

Technische Universität München  
Physik-Department E17

**Dynamik des Myoglobins**  
**– Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung und nukleare**  
**Vorwärtsstreuung von Synchrotron-Strahlung**

Christian Zach

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Fischer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak
2. Univ.-Prof. Dr. F. E. Wagner

Die Dissertation wurde am 16.10.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 14.11.2001 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	3
2	Theorie .....	9
2.1	Mößbauer-Effekt .....	9
2.2	Nukleare Vorwärtsstreuung.....	12
2.3	Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung (RSMR).....	17
2.4	Streuung von $\gamma$ -Strahlung an Materie.....	19
2.4.1	Festkörper.....	23
2.4.2	Flüssigkeiten.....	33
2.5	Bewegungs-Modelle für die Dynamik in Myoglobin .....	35
2.5.1	Normal-Moden.....	36
2.5.2	TLS-Modell.....	38
2.5.3	Akustische Phononen .....	40
2.5.4	Brown'scher Oszillator .....	43
2.5.5	Diffusion.....	45
3	Meßapparaturen.....	48
3.1	Nukleare Vorwärtsstreuung.....	48
3.2	Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung .....	51
4	Probenpräparation .....	61
5	Auswertung und Ergebnisse.....	64
5.1	Nukleare Vorwärtsstreuung an Deoxy-Myoglobin.....	65
5.2	Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung an Pferde-Myoglobin.....	69
5.2.1	Modell zur Beschreibung der mittleren quadratischen Auslenkungen der Atome im Myoglobinmolekül.....	73
6	Diskussion .....	81
6.1	Nukleare Vorwärtsstreuung.....	81
6.1.1	Inhomogenitätsverbreiterung .....	82
6.1.2	Dynamik des Eisenatoms in Myoglobin .....	84
6.2	Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung .....	88
6.2.1	Probenzusammensetzung .....	89
6.2.2	Struktur der Myoglobinkristalle.....	93
6.2.3	Korrelationen in den Auslenkungen.....	98
6.2.4	Dynamik des Myoglobins .....	100

6.2.5	Dynamik des Puffers .....	110
7	Zusammenfassung.....	114
	Anhang .....	116
	Literaturverzeichnis.....	120

# 1 Einleitung

Die Grundlage des Lebens ist die Photosynthese, die Umsetzung der Energie des Sonnenlichts in chemische Energie. In diesen Prozeß sind einige Proteine involviert, die die Photonen sammeln, absorbieren und über eine Kaskade, die die sofortige Reemission des absorbierten Lichtes verhindert, die Energie zur Ladungstrennung benutzen. Der Ladungsgradient ist unter Mithilfe von Proteinen die treibende Kraft für die Produktion von energiereichen chemischen Verbindungen. Im Photosynthesezyklus sind bereits die meisten Funktionen der Proteine, die das Leben ermöglichen, enthalten. Proteine sind Katalysatoren von chemischen Prozessen, sie transportieren bzw. speichern Energie oder kleinere Moleküle und erfüllen stabilisierende oder motorische Aufgaben. Hierfür benötigen sie eine definierte Struktur, die im Prinzip einfach aufgebaut ist und einerseits die nötige Stabilität liefert, andererseits aber flexibel genug ist, die verschiedenen Aufgaben zu erfüllen.

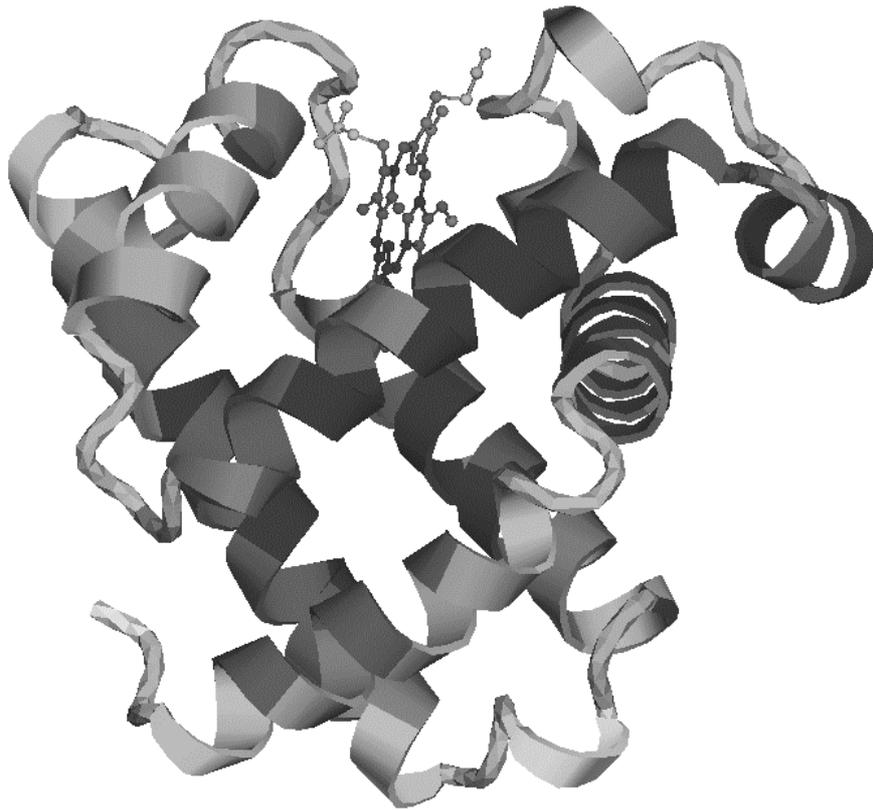
Aufgebaut sind die Proteine aus einer oder mehreren unverzweigten Ketten bestehend aus 20 verschiedenen Aminosäuren. Diese Aminosäureketten werden von einer Abfolge der drei Atome N-C<sub>α</sub>-C, der sogenannten Rückgrat-Atome, gebildet. Die Aminosäurereste, die sich in Größe, Ladung und Hydrophobie unterscheiden, sind am C<sub>α</sub>-Atom gebunden. Die Struktur der Proteine wird in vier aufeinander aufbauenden Stufen beschrieben: als Primärstruktur bezeichnet man die Abfolge der verschiedenen Aminosäuren in der Kette. Die Sekundärstruktur oder die Sekundärstrukturelemente sind häufig wiederkehrende Motive in der dreidimensionalen Proteinstruktur, wie z.B. die  $\alpha$ -Helizes oder die  $\beta$ -Faltblätter. Die Tertiärstruktur schließlich stellt die komplette dreidimensionale Struktur der Aminosäurekette dar, die sich aus den Sekundärstrukturelementen und den verbleibenden, nicht in die Sekundärstrukturelemente involvierten Aminosäuren zusammensetzt. Einige Proteine bestehen oft aus mehreren Untereinheiten, die jeweils einer Aminosäurekette entsprechen. Dies wird als Quartärstruktur bezeichnet. Darüberhinaus können in die Proteinmatrix Metallzentren oder prosthetische Gruppen eingebunden sein, die dann in der Regel das Reaktionszentrum für die Funktion des Proteins darstellen.

Trotz des einfachen Aufbaus aus nur 20 verschiedenen Aminosäuren kann die Tertiärstruktur der Proteine aus der Aminosäuresequenz nicht vorhergesagt werden. In natürlicher Umgebung allerdings läuft die Faltung des Proteins aus dem entfalteten Zustand in die

korrekte Struktur spontan ab. Bestimmend für die Struktur sind die Wasserstoffbrückenbindungen, die elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminosäuren, die Van der Waals-Kräfte und die hydrophoben Wechselwirkungen der Seitenketten mit dem umgebenden Lösungsmittel.

Als Standardmethode zur Strukturbestimmung hat sich die Röntgenstrukturanalyse etabliert. Diese haben erstmals Kendrew et al. (1960) erfolgreich an Pottwal-Myoglobin durchgeführt. Neben der Röntgenstreuung wird nun auch vermehrt die kohärente Streuung von termischen Neutronen angewendet. Für kleine Proteine ist auch eine Strukturbestimmung über eine korrelierte Abstandsmessung zwischen verschiedenen Seitenketten- und Rückgratatomen mit der Kernmagnetischen Resonanz-Methode (NMR) möglich. Zur genaueren Untersuchung der Umgebung der Metallzentren in den Proteinen bieten sich EXAFS-Messungen (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) an. Mit diesen können Abstandsbestimmungen der nächsten Nachbaratome vorgenommen werden. Ist das Metallzentrum ein Mößbauer-aktiver Kern, kann mit der Mößbauer-Absorption und der nuklearen Vorwärtsstreuung die elektronische Struktur dieses Kernes erschlossen werden.

Das Myoglobinmolekül hat sich zum Standarduntersuchungsobjekt in der Biophysik entwickelt. Es ist ein relativ kleines Molekül bestehend aus einer einzelnen Kette von 153 Aminosäuren. Seine Struktur wird von 8  $\alpha$ -Helizes dominiert. In die Struktur ist ein Protoporphyrin IX Ring mit einem Eisenatom als aktivem Zentrum eingelagert. Myoglobin ist ein Speicher- und Transportprotein für den Sauerstoff im Muskel von Säugetieren. Der Sauerstoff bindet an der sechsten Koordinationstelle des Eisens. Die anderen fünf Koordinationstellen sind mit vier Stickstoffatomen des Protoporphyrins IX und einem Stickstoffatom des Histidins 93, der 93sten Aminosäure in der Sequenz des Myoglobins, besetzt. Anstelle des O<sub>2</sub> (Oxy-Myoglobin) kann an das Eisenatom z.B. ein Wassermolekül (Met-Myoglobin) oder ein CO-Molekül (CO-Myoglobin) gebunden sein. Ist das Eisenatom nur 5-fach ligandiert, d.h. die sechste Koordinationstelle ist unbesetzt, spricht man von Deoxy-Myoglobin. In Abb. 1 ist das Strukturmodell des Pottwal-Myoglobins mit seinen Sekundärstrukturelementen dargestellt. Die Farbgebung entspricht den mittleren quadratischen Auslenkungen der Atome aus ihrer Gleichgewichtslage: je heller die Farbe desto größer sind die Auslenkungen.



**Abb. 1:** Strukturmodell des Pottwal-Myoglobins aus Chong et al. (2001). Zu sehen sind die Proteinrückgratkatome, symbolisiert durch ihre Sekundärstrukturelemente, und die Hämebene als Ball- und Stab-Modell. Die Graustufen stellen die mittlere quadratische Auslenkung der Atome aus ihrer Mittellage dar: je heller die Farbe, desto größer sind die Auslenkungen.

Alle erwähnten Meßmethoden liefern einen Ensemblemittelwert der Strukturen der sich in der Probe befindenden Proteinmoleküle. Im Fall des Myoglobins ergeben sich unterschiedliche Konformationen z.B. durch verschiedene Liganden, die am Häm-Eisen, dem aktiven Zentrum, gebunden sind. Eine Mischung verschiedener Konformationen in der Probe können bei der Probenpräparation vermieden werden. Allerdings existieren auch für eine einzige Konformation mehrere Strukturen, die sich kaum voneinander unterscheiden: die Konformationssubzustände. Das Modell der Konformationssubzustände wurde von Austin et al. (1975) zur Erklärung der Rückbindungskinetik des CO-Liganden an das aktive Zentrum von Myoglobin nach einer Blitzlicht-Photolyse entwickelt. Für die Tertiärstruktur existieren in einer Energielandschaft mehrere lokale Minima. Bei niedrigen Temperaturen ist ein Molekül in einem solchen Minimum gefangen. Ab einer bestimmten Temperatur sind Übergänge zwischen den einzelnen Minima möglich, die mit geringfügigen strukturellen Änderungen einhergehen. Die Konformationssubzustände sind hierarchisch aufgebaut. Für das CO-ligandierte Myoglobin existieren bei Raumtemperatur drei taxonomische Subzustände, die durch ihre unterschiedlichen Absorptionsspektren charakterisiert sind

(Young et al. 1991). Jeder dieser Konformationszustände enthält wiederum eine Reihe weiterer Subzustände, zwischen denen ab einer Temperatur von etwa 200 K Übergänge beobachtet werden, wie z.B. mit optischer Spektroskopie (Austin et al. 1975; Ansari et al. 1985) oder Mößbauer-Spektroskopie (Parak und Formanek 1971; Parak et al. 1982). Mittels dem spektroskopischen Loch-Brennen konnte eine weitere Hierarchiestufe von Konformationszuständen mit Barrierenhöhen zwischen 2 K und 4 K nachgewiesen werden (Fritsch et al. 1996). Das Vorhandensein von Konformationszuständen ist keineswegs nur für Myoglobin charakteristisch, sondern kann auch bei anderen Proteinen beobachtet werden. Es scheint sich demnach um eine allgemeine Eigenschaft der Proteine zu handeln.

Ein prominentes Beispiel dafür, wie wichtig die definierte Struktur der Proteine für ihre Funktion ist, sind die Prionen, die durch den BSE-Skandal in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses gelangt sind. Im gesunden Organismus sind nur Prionen in der richtigen Konformation vorhanden. In kranken Organismen dagegen befinden sich einige falsch gefaltete Prionen, die wahrscheinlich die strukturellen Umlagerungen der gesunden Prionen in die krankhafte Struktur erzwingen und die Nerven im Gehirn schädigen können.

Mit den Konformationszuständen eng verknüpft sind die dynamischen Eigenschaften der Proteine; d.h. das von der Festkörperdynamik abweichende Verhalten der Proteine hat die Entwicklung des Modells der Konformationszustände überhaupt erst bedingt. Unterhalb der dynamischen Übergangstemperatur von ca. 200 K ist das Protein in einem Konformationszustand gefangen. Die mittleren quadratischen Auslenkungen der Proteinatome von ihrer Gleichgewichtslage nehmen im klassischen Limit linear mit der Temperatur zu. Dies entspricht der zunehmenden Besetzungswahrscheinlichkeit der akustischen und optischen Phononen in der Probe. Oberhalb von etwa 200 K sind Übergänge zwischen den Konformationszuständen möglich. Als Folge davon steigen die mittleren quadratischen Fluktuationen der Atome stärker an. Ein Abweichen von der linearen Temperaturabhängigkeit ist zu beobachten (Parak et al. 1982). Mit dem Einsetzen der proteinspezifischen Dynamik beginnt die Funktionsfähigkeit des Proteins (Parak et al. 1980; Garbers et al. 1998). Dies läßt auf einen Zusammenhang zwischen Dynamik und Funktion schließen. Im Fall des Myoglobins existiert ein weiterer Hinweis darauf, daß die Proteindynamik für die Funktion essentiell ist. Der direkte Weg für einen Liganden vom Lösungsmittel zur im Inneren des Proteins gelegenen Bindungsstelle ist in der

Gleichgewichtsstruktur sterisch gehindert. Ohne die Flexibilität des Myoglobinmoleküls ist demnach eine Bindung des Liganden unmöglich.

