besser mit der von MbCO als mit der von Mbdesoxy überein (siehe Abb. 27). Damit wird deutlich, daß das Spektrum niederfrequenter Moden von Fe(II)MbH₂O und Mbdesoxy nahezu identisch sein muß. Dies ist deshalb überraschend, weil sich alle bisher diskutierten strukturabhängigen Parameter von Fe(II)MbH₂O wie jene von MbCO verhalten. Das Spektrum niederfrequenter Moden ist für MbCO ein anderes als für Mbdesoxy (Melchers et al., 1996). Die Übereinstimmung der Temperaturabhängigkeit von $\sigma^2(T)$ von Fe(II)MbH₂O und Mbdesoxy stellt jedoch klar, daß das dynamische Verhalten des metastabilen Zustands dem von Mbdesoxy ähnelt.

Wie an Abb. 46 zu erkennen ist, nehmen die Übergangsfrequenz $\nu_0(T) - \nu_0(T=20K)$ und die Gaußverbreiterung $\sigma(T) - \sigma(T=20K)$ die gleiche Temperaturabhängigkeit an. Es liegt deshalb nahe zu vermuten, daß die niederfrequenten Moden, die zu der Gaußverbreiterung führen, die Relaxation ermöglichen. Ausgehend von der sechsfach ligandierten Struktur von Fe(II)MbH₂O findet deshalb die Proteinrelaxation zu Mbdesoxy aufgrund der veränderten Dynamik statt. Der metastabile Zustand ist dabei bis zu Temperaturen von 180 K stabil. Er relaxiert erst zu Mbdesoxy bei Temperaturen, bei denen die proteinspezifische Dynamik angeregt ist.

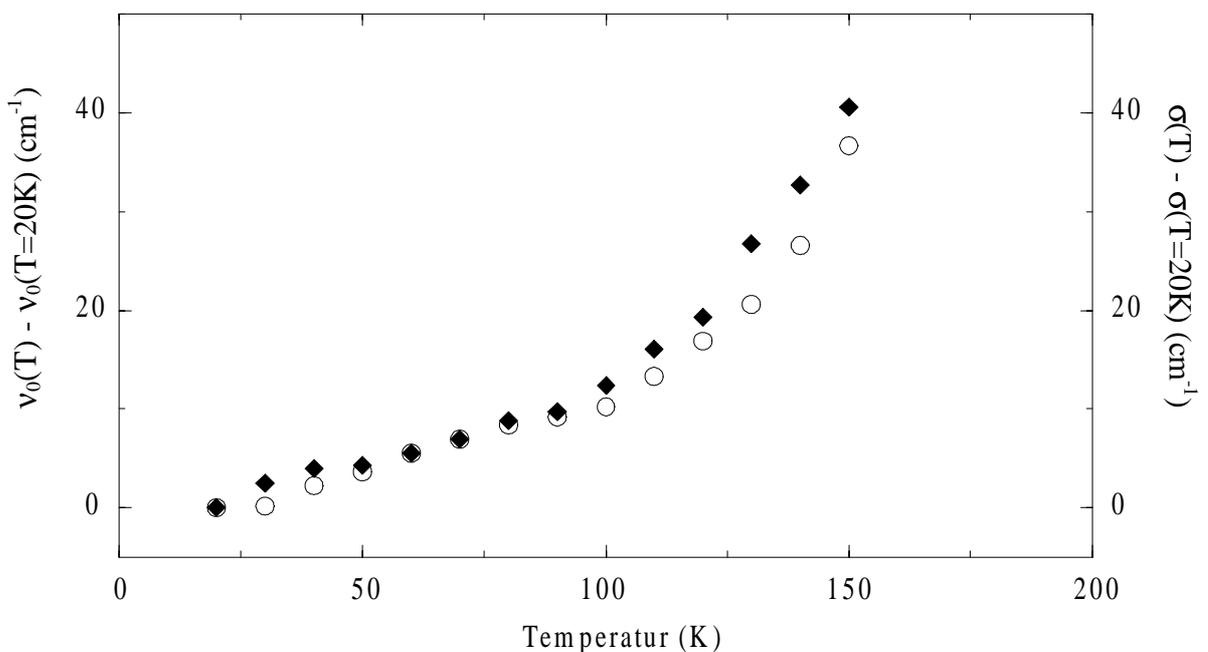


Abb. 46: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Übergangsfrequenz $\nu_0(T) - \nu_0(T=20K)$ (O) mit der Temperaturabhängigkeit der Gaußverbreiterung $\sigma(T) - \sigma(T=20K)$ (◆).

6.4 Vergleich der Röntgenstrukturen eines Mbmet-Trehalose-Kristalls und eines Mbmet-Kristalls

Bindungen zwischen Trehalose-Molekülen und Mbmet werden in der Röntgenstruktur des Mbmet-Trehalose-Kristalls nur dann sichtbar, wenn sie spezifisch sind. Eine spezifische Bindung läge vor, wenn Trehalose in jedem Kristall an einer oder mehreren bestimmten Positionen binden würde. Im Vergleich zu der Röntgenstruktur von Mbmet sind in dem Mbmet-Trehalose-Kristall keine zusätzlichen Elektronendichten zu erkennen, die als Trehalose-Moleküle interpretiert werden könnten. Dies bedeutet, daß Trehalose zumindest in der Raumgruppe des verwendeten Mbmet-Trehalose-Kristalls (P_{21}) keine spezifische Bindung zu dem Protein ausbildet. Mögliche Ursache hierfür ist die kompakte Struktur des Mbmet-Kristalls, die ein Eindiffundieren der Trehalose in das Protein verhindert.

Unterschiede zwischen den Kristallstrukturen von Mbmet und von Mbmet mit eindiffundierter Trehalose-Lösung, sind in der Differenzabstandsmatrix in Abb. 29 lediglich in den Bereichen um die Aminosäuren Lysin 50 und Glycin 121 erkennbar. Ein Ausschnitt der Strukturen im Bereich um Glycin 121 ist in Abb. 47 zu sehen. Kachalova et al. (1999) konnten zeigen, daß hier eine Doppellage der Struktur vorliegt, die in Abb. 47 ebenfalls eingezeichnet ist. Die räumliche Lage der Aminosäuren in diesem Bereich ist folglich nicht eindeutig bestimmt. Abweichungen der Mbmet-Trehalose-Struktur von der Mbmet-Struktur sind auf die alternativen Lagen der Aminosäuren in diesem Bereich zurückzuführen, die mit einer Struktur modelliert wurden. Der Bereich um Glycin 121 ist zudem in Protein-Protein-Kontakt zu dem Bereich um Lysin 50. Der über ein Sulfat vermittelte Molekülkontakt beeinflusst folglich auch die Struktur im Bereich um Lysin 50. Die Unterschiede zwischen der Mbmet- und Mbmet-Trehalose-Struktur beruhen somit auf den verschiedenen Interpretationsmöglichkeiten der Elektronendichte in den beiden Bereichen.

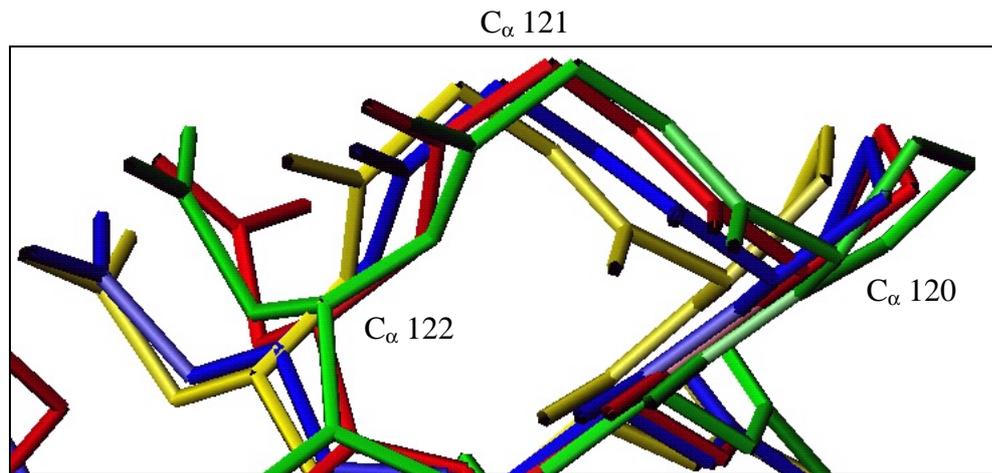


Abb. 47: Ausschnitt der Röntgenstrukturen von Mbmet (blau) (Ostermann, 1999b) und Mbmet in Trehalose (rot) im Bereich um Glycin 121. Die von Kachalova et al. (1999) ermittelten Doppellagen der hochaufgelösten Struktur von Mbmet (1.15 Å) sind in gelb bzw. grün eingezeichnet. Von den verschiedenen Strukturen ist die Lage der C_{α} -Atome der Aminosäure Prolin 120, Glycin 121 und Asparagin 122 gekennzeichnet.