Die Messung der Dynamik ist mit der Röntgenstrukturanalyse nur bedingt möglich. Wegen der fehlenden Energieauflösung kann nur die Summe aus den statischen und dynamischen Auslenkungen der Atome aus ihrer Mittellage bestimmt werden. Indirekt können aber mit temperaturabhängigen Meßreihen einige Eigenschaften aufgeklärt werden. Direktere Methoden zur Auswertung der Proteindynamik sind die Mößbauer-Spektroskopie, die optische Spektroskopie, die Raman-Spektroskopie und die EXAFS-Messungen. Diese Verfahren sind allerdings nicht auf das gesamte Protein sensitiv, sondern nur auf einen bestimmten Bereich. Bei der Mößbauer-Spektroskopie ist dies der Mößbauer-Kern, bei der optischen und der Resonanz-Raman-Spektroskopie der Chromophor – das ist für das Myoglobin die Hämebene – und bei den EXAFS-Messungen die nächste Umgebung des untersuchten Metallzentrums. Detektiert werden demnach nur diejenigen dynamischen Eigenschaften, die an den jeweiligen Marker ankoppeln.

Die Dynamik des gesamten Proteins läßt sich mit der inelastischen Neutronenstreuung untersuchen. Hierbei dominiert wegen ihrer großen inkohärenten Streulänge die inkohärente Streuung an den Wasserstoffatomen. Diese folgen zwar auf Grund ihres geringen Gewichts den Bewegungen der Rückgrat- und Seitenkettenatome, vollführen aber auch zusätzliche Schwingungen, die unter Umständen die gleiche Größenordnung wie die Dynamik der schwereren Atome besitzen und diese damit überdecken. Allerdings können mit dieser Methode die Wasserstoffatome des Puffers durch Deuterieren maskiert werden, so daß nur noch das Protein sichtbar bleibt.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist die Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung. Diese Methode kombiniert die Vorteile der Röntgenstrukturanalyse mit denen der Mößbauer-Spektroskopie. Die Streuung der  $\gamma$ -Strahlung erfolgt kohärent an den Elektronen der Probe. Damit kann die Streuung an Wasserstoffatomen gegenüber der Streuung an den schwereren Atomen vernachlässigt werden. Die Kohärenz bedingt die Empfindlichkeit dieser Meßmethode auf die Positionen der Atome und die Energieauflösung des Mößbauer-Effekts ermöglicht die Beobachtung der Dynamik.

Neben experimentellen Untersuchungen zur Proteindynamik sind in den letzten Jahren vermehrt theoretische Berechnungen durchgeführt worden. Anhand der experimentell bestimmten dreidimensionalen Proteinstruktur kann das dynamische Verhalten sowohl mit Molekulardynamiksimulationen als auch mit Normal-Moden-Analysen näher untersucht werden. Die Normal-Moden-Analyse liefert die harmonischen Schwingungen der Atome im Gleichgewichtszustand des Proteins. Mit Molekulardynamiksimulationen wird dagegen auch die Störung des Gleichgewichtszustandes berechnet.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Proteindynamik am Beispiel des Myoglobins mit der nuklearen Vorwärtsstreuung und der Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung temperaturabhängig gemessen. Die nukleare Vorwärtsstreuung liefert Informationen über alle Bewegungsmoden, die an das Eisenatom ankoppeln, die Rayleigh-Streuung die Dynamik des gesamten Proteins. Die gewonnenen Meßdaten werden im Folgenden unter Verwendung der theoretischen Vorhersagen einer Normal-Moden-Analyse interpretiert.

## 2 Theorie

### 2.1 Mößbauer-Effekt

Die Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist der Mößbauer-Effekt. Darum sollen zunächst die Besonderheiten der Mößbauer-Spektroskopie kurz erläutert werden.

Ein Atom-Kern kann durch Absorption von Gamma-Strahlung von seinem Grundzustand der Energie  $E_g$  in einen angeregten Zustand der Energie  $E_a$  übergehen oder umgekehrt durch Aussenden von Gamma-Strahlen spontan in den Grundzustand zerfallen. In einem Ensemble von angeregten Kernen nimmt die ausgesendete Strahlung und damit die Anzahl der sich im angeregten Zustand befindenden Kerne exponentiell mit der Zeit ab. Mit der mittleren Lebensdauer  $\tau_N$  des angeregten Zustandes ist über die Heisenberg'sche Unschärferelation die Energieunschärfe  $\Gamma$  des angeregten Zustandes verknüpft:  $\tau_N \Gamma = \hbar$ . Ein zerfallender Kern sendet also einen mit der Zeit exponentiell abnehmenden Wellenzug der Frequenz  $\omega_s = \hbar^{-1}(E_a - E_g)$  aus. Auf Grund der Energie- und Impulserhaltung muß der emittierende Kern den Photonimpuls  $\hbar k$  aufnehmen und erfährt dadurch einen Rückstoß. Die Energie des emittierten Photons ist deshalb

$$\begin{aligned} E_\gamma &= E_a - E_g - E_R \\ &= \hbar\omega_s - \frac{\hbar^2 k^2}{2M}, \end{aligned} \quad (1)$$

wobei  $M$  die Masse des emittierenden Kerns ist. Für einen freien Mößbauer-Kern ist die Rückstoßenergie  $E_R$  um ein Vielfaches größer als die Energieunschärfe des angeregten Zustandes, so daß ein einmal emittiertes  $\gamma$ -Quant nicht wieder resonant absorbiert werden kann. Ist der Kern dagegen in einem Festkörper eingebunden, so kann dieser den Rückstoß aufnehmen. Die Rückstoßenergie wird nun auf Grund der erhöhten Masse vernachlässigbar klein. Mit einer Wahrscheinlichkeit  $f_s$ , die als Lamb-Mößbauer-Faktor bezeichnet wird, kann in diesem Fall das  $\gamma$ -Quant ohne Energieverlust emittiert werden. Analog dazu verläuft die resonante Absorption (Mößbauer 1958, 1959). Drückt man der Einfachheit halber die

Energieunschärfe  $\Gamma$  in Einheiten von  $\hbar$  aus und berücksichtigt, daß die Intensität das Quadrat der Wellenfunktion ist, erhält man für die abgestrahlte Intensität eine Lorentz-Linie der Breite  $\Gamma$ , die um die Frequenz  $\omega_s$  zentriert ist (Singwi und Sjölander 1960b).

$$S(\omega) = \frac{f_s}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{i\omega_s t} e^{-\frac{\Gamma}{2}|t|} e^{-i\omega t} dt \quad (2)$$

$$= \frac{f_s \frac{\Gamma}{2\pi}}{(\omega - \omega_s)^2 + \left(\frac{\Gamma}{2}\right)^2}$$

Für eine genauere Betrachtung des Lamb-Mößbauer-Faktors muß die zeitabhängige Ortsänderung des Mößbauer-Kerns während der Absorption berücksichtigt werden. Dazu sei hier auf Kapitel 2.5 verwiesen.

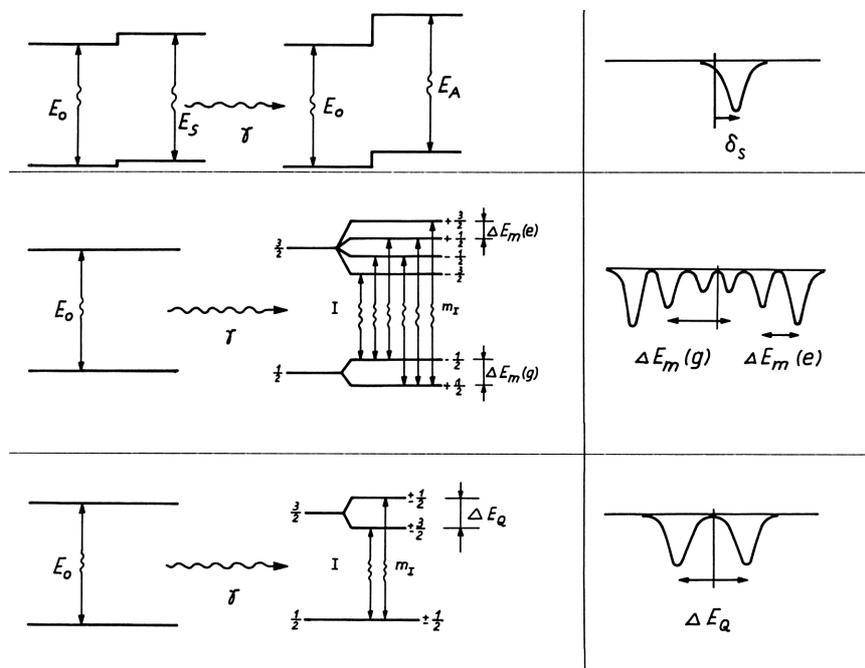
Zur Energievariation der Mößbauer-Strahlung wird in der Mößbauer-Spektroskopie der Doppler-Effekt ausgenutzt. Dazu wird die Quelle gegenüber dem Absorber bewegt und die transmittierte Strahlung in Abhängigkeit von der Doppler-Geschwindigkeit aufgezeichnet. Für jede Doppler-Geschwindigkeit muß also die Faltung des Quellspektrums mit der Absorberfunktion berechnet werden. Faßt man den Lamb-Mößbauer-Faktor des Absorbers  $f_a$ , die Flächendichte der Mößbauer-Kerne im Absorber  $n_{Fe}$  und den maximalen resonanten Absorptionswirkungsquerschnitt  $\sigma_0$  in der effektiven Dicke des Absorbers  $t_a = \sigma_0 n_{Fe} f_a$  zusammen und vernachlässigt die elektronische Absorption, erhält man für die Transmission in Abhängigkeit von der Relativgeschwindigkeit  $v$  zwischen Quelle und Absorber:

$$T(v) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{f_s \frac{\Gamma_s}{2\pi}}{(\omega - \omega_s (1 + \frac{v}{c}))^2 + \left(\frac{\Gamma_s}{2}\right)^2} \exp\left\{ -\frac{t_a \left(\frac{\Gamma_a}{2}\right)^2}{(\omega - \omega_a)^2 + \left(\frac{\Gamma_a}{2}\right)^2} \right\} d\omega \quad (3)$$

Die Indizes  $s$  und  $a$  stehen für Quelle bzw. Absorber, deren Resonanzenergien und Linienbreiten nicht gleich sein müssen. Der Faktor  $\frac{v}{c}$  gibt die Energieverschiebung durch den Dopplereffekt erster Ordnung wieder, wobei  $c$  die Lichtgeschwindigkeit bezeichnet. Der Exponent in Gl. ( 3 ) ist der Wirkungsquerschnitt für resonante Absorption  $\sigma_a$  (Breit und Wigner 1936; Lamb 1939) multipliziert mit der Flächendichte der Mößbauer-Kerne.

$$\sigma_a = \sigma_0 f_a \frac{\left(\frac{\Gamma}{2}\right)^2}{(\omega - \omega_R)^2 + \left(\frac{\Gamma}{2}\right)^2} \quad (4)$$

Die Energieauflösung des Mößbauer-Effekts ist so gut, daß die Hyperfeinwechselwirkungen des Kerns mit seiner Umgebung aufgelöst werden können. In einer Multipolentwicklung des Hamilton-Operators für den Mößbauer-Übergang unterscheidet man die Isomerieverschiebung, die magnetische Dipolwechselwirkung und die elektrische Quadrupolaufspaltung (vgl. Abb. 2). Als Isomerieverschiebung wird die Wechselwirkung des ausgedehnten Kernes mit der Ladung der Elektronen am Kernort bezeichnet. Durch diese werden die Energieniveaus des Grund- und des angeregten Zustandes verschoben. Die elektrische Quadrupolaufspaltung beruht auf der Wechselwirkung des Kernquadrupolmoments mit dem elektrischen Feldgradienten. Die Energieniveaus spalten nach dem Betrag des Kernspins auf. Durch die magnetische Dipolwechselwirkung wird die Entartung der Kernenergieniveaus in den magnetischen Quantenzahlen vollständig aufgehoben. Diese wird durch die Wechselwirkung des magnetischen Moments des Kerns mit dem umgebenden Magnetfeld verursacht, also durch den Kern-Zeemann-Effekt. Die Hyperfeinwechselwirkungen ändern die Anzahl der Resonanzlinien und die Linienlage im



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Verschiebung bzw. Aufspaltung der Energieniveaus durch die Hyperfeinwechselwirkungen (linke Spalte) und deren Auswirkungen auf die Mößbauer-Spektren (rechte Spalte) aus Gonser (1975). Von oben nach unten: Isomerieverschiebung, magnetische Hyperfeinwechselwirkung und elektrische Quadrupolaufspaltung.

Mößbauer-Spektrum, aber nicht die Linien-Form. Ein detaillierter Überblick über die Mößbauer-Spektroskopie ist zum Beispiel in Wegener (1965) oder Gonser (1975) zu finden.

## 2.2 Nukleare Vorwärtsstreuung

Die nukleare Vorwärtsstreuung ist eine komplementäre Methode zur Mößbauer-Absorptionsmessung. Hierbei wird die Zeitabhängigkeit des Zerfalls des angeregten Zustandes der Mößbauer-Isotope gemessen. Derartige Messungen sind durch die Entwicklung des Synchrotrons möglich geworden. Durch die gepulste Strahlung eines Synchrotrons werden die Mößbauer-Atome in der Probe zu einem definierten Zeitpunkt angeregt. Zwischen den Synchrotronpulsen ist dann die zeitabhängige Messung des Zerfalls der Kerne möglich. Typischerweise erfolgen pro Sekunde über  $10^6$  Synchrotronpulse, so daß bei Zählraten von wenigen 100 Hz in den verzögerten Quanten eine Mehrfachanregung der Probe praktisch ausgeschlossen werden kann. Durch die Absorption entsteht in der Probe eine quantenmechanisch delokalisierte Anregung, da bei gleichen Isotopen in der Probe nicht unterschieden werden kann, welcher Mößbauer-Kern angeregt wurde. Ungeachtet des Ordnungsgrads in der Probe erfolgt der Zerfall des delokalisierten angeregten Zustandes in Vorwärtsrichtung kohärent. Wird dagegen bei der Absorption oder Emission des  $\gamma$ -Quants in der Probe ein Phonon erzeugt bzw. vernichtet, dann wird die Kohärenz zerstört, da die Phononerzeugung bzw. -vernichtung an einem bestimmten Mößbauer-Kern stattfindet. Als Folge davon ist die Vorwärtsstreuung nicht mehr die bevorzugte Streurichtung, so daß die Emission in alle Raumrichtungen erfolgt und somit gegenüber dem kohärenten Zerfall in Transmissionsrichtung nicht mehr detektierbar ist. Aus quantenmechanischen Störungsrechnungen ergibt sich für die nukleare Vorwärtsstreuung an einem freien Kern die komplexe Streuamplitude (Trammell 1962; Champeney 1979)

$$f_N(\omega) = -\frac{k}{4\pi} \sigma_0 f_a \frac{\frac{\Gamma}{2}}{(\omega - \omega_R) - i \frac{\Gamma}{2}} \quad (5)$$

Die Symbole in Gl. ( 5 ) haben dieselbe Bedeutung wie im vorherigen Kapitel über die Mößbauer-Absorption. Mit Hilfe des optischen Theorems

$$\sigma_a = -\frac{4\pi}{k} \text{Im}(f_N), \quad (6)$$

das den Imaginärteil der Vorwärtsstreuamplitude mit dem Wirkungsquerschnitt für resonante Absorption verknüpft, gelangt man zum Ergebnis aus Gl. (4). Die weitere theoretische Behandlung der nuklearen Vorwärtsstreuung kann klassisch vorgenommen werden. Unter Berücksichtigung der zeitlichen und örtlichen Kohärenz der Vorwärtsstreuung – die Kohärenzlänge beträgt auf Grund der Lebensdauer des Mößbauer-Übergangs beim  $^{57}\text{Fe}$  etwa 30 m – läßt sich für eine Probe der Dicke  $d$  der komplexe Brechungsindex (van Bürck et al. 1992)

$$n(\omega) = 1 - \frac{t_a}{2kd} \frac{\frac{\Gamma}{2}}{(\omega - \omega_R) - i\frac{\Gamma}{2}} \quad (7)$$

definieren.  $t_a$  bezeichnet wie bei der Mößbauer-Absorption die effektive Dicke der Probe. Mit diesem ergibt sich die Amplitude des durch die Probe transmittierten magnetischen Feldes für jede Frequenz  $\omega$  in Abhängigkeit des eingestrahnten Feldes  $B_{in}$  zu

$$B_{tr}(\omega) = B_{in}(\omega) e^{-in(\omega)kd}. \quad (8)$$

Die Zeitabhängigkeit der in Vorwärtsrichtung gestreuten Intensität  $I(t)$  erhält man durch eine Fourier-Transformation der Streuamplitude vom Energie- in den Zeitraum und durch eine anschließende Quadratur der Streuamplitude.

$$B_{tr}(t) = \int B_{tr}(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (9)$$

$$I(t) = B_{tr}(t) \cdot B_{tr}^*(t) \quad (10)$$

Obwohl die Synchrotronstrahlung monochromatisiert wird, ist die energetische Breite des Synchrotronpulses um bis zu sechs Größenordnungen breiter als die Energieschärfe des Mößbauer-Übergangs. Für die anzuregenden Resonanzen entspricht der Puls mit einer typischen Dauer von etwa 100 ps praktisch weißer Strahlung. In der Fourier-Transformation kann deshalb ohne Einschränkungen die einfallende Strahlung über den gesamten Frequenzbereich als konstant angenommen werden. Der komplexe Brechungsindex geht

außerhalb der Resonanzen schnell gegen den Wert 1 und damit die transmittierte Strahlung gegen einen konstanten Wert, der nach der Fourier-Transformation nur Intensität bei der Zeit  $t=0$  liefert. Bei den interessierenden Zeiten von  $t > 0$  wirkt sich die Erweiterung der anregenden Strahlung auf den gesamten Frequenzbereich nicht aus.

Die Berechnung der zeitabhängigen vorwärts gestreuten Intensität ist nur in Spezialfällen analytisch möglich. Im Allgemeinen muß die Auswertung der Fourier-Transformation numerisch durchgeführt werden. Im Folgenden sollen kurz die Besonderheiten im Zeitverhalten der nuklearen Vorwärtsstreuung, die sich aus dem kohärenten Zerfall des angeregten Zustandes ergeben, beschrieben werden. Entwickelt man den Integranden in Gl. ( 9 ) nach Besselfunktionen (Lynch et al. 1960), dann ist die Integration für den Spezialfall einer einzelnen Resonanz möglich. Die vorwärts gestreute Intensität ergibt sich zu (Kagan et al. 1978, 1979)

$$I(t) = B_{in}^2 e^{-t/\tau_N} \frac{t_a}{4t\tau_N} J_1^2\left(\sqrt{t_a t/\tau_N}\right). \quad (11)$$

Analog zur Mößbauer-Absorption bezeichnet  $\tau_N$  die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands und  $t_a$  die effektive Dicke der Probe.  $J_1$  ist die Besselfunktion erster Ordnung. Für kleine effektive Dicken und kleine Zeiten kann die Besselfunktion durch eine Exponentialfunktion angenähert werden, so daß für  $t < 4\tau_N/(4+t_a)$  gilt (van Bürck et al. 1992):

$$I(t) \propto t_a^2 \exp\left\{-\left(1 + \frac{t_a}{4}\right) \frac{t}{\tau_N}\right\}. \quad (12)$$

In Vorwärtsrichtung nimmt die resonant gestreute Intensität demnach schneller ab als mit der mittleren Lebensdauer des angeregten Zustands. Dieser Effekt wird als „speed up“ bezeichnet. Bei dickeren Proben, bei denen die Näherung von Gl. ( 12 ) nicht gültig ist, wird das Zeitspektrum von den „dynamical beats“ bestimmt. Diese werden von der Besselfunktion in Gl. ( 11 ) hervorgerufen. Eine Simulation dieser Effekte ist in Abb. 3 dargestellt. Ihre experimentelle Bestätigung ist für die Streuung in Bragg-Richtung z.B. in van Bürck et al. (1987) zu finden.

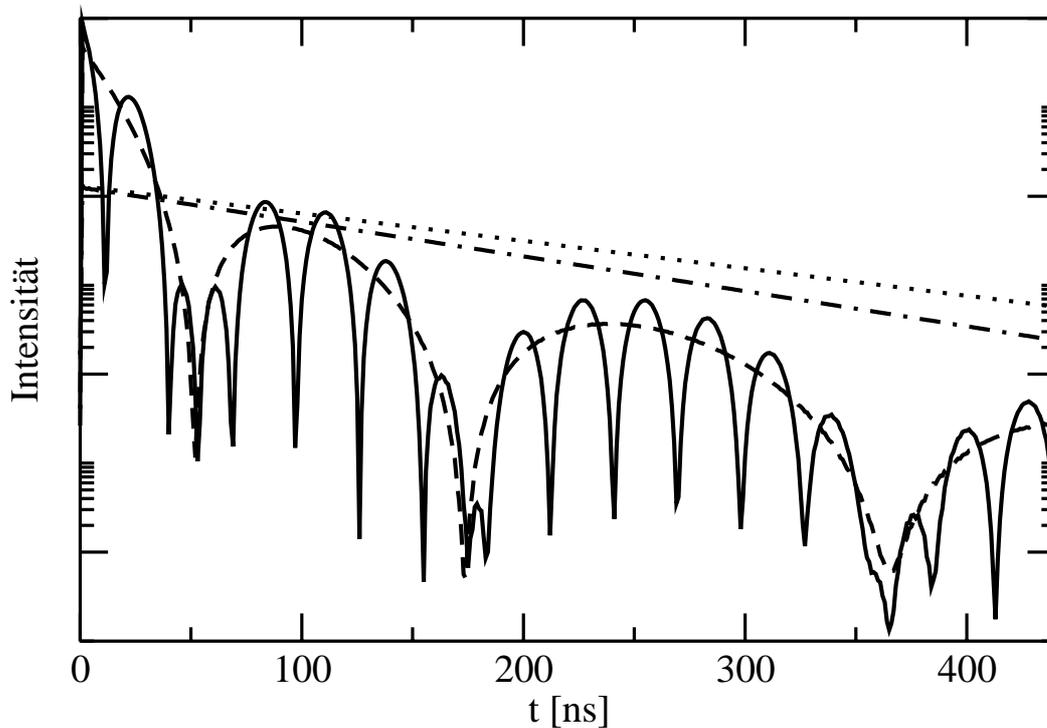
Wie bei der Mößbauer-Absorption können die Hyperfeinwechselwirkungen der Kerne mit ihrer Umgebung ebenfalls mit der nuklearen Vorwärtsstreuung aufgelöst werden. Durch die Aufspaltung der Energieniveaus entstehen mehrere Resonanzfrequenzen  $\omega_{R,j}$ , die miteinander interferieren. Im komplexen Brechungsindex muß demnach über alle möglichen Resonanzen summiert werden (Trammell und Hannon 1978, 1979).

$$n(\omega) = 1 - \frac{1}{2kd} \sum_j \frac{t_{a,j} \frac{\Gamma}{2}}{(\omega - \omega_{R,j}) - i \frac{\Gamma}{2}} \quad (13)$$

Der Index  $j$  läuft dabei über die Anzahl der Resonanzfrequenzen in der Probe. Da die effektive Dicke  $t_a$  die Flächendichte  $n_{Fe}$  der Mößbauer-Kerne in der Probe beinhaltet, ist diese für jede Resonanz separat anzugeben. Die Flächendichte ist in Gl. ( 13 ) als Flächendichte  $n_{Fe,j}$  derjenigen Mößbauer-Kerne zu verstehen, die die Resonanzfrequenz  $\omega_{R,j}$  besitzen. Durch die Art der Hyperfeinwechselwirkungen ist das Verhältnis der Flächendichten vorgegeben. Zu beachten ist, daß nur die relativen Unterschiede in den Resonanzenergien einen Einfluß auf die Zeitabhängigkeit der Vorwärtsstreuung haben. Die absoluten Werte sind wegen der energetischen Breite der einfallenden Strahlung ohne Bedeutung. Die Lösung der Fourier-Transformation ist bei mehreren Resonanzen nur numerisch möglich und führt zu einer weiteren Modulation der gestreuten Intensität, die als „quantum beats“ bezeichnet wird (vgl. Abb. 3). Bei zwei Resonanzen im Abstand  $\Delta\omega = \omega_{R,1} - \omega_{R,2}$  mit gleichen effektiven Dicken beträgt die Frequenz der „quantum beats“  $\frac{1}{2}\Delta\omega$  (Hastings et al. 1991). Überlappen die beiden Resonanzen nur unwesentlich, das bedeutet, daß der Abstand der Resonanzen  $\Delta\omega$  sehr viel größer ist als deren energetische Breite  $\Gamma$ , kann die vorwärts gestreute Intensität näherungsweise zu

$$I(t) = B_{in}^2 e^{-t/\tau_N} \frac{t_a}{4t\tau_N} J_1^2\left(\sqrt{t_a t/\tau_N}\right) \cos^2\left(\frac{1}{2}\Delta\omega t + \frac{t_a}{4} \frac{\frac{\Gamma}{2} \Delta\omega}{\Delta\omega^2 + \left(\frac{\Gamma}{2}\right)^2}\right) \quad (14)$$

bestimmt werden (Chumakov et al. 1992).



**Abb. 3:** Simulation der Nuklearen Vorwärtsstreuung. Punktierte Linie: exponentieller Zerfall mit einer Halbwertszeit von 141 ns, strichpunktierte Linie: „speed-up“ mit  $t_a = 1$ , gestrichelte Linie: „dynamical beats“ mit  $t_a = 40$ , durchgezogene Linie: „quantum beats“ mit  $t_a = 40$  und einer Quadrupolaufspaltung von  $\Delta E_Q = 3$  mm/s.

Die Umgebung der einzelnen Mößbauer-Kerne und damit die Hyperfeinwechselwirkungen sind in einer realen Probe unterschiedlich. Gerade bei Proteinen ist dieser Effekt durch die Verteilung auf die Konformationssubzustände deutlich ausgeprägt. Dies führt dazu, daß die Resonanzfrequenzen der einzelnen Kerne leicht gegeneinander verschoben sind. Im komplexen Brechungsindex wird die inhomogene Resonanzverbreiterung durch eine Faltung mit einer Lorentz- bzw. Gauß-Verteilung berücksichtigt (Smirnov 1996; Shvyd'ko et al. 1998). Während die Faltung mit einer Lorentz-förmigen Verteilung die Lage der Besselminima im Vorwärtsstreuungsspektrum unverändert läßt und nur zu einem stärkeren Abfall der gestreuten Intensität mit der Zeit führt, werden die Minima bei einer Gauß-förmigen Verteilung der Resonanzfrequenzen zu kürzeren Zeiten verschoben, d.h. die Frequenz der „dynamical beats“ vergrößert sich.