Die in Abb. 30 dargestellten Abstände der vergleichbaren Kristallwasser-Moleküle in Mbmet und Mbmet mit eindiffundierter Trehalose-Lösung weisen auf die Übereinstimmung der Kristallwasserstruktur hin. Trehalose, das in der Aufbewahrungslösung der Kristalle gelöst ist, hat folglich keinen Einfluß auf die Wasserstruktur. Trehalose beeinflusst somit in dem Mbmet-Kristall, der in der Raumgruppe P_{21} kristallisiert ist, weder die Kristallwasser- noch die Proteinstruktur. Dies steht im Gegensatz zu der Wirkung von Trehalose im trockenen Milieu dar. Nach der Wasser-Ersatz-Hypothese ("water replacement hypothesis") ersetzt Trehalose Wasser an der Proteinoberfläche, d.h. es bildet Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus (Prestrelski et al., 1993; Carpenter und Crowe, 1989). Die im Vergleich zu Wasser- sehr viel größeren Trehalose-Moleküle bilden auf der Proteinoberfläche gleichzeitig eine wesentlich starrere Matrix als eine wäßrige Lösung. Wie mittels Mößbauer-spektroskopischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, wird deshalb in MbCO, getrocknet in Trehalose, proteinspezifische Bewegung bis zu sehr hohen Temperaturen unterdrückt.

Aus der vorliegenden Röntgenstruktur von Mbmet in Trehalose kann geschlossen werden, daß Trehalose diese Wirkung ausschließlich im trockenen Milieu ausübt. In einer wäßrigen Trehalose-Lösung bleibt die Kristallstruktur von Myoglobin sowie die Wasserstruktur und damit auch die Dynamik unverändert.

6.5 Diskussion des Relaxationsverhaltens des metastabilen Zustands von Myoglobin in Trehalose

Betrachtet man nochmals Abb. 31, so erkennt man eine deutliche Veränderung des Spektrums von Mbmet in Trehalose nach der Röntgenbestrahlung. Die Hyperfeinparameter der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe zeigen ein dominantes Dublett, dessen Hyperfeinparameter typisch für einen Fe(II)-Zustand sind (Prusakov et al., 1995). Wie bereits in Zusammenhang mit den optischen Absorptionsspektren eines metastabilen Zustands von Mb erörtert, führt die Röntgenbestrahlung von Mbmet (Fe(III) *high spin*) zu einem Fe(II) *low spin*-Zustand, dessen Struktur gegenüber der Mbmet-Struktur unverändert ist (Prusakov et al., 1985; Engler et al., 1999). Da die sehr ungewöhnliche H₂O-Ligandierung des Fe(II)MbH₂O-Zustands nur aufgrund der eingeschränkten sterischen Beweglichkeit bei tiefen Temperaturen stabilisiert wird, wird dieser Zustand auch metastabiler Zustand genannt. Anhand des großen Flächenanteils von Fe(II)MbH₂O in dem Mößbauer-Spektrum nach der Bestrahlung konnte nachgewiesen werden, daß ein Großteil der Proteinmoleküle reduziert wurde. Neben Fe(II)MbH₂O sind weitere Spezies in dem Mößbauer-Spektrum der bestrahlten Probe erkennbar.

Das symmetrische Dublett mit einer Quadrupolaufspaltung von 2.2 mm/s und einer Isomerieverschiebung von 0.9 mm/s konnte als Mbdesoxy identifiziert werden (Eicher et al., 1974). Mbdesoxy entsteht nach der Dissoziation des Wasser-Liganden von Fe(II)MbH₂O. In dem Absorptionsspektrum der bestrahlten Probe sind die Hyperfeinparameter des Dubletts mit einer Quadrupolaufspaltung von $EQ = 0.39$ mm/s und einer Isomerieverschiebung von $IS = 0.27$ mm/s typisch für MbCO (Parak et al., 1977). Die Bildung von MbCO setzt freie CO-Moleküle in der bestrahlten Probe voraus, die sich an das Eisen anlagern. Freie CO-Moleküle können bei der Radiolyse von organischen Verbindungen entstehen. Trehalose mit seinen zahlreichen CO-Gruppen stellt eine effektive Quelle für die CO-Bildung dar. CO-Moleküle könnten allerdings auch von dem Protein selbst stammen. An welchen Stellen die CO-Moleküle entstehen, wird nachstehend diskutiert. Die bestrahlte Mbmet-Trehalose-Probe zeigt schließlich noch ein asymmetrisches Dublett, das sich von Fe(II)MbH₂O, Mbdesoxy und MbCO dadurch unterscheidet, daß sein Flächenanteil bei Temperaturerhöhung konstant bleibt. Bei dieser Spezies muß es sich deshalb um eine stabile Mb-Spezies handeln, dessen Hyperfeinparameter

die Zuordnung zu CO-, H₂O- oder O₂-ligandiertem Mb bzw. unligandiertem Mb ausschließen. In Frage kommt deshalb nur die als Hämochrom bezeichnete Form von Mb, in der das Hämeisen direkt an das distale Histidin gebunden ist (Chang, 1992).

Die Ergebnisse des Relaxationsexperiments an bestrahltem Mbmet in Trehalose werden im folgenden mit den Ergebnissen des Relaxationsexperiments an bestrahltem Mbmet in Glycerin verglichen (Prusakov et al., 1995). Dabei ist zu beachten, daß die Bestrahlungsdauer der Mbmet-Trehalose-Probe im Vergleich zu der Bestrahlungsdauer von Mbmet in Glycerin verdreifacht wurde, um die gewünschte Reduktion des Hämeisens zu erzielen. Der Grund für die verschieden starke Reduktion könnte darin liegen, daß durch Röntgenbestrahlung weniger Elektronen in der Mbmet-Trehalose-Probe freigesetzt werden. Elektronen entstehen durch Röntgenbestrahlung in der Regel bei der Radiolyse von Wasser (Sonntag, 1987). In der getrockneten Mbmet-Trehalose-Probe ist jedoch kaum noch Wasser vorhanden, so daß bei vergleichbarer Bestrahlungsdauer weniger Moleküle reduziert werden. Infolge der langen Röntgenbestrahlung der Mbmet-Trehalose-Probe können außerdem Strahlenschäden entstehen. Die Bindung des distalen Histidins an das Hämeisen im Falle von Hämochrom ist Beispiel eines derartigen Strahlenschadens.

Anhand eines Vergleichs der temperaturabhängigen Flächenanteile der verschiedenen Mb-Spezies in bestrahltem Mbmet in Trehalose und in bestrahltem Mbmet in Glycerin wird der Einfluß von Trehalose auf die Relaxation untersucht. Der metastabile Zustand der bestrahlten Mbmet-Glycerin-Probe wird bei Temperaturerhöhung zu gleichen Teilen in MbCO und Mbdesoxy umgewandelt. In der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe wird der metastabile Zustand ebenfalls in MbCO und Mbdesoxy umgewandelt. Die Mbdesoxy-Konzentration bleibt jedoch bei Erwärmung konstant, während der MbCO-Flächenanteil so stark mit der Erwärmungstemperatur zunimmt wie der Flächenanteil des metastabilen Zustands abnimmt. Mit steigender Erwärmungstemperatur werden somit nahezu alle Moleküle im metastabilen Zustand in MbCO umgewandelt (siehe Abb. 33). Dies deutet auf einen großen Überschuß an CO-Molekülen hin. Wie bereits festgestellt, können CO-Moleküle sowohl von Aminosäuren des Proteins als auch von Trehalose-Molekülen in der Proteinumgebung abgespaltet werden.