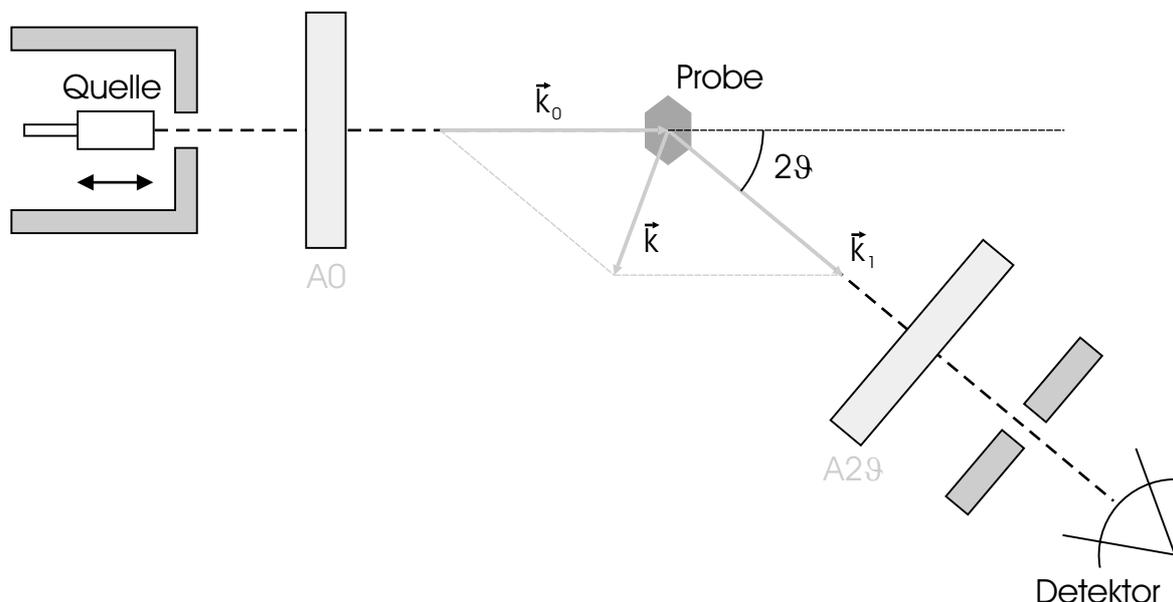
Analog zu Gl. ( 11 ) kann für eine einzelne Resonanz mit einer Lorentz-förmigen Verbreiterung eine analytische Lösung der vorwärts gestreuten Intensität gefunden werden. An der Näherungslösung für kurze Zeiten (vgl. Gl. ( 12 ))

$$I(t) \propto t_a^2 \exp\left\{-\left(1 + \frac{t_a}{4} + \frac{\Gamma_{inh}}{\Gamma_{nat}}\right) \frac{t}{\tau_N}\right\} \quad (15)$$

zeigt sich, daß die inhomogene Resonanzverbreiterung einen zusätzlichen exponentiellen Abfall der Intensität bewirkt, der zum Verhältnis der inhomogenen Verbreiterung  $\Gamma_{inh}$  zur natürlichen Breite der Resonanz  $\Gamma_{nat}$  proportional ist. Eine Separation der effektiven Dicke von der Lorentz-Verbreiterung ist aus den Meßspektren bei kurzen Zeiten nicht möglich (Smirnov 1996).

Eine vollständige Zusammenfassung der Theorie zur resonanten Streuung von Synchrotron-Strahlung sowie ein Überblick über mögliche Anwendungen ist in Gerdau und DeWaard (1999) zu finden. Die Auswirkungen verschiedener effektiver Dicken, Quadrupolaufspaltungen und variabler Resonanzverbreiterungen auf die Zeitspektren der nuklearen Vorwärtsstreuung sind in Keppler (1999) zusammengefaßt und mit Beispielen illustriert.

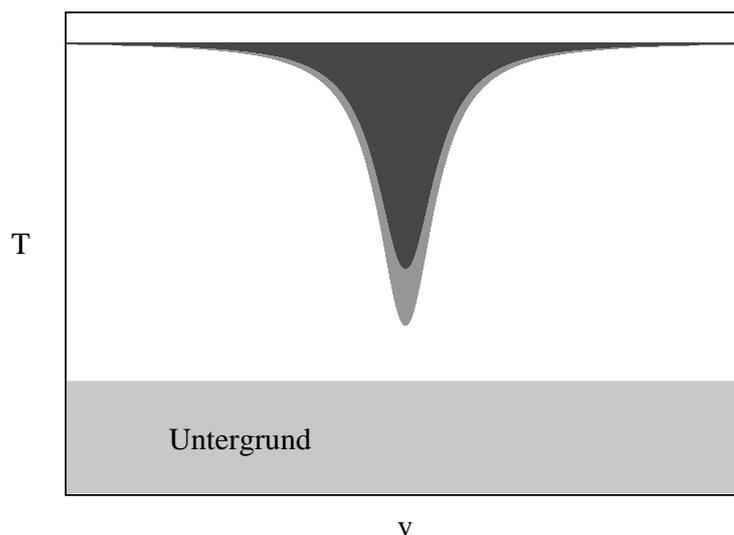
### 2.3 Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung (RSMR)



**Abb. 4:** Komponenten eines RSMR-Experiments. An die Positionen A0 und A2 $\theta$  wird wechselweise ein Mößbauer-Absorber zur Energieanalyse in den Strahlengang eingebracht.

Die Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung ist eine Kombination eines Röntgenstreuexperimentes mit der Mößbauer-Spektroskopie. An Stelle einer Röntgenröhre wird als Strahlungsquelle eine Mößbauer-Quelle verwendet. Die aus der Quelle austretende Strahlung wird kollimiert, an der Probe gestreut und anschließend in Abhängigkeit vom Streuwinkel detektiert. Zusätzlich wird ein Mößbauer-Absorber in den Strahlengang gebracht, entweder zwischen Quelle und Probe an die mit A0 gekennzeichnete Position oder zwischen Probe und Detektor an Position A2 $\vartheta$ . Der schematische Aufbau ist in Abb. 4 skizziert.

Für jede dieser Absorberstellungen kann nun in Streurichtung ein Mößbauer-Spektrum aufgenommen werden. Steht der Absorber in der Stellung A0, dann ist die im Mößbauer-Spektrum fehlende Fläche proportional zur Zahl der von der Quelle resonanzfähig emittierten Quanten, die an der Probe im Winkel 2 $\vartheta$  gestreut werden. In der Position A2 $\vartheta$  hinter der Streuprobe kann nur noch derjenige Anteil der Strahlung resonant absorbiert werden, der zusätzlich zu den vorherigen Bedingungen auch noch an der Probe elastisch gestreut wurde. Benutzt man für diese Messungen dieselbe Quelle und denselben Absorber für beide Absorberstellungen, dann sind die Proportionalitätskonstanten in beiden Fällen gleich, so daß man direkt die total und die elastisch gestreute Intensität bestimmt. Zudem ist diese Technik untergrundfrei, da Untergrundstrahlung oder elektronisches Rauschen nicht resonant absorbiert werden und diese Beiträge daher gleichmäßig über das Mößbauer-Spektrum verteilt sind (vgl. Abb. 5).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Mößbauer-Spektren mit Analysator in Position A0 (hellgrau) bzw. A2 $\vartheta$  (dunkelgrau) und des nicht resonanzfähigen Untergrunds (hellgrau).

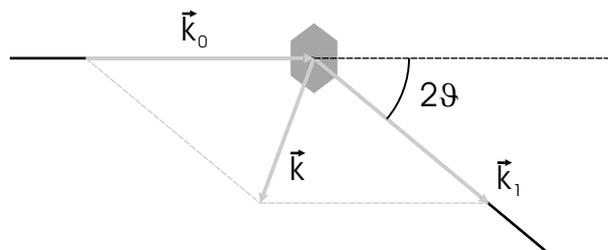
Oft wird in der RSMR der elastisch gestreute Anteil  $f_R$ , der Quotient aus der elastischen und der totalen Streuintensität

$$f_R = \frac{S_{el}}{S_{tot} + I_{Compton}}, \quad (16)$$

angegeben oder auch der elastisch Rayleigh-gestreuete Anteil  $f_{RAY} = \frac{S_{el}}{S_{tot}}$  ohne die inelastische Compton-Streuung. Hierbei bezeichnen  $S_{el}$  und  $S_{tot}$  die elastisch bzw. total Rayleigh-gestreuete Intensität und  $I_{Compton}$  die Compton-gestreuete Intensität.

## 2.4 Streuung von $\gamma$ -Strahlung an Materie

$\gamma$ -Strahlung mit der Energie  $\hbar\omega_0$  und dem Impuls  $\hbar\vec{k}_0$  wird an einer Probe unter dem Streuwinkel  $2\vartheta$  gestreut. Nach dem Streuprozess besitzt die  $\gamma$ -Strahlung die Energie  $\hbar\omega_1$  und den Impuls  $\hbar\vec{k}_1$ . Die Streuung erfolgt also mit dem Energieübertrag  $\hbar\omega = \hbar(\omega_1 - \omega_0)$  und dem Impulsübertrag  $\hbar\vec{k} = \hbar(\vec{k}_1 - \vec{k}_0)$ .



**Abb. 6:** Zusammenhang zwischen Impulsübertrag  $\hbar\vec{k}$ , Wellenlänge  $\lambda$  und Streuwinkel  $2\vartheta$  für die Rayleigh-Streuung von  $\gamma$ -Quanten:  $|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1| = \frac{2\pi}{\lambda}$  und  $|\vec{k}| = 4\pi \frac{\sin \vartheta}{\lambda}$ .

Der Ausgangspunkt für die Berechnung der gestreuten Intensität ist der doppelt differentielle Wirkungsquerschnitt  $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$ . Dieser gibt das Verhältnis der in ein Raumwinkelelement  $d\Omega$  gestreuten Intensität zur eingestrahnten Intensität pro Energieübertrag  $\hbar\omega$  an die Streuprobe

wieder. Die Streuung von  $\gamma$ -Strahlung erfolgt an den Elektronen in der Probe und kann in erster Born'scher Näherung in zwei Anteile separiert werden.

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{d\sigma}{d\Omega} \cdot S(\vec{k}, \omega) \quad (17)$$

Diese Näherung ist gültig, wenn sich der Betrag des Wellenvektors der gestreuten Strahlung  $|\vec{k}_1|$  nicht wesentlich vom Betrag des Wellenvektors der einfallenden Strahlung  $|\vec{k}_0|$  unterscheidet, wenn also Energie- und Impulsübertrag als unabhängige Variablen angenommen werden können. Dies ist für die Thomson-Streuung von  $\gamma$ -Strahlung an einem Elektron erfüllt. Mit dem Polarisationsfaktor für unpolarisierte  $\gamma$ -Strahlung ergibt die Streuung in ein Raumwinkelelement im Abstand R vom Streuzentrum für einen Streuwinkel  $2\vartheta$ :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{1}{R^2} \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \frac{1 + \cos^2(2\vartheta)}{2} \quad (18)$$

$\frac{e^2}{m_e c^2}$  ist der klassische Elektronenradius mit der Elementarladung e, der Elektronenmasse  $m_e$  und der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum c. Die dynamische Streufunktion  $S(\vec{k}, \omega)$  gibt die gestreute Intensität in Abhängigkeit vom Impulsübertrag  $\hbar\vec{k}$  und Energieübertrag  $\hbar\omega$  wieder und enthält damit alle Informationen über die Probe. Sie ist die zweifach Fourier-Transformierte der van Hove'schen Paarkorrelationsfunktion  $G(\vec{r}, t)$  (van Hove 1954). Diese gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen der Probe zu einer bestimmten Zeit t an einem bestimmten Ort  $\vec{r}(t)$  zu finden, wenn sich ein anderes oder dasselbe Teilchen zur Zeit  $t = 0$  am Ort  $\vec{r}(0)$  befunden hat.

$$G(\vec{r}, t) = \frac{1}{M} \sum_{m, m'} \langle \delta(\vec{r} + \vec{r}_m(0) - \vec{r}_m(t)) \rangle \quad (19)$$

Die Doppelsumme läuft dabei über alle M Streuzentren der Probe, während die spitzen Klammern  $\langle \dots \rangle$  eine Ensemblemittelung darstellen. Eine oft nützliche Größe ist die

intermediäre Streufunktion  $I(\vec{k}, t)$ , die vom Orts- in den Impulsraum Fourier-Transformierte der van Hove'schen Paarkorrelationsfunktion. Die intermediäre Streufunktion ist das Amplitudenquadrat der phasenrichtigen Addition der an den Elektronen verschiedener Atome der Streuprobe gestreuten Streuwellen.

$$\begin{aligned} I(\vec{k}, t) &= \int e^{i\vec{k}\vec{r}} G(\vec{r}, t) d\vec{r} \\ &= \frac{1}{M} \sum_{m, m'} f_m f_{m'} \langle e^{i\vec{k}(\vec{r}_m(0) - \vec{r}_{m'}(t))} \rangle \end{aligned} \quad (20)$$

Und für die dynamische Streufunktion ergibt sich:

$$\begin{aligned} S(\vec{k}, \omega) &= \frac{1}{2\pi} \int e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)} G(\vec{r}, t) d\vec{r} dt \\ &= \frac{1}{2\pi} \int e^{-i\omega t} I(\vec{k}, t) dt \\ &= \frac{1}{2\pi} \frac{1}{M} \int e^{-i\omega t} \sum_{m, m'} f_m f_{m'} \langle e^{i\vec{k}(\vec{r}_m(0) - \vec{r}_{m'}(t))} \rangle dt. \end{aligned} \quad (21)$$

Dabei bezeichnet  $f_m$  den Atomformfaktor des m-ten Atoms, der die Interferenzen bei der Streuung an den Elektronen der Elektronenhülle des Atoms berücksichtigt.

Für die RSMR-Messungen interessieren besonders zwei Spezialfälle: die totale Streuung  $S_{\text{tot}}(\vec{k})$  unabhängig vom Energieübertrag an die Streuprobe und die elastische Streuung  $S_{\text{el}}(\vec{k})$  ohne Energieübertrag:

$$\begin{aligned} S_{\text{tot}}(\vec{k}) &= \int S(\vec{k}, \omega) d\omega \\ &= \frac{1}{2\pi} \iint e^{-i\omega t} d\omega I(\vec{k}, t) dt \\ &= \int \delta(t) I(\vec{k}, t) dt \\ &= I(\vec{k}, 0) \\ &= \frac{1}{M} \sum_{m, m'} f_m f_{m'} \langle e^{i\vec{k}(\vec{r}_m(0) - \vec{r}_{m'}(0))} \rangle \end{aligned} \quad (22)$$

$$\begin{aligned}
S_{el}(\vec{k}) &= \int S(\vec{k}, \omega) \delta(\omega) d\omega & (23) \\
&= \frac{1}{2\pi} \int \int e^{-i\omega t} \delta(\omega) d\omega I(\vec{k}, t) dt \\
&= \frac{1}{2\pi} \int I(\vec{k}, t) dt \\
&= \lim_{t \rightarrow \infty} I(\vec{k}, t) \\
&= \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{M} \sum_{m, m'} f_m f_{m'} \langle e^{i\vec{k}(\vec{r}_m(0) - \vec{r}_{m'}(t))} \rangle.
\end{aligned}$$

Die totale Streuung ist somit proportional zum statischen Strukturfaktor  $I(\vec{k}, 0)$ , während die elastische Streuung proportional zum zeitlichen Mittelwert der intermediären Streufunktion ist. Die letzten beiden Zeilen in Gl. ( 23 ) ergeben sich aus der Annahme, daß sich das System im Grenzwert  $t \rightarrow \infty$  gegen seinen Mittelwert bewegt (Albanese und Deriu 1979). Der Anteil der Streuung, der als elastisch gemessen wird, hängt natürlich von der Meßapparatur ab. Es ist dabei die Energieverteilung der einfallenden Strahlung und die Energieauflösung des Detektors zu berücksichtigen. So verschwinden in den RSMR-Experimenten bei der elastischen Streuung die Korrelationen in den von den Phononen verursachten dynamischen Auslenkungen, da die Lebensdauer eines Phonons in Proteinen im Vergleich zur mittleren Lebensdauer des angeregten Mößbauer-Niveaus mit typischerweise  $10^{-11}$ - $10^{-12}$  s sehr kurz ist (vgl. z.B. Hill et al. (1996) für CO-Myoglobin). Während der Zeit, in der die von der Mößbauer-Quelle emittierte Strahlung über die Probe streicht, kann ein und dasselbe Phonon mehrfach angeregt und vernichtet werden, so daß jegliche Phasenbeziehungen in den Auslenkungen der Atome verloren gehen. Im Energiebild bedeutet das, daß die Phononenenergien deutlich oberhalb der Auflösungsgrenze des Mößbauer-Effektes liegen. Wird bei der Streuung des  $\gamma$ -Quants eine Mode angeregt, dann wird an die Probe soviel Energie übertragen, daß eine resonante Absorption im Analysator bei den typischen Doppler-Geschwindigkeiten nicht mehr möglich ist.

Zur weiteren Berechnung der Streufunktionen müssen einige Annahmen über die Streuprobe getroffen werden, die im Folgenden diskutiert werden.

## 2.4.1 Festkörper

In einem Festkörper befinden sich die Atome auf festen Positionen, um die sie Schwingungen ausführen bzw. statisch verteilt sind. Daher ist es sinnvoll, die Atompositionen  $\vec{r}_m(t)$  in eine mittlere Position  $\vec{R}_m$  und die Abweichung von diesem Mittelwert, die sowohl zeitunabhängig  $\vec{s}_m$  wie auch zeitabhängig  $\vec{x}_m(t)$  sein kann, aufzuteilen.

$$\vec{r}_m(t) = \vec{R}_m + \vec{s}_m + \vec{x}_m(t) \quad (24)$$

Weiterhin kann die Ensemblemittelung über die Exponentialfunktion  $\langle e^{i\vec{k}(\vec{r}_m(0) - \vec{r}_m(t))} \rangle$  mit Hilfe der Kummulantenentwicklung in den Exponenten gezogen werden (Kubo 1962). Dabei wird der Exponent nach den Momenten des Impulsübertrags  $\vec{k}$  entwickelt. Für Gauß-förmige Verteilungen der Abweichungen  $\vec{s}_m + \vec{x}_m(t)$  vom Mittelwert  $\vec{R}_m$  entfallen alle Reihenglieder mit Potenzen größer als zwei (Dietrich und Fenzl 1989). Da trivialerweise der Mittelwert der Abweichungen vom Mittelwert verschwindet,  $\langle \vec{s}_m + \vec{x}_m(t) \rangle = 0$ , bleibt schließlich nur der quadratische Term übrig. Diese Näherung ist unabhängig von der Größe des Exponenten exakt und gilt z.B. für ein ideales Gas (van Hove 1954), für harmonische Oszillatoren (Bloch 1932) und für freie Diffusion (Vineyard 1958; Rahman et al. 1962a). Damit folgt für die intermediäre Streufunktion:

$$I(\vec{k}, t) = \frac{1}{M} \sum_{m, m'} f_m f_{m'} e^{i\vec{k}(\vec{R}_m - \vec{R}_{m'})} e^{-\frac{1}{2} \langle (\vec{k}((\vec{s}_m + \vec{x}_m(0)) - (\vec{s}_{m'} + \vec{x}_{m'}(t))))^2 \rangle} \quad (25)$$

Für die Auswertung der Exponentialfunktionen empfiehlt es sich, die Summe weiter aufzuteilen in den Selbstterm, in dem nur über gleiche Atome summiert wird  $m = m'$ , und in den Paarterm, der die Kreuzterme mit  $m \neq m'$  enthält.

$$I(\vec{k}, t) = \frac{1}{M} \sum_m f_m^2 e^{-k^2 \langle x_m^2 \rangle} e^{k^2 \langle x_m(0) x_m(t) \rangle} \quad (26)$$

$$+ \frac{1}{M} \sum_{m \neq m'} f_m f_{m'} e^{i\vec{k}(\vec{R}_m - \vec{R}_{m'})} e^{-\frac{1}{2} k^2 (\langle s_m^2 \rangle + \langle x_m^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2} k^2 (\langle s_{m'}^2 \rangle + \langle x_{m'}^2 \rangle)} e^{k^2 (\langle s_m s_{m'} \rangle + \langle x_m(0) x_{m'}(t) \rangle)}$$

Hierbei werden nur noch die Abweichungen von den mittleren Positionen  $\bar{R}_m$  in Richtung des Streuvektors  $\vec{k}$  betrachtet, was durch das Fehlen der Vektorpfeile symbolisiert wird. Außerdem wurde angenommen, daß sich die dynamischen Auslenkungen in ihrem quadratischen Mittel mit der Zeit nicht ändern,  $\langle x^2(0) \rangle = \langle x^2(t) \rangle = \langle x^2 \rangle$ , und daß die statischen und dynamischen Auslenkungen von der mittleren Atomposition nicht voneinander abhängen,  $\langle s_m x_{m'}(t) \rangle = 0$ . Der Vorteil der Aufteilung in den Selbst- und den Paarterm zeigt sich bei der Berechnung der elastisch und der total gestreuten Intensität, da für  $t \rightarrow 0$  die Exponentialfunktionen im Selbstterm wegen  $\langle x_m(0)x_m(0) \rangle = \langle x_m^2(0) \rangle = \langle x_m^2 \rangle$  verschwinden und im Zeitmittel  $\langle x_m(0)x_m(t) \rangle$  gegen Null geht, weil durch wiederholtes An- und Abregen von Schwingungszuständen jegliche Phasenbeziehung in den Bewegungen verloren geht. Damit ergibt sich für die elastisch und total gestreute Intensität:

$$S_{el}(\vec{k}) = \frac{1}{M} \sum_m f_m^2 e^{-k^2 \langle x_m^2 \rangle} + \frac{1}{M} \sum_{m \neq m'} f_m f_{m'} e^{i\vec{k}(\bar{R}_m - \bar{R}_{m'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_m^2 \rangle + \langle x_m^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{m'}^2 \rangle + \langle x_{m'}^2 \rangle)} e^{k^2 \langle s_m s_{m'} \rangle} \quad (27)$$

$$S_{tot}(\vec{k}) = \frac{1}{M} \sum_m f_m^2 + \frac{1}{M} \sum_{m \neq m'} f_m f_{m'} e^{i\vec{k}(\bar{R}_m - \bar{R}_{m'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_m^2 \rangle + \langle x_m^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{m'}^2 \rangle + \langle x_{m'}^2 \rangle)} e^{k^2 \langle s_m s_{m'} \rangle} e^{k^2 \langle x_m x_{m'} \rangle}. \quad (28)$$

In Pulverproben kann die intermediäre Streufunktion weiter unterteilt werden, z.B. in Moleküle, die einander gleichen, aber zufällig zueinander orientiert sind. Für große Abstände zwischen den Molekülen, wie z.B. bei verdünnten Proben, gehen durch die zufällige Orientierung und die zufällige räumliche Anordnung der Moleküle im Ensemblemittel die Phasenbeziehungen der Streuwellen, die an verschiedenen Molekülen gestreut werden, verloren. Die Phasenbeziehungen der Streuwellen, die an den verschiedenen Atomen ein und desselben Moleküls gestreut werden, bleiben hingegen erhalten. Somit ergibt sich eine inkohärente Aufsummierung der an den Molekülen gestreuten Strahlung, die selbst wiederum kohärent, gemittelt über alle Orientierungen berechnet werden muß. Sind alle Orientierungen gleich wahrscheinlich und die mittleren quadratischen Auslenkungen isotrop in alle Raumrichtungen, wird die Mittelung über alle Ausrichtungen zu

$$\frac{1}{4\pi} \iint e^{i\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'} \cos\alpha} \sin\alpha \, d\alpha \, d\beta = \frac{\sin(\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'})}{\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'}}, \quad (29)$$

wobei  $\alpha$  in diesem Fall den Winkel zwischen den Vektoren  $\vec{k}$  und  $\vec{R}_{mm'} = (\vec{R}_m - \vec{R}_{m'})$  bezeichnet. Die dynamische Streufunktion ergibt dann

$$S_{el}(\mathbf{k}) = \frac{1}{M} \sum_m f_m^2 e^{-k^2 \langle x_m^2 \rangle} + \frac{1}{M} \sum_{m \neq m'} f_m f_{m'} \frac{\sin(\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'})}{\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'}} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_m^2 \rangle + \langle x_m^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{m'}^2 \rangle + \langle x_{m'}^2 \rangle)} e^{k^2 \langle s_m s_{m'} \rangle} \quad (30)$$

und

$$S_{tot}(\mathbf{k}) = \frac{1}{M} \sum_m f_m^2 + \frac{1}{M} \sum_{m \neq m'} f_m f_{m'} \frac{\sin(\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'})}{\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'}} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_m^2 \rangle + \langle x_m^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{m'}^2 \rangle + \langle x_{m'}^2 \rangle)} e^{k^2 \langle s_m s_{m'} \rangle} e^{k^2 \langle x_m x_{m'} \rangle}. \quad (31)$$

Der Faktor  $\frac{\sin(\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'})}{\mathbf{k}\mathbf{R}_{mm'}}$  geht für große Streuvektoren  $\vec{k}$  gegen Null, so daß der Paarterm verschwindet und nur der Selbstterm übrigbleibt. Für große Streuwinkel nähert sich die kohärente Streuung der inkohärenten Streuung an, die auf Grund der fehlenden Interferenzen nur aus dem Selbstterm besteht.

In einem Kristall sind die einzelnen Moleküle periodisch angeordnet, d.h. die von den Atomen verschiedener Moleküle gestreute Strahlung überlagert sich kohärent. Demzufolge muß die Summe in der intermediären Streufunktion über alle Streuzentren im Kristall laufen. Auf Grund des periodischen Kristallaufbaus lassen sich die Ortsvektoren  $\vec{R}_m$  als Summe des Vektors  $\vec{r}_n$ , der den Aufpunkt der n-ten Einheitszelle des Kristalls beschreibt, und des Vektors  $\vec{R}_{nj}$ , der den Ort des j-ten Atoms innerhalb dieser Einheitszelle angibt, darstellen. Die Summe über die M Atome der Probe wird also nun zu einer Doppelsumme über die N Einheitszellen des Kristalls und die jeweils J Atome in der Einheitszelle. Des weiteren soll angenommen werden, daß die Auslenkungen der Atome verschiedener Einheitszellen nicht miteinander korreliert sind, d.h.  $\langle x_{nj}(0)x_{n'j'}(t) \rangle = 0$  und  $\langle s_{nj}s_{n'j'} \rangle = 0$  für alle  $n \neq n'$ . Diese

Annahme bedeutet, daß zwischen den Molekülen in benachbarten Einheitszellen keinerlei Kräfte vorhanden sind. Das ist offensichtlich nicht richtig, da ohne diese Bindungskräfte Phononen und Phononenausbreitungen nicht möglich wären. Auch würden sich Fehlorderungen einzelner Moleküle nicht auf die Nachbarmoleküle auswirken. Aber für die Verwendung der Ergebnisse einer Normal-Moden-Analyse, die an einem einzelnen Myoglobinmolekül durchgeführt wurde, ist diese Näherung notwendig. Mit der Aufteilung der Summen und der Vernachlässigung der Korrelationen zwischen Atomen verschiedener Einheitszellen können nun die Indizes  $n$  und  $n'$  in den Ortsvektoren innerhalb der Einheitszelle  $\vec{R}_{nj}$  und in den mittleren quadratischen Auslenkungen  $\langle x_{nj}^2 \rangle$  weggelassen werden, da im Mittel jede Einheitszelle identisch ist. Nach einer kurzen Umformung, in der die Summe über die verschiedenen Einheitszellen  $n \neq n'$  um die Terme mit  $n = n'$  erweitert wird, die wiederum in den anderen Zeilen abgezogen werden, folgt für die intermediäre Streufunktion:

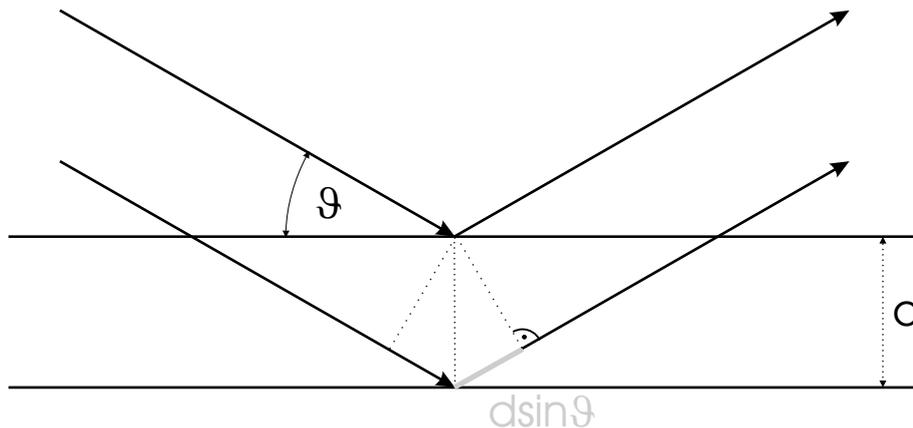
$$\begin{aligned}
I(\vec{k}, t) = & \sum_j f_j^2 e^{-k^2 \langle x_j^2 \rangle} \left( e^{k^2 \langle x_j(0)x_j(t) \rangle} - e^{-k^2 \langle s_j^2 \rangle} \right) \quad (32) \\
& + \sum_{j \neq j'} f_j f_{j'} e^{i\vec{k}(\vec{R}_j - \vec{R}_{j'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_j^2 \rangle + \langle x_j^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{j'}^2 \rangle + \langle x_{j'}^2 \rangle)} \left( e^{k^2(\langle s_j s_{j'} \rangle + \langle x_j(0)x_{j'}(t) \rangle)} - 1 \right) \\
& + \frac{1}{N} \sum_{n, n'} \sum_{j, j'} f_j f_{j'} e^{i\vec{k}(\vec{r}_n - \vec{r}_{n'})} e^{i\vec{k}(\vec{R}_j - \vec{R}_{j'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_j^2 \rangle + \langle x_j^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{j'}^2 \rangle + \langle x_{j'}^2 \rangle)}.
\end{aligned}$$

Der Vorfaktor  $\frac{1}{M}$  wurde hier durch  $\frac{1}{N}$  ersetzt, d.h. die intermediäre Streufunktion gibt nicht mehr die mittlere Streuintensität pro beleuchtetem Atom sondern pro beleuchteter Einheitszelle an. Der erste Summand in Gl. ( 32 ) gibt den inkohärent gestreuten Anteil wieder, der zweite entspricht dem Paarterm der diffusen Streuung in den gesamten reziproken Raum, während der letzte Summand die Bragg-Streuung an einem Kristall ist. Der Paarterm der diffusen Streuung tritt nur dann auf, wenn Korrelationen in den Auslenkungen der Atome aus ihrer Mittellage existieren.