Um herauszufinden, ob im Protein oder in der Proteinumgebung mehr CO-Moleküle freigesetzt werden, wurde eine polykristalline Mbmet-Probe bestrahlt, in der die Freisetzung

von CO-Molekülen im Kristallwasser ausgeschlossen ist. Da in der polykristallinen Mbmet-Probe nur eine sehr geringe Zahl an CO-Molekülen nach der Bestrahlung entstanden, wird CO hauptsächlich in einer anorganischen Proteinumgebung gebildet (Ostermann, 1998). Bei der Bestrahlung der Mbmet-Glyzerin-Probe wird demnach der überwiegende Anteil an CO-Molekülen in Glyzerin und nur ein geringer Anteil im Protein gebildet. Aufgrund der außergewöhnlich langen Bestrahlung von Mbmet in Trehalose ist jedoch davon auszugehen, daß eine signifikante Zahl an CO-Molekülen auch im Proteininneren produziert wurde.

Auf ein überraschendes Ergebnis führte der Temperaturverlauf der Flächenanteile des metastabilen Zustands in der Mbmet-Trehalose-Probe. Bei der Erwärmung der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe wäre zu erwarten gewesen, daß die Flächenabnahme von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ im Vergleich zu der bestrahlten Mbmet-Glyzerin-Probe verzögert ist, d.h. eine Verschiebung der Vorgänge hin zu höheren Temperaturen auftritt. Grund für diese Annahme sind Mößbauer-Untersuchungen an in Trehalose getrocknetem MbCO, in denen proteinspezifische Dynamik zu sehr viel höheren Temperaturen verschoben ist (siehe Kap. 4.1). Die Ergebnisse der vorliegenden Bestrahlungsexperimente stehen zu diesen Erwartungen aber im Widerspruch, da die Fläche von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ bereits bei 120 K, d.h. bei sehr viel tieferen Temperaturen abnimmt, als in dem Relaxationsexperiment von bestrahltem Mbmet in Glyzerin (150 K). Es stellt sich deshalb die Frage, ob $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ in der bestrahlten Mbmet-Trehalose-Probe tatsächlich bei tieferen Temperaturen relaxieren konnte. Bei der Relaxation von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$ wäre Mbdesoxy entstanden. Der Flächenanteil von Mbdesoxy bleibt aber in dem gesamten Temperaturbereich nahezu konstant. Eine Relaxation des metastabilen Zustands zu Mbdesoxy kann deshalb ausgeschlossen werden. Dies wird durch CO-Rückbindungsstudien bestätigt, in denen gezeigt wurde, daß MbCO in Trehalose nach der Photolyse nicht relaxiert (Hagen et al., 1995).

Durch Einbettung in Trehalose kann folglich die Proteinrelaxation von metastabilem Mb unterdrückt werden.

Ungeklärt ist aber bisher, wie die Fläche von $\text{Fe(II)MbH}_2\text{O}$, wenn nicht aufgrund von Relaxation, mit steigender Temperatur kleiner werden kann. Es wurde bereits auf die lange Bestrahlungsdauer der Mbmet-Trehalose-Probe hingewiesen. Aufgrund dieser langen Bestrahlung könnte so viel CO entstanden sein, daß der Wasser-Ligand, der bei höheren

Temperaturen aus der Häm Tasche entweichen kann, lediglich durch ein CO-Molekül ersetzt wird. Die CO-Bindung ist dabei in Analogie zu CO-Blitzlicht-Experimenten zu sehen, in denen das durch Blitzlicht abgespaltete CO bei Temperaturen unter 180 K auf einer Zeitskala von Sekunden, d.h. also wesentlich schneller als die Dauer der Mößbauer-Experimente, zurückbindet (Austin et al., 1975, Agmon und Hopfield, 1983, Steinbach et al., 1991). Die Zunahme der Fläche von MbCO bei gleichzeitiger Abnahme der Fläche von Fe(II)MbH₂O könnte also auf eine schnelle CO-Ligandierung nach der Dissoziation von Wasser zurückzuführen sein.

Mit Blitzlichtphotolyse-Messungen konnte außerdem gezeigt werden, daß das CO bei höheren Temperaturen nicht aus menschlichem Hämoglobin, das in Trehalose eingebettet ist, entweichen kann. In dem Bestrahlungsexperiment an MbCO in Trehalose würde sich das Entweichen von CO-Liganden in die Trehalose-Matrix in einer Abnahme der Fläche widerspiegeln. Die Fläche von MbCO nimmt jedoch bis zu hohen Temperaturen zu. In Übereinstimmung mit den Blitzlichtphotolyse-Messungen entweicht der CO-Ligand folglich nicht in die Trehalose-Matrix.

Anhang

Anhang A: Struktur des Eisen-Protoporphyrin-IX

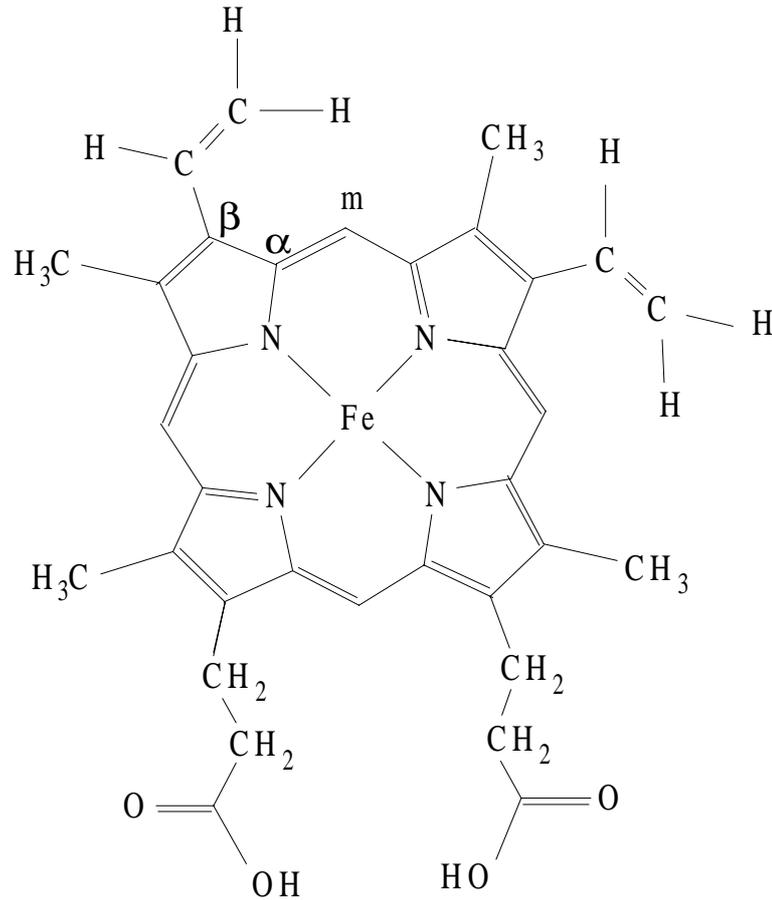


Abb. 48: Molekulare Struktur des Eisen-Protoporphyrin-IX und die Bezeichnung der Kohlenstoffatome nach Hu et al. (1996).