Zur Berechnung der Bragg-Streuung kann nun entweder über alle Einheitszellen des Kristalls summiert werden, was aber wegen des ungeheuren Rechenaufwandes praktisch unmöglich ist, oder man folgt dem Rechenvorschlag von Bragg (1913) und Darwin (1914). Dabei wird der Kristall als eine Anordnung von parallelen Netzebenen dargestellt, an denen die Strahlung reflektiert wird. Wegen des definierten Abstandes der Netzebenen ist die Reflexion nur in

bestimmte ausgezeichnete Richtungen möglich. Haben die Netzebenen den Abstand  $d$ , dann überlagern sich die an benachbarten Ebenen um den Winkel  $2\vartheta$  gestreuten Wellen nur dann konstruktiv, wenn der Gangunterschied auf Grund der Wegdifferenz ein Vielfaches der Wellenlänge  $\lambda$  beträgt (vgl. Abb. 7). Dies ist das bekannte Bragg-Gesetz:

$$2d \sin \vartheta = n\lambda. \quad (33)$$



**Abb. 7:** Streuung an zwei parallelen Ebenen im Abstand  $d$ . Gangunterschied der Streuwellen:  $2d \sin \vartheta$ .

Allgemein ist die Phasendifferenz  $\delta$  zwischen zwei im Abstand  $d$  gestreuten Wellen

$$\delta = \vec{k} \vec{r} = \frac{4\pi \sin \vartheta}{\lambda} d. \quad (34)$$

Bei  $P$  parallelen Ebenen im Abstand  $d$  ist die gestreute Intensität analog zu Gl. ( 21 ) proportional zu

$$\sum_{p,p'=0}^P e^{-i(p-p')\delta} = \left( \sum_{p=0}^P e^{-ip\delta} \right)^2 = \left( 1 + e^{-i\delta} + \dots + e^{-i(P-1)\delta} \right)^2 = \left( \frac{1 - e^{-iP\delta}}{1 - e^{-i\delta}} \right)^2 = \frac{\sin^2(\frac{1}{2}P\delta)}{\sin^2(\frac{1}{2}\delta)}. \quad (35)$$

Dies ist gleichbedeutend mit dem Bragg-Gesetz, da der Term  $\frac{\sin^2(\frac{1}{2}P\delta)}{\sin^2(\frac{1}{2}\delta)}$  für große  $P$  nur dann von Null verschieden ist, wenn  $\delta$  ein ganzzahliges Vielfaches von  $2\pi$  ist. Wird die Einheitszelle des Kristalls durch die Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  aufgespannt und stellt man den

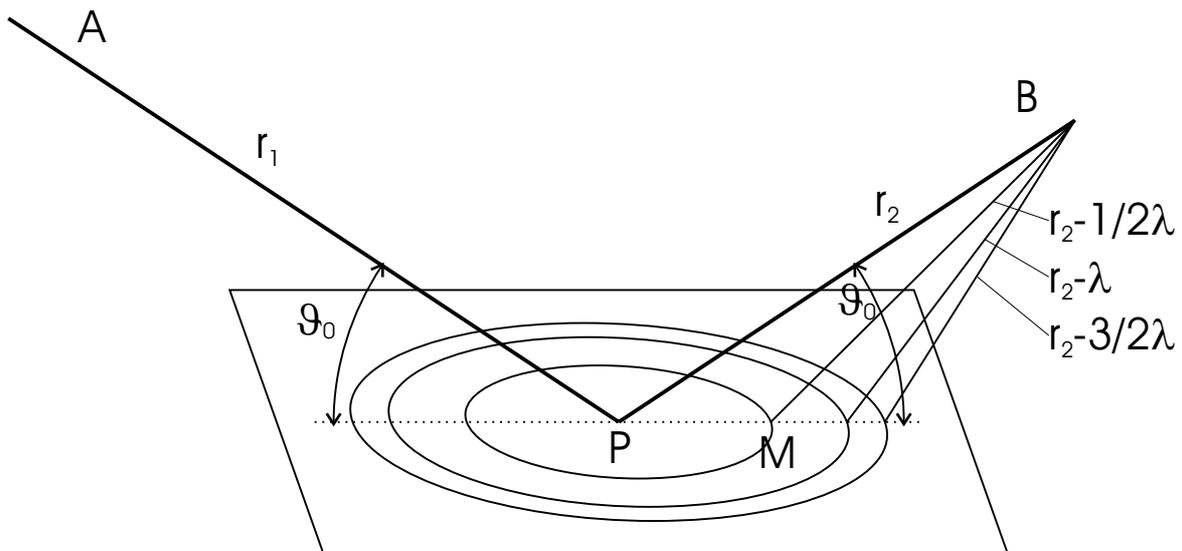
Streuvektor  $\vec{k}$  durch eine Linearkombination aus den reziproken Gittervektoren  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$  und  $\vec{c}^*$  dar mit

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}, \quad \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}, \quad \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}, \quad (36)$$

erhält man schließlich wegen  $\vec{a} \cdot \vec{a}^* = 1$ ,  $\vec{a} \cdot \vec{b}^* = 0$  etc. ein Produkt aus drei  $\frac{\sin^2(\frac{1}{2}P\delta)}{\sin^2(\frac{1}{2}\delta)}$ -Termen,

so daß Reflexion also immer dann möglich ist, wenn der Vektor  $\frac{\vec{k}}{2\pi}$  zwei reziproke Gitterpunkte verbindet, also wenn der Streuvektor  $\vec{k}$  das  $2\pi$ -fache einer Linearkombination der reziproken Gittervektoren mit den ganzzahligen Indizes h, k und l ist.

$$\vec{k} = 2\pi (h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*) \quad (37)$$



**Abb. 8:** Fresnelzonenkonstruktion für die Streuung an einer Ebene. Bei parallel einfallendem Strahl sind die Zonengrenzen nur vom Abstand  $r_2$  zum Beobachtungspunkt B und dem Winkel  $\vartheta_0$  abhängig.

Des weiteren müssen noch die Interferenzeffekte innerhalb einer Netzebene berücksichtigt werden. Dazu wird die streuende Ebene in Fresnelzonen aufgeteilt. Die Zonengrenzen sind jeweils durch diejenigen Punkte definiert, die gegenüber der vorherigen Zone bezüglich des Beobachtungspunktes B genau einen Gangunterschied von  $\frac{\lambda}{2}$  haben. Im Streufall sind dies

Ellipsen. Jede Zone enthält dabei so viele Streuzentren, daß diese als Kontinuum aufgefaßt werden können. Da jede Zone die gleiche Fläche besitzt, findet sich für jedes Streuzentrum in der benachbarten Zone eines mit entgegengesetzter Phase, so daß sich die Streuamplituden auf Grund des Gangunterschieds jeweils auslöschen. Schließlich bleibt nur noch die Hälfte der Streuzentren der ersten Zone übrig, für die sich keine Auslöschpartner finden. Die Amplitude der gestreuten Welle ist also proportional zur Zahl der halben Streuzentren in der ersten Zone und muß wegen der geringen Phasendifferenzen der Streuwellen innerhalb dieser Zone mit dem Faktor  $\frac{2}{\pi}$  multipliziert werden (vgl. z.B. James 1948). Mit der Fläche  $\frac{\pi r_1 r_2}{r_1 + r_2} \frac{\lambda}{\sin \vartheta}$  für die erste Fresnelzone, n Streuzentren pro Einheitsfläche und der Tatsache, daß die Streuamplitude mit  $\frac{1}{r_2}$  abnimmt, ist die gestreute Intensität im Beobachtungspunkt B proportional zu

$$I_B \propto \left( \frac{1}{2} \frac{\pi r_1 r_2}{r_1 + r_2} \frac{\lambda}{\sin \vartheta} \frac{n}{r_2} \frac{2}{\pi} \right)^2. \quad (38)$$

Bei kollimierten Strahlungsquellen ist die einfallende Strahlung nahezu parallel. Das entspricht einer Punktquelle im Unendlichen, so daß  $r_1 \gg r_2$  ist und damit  $\frac{r_1 r_2}{r_1 + r_2} \approx \frac{r_1 r_2}{r_1} = r_2$ .

Für einen Netzebenenabstand d und einer Streuzentrendichte N pro Volumenelement gilt  $n = d N = \frac{d}{V}$ . Dabei ist V das Volumen der Einheitszelle. Die von der Ebene gestreute Intensität ergibt sich unter Verwendung von Gl. ( 38 ) und der Streuamplitude  $F_{hkl}$  eines Streuzentrums nach Darwin (1914) zu

$$I_B = \left( \frac{d \lambda}{V \sin \vartheta} \right)^2 |F_{hkl}|^2. \quad (39)$$

Dabei ist  $F_{hkl}$  der Strukturfaktor der Einheitszelle, wobei die ganzzahligen Indizes h, k und l nach Gl. ( 37 ) die Streurichtung angeben.

$$|F_{hkl}|^2 = \sum_{j,j'} f_j f_{j'} e^{i\vec{k}(\vec{R}_j - \vec{R}_{j'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_j^2 \rangle + \langle x_{j'}^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{j'}^2 \rangle + \langle x_j^2 \rangle)} \quad (40)$$

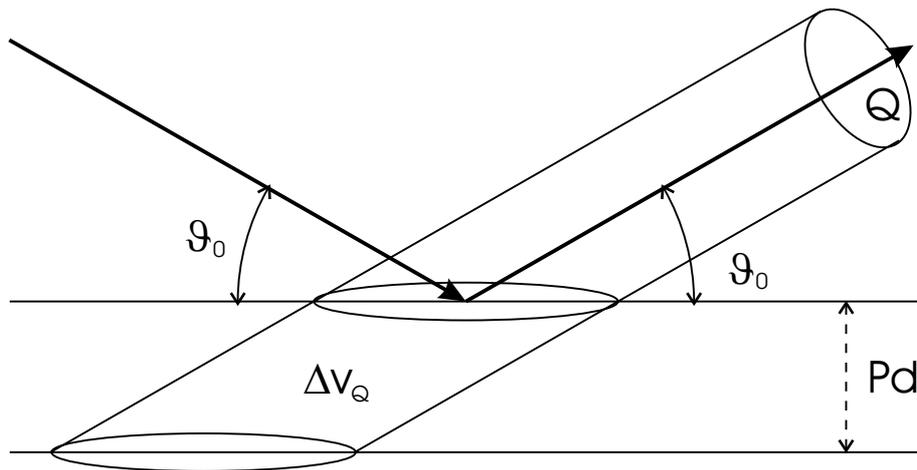
Die Gl. ( 35 ) und ( 39 ) sind dann gültig, wenn der Kristall exakt in Reflexionsrichtung steht. In der Praxis ist aber der Kristall nicht perfekt. Insbesondere Proteinkristalle sind Mosaik-Kristalle, d.h. sie bestehen aus einzelnen perfekten Einkristallblöcken, die leicht gegeneinander verkippt sind. Ebenso ist der Primärstrahl wegen des endlichen Blendenabstandes und der endlichen Blendenweite nicht exakt parallel sondern leicht konvergent. Deshalb steht der Kristall über einen kleinen Winkelbereich hinweg in Reflexionsstellung. Die interessante Größe ist daher das sogenannte integrale Reflexionsvermögen. Dazu wird für einen Reflex über alle möglichen Kristallstellungen und über alle Streuwinkel  $2\vartheta$  integriert. Da der Reflexionsbereich des Kristalls, der durch Gl. ( 35 ) gegeben ist, sehr schmal ist, kann Gl. ( 39 ) über den Reflexionsbereich hinweg als konstant betrachtet werden. In Gl. ( 35 ) dagegen geht nur die relative Phasenverschiebung zwischen den an den einzelnen Ebenen gestreuten Wellen ein, so daß Gl. ( 34 ) mit dem idealen Winkel  $\vartheta_0$  für die Reflexion und dem Winkel  $\varepsilon$  für die Abweichung von diesem zu

$$\delta = \frac{4\pi d}{\lambda} (\sin(\vartheta_0 + \varepsilon) - \sin \vartheta_0) \approx \frac{4\pi d \varepsilon}{\lambda} \cos \vartheta_0 \quad (41)$$

wird. Die Taylor-Entwicklung in Gl. ( 41 ) ist gültig, da, wie schon erwähnt, der Reflexionsbereich um den idealen Winkel  $\vartheta_0$  sehr schmal ist. Damit ist das integrale Reflexionsvermögen  $R_{hkl}$  bei einer Strahlquerschnittsfläche  $Q$

$$R_{hkl} = Q \int \left( \frac{d\lambda}{V \sin \vartheta_0} \right)^2 \frac{\sin^2 \left( P \frac{2\pi d \varepsilon}{\lambda} \cos \vartheta_0 \right)}{\sin^2 \left( 2\pi d \frac{\varepsilon}{\lambda} \cos \vartheta_0 \right)} d\varepsilon \quad (42)$$

$$= \frac{\lambda^3}{V^2 \sin 2\vartheta_0} |F_{hkl}|^2 \frac{P d Q}{\sin \vartheta_0}.$$



**Abb. 9:** Beleuchtetes Kristallvolumen.

Der Faktor  $\frac{P d Q}{\sin \vartheta_0}$  entspricht dabei gerade dem beleuchteten Kristallvolumen  $\Delta v_Q$  (vgl. Abb. 9). Normiert man die gestreute Intensität auf eine Einheitszelle, dann ist  $\Delta v_Q = V$  und die Bragg-Streuung pro Einheitszelle aus Gl. ( 32 ) wird zu

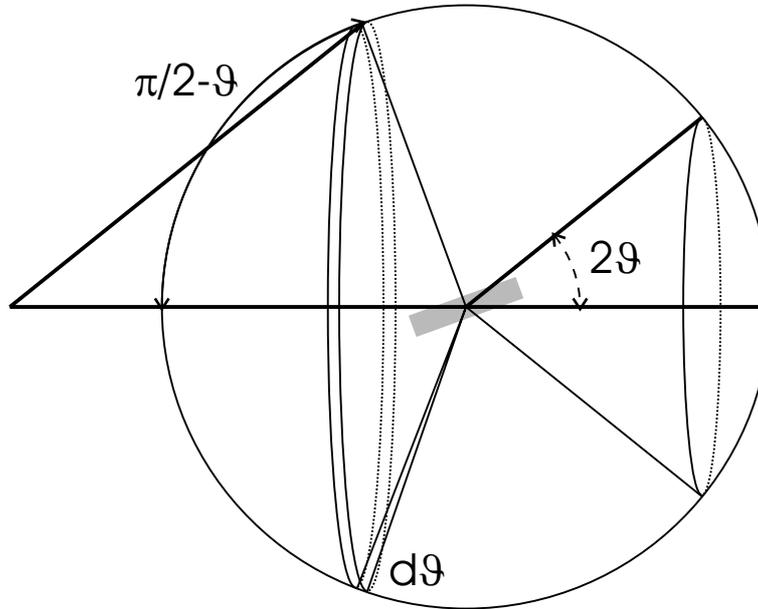
$$R_{hkl} = \frac{\lambda^3}{V \sin 2\vartheta} |F_{hkl}|^2. \quad (43)$$

Zu Beachten ist, daß diese Gleichungen nur für kleine Kristalle richtig sind, bei denen die Absorption vernachlässigbar klein ist. Der Faktor  $\frac{1}{\sin 2\vartheta}$  in Gl. ( 43 ) wird Lorentz-Faktor genannt. Dieser muß allerdings für jede Probengeometrie gesondert berechnet werden. Für polykristalline Proben z.B. muß berücksichtigt werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Kristallit der Probe in Reflexionsstellung steht und welchen Raumwinkel der Detektor abdeckt. Bei einer zufälligen Ausrichtung des Kristalls liegt der Normalenvektor der Streuebenen irgendwo auf einer Kugelschale. Liegt er aber auf einem schmalen Kreisring, dessen Radius proportional zu  $\cos \vartheta$  ist, dann erfüllt der Kristall die Reflexionsbedingung. Sind alle Kristallorientierungen gleich wahrscheinlich, ist die Wahrscheinlichkeit  $W_{\text{Ref}}$ , daß der Kristall für diesen Reflex in Reflexionsstellung steht, gleich dem Flächenverhältnis des Kreisrings zur Kugeloberfläche (vgl. Abb. 10):

$$W_{\text{Ref}} = \frac{2\pi \cos \vartheta d\vartheta}{4\pi} = \frac{1}{2} \cos \vartheta d\vartheta. \quad (44)$$

Die gestreute Strahlung fällt dabei in einen Kreisring, dessen Radius proportional zu  $\sin 2\vartheta$  ist. Pro Raumwinkelelement  $d\Omega$  beträgt die Wahrscheinlichkeit also

$$\frac{W_{\text{Ref}}}{d\Omega} = \frac{\frac{1}{2} \cos \vartheta d\vartheta}{2\pi \sin 2\vartheta} \quad (45)$$



**Abb. 10:** Konstruktion zur Bestimmung des Lorentz-Faktors für Pulverproben. Der Kristall steht für einen bestimmten Reflex in Reflexionsstellung, wenn die Normale der Streuebenen mit dem einfallenden Strahl den Winkel  $\pi/2 - \vartheta$  bildet. Die gestreute Strahlung fällt dann in einen Konus mit dem Öffnungswinkel  $2\vartheta$ .

Die Integration der gestreuten Intensität über  $d\vartheta$  liefert aber genau das Integrale Reflexionsvermögen von Gl. ( 43 ). Damit wird die intermediäre Streufunktion für polykristalline Proben zu

$$\begin{aligned} I(\vec{k}, t) = & \overline{\sum_j f_j^2 e^{-k^2 \langle x_j^2 \rangle} \left( e^{k^2 \langle x_j(0)x_j(t) \rangle} - e^{-k^2 \langle s_j^2 \rangle} \right)} \quad (46) \\ & + \overline{\sum_{j \neq j'} f_j f_{j'} e^{i\vec{k}(\vec{R}_j - \vec{R}_{j'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_j^2 \rangle + \langle x_j^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{j'}^2 \rangle + \langle x_{j'}^2 \rangle)} \left( e^{k^2(\langle s_j s_{j'} \rangle + \langle x_j(0)x_{j'}(t) \rangle)} - 1 \right)} \\ & + \frac{\lambda^3}{8\pi V \sin \vartheta \sin 2\vartheta} \sum |F_{hkl}|^2 \end{aligned}$$

und der Lorentz-Faktor analog zum Lorentz-Faktor für Debye-Scherrer-Aufnahmen zu  $\frac{1}{\sin \vartheta \sin 2\vartheta}$  (Kasper und Lonsdale 1985). Im dritten Term der Gl. ( 46 ) muß über alle Bragg-Reflexe summiert werden, deren Streuvektor die Länge  $|\vec{k}|$  besitzt, da jeder dieser Bragg-Reflexe mit der oben berechneten Wahrscheinlichkeit zur Streuung beiträgt. Die beiden anderen Terme besitzen keine ausgezeichneten Streurichtungen, müssen also über alle Orientierungen gemittelt werden. Die Mittelung ist analytisch nicht möglich, da die einzelnen Auslenkungen der Bewegungsmoden nicht notwendigerweise parallel sind. Sie muß daher numerisch durchgeführt werden. Da die intermediäre Streufunktion bezüglich des Vektors  $\vec{k}$  punktsymmetrisch ist, sind die Ergebnisse für jeweils antiparallele Vektoren gleich. Es genügt also, die Richtung von  $\vec{k}$  über eine Halbkugel zu mitteln.

## 2.4.2 Flüssigkeiten

Da in der Streuprobe auch ein Anteil flüssiger Puffer vorhanden ist, wird im Folgenden kurz auf die Besonderheiten der Flüssigkeitsstreuung eingegangen. Die Berechnung der gestreuten Intensitäten für Flüssigkeiten verläuft ähnlich wie bei Pulverproben. Da aber in Flüssigkeiten die Abstände der einzelnen Moleküle nicht fest sind, wird oft eine radiale Dichtefunktion  $\rho(R)$  eingeführt. Die Anzahl der Moleküle, die sich im Abstandsbereich zwischen  $R$  und  $R + dR$  eines anderen Moleküls befinden, ist somit  $4\pi R^2 \rho(R) dR$ . Mit dem Übergang von den exakten Atompositionen zur Dichtefunktion entfallen die statischen Auslenkungen  $s_j$  und die Summe über die Atome in der intermediären Streufunktion wird zu einem Integral. Bewegen sich die Moleküle mit dem Strukturfaktor  $F$  in der Flüssigkeit unabhängig voneinander mit denselben  $\langle x^2 \rangle$ -Werten, wird die elastische Streuung zu

$$S_{el}(\mathbf{k}) = F_{el}^2 \left( e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} + 4\pi e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \int_0^{\infty} \rho(R) R^2 \frac{\sin(kR)}{kR} dR \right) \quad (47)$$

und die totale Streuung zu

$$S_{\text{tot}}(\mathbf{k}) = F_{\text{tot}}^2 \left( 1 + 4\pi e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \int_0^{\infty} \rho(R) R^2 \frac{\sin(kR)}{kR} dR \right). \quad (48)$$

Die intramolekularen Auslenkungen der Atome müssen bei der Berechnung der Strukturfaktoren für die elastische,  $F_{\text{el}}$ , und die totale,  $F_{\text{tot}}$ , Streuung ebenso berücksichtigt werden, wie die Mittelung über alle Molekülorientierungen. Da sich die radiale Dichte für große  $R$  der mittleren Dichte der Flüssigkeit  $\rho_0$  annähert und damit die Integrale in den beiden Gleichungen nicht konvergieren, ist es üblich,  $\rho(R)$  durch  $(\rho(R) - \rho_0) + \rho_0$  zu ersetzen. Das Integral über die konstante mittlere Dichte  $\int_0^{\infty} \rho_0 R^2 \frac{\sin(kR)}{kR} dR$  liefert nur für sehr kleine Streuvektoren  $\vec{k}$ , die bei makroskopischen Proben und unter Verwendung von Röntgenstrahlen nur um Bruchteile von Winkelsekunden vom Primärstrahl abweichen, einen signifikanten Beitrag zur gestreuten Intensität (z.B. Compton und Allison 1935), so daß dieser Term außer für  $k \cong 0$  vernachlässigt werden kann. Damit gelangt man schließlich zur Formel von Zernike und Prins (1927) für die Streuung von  $\gamma$ -Strahlung an Flüssigkeiten:

$$S_{\text{el}}(\mathbf{k}) = F^2 \left( e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} + 4\pi e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \int_0^{\infty} (\rho(R) - \rho_0) R^2 \frac{\sin(kR)}{kR} dR \right) \quad (49)$$

$$S_{\text{tot}}(\mathbf{k}) = F^2 \left( 1 + 4\pi e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \int_0^{\infty} (\rho(R) - \rho_0) R^2 \frac{\sin(kR)}{kR} dR \right). \quad (50)$$

Umgekehrt kann durch eine Fourier-Transformation aus der gemessenen Streuintensität die radiale Verteilungsfunktion der Flüssigkeit bestimmt werden:

$$4\pi R^2 (\rho(R) - \rho_0) = \frac{2R}{\pi} \int_0^{\infty} k e^{k^2 \langle x^2 \rangle} \left( \frac{S_{\text{tot}}(\mathbf{k})}{F^2} - 1 \right) \sin(kR) dk. \quad (51)$$

## 2.5 Bewegungs-Modelle für die Dynamik in Myoglobin

Die Beschreibung der komplexen dynamischen Vorgänge in der Probe ist nur unter zu Hilfe nahme simpler Bewegungsmodelle möglich. Die einfachste Annahme ist, daß sich jedes Atom in der Probe gleich stark bewegt, d.h. die Bewegungen mit einem einzigen  $\langle x^2 \rangle$ -Wert für jedes Atom zu beschreiben. Aber schon bei diesem einfachen Modell muß unterschieden werden, ob sich die Atome in Phase, also die Probe als Ganzes, oder ob sich die Atome unabhängig voneinander bewegen. Dieser Unterschied spiegelt sich in den Korrelationstermen wieder: Entweder sind die Bewegungen streng korreliert, d.h.  $\langle x_m(0)x_{m'}(0) \rangle = \langle x^2 \rangle$ , oder überhaupt nicht, d.h.  $\langle x_m(0)x_{m'}(0) \rangle = 0$ . Wenn, wie im ersten Fall, alle Streuzentren der Probe gemeinsam vibrieren, ergibt sich nach Champeney und Woodhams (1968) für den elastisch Rayleigh-gestreuten Anteil  $f_{\text{RAY}}$  aus den Gl. ( 27 ) und ( 28 )

$$f_{\text{RAY}} = \frac{S_{\text{el}}(\vec{k})}{S_{\text{tot}}(\vec{k})} = e^{-k^2 \langle x^2 \rangle}. \quad ( 52 )$$

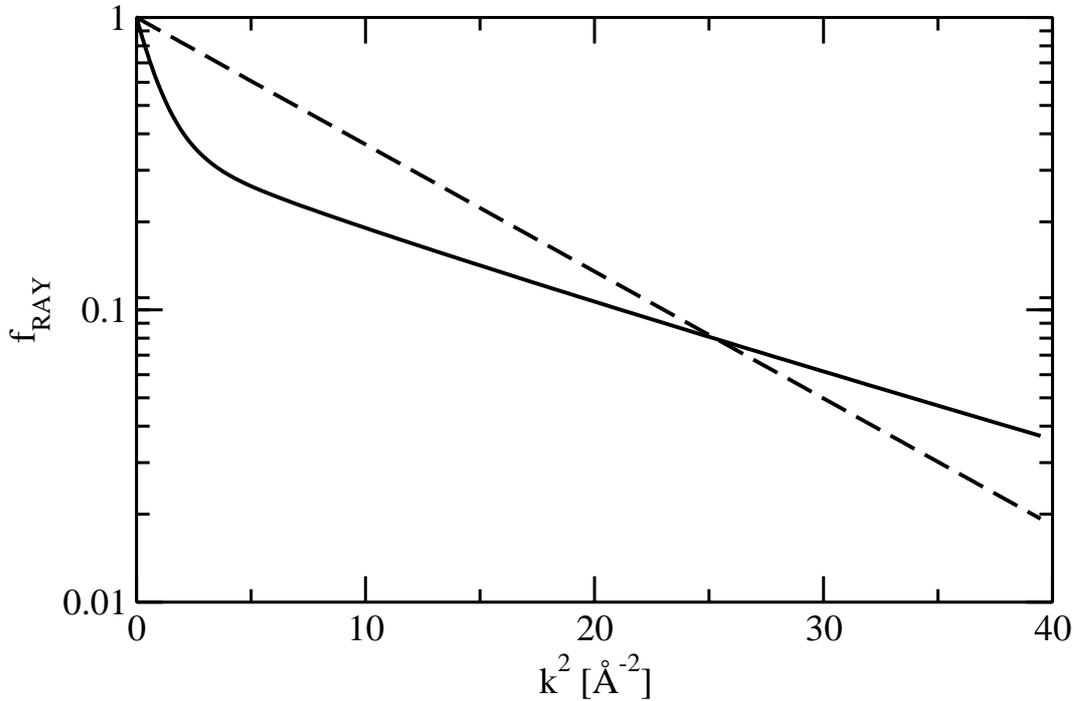
Bewegen sich die Atome dagegen unabhängig voneinander, dann unterscheidet sich die totale von der elastischen Streuung nur im Selbstterm, so daß gilt (Champeney und Dean 1975):

$$f_{\text{RAY}} = \frac{S_{\text{el}}(\vec{k})}{S_{\text{tot}}(\vec{k})} = \frac{e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \sum_j f_j^2 + S_{\text{tot}}(\vec{k}) - 1 \sum_j f_j^2}{S_{\text{tot}}(\vec{k})}. \quad ( 53 )$$

Für große Streuwinkel geht Gl. ( 53 ) in Gl. ( 52 ) über, da der Paarterm in der Streufunktion für große Streuvektoren  $\vec{k}$  verschwindet. Für die inkohärente Streuung, bei der der Paarterm nicht existiert, führen beide Annahmen zum Ergebnis von Gl. ( 52 ).