Anhang B: Geometrie der Hämgruppe in verschiedenen Ligandierungszuständen

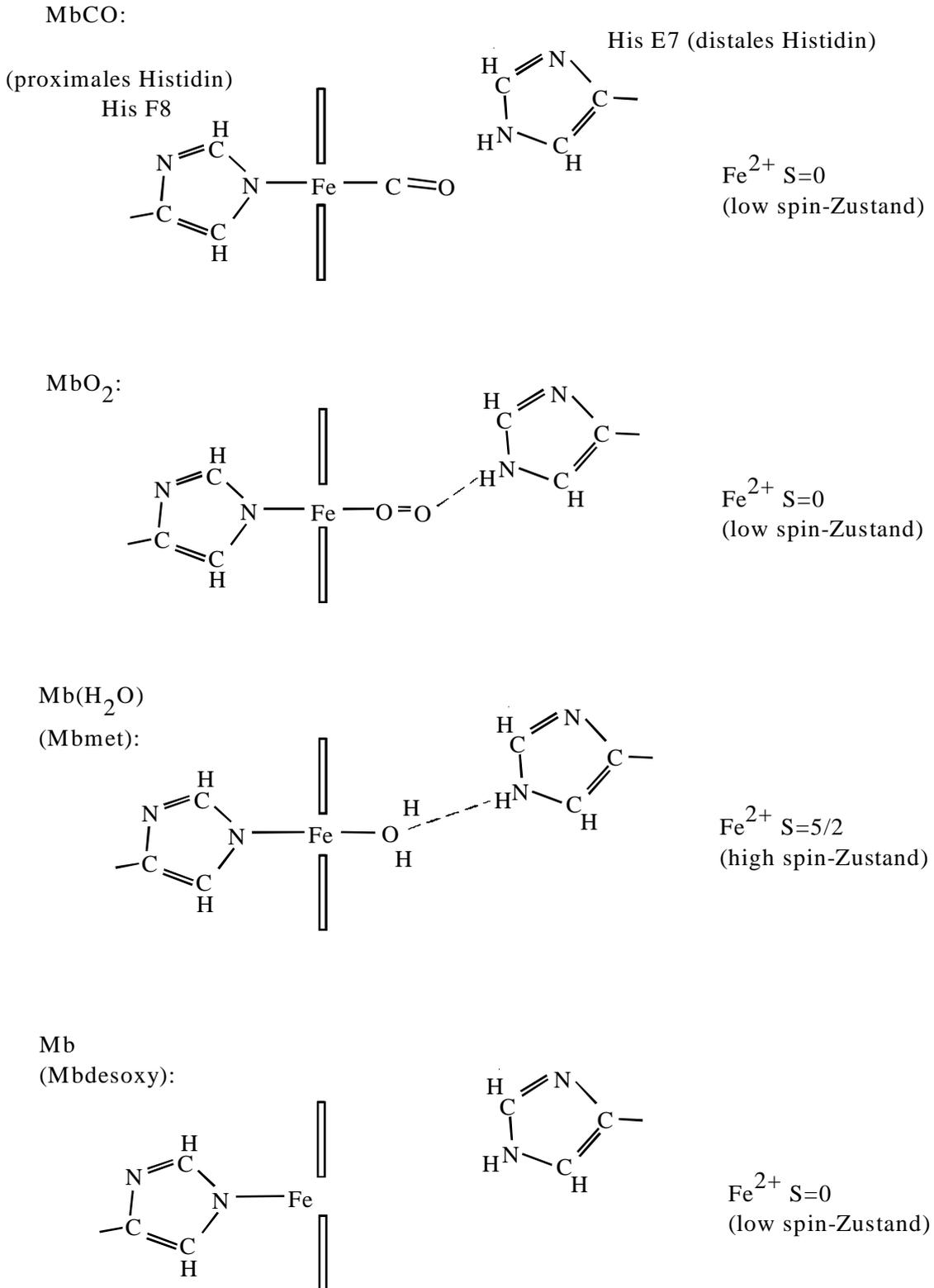


Abb. 49: Struktur der Eisenumgebung von Mb in verschiedenen Ligandierungszuständen.

Anhang C: Parameter aus der Anpassung der Mößbauer-Spektren mit phänomenologisch eingeführten breiten Linien

a) Linienbreite der Quellen:

	MbCO-Kristalle	MbCO in Glycerin	MbCO in Trehalose
Linienbreite der Quelle (mm/s)	0.14	0.11	0.14

Tab. 12: Linienbreiten der Quellen, die bei der Auswertung der Mößbauer-Spektren von MbCO-Kristallen, MbCO in Glycerin und MbCO, getrocknet in Trehalose, eingesetzt wurden.

b) Mößbauer-Parameter von MbCO-Kristallen:

T(K)	$\langle x^2 \rangle (\text{Å}^2)$	EQ(mm/s)	IS(mm/s)	LBR(mm/s)
80	0.0058	0.370	0.279	0.154
89	0.0069	0.370	0.280	0.153
101	0.0078	0.372	0.275	0.156
113	0.0088	0.374	0.272	0.157
123	0.0100	0.380	0.272	0.161
133	0.0104	0.374	0.269	0.162
143	0.0108	0.379	0.269	0.157
153	0.0118	0.382	0.259	0.160
163	0.0122	0.385	0.252	0.156
176	0.0140	0.391	0.245	0.164
183	0.0142	0.392	0.248	0.153
195	0.0175	0.395	0.246	0.172
204	0.0193	0.392	0.249	0.172
213	0.0225	0.399	0.238	0.180
223	0.0282	0.397	0.228	0.175
234	0.0335	0.398	0.233	0.180
243	0.0441	0.417	0.220	0.210

Tab. 13: Die mittleren quadratischen Auslenkungen $\langle x^2 \rangle$ und die Hyperfeinparameter des Transmissionsintegrals für MbCO-Kristalle als Funktion der Temperatur (Elektrische Quadrupolaufspaltung EQ, Isomerieverschiebung IS, Linienbreite LBR).

c) Mößbauer-Parameter von MbCO in Glyzerin:

T(K)	$\langle x^2 \rangle (\text{Å}^2)$	EQ(mm/s)	IS(mm/s)	LBR(mm/s)
80	0.0061	0.360	0.274	0.133
90	0.0068	0.363	0.272	0.133
100	0.0076	0.366	0.270	0.134
110	0.0082	0.366	0.268	0.135
120	0.0088	0.369	0.266	0.135
130	0.0097	0.366	0.264	0.137
140	0.0102	0.373	0.261	0.136
150	0.0108	0.374	0.259	0.133
160	0.0119	0.374	0.254	0.138
170	0.0125	0.380	0.251	0.136
180	0.0135	0.381	0.248	0.139
190	0.0146	0.390	0.244	0.139
200	0.0159	0.394	0.242	0.141
210	0.0170	0.393	0.232	0.137
220	0.0189	0.392	0.226	0.140
230	0.0304	0.393	0.220	0.170
235	0.0402	0.391	0.219	0.292
240	0.0477	0.410	0.218	0.330
245	0.0631	0.410	0.210	0.600

Tab. 14: Die mittleren quadratischen Auslenkungen $\langle x^2 \rangle$ und die Hyperfeinparameter des Transmissionsintegrals für MbCO in Glyzerin als Funktion der Temperatur (Elektrische Quadrupolaufspaltung EQ, Isomerieverschiebung IS, Linienbreite LBR).

d) Mößbauer-Parameter von MbCO, getrocknet in Trehalose:

T(K)	$\langle x^2 \rangle (\text{\AA}^2)$	EQ(mm/s)	IS(mm/s)	LBR(mm/s)
81	0.0057	0.359	0.265	0.141
99	0.0071	0.362	0.263	0.139
117	0.0081	0.365	0.261	0.141
130	0.0090	0.370	0.257	0.141
142	0.0100	0.371	0.254	0.143
149	0.0103	0.374	0.250	0.140
162	0.0112	0.375	0.245	0.142
172	0.0124	0.378	0.243	0.143
183	0.0126	0.380	0.239	0.139
191	0.0135	0.385	0.235	0.142
208	0.0167	0.390	0.228	0.139
222	0.0183	0.390	0.221	0.146
233	0.0190	0.393	0.217	0.156
242	0.0194	0.395	0.214	0.141
253	0.0199	0.399	0.210	0.140
270	0.0230	0.401	0.203	0.147
284	0.0233	0.406	0.195	0.142
298	0.0274	0.409	0.189	0.149
317	0.0287	0.419	0.176	0.137

Tab. 15: Die mittleren quadratischen Auslenkungen $\langle x^2 \rangle$ und die Hyperfeinparameter des Transmissionsintegrals für in Trehalose getrocknetem MbCO als Funktion der Temperatur (Elektrische Quadrupolaufspaltung EQ, Isomerieverschiebung IS, Linienbreite LBR).

Anhang D: Parameter aus der Anpassung der Mößbauer-Spektren mit dem Brownschen Oszillator-Modell

a) MbCO-Kristalle:

T(K)	EQ (mm/s)	IS(mm/s)	LBR (mm/s)	$\langle x_t^2 \rangle$ (\AA^2)	α_t (10^8 s^{-1})
80	0.371	0.279	0.31	0	0
89	0.374	0.280	0.31	0	0
101	0.375	0.276	0.31	0	0
113	0.377	0.272	0.31	0	0
123	0.383	0.272	0.31	0	0
133	0.375	0.269	0.30	0	0
143	0.382	0.269	0.31	0	0
153	0.380	0.259	0.33	0	0
163	0.388	0.252	0.31	0	0
176	0.393	0.245	0.33	0	0
183	0.397	0.248	0.35	0	0
195	0.391	0.246	0.32	0.002683	0.37
204	0.388	0.248	0.32	0.003986	0.60
213	0.396	0.238	0.33	0.005044	0.90
223	0.398	0.231	0.30	0.010365	1.40
234	0.396	0.234	0.34	0.012706	2.04
243	0.422	0.222	0.34	0.019764	2.75

Tab. 16: Temperaturabhängigkeit der Parameter im Brownschen Oszillator-Modell für MbCO-Kristalle: Elektrische Quadrupolaufspaltung EQ, Isomerieverschiebung IS, Linienbreite von Quelle und Absorber $LBR = (\Gamma_a + \Gamma_s)/2$, mittlere quadratische Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ und Linienverbreiterung α_t .

b) MbCO in Glyzerin:

T(K)	EQ (mm/s)	IS (mm/s)	LBR (mm/s)	$\langle x_t^2 \rangle (\text{\AA}^2)$	$\alpha_t (10^8 \text{ s}^{-1})$
80	0.360	0.274	0.25	0	0
90	0.363	0.272	0.25	0	0
100	0.366	0.270	0.25	0	0
110	0.365	0.268	0.25	0	0
120	0.368	0.266	0.25	0	0
130	0.364	0.264	0.25	0	0
140	0.371	0.261	0.25	0	0
150	0.373	0.259	0.25	0	0
160	0.373	0.254	0.26	0	0
170	0.378	0.251	0.25	0	0
180	0.380	0.248	0.26	0	0
190	0.390	0.244	0.26	0	0
200	0.396	0.243	0.26	0	0
210	0.398	0.232	0.25	0	0
220	0.392	0.226	0.30	0.001192	0.90
230	0.393	0.220	0.35	0.004088	1.60
235	0.396	0.218	0.45	0.006192	2.32
240	0.426	0.213	0.50	0.009242	2.82
245	0.419	0.215	1.00	0.009973	3.08

Tab. 17: Temperaturabhängigkeit der Parameter von MbCO in Glyzerin in dem Modell des Brownschen Oszillators: die elektrische Quadrupolaufspaltung EQ, die Isomerieverschiebung IS, die Linienbreite von Quelle und Absorber $(\Gamma_a + \Gamma_s)/2$, die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x_t^2 \rangle$ und die Linienverbreiterung α_t .

Anhang E: Röntgenstrukturdaten von Mbmet mit eindiffundierter Trehalose-Lösung

a) Datensammlung

Raumgruppe	P2 ₁
Kristallgröße (mm ³)	0.4*0.6*0.2
Gitterkonstanten (Å)	a = 64.65 ± 0.04; b = 31.02 ± 0.02; c = 34.90 ± 0.02
Winkel (°)	β = 105.89
Auflösung (Å)	1.5
Gemessene Reflexe	107207
Unabhängige Reflexe	20839
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	10.4 (4.5) ¹
Vollständigkeit (%)	96.5 (84.8) ¹
Redundanz	5.0 (2.3) ¹
R _{merge} (%)	4.3 (16.5) ¹

Tab. 18: Statistische Daten der Röntgenstrukturaufnahme. Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale, d.h. auf eine Auflösung zwischen 1.57 und 1.50 Å.

b) Verfeinerung

Auflösung (Å)	7.0 – 1.5
Anzahl Reflexe	20539
Reflexe Work/Test	18499/2094
R _{cryst} (%)	19.4
R _{free} (%)	22.4
Standardabweichung:	
Bindungslänge (Å)	0.005
Bindungswinkel (°)	1.2
Koordinatenfehler (Å)	0.18
Anzahl Wasser	99
Anzahl Sulfate	2

Tab. 19: Statistische Daten der Strukturverfeinerung. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die Standardwerte von Engh und Huber (1991). Der mittlere Koordinatenfehler wurde durch einen σ_a -Plot bestimmt (Read, 1986).

Anhang F: Optische Absorptionsspektren von Mbdesoxy, MbCO und Mbmet

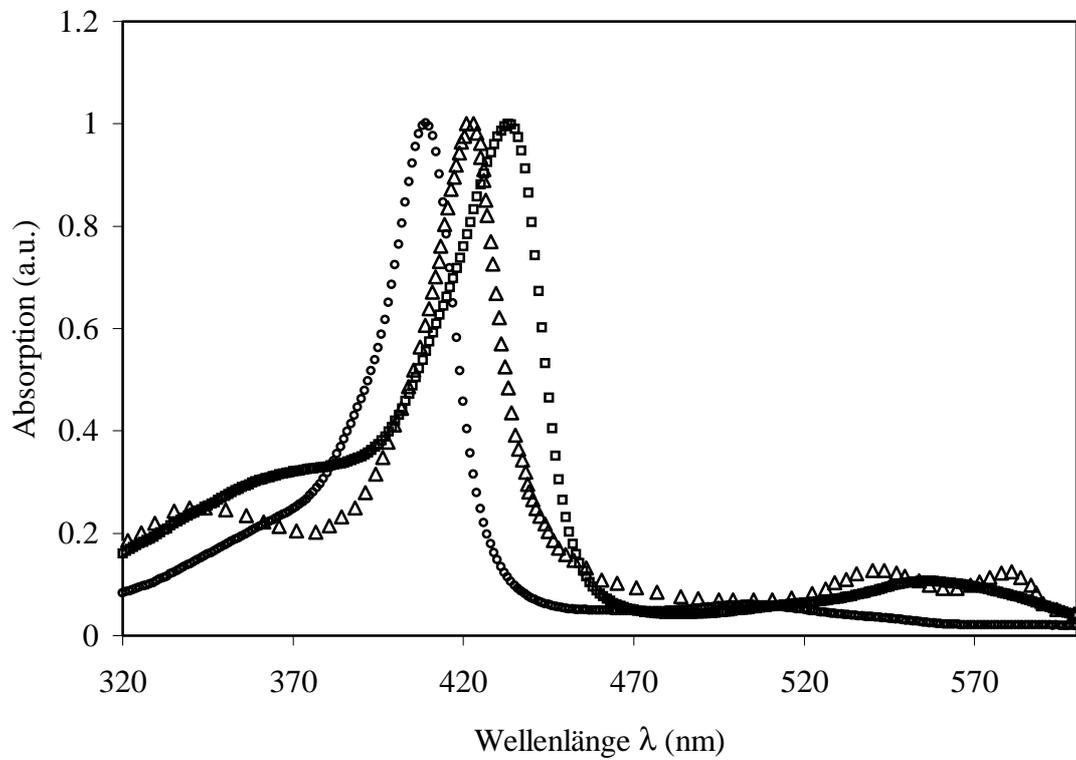


Abb. 50: Optische Absorptionsspektren im Bereich der Soretbande von Mbmet (Kreise), in Trehalose getrocknetem MbCO (Dreiecke) und Mbdesoxy (Quadrate).

Literaturverzeichnis

Angell, C.A., Sare, E.J., *Glass-Forming Composition Regions and Glass Transition Temperatures for Aqueous Electrolyte Solutions*, J. Chem. Phys. 52 (1970) 1058.

Antonini, E., Brunori, M., *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, London (1971).

Austin, R.H., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Gusalus, I.C., *Dynamics of ligand binding to myoglobin*, Biochemistry 14 (1975) 5355-5373.

Agmon, N., Hopfield, J.J., *CO binding to heme proteins: a model for barrier height distributions and slow conformational changes*, J. Chem. Phys. 79 (1983) 2042-2053.

Becker, R., *Theorie der Wärme*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.

Bondarenko, N.F., Zheleznyi, B.V., Osipov, Yu.A., Ostapenko, N.S., *Rheological characteristics of thin wetting films of single-component liquids, as determined by a capillary method*, Colloid Journal of the USSR 39 No.2 (1977) 207-215.