Sind dagegen die mittleren quadratischen Auslenkungen der Atome verschieden, dann weicht selbst der inkohärent berechnete elastisch gestreute Anteil von der einfachen exponentiellen Abnahme ab (vgl. Abb. 11), auch wenn die Streustärke jedes Atoms als gleich angenommen wird.

$$f_{\text{RAY}} = \frac{\sum_j f_j^2 e^{-k^2 \langle x_j^2 \rangle}}{\sum_j f_j^2} = \frac{\sum_j e^{-k^2 \langle x_j^2 \rangle}}{\sum_j 1} \quad (54)$$



**Abb. 11:** Durchgezogene Linie: inkohärente Auswertung mit zwei  $\langle x^2 \rangle$ -Werten.  $\langle x_{\text{Puffer}}^2 \rangle = 1 \text{ \AA}^2$ ,  $\langle x_{\text{Mb}}^2 \rangle = 0.054 \text{ \AA}^2$ , Gestrichelte Linie:  $\langle x^2 \rangle = 0.1 \text{ \AA}^2$ .

### 2.5.1 Normal-Moden

Eine Möglichkeit, eine Annahme über die unterschiedlichen Auslenkungen der Atome und deren Korrelationen zu treffen, bietet eine Normal-Moden-Analyse. Dabei werden die Kräfte zwischen den Atomen, wie z.B. kovalente Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Potentiale und Van der Waals-Bindungen, durch eine harmonische Näherung beschrieben und nach einer Energieminimierung des Systems dessen Eigenschwingungen bestimmt. Bei  $J$  Atomen und damit  $3J$  Freiheitsgraden erhält man abzüglich der Translations- und Rotationsbewegungen  $3J - 6$  Normal-Moden, die jeweils für jedes Atom Richtung und Amplitude der Bewegung festlegen. Innerhalb einer Mode sind die Bewegungen aller Atome in Phase und somit korreliert. Die mittlere quadratische Auslenkung jedes Atoms  $j$  setzt sich aus den  $m = 3J - 6$  Normal-Moden zusammen, die an dieses Atom angreifen. Da die einzelnen Normalmoden voneinander unabhängig sind, gilt:

$$\begin{aligned}
\langle (\vec{k}\bar{x}_j)^2 \rangle &= \langle \left( \sum_m \vec{k}\bar{x}_{jm} \right)^2 \rangle & (55) \\
&= \left\langle \left( \sum_m \begin{pmatrix} k_x & k_y & k_z \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_{jm} \\ y_{jm} \\ z_{jm} \end{pmatrix} \right)^2 \right\rangle \\
&= \sum_{m,m'} \left( k_x^2 \langle x_{jm} x_{jm'} \rangle + k_y^2 \langle y_{jm} y_{jm'} \rangle + k_z^2 \langle z_{jm} z_{jm'} \rangle \right. \\
&\quad \left. + k_x k_y (\langle x_{jm} y_{jm'} \rangle + \langle x_{jm'} y_{jm} \rangle) \right. \\
&\quad \left. + k_x k_z (\langle x_{jm} z_{jm'} \rangle + \langle x_{jm'} z_{jm} \rangle) \right. \\
&\quad \left. + k_y k_z (\langle y_{jm} z_{jm'} \rangle + \langle y_{jm'} z_{jm} \rangle) \right) \\
&= \sum_m \left( k_x^2 \langle x_{jm}^2 \rangle + k_y^2 \langle y_{jm}^2 \rangle + k_z^2 \langle z_{jm}^2 \rangle \right. \\
&\quad \left. + 2k_x k_y \langle x_{jm} y_{jm} \rangle + 2k_x k_z \langle x_{jm} z_{jm} \rangle + 2k_y k_z \langle y_{jm} z_{jm} \rangle \right) \\
&= k_x^2 \sum_m \langle x_{jm}^2 \rangle + k_y^2 \sum_m \langle y_{jm}^2 \rangle + k_z^2 \sum_m \langle z_{jm}^2 \rangle \\
&\quad + 2k_x k_y \sum_m \langle x_{jm} y_{jm} \rangle + 2k_x k_z \sum_m \langle x_{jm} z_{jm} \rangle + 2k_y k_z \sum_m \langle y_{jm} z_{jm} \rangle \\
&= \sum_m \langle (\vec{k}\bar{x}_{jm})^2 \rangle
\end{aligned}$$

und:

$$\begin{aligned}
\langle (\vec{k}\bar{x}_j)(\vec{k}\bar{x}_{j'}) \rangle &= \left\langle \left( \sum_m \vec{k}\bar{x}_{jm} \right) \left( \sum_{m'} \vec{k}\bar{x}_{j'm'} \right) \right\rangle & (56) \\
&= \sum_m \langle (\vec{k}\bar{x}_{jm})(\vec{k}\bar{x}_{j'm}) \rangle \\
&= \sum_m \left( k_x^2 \langle x_{jm} x_{j'm} \rangle + k_y^2 \langle y_{jm} y_{j'm} \rangle + k_z^2 \langle z_{jm} z_{j'm} \rangle \right. \\
&\quad \left. + k_x k_y (\langle x_{jm} y_{j'm} \rangle + \langle x_{j'm} y_{jm} \rangle) \right. \\
&\quad \left. + k_x k_z (\langle x_{jm} z_{j'm} \rangle + \langle x_{j'm} z_{jm} \rangle) \right. \\
&\quad \left. + k_y k_z (\langle y_{jm} z_{j'm} \rangle + \langle y_{j'm} z_{jm} \rangle) \right) \\
&= k_x^2 \sum_m \langle x_{jm} x_{j'm} \rangle + k_y^2 \sum_m \langle y_{jm} y_{j'm} \rangle + k_z^2 \sum_m \langle z_{jm} z_{j'm} \rangle \\
&\quad + k_x k_y \sum_m (\langle x_{jm} y_{j'm} \rangle + \langle x_{j'm} y_{jm} \rangle) \\
&\quad + k_x k_z \sum_m (\langle x_{jm} z_{j'm} \rangle + \langle x_{j'm} z_{jm} \rangle) \\
&\quad + k_y k_z \sum_m (\langle y_{jm} z_{j'm} \rangle + \langle y_{j'm} z_{jm} \rangle)
\end{aligned}$$

Hierbei fallen alle Kreuzterme über verschiedene Moden weg, so daß die Beiträge der einzelnen Normal-Moden getrennt berechnet und aufsummiert werden können. Allerdings geben die Normal-Moden nur den stationären Fall stehender Wellen wieder, so daß eine Ausbreitung der Phononen nicht berücksichtigt wird. Auch werden in der Praxis die Normal-Moden nur für ein einzelnes Molekül berechnet, wodurch die Anzahl der möglichen Moden eingeschränkt ist. Für die optischen Phononen, deren Dispersionsrelation weitgehend unabhängig von ihrem Pseudoimpuls ist, so daß sie durch einen Einsteinoszillator angenähert werden können, sind diese Einschränkungen kaum von Bedeutung. Mit der Beschränkung auf ein einzelnes Molekül verschwinden bei Abwesenheit von äußeren Kräften die Translations- und Rotations-Moden des Moleküls, so daß diese demnach ebensowenig mit den Normal-Moden beschrieben werden können wie die akustischen Phononen im Kristall.

## 2.5.2 TLS-Modell

Das TLS-Modell – TLS steht für Translations-, Rotations- und Schraubenbewegungen – wurde von Cruickshank (1956) zur Bestimmung anisotroper B-Faktoren in der Röntgenkristallographie entwickelt. Es beschreibt die Bewegungen der Atome im Kristall, indem das ganze Molekül als starrer Körper angenommen wird, der um seinen Schwerpunkt Translations- und Rotationsschwingungen ausführt. Die Weiterentwicklung des Modells von Schomaker und Trueblood (1968) um die Schraubenbewegungen trägt der Tatsache Rechnung, daß die Rotationsbewegungen nicht unbedingt um den Schwerpunkt des Moleküls erfolgen müssen. Die Schraubenbewegungen beinhalten keinerlei neue Freiheitsgrade, sondern sind Kopplungsparameter zwischen den Translations- und Rotationsbewegungen. Da sich bei diesen Bewegungen das Molekül als Ganzes bewegt, sind die Auslenkungen der Atome wiederum miteinander korreliert. Stellt man die Auslenkung des Atoms  $j$  durch eine  $3 \times 3$  Matrix  $U_j$  dar, so daß  $\langle (\vec{k}\vec{x}_j)^2 \rangle = \vec{k}^t U_j \vec{k}$ , lassen sich die TLS-Auslenkungen durch die 21 freien Parameter einer symmetrischen  $6 \times 6$  Matrix beschreiben (Kidera und Go 1992):

$$\Sigma = \begin{pmatrix} t_{11} & t_{12} & t_{13} & s_{11} & s_{12} & s_{13} \\ t_{12} & t_{22} & t_{23} & s_{21} & s_{22} & s_{23} \\ t_{13} & t_{23} & t_{33} & s_{31} & s_{32} & s_{33} \\ s_{11} & s_{21} & s_{31} & l_{11} & l_{12} & l_{13} \\ s_{12} & s_{22} & s_{32} & l_{12} & l_{22} & l_{23} \\ s_{13} & s_{23} & s_{33} & l_{13} & l_{23} & l_{33} \end{pmatrix}. \quad (57)$$

Mit der Matrix

$$\Phi_j = \begin{pmatrix} c_t & 0 & 0 & 0 & c_y z_j & -c_z y_j \\ 0 & c_t & 0 & -c_x z_j & 0 & c_z x_j \\ 0 & 0 & c_t & c_x y_j & -c_y x_j & 0 \end{pmatrix}, \quad (58)$$

den Atomkoordinaten  $\vec{R}_j = \begin{pmatrix} x_j \\ y_j \\ z_j \end{pmatrix}$  und den Normierungskonstanten

$$\begin{aligned} c_t &= \left( \sum_j m_j \right)^{-\frac{1}{2}} \\ c_x &= \left( \sum_j m_j (z_j^2 + y_j^2) \right)^{-\frac{1}{2}} \\ c_y &= \left( \sum_j m_j (z_j^2 + x_j^2) \right)^{-\frac{1}{2}} \\ c_z &= \left( \sum_j m_j (y_j^2 + x_j^2) \right)^{-\frac{1}{2}} \end{aligned} \quad (59)$$

gilt:

$$U_j = \Phi_j \Sigma (\Phi_j)^t. \quad (60)$$

Die Korrelationen in den Auslenkungen ergeben sich, indem in Gl. ( 60 ) eine der Matrizen  $\Phi_j$  durch  $\Phi_{j'}$ , ihr Analogon für das  $j'$ -te Atom, ersetzt wird. Da die Matrix  $\Sigma$  symmetrisch ist, ist auch  $\vec{k}^t U_{jj'} \vec{k} = \vec{k}^t U_{j'j} \vec{k} = \vec{k}^t \Phi_{j'} \Sigma (\Phi_j)^t \vec{k}$  und folglich:

$$\langle (\vec{k}(\vec{x}_j - \vec{x}_{j'}))^2 \rangle = \vec{k}^t U_j \vec{k} + \vec{k}^t U_{j'} \vec{k} - 2\vec{k}^t U_{jj'} \vec{k} . \quad (61)$$

### 2.5.3 Akustische Phononen

Bisher wurden nur solche Auslenkungen der Atome aus ihrer mittleren Position betrachtet, die innerhalb eines Moleküls korreliert sind. Erstrecken sich die Korrelationen aber über die Einheitszellengrenzen hinweg, wie es z.B. bei akustischen Phononen der Fall ist, dann führt dies zu aus den Bragg-Reflexen herausgestreuter Intensität. Das wird im Folgenden am Beispiel eines Phonons demonstriert. Akustische Phononen sind harmonische Gitterschwingungen, deren Wellenlänge ein Vielfaches der Gitterkonstanten beträgt, so daß die Auslenkungen meist die Moleküle als Ganzes betreffen. Langwellige akustische Phononen können daher auch als korrelierte TLS-Moden aufgefaßt werden. Ein akustisches Phonon mit Amplitude  $\vec{A}$ , Frequenz  $\Omega$ , Wellenlänge  $\Lambda$  und Wellenvektor  $\vec{K}$  mit  $|\vec{K}| = \frac{2\pi}{\Lambda}$  verursacht am Ort  $\vec{r}_n$  die Auslenkung

$$\vec{x}_n(t) = \vec{A} \cos(\Omega t - \vec{K} \vec{r}_n) \quad (62)$$

des Kristallgitters. Für die elastische Streuung verschwindet, jegliche Korrelation zwischen den Auslenkungen, so daß der Mittelwert über die quadrierte Cosinusfunktion gleich dem halben Amplitudenquadrat ist.

$$\langle (\vec{k}(\vec{x}_n(0) - \vec{x}_n(t)))^2 \rangle = \langle (\vec{k} \vec{x}_n)^2 \rangle + \langle (\vec{k} \vec{x}_n')^2 \rangle = (\vec{k} \vec{A})^2 \quad (63)$$

Bei der totalen Streuung,  $t \rightarrow 0$ , sind die Auslenkungen miteinander in Phase. Mit dem zusätzlichen Korrelationsterm, dem Produkt zweier Cosinusfunktionen

$\cos\alpha \cdot \cos\beta = \frac{1}{2}(\cos(\alpha+\beta) + \cos(\alpha-\beta))$ , ergeben die mittleren quadratischen Auslenkungen im Mittelwert

$$\langle (\vec{k}(\bar{x}_n(0) - \bar{x}_{n'}(0)))^2 \rangle = (\vec{k}\bar{A})^2 (1 - \cos(\vec{K}(\bar{r}_n - \bar{r}_{n'}))) \quad (64)$$

Entwickelt man nun die Exponentialfunktion für kleine Werte von  $(\vec{k}\bar{A})^2$

$$e^{-\frac{1}{2}\langle (\vec{k}(\bar{x}_n(0) - \bar{x}_{n'}(0)))^2 \rangle} = e^{-\frac{1}{2}(\vec{k}\bar{A})^2} \left( 1 + \frac{1}{2}(\vec{k}\bar{A})^2 \cos(\vec{K}(\bar{r}_n - \bar{r}_{n'})) + \dots \right) \quad (65)$$

und benutzt  $e^{i\alpha} \cos\beta = \frac{1}{2}(e^{i(\alpha+\beta)} + e^{i(\alpha-\beta)})$ , so folgt für die totale