Carpenter, J.F., Crowe, J.H., *An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins*, Biochemistry 28 (1989) 3916-3922.

Chan, C.K., Page, J.B., *Temperature effects in the time correlator theory of resonance raman scattering*, J. Chem. Phys. 79(11) (1983) 5234-5250.

Chan, C.K., Page, J.B., *T≠0K Multimode Modeling of Optical Absorption Spectra and Resonance Raman Profiles*, Chem. Phys. Letters 104(6) (1984) 609-614.

Chandrasekhar, S., Rev. Mod. Phys. 15 (1943), 1-89.

Chang, I., Diplomarbeit Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, *Mößbauerspektroskopie an Myoglobin: Untersuchung der Dynamik von Deoxy-Myoglobin-Kristallen* (1992).

- Chang, I., Hartmann, H., Krupyanskii, Yu., Zharikov, A., Parak, F., *Dielectric relaxation models applied to the dynamics of myoglobin as determined by Mössbauer spectroscopy*, Chem. Phys. 212 (1996) 221-229.
- Cheng, X., Schoenborn, B.P., *Neutron diffraction study of carbonmonoxymyoglobin*, J. Mol. Biol. 220 (1991) 381-399.
- Cohen, M.H., Turnbull, D., J. Chem. Phys. 31 (1959) 1164-1169.
- Cohen, M.H., Grest, G.S., *Liquid-glass transition, a free-volume approach*, Phys. Rev. B 20 (1979) 1077-1098.
- Collman, J.P., Brauman, J.I., Halber, T.R., Suslik, K.S., *Nature of O₂ and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 3333-3337.
- Cordone L., Galajda, P., Vitrano, E., Gassmann, A., Ostermann, A., Parak, F., *A reduction of protein specific motions in CO-ligated myoglobin embedded in a trehalose glass*, Eur. Biophys. J. 27 (1998) 173-176.
- Craig, P.P., Sutin, N., *Mössbauer Effect in Liquids: Influence of Diffusion Broadening*, Phys. Rev. Lett. 11 (1963) 460.
- Crowe, J.H., Clegg, J.S., *Dry Biological Systems*, Academic Press, New York (1978).
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Aurell Wistrom, C., *Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars*, Biochem. J. 242 (1987) 1-10.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., *Überleben ohne Wasser*, Biologie in unserer Zeit 22 (1992), 28-32.
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., *Is Trehalose Special for Preserving Dry Biomaterials?*, Biophys. J. 71 (1996) 2087-2093.
- Cupane, A., Leone, M., Vitrano, E., Cordone, L., Hiltbold, U.R., Winterhalter, K.H., Yu, W., Di Iorio, E.E., *Structure-dynamics-function relationships in asian elephant (Elephas maximus) myoglobin. An optical spectroscopy and flash photolysis study on functionally important motions*, Biophys. J. 65 (1993) 2461-2472.

Cupane, A., Leone, M., Vitrano, E., Cordone, L., *Low temperature optical absorption spectroscopy: an approach to the study of stereodynamic properties of heme proteins*, Eur. Biophys. J. 23 (1995) 385-398.

Cupane, A., Vitrano, E., Ormos, P., Nienhaus, G.U., *Heme geometry in the 10K photoproduct from sperm whale carbonmonoxymyoglobin*, Biophys. Chem. 60 (1996) 111-117.

Danon, J., *Lectures on the Mössbauer Effect*, Gordon and Breach Science Publishers New York, 1968.

Di Pace, A., Cupane, A., Leone, M., Vitrano, E., Cordone, L., *Vibrational coupling, spectral broadening mechanisms and anharmonicity effects in carbonmonoxy heme proteins studied by the temperature dependence of the Soret band lineshape*, Biophys. J. 63 (1992) 475-484.

Dickson, D., Berry, F., *Mössbauer Spectroscopy*, Cambridge University Press, 1986.

Dietrich, S., Fenzl, W., *Correlations in disordered crystals and diffuse scattering of x-rays or neutrons*, Phys. Rev. B39 (1989) 8873-8899.

Doster, W., Bachleitner, A., Dunau, R., Hiebl, M., Lüscher, E., *Thermal properties of water in myoglobin crystals and solutions at subzero temperatures*, Biophys. J., 50 (1986) 213-219.

Drenth, J., *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer Verlag, New York (1994).

Eicher, H., Parak, F., Bade, D., Tejada, J., *Electronic structure of the iron in deoxygenated myoglobin from Mössbauer spectroscopy*, J. de Physique Coll. C6 Suppl. 12 No.35 (1974) 363-366.

Elber, R., Karplus, M., *Multiple conformational states of proteins: a molecular dynamics analysis of myoglobin*, Science 235 (1987) 318-321.

Elber, R., Karplus, M., *Enhanced Sampling in Molecular Dynamics: Use of the Time-Dependent Hartree Approximation for Simulation of Carbon Monoxide Diffusion through Myoglobin*, J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 9161-9175.

Engh, R.A., Huber, R., *Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement*, Acta Cryst. A 47 (1991) 392-400.

Engler, N., Ostermann, A., Gassmann, A., Lamb D.C., Prusakov, V.E., Schott, J., Schweitzer-Stenner, R., Parak, F.G., *Protein dynamics in an intermediate state of myoglobin: Optical absorption, resonance Raman spectroscopy and X-ray structure analysis*, submitted to Biophys. J. (1999)

Franke, M., Dissertation Uni Erlangen, *Konformationszustände in Myoglobin: Mößbauerspektroskopische Untersuchung und modellmäßige Deutung der Reaktionskinetik mit CO* (1992).

Franzen, S., Boxer, S.G., *On the Origin of Heme Absorption Band Shifts and Associated Protein Structural Relaxation in Myoglobin following Flash Photolysis*, J. Biol. Chem. 272 (1997) 9655-9660.

Frauenfelder, H., Petsko, G.A., Tsernoglou, D., *Temperature dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics*, Nature 280 (1979) 558-563.

Frauenfelder, H., Parak, F., Young, R.D., *Conformational substates in proteins*, Annu. Rev. Biophys. Chem. 17 (1988) 451-479.

Goldanskii, V., Herber, R., *Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy*, Academic Press New York, 1968.

Goldanskii, V.I., Krupyanskii, Y.F., Fleurov, V.N., in Protein Structure, (Eds. Austin, R., Buhks, E., Chance, B., De Vault, D., Dutton, P.L., Frauenfelder, H., Goldanskii, V.I.) Springer, Berlin, (1987).

Gonser, U., *Mössbauer Spectroscopy*, Springer Verlag Berlin, 1975.

Green, J.L., Angell, C.A., *Phase Relations and Vitrification in Saccharide-Water Solutions and the Trehalose Anomaly*, J. Phys. Chem. 93 (1989) 2880-2882.

Gregory, R.B., *Protein Hydration and Glass Transition Behaviour*, in "Protein-Solvent Interactions", ed.: R.B. Gregory, Marcel Dekker, New York (1995).

Hagen, S.J., Hofrichter, J., Eaton, W.A., *Protein Reaction Kinetics in a Room-Temperature Glass*, Science 269 (1995) 959-962.

- Hallett, J., Proc. Phys. Soc. 82 (1963) 1046.
- Hartmann, H., Parak, F., Steigemann, W., Petsko, G.A., Ringe Ponzi, D., Frauenfelder, H., *Conformational substates in a protein: structure and dynamics of metmyoglobin at 80 K*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 4967-4971.
- Hu, S., K.M. Smith, and T.G. Spiro, *Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin*, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 12638-12646.
- Huck, J., Bondeau, A., *The viscosity of supercooled water*, Conference record 9th Int. Conf. on Conduction and Breakdown in Dielectric Liquids, IEEE 87CH2403-4 (1987) 245-249.
- Huck, J., Bondeau, A., Noyel, G., Jorat, L., *Transport and Relaxation Phenomena in Highly Viscous Liquids*, IEEE Trans. Electr. Insul. 23 (1988a) 615-625.
- Huck, J., Noyel, G., Jorat, L., *Dielectric Properties of Supercooled Glycerol Water Solutions*, IEEE Transactions Elect. Insul. 23 (1988b) 627-638.
- Iben, I.E.T., Braunstein, D., Doster, W., Frauenfelder, H., Hong, M.K., Johnson, J.B., Luck, S., Ormos, P., Schulte, A., Steinbach, P.J., Xie, A.H., Young, R.D., *Glassy Behaviour of a Protein*, Phys. Rev. Lett. 62 (1989) 1916.
- Johari, G.P., *Intrinsic mobility of molecular glasses*, J. Chem. Phys. 58 (1973) 1766.
- Kachalova, G.S., Popov, A.N., Bartunik, H.D., *A steric mechanism for inhibition of CO binding to heme proteins*, Science 284(5413) (1999) 473-476.
- Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C., Shore, V.C., *Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier Synthesis at 2Å resolution*, Nature 185 (1960) 422-427.
- Kleinert, T., Dissertation TU München, *Blitzphotolysemessungen zum Einfluß des Lösungsmittels auf die CO-Bindungskinetik von Myoglobin und Hämoglobin* (1997).
- Knapp, E.W., Fischer, S.F., Parak, F., *Protein Dynamics from Mössbauer spectra. The temperature dependence*, J. Phys. Chem. 86 (1982) 5042-5047.

Knapp, E.W., Fischer, S.F., Parak, F., *The influence of protein dynamics on Mössbauer spectra*, J. Chem. Phys. 78 (1983) 4701-4711.

Köhler, W., Friedrich, J., Scheer, H., *Conformational barriers in low-temperature proteins and glasses*, Phys. Rev. A 37 (1988) 660.

Kushkuley, B. and S. Stavrov, *Theoretical Study of the Distal-Side Steric and Electrostatic Effects on the Vibrational Characteristics of the FeCO Unit of the Carboxylheme Proteins and Their Models*, Biophys. J. 70 (1996) 1214-1229.

Lamb, D.C., Ostermann, A., Prusakov, V.E., Parak, F.G., *From metmyoglobin to deoxy myoglobin: relaxations of an intermediate state*, Eur. Biophys. J. 27 (1998) 113-125.

Leyser, H., Diplomarbeit Technische Universität München, *Spektroskopie der frequenzabhängigen spezifischen Wärme an unterkühlten wässrigen Lösungen* (1994).

Li, X.Y., R.S. Czernuszewicz, J.R. Kincaid, P. Stein, and T.G. Spiro, *Consistent Porphyrin Force Field. 2. Nickel Octaethylporphyrin Skeletal and Substituent Mode assignment from ¹⁵N, Meso-d₄, and Methylene-d₁₆ Raman and Infrared Isotope shifts*, J. Phys. Chem. 94 (1990) 47-61.

Lichtenegger, H., Doster, W., Kleinert, T., Birk, A., Parak, F., Sepiol, B., Vogl, G., *Heme-solvent coupling: A Mössbauer study of Myoglobin in sucrose*, Biophys. J. 76(1) (1999) 414-422.

Madin, K.A.C., Crowe, J.H., *Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration*, J. Exp. Zool. 193 (1975) 335-342.

Mayo, K.H., Parak, F., Mössbauer, R.L., *Observation of elastic and quasi-elastic nuclear gamma resonance absorption in hemoglobin crystals*, Phys. Lett. 82A (1981) 468-470.

Melchers, B., Knapp, E.W., Parak, F., Cordone, L., Cupane, A., Leone, M., *Structural Fluctuations of Myoglobin from Normal-modes, Mössbauer, Raman and Absorption spectroscopy*, Biophys. J. 70 (1996) 2092-2099.

Nienhaus, G.U., Parak, F., *The Mössbauer effect in glass-forming liquids*, Hyperfine Interact. 90 (1994) 243-264.

Nobbs, C.L., in "Hemes and Hemoproteins", ed.: Chance, B., Estrabrook, R.W., Yonetani, T., Academic Press, New York (1966) 143-147.

Nowik, I., Bauminger, E.R., Cohen, S.G., Ofer, S., *Spectral shapes of Mössbauer absorption and incoherent neutron scattering from harmonically bound nuclei in Brownian motion: Applications to macromolecular systems*, Phys. Rev. A 31A No.4 (1985) 2291-2299.

Ostermann, A., private Mitteilung (1998).

Ostermann, A., Waschipky, R., Parak, F., Nienhaus, G., *Ligand Binding and Conformational Motions in Myoglobin*, submitted to Nature (1999a).

Ostermann, A., Dissertation, Technische Universität München, in Bearbeitung (1999b).

Parak, F., Thomanek, U.F., Bade, D., Wintergerst, B., *The orientation of the electronic field gradient tensor in CO-liganded myoglobin*, Z. Naturforsch. 32c (1977) 507-512.

Parak, F., Frolov, E.N., Mössbauer, R.L., Goldanskii, V.I., *Dynamics of metmyoglobin crystals investigated by nuclear gamma resonance absorption*, J. Mol. Biol. 145 (1981) 825-833.

Parak, F., Knapp, E.W., Kucheida, D., *Protein Dynamics: Mößbauer Spectroscopy on Deoxymyoglobin Crystals*, J. Mol. Biol. 161 (1982) 177-194.

Parak, F., Knapp, E.W., *A consistent picture of protein dynamics*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 7088-7092.

Parak, F., Reinisch, L., *Mössbauer effect in the study of dynamics*, Methods in Enzymology 127 (1986) 196-206.

Parak, F., Ostermann, A., Gassmann, A., Scherk, C., Chong, S.-H., Kidera, A., Go, N., *Biomolecules: Fluctuations and relaxations*, Biological Physics: Third Symposium (ed. Frauenfelder, H., Hummer, G., Garcia, R.), American Institute of Physics (1999) 117-127.

Perutz, M.F., Matthews, F.W., J. Mol. Biol. 21 (1996) 199.

Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., Carpenter, J.F., *Dehydration-induced conformational transitions in protein and their inhibition by stabilizers*, Biophys. J. 65 (1993) 661-671.

Prusakov, V., Stukan, R.A., Davidov, R.M., Gersonde, K., *Non-equilibrium state of a monomeric insect haemoglobin induced by γ -irradiation and detected by Mössbauer spectroscopy*, FEBS Letters 186(2) (1985) 158-162.

Prusakov, V.E., Steyer, J., Parak, F., *Mössbauer spectroscopy on nonequilibrium states of myoglobin: a study of r-t relaxation*, Biophys. J. 68 (1995) 2524-2530.

Rasmussen, D.H., MacKenzie, A.P., Nature 220 (1968) 1317.

Read, R.J., *Improved fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors*, Acta Cryst. A 42 (1986) 140-149.

Scherer, G.W., *Relaxation in Glasses and Composites*, Wiley, New York (1986).

Schmidt, M., Dissertation Technische Universität München, *Röntgenstrukturanalyse der cambialistischen Superoxiddismutase aus Propionibacterium freudenreichii subspec. shermanii* (1996).

Schoffield, P., *Wavelength-Dependent Fluctuations in Classical Fluids*, Proc. Phys. Soc. 88 (1966) 149.

Shaitan, K.V., Rubin, A.B., *Theory of the Mössbauer effect in proteins*, Biophysics 25 No.5 (1980) 809-816.

Singh, G.P., Parak, F., Hunklinger, S., Dransfeld K., *Role of adsorbed water in the dynamics of metmyoglobin*, Phys. Rev. Lett. 47 (1981) 685-688.

Singh, G.P., Schink, H.J., Löhneysen, H.V., Parak, F., Hunklinger, S., *Excitations in Metmyoglobin Crystals at Low Temperatures*, Z. Phys. 55B (1984) 23.

Sonntag, C.v., *The chemical basis of radiation biology*, Taylor & Francis Ltd., London (1987).

Šrajer, V., Schomacker, K.T., Champion, P.M., *Spectral Broadening in Biomolecules*, Phys. Rev. Letters 75 (1986) 1267-1270.

Šrajer, V., Champion, P.M., *Investigations of optical line shapes and kinetic hole burning in myoglobin*, Biochemistry, 30, S.7390-7402, (1991).

Steinbach, P.J., Ansari, A., Berendzen, J., Braunstein, D., Chu K., Cowen, B.R., Ehrenstein, D., Frauenfelder, J., Johnson, J.B., Lamb, D.C., Luck, S., Mourant, J.R., Nienhaus, G.U., Ormos, P., Phillip, R., Xie, A., Young, R.D., *Ligand Binding to Heme Proteins: Connection between Dynamics and Function*, Biochemistry 30 (1991) 3988-4001.

Steyer, J., Diplomarbeit Johannes Gutenberg-Universität Mainz, *Strukturelle Fluktuationen und Relaxationen in Myoglobin* (1993).

Takano, T., J. Mol. Biol. 110 (1977) 537.

Thomanek, U.F., Parak, F., Formanek, S., Kalvius, G.M., *Mössbauer and susceptibility experiments on different compounds of Fe³⁺ - myoglobin*, Biophys. Struc. Mech. 3 (1977) 207-227.

Van Hove, L., *Correlations in space and time and Born approximation scattering in systems of interacting particles*, Phys. Rev. 95 (1954), 249-262.

Wegener, A., *Der Mössbauereffekt und seine Anwendungen in Physik und Chemie*, Hochschultaschenbücher Verlag Berlin, 1965.

Wölfel, E.R., *Theorie und Praxis der Röntgenstrukturanalyse*, Vieweg-Verlag (1987).

Abkürzungsverzeichnis

A		Index für Absorber
A	(mm/s)	Absorptionsfläche unter dem Mößbauer-Spektrum
B _{ex}	(T)	extern angelegtes Magnetfeld
c	(m/s)	Vakuumlichtgeschwindigkeit
c _i	(Å ² /K)	Steigung der <x _{i0} ² >-Werte
D		Diffusionskoeffizient
\bar{d}_i^k		Normalmodenvektor
E	(J)	Energie
EQ	(mm/s)	Elektrische Quadrupolaufspaltung
f		Lamb-Mößbauer-Faktor (allgemein)
f _A		Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers
f _s		Lamb-Mößbauer-Faktor der Quelle
Fe(II)MbH ₂ O		metastabiles Myoglobin: ein Fe(II)-Zustand mit Wasser-Ligandierung
G		Gibbsche Freie Energie
G _s		Greensche Selbstkorrelationsfunktion
h		Index für hochfrequente Moden
H		Hamiltonian
\hbar	(Js)	Plancksches Wirkungsquantum dividiert durch 2π
I	(W/m ²)	Intensität
I		Quantenzahl des Kernspins
IS	(mm/s)	Isomerieverschiebung
k	(cm ⁻¹)	Wellenzahl
l		Index für niederfrequente Moden
LBR	(mm/s)	Linienbreite
m	(kg)	Masse
m	(Å ² /K)	Steigung einer Regressionsgerade
M _I		magnetische Spinquantenzahl des Kernspins (z-Komponente)
Mb		Myoglobin
MbCO		CO-ligandiertes Myoglobin
Mbdesoxy		desoxygeniertes Myoglobin (fünffach ligandiert)

Mbmet		Wasser-ligandiertes Myoglobin
Mboxy		oxygeniertes (Sauerstoff-gebundenes) Myoglobin
MbO ₂		oxygeniertes (Sauerstoff-gebundenes) Myoglobin
n _{Fe}	(cm ⁻²)	Teilchenzahldichte der ⁵⁷ Fe-Kerne
p _t		Wahrscheinlichkeit des Proteins, sich im Übergangszustand aufzuhalten
Q	(cm ²)	Kernquadrupolmoment
Q(E)	(s/mm)	Quellenfunktion (Emissionsspektrum der Mößbauer-Quelle)
q _j	(cm)	generalisierte Ortskoordinate im Grundzustand
Q _j	(cm)	generalisierte Ortskoordinate im angeregten Zustand
R		Faktor zur Untergrundkorrektur (Anteil der Quanten im Energiefenster des Mößbauer-Übergangs)
R _{ct} , R _{tc}		Sprungrate zwischen Konformationssub- und Übergangszustand bzw. umgekehrt
R _j		quadratische Kopplungskonstante der optischen Absorptionsspektroskopie
r	(Å)	Kugelradius
s		Index für Quelle
S	(J/K)	Entropie
S _j		lineare Kopplungskonstante der optischen Absorptionsspektroskopie
t		Index für proteinspezifische Bewegung
t	(s)	Zeit
t _A		effektive Dicke (t _A ≡ σ ₀ n _{Fe} f _A)
T(v)		Transmission
T _C	(K)	Grenztemperatur, oberhalb derer proteinspezifische Dynamik im Mößbauer-Spektrum sichtbar wird
T _G	(K)	Glastemperatur
v	(mm/s)	Geschwindigkeit
V _{zz}		elektrischer Feldgradient
v/v		Volumenverhältnis
<x ² >	(Å ²)	mittlere quadratische Auslenkung (quantenmechanischer Erwartungswert)
<x _v ² >	(Å ²)	Beitrag harmonischer Festkörperschwingungen zur mittleren quadratischen Auslenkung

$\langle x_t^2 \rangle$ (\AA^2)	Beitrag der proteinspezifischen Dynamik zur mittleren quadratischen Auslenkung
$\langle x_{t_0}^2 \rangle$ (\AA^2)	linear mit der Temperatur steigende mittlere quadratische Auslenkung der proteinspezifischen Bewegung ($\langle x_{t_0}^2 \rangle = \text{const} \cdot T$)
Z	Kernladungszahl
Z(v)	Zählrate in Abhängigkeit von der Antriebsgeschwindigkeit
α_t (s^{-1})	Linienverbreiterung im Brownschen Oszillator-Modell
α_j	Fourier-Koeffizienten
β_t (s^{-1})	Dämpfungskonstante im Brownschen Oszillator-Modell
δ	Phase
δ	Deltafunktion
δ (mm/s)	Isomerieverschiebung (inklusive quadratischer Dopplereffekt)
ΔE_Q (mm/s)	Elektrische Quadrupolaufspaltung
ε (J)	Enthalpie
Γ_{nat} (mm/s)	natürliche Linienbreite
η (Poise)	Viskosität
η_t (Poise)	Viskosität der proteinspezifischen Bewegung im Brownschen Oszillator-Modell
η (J)	Schwingungsgrundzustand
η	Asymmetrieparameter
λ (nm)	Wellenlänge
μ (m^{-1})	Absorptionskoeffizient
ν (cm^{-1})	Frequenz
σ (cm^{-1})	Gaußverbreiterung der Soret-Bande
σ_A (barn)	Absorptionswirkungsquerschnitt
σ_0 (barn)	Wirkungsquerschnitt für Resonanzabsorption von 14.4 keV-Strahlung durch ^{57}Fe
τ (s)	mittlere Lebensdauer
ω (s^{-1})	Schwingungsfrequenz im Brownschen Oszillator-Modell
Ψ ($\text{m}^{-3/2}$)	Wellenfunktion

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Parak für die Überlassung des sehr interessanten Themas. Sein Interesse am Fortschritt der Arbeit, seine Begeisterungsfähigkeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Andreas Ostermann, der die Röntgenstruktur des metastabilen Zustands von Myoglobin sowie der von Wasser-ligandiertem Myoglobin zur Verfügung gestellt hat. Seine Einweisung in die Röntgenkristallographie und seine Unterstützung bei den Probenpräparationen und biochemischen Fragen waren für mich sehr wertvoll.

Niklas Engler danke ich für die optischen Absorptionsmessungen des metastabilen Zustands von Myoglobin und die gute Zusammenarbeit. Bei Herrn Professor Schweitzer-Stenner und Joachim Schott möchte ich mich für die Resonanz-Raman-Messungen bedanken, die entscheidend zur Auswertung der optischen Absorptionsspektren beigetragen haben.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima. Die Zeit mit meinen Zimmerkollegen Dr. Christoph Scherk, Andreas Dilg und Matthias Mentler war großartig. Klaus Grantner hat dabei durch seine gelegentlichen Besuche in unserem Zimmer maßgeblich zu der guten Stimmung beigetragen.

Meine Familie und ganz besonders meine Eltern waren mir stets eine große Hilfe.

Bei Martin bedanke ich mich für seine unschätzbare Geduld, sein Verständnis und seine Unterstützung während dieser Zeit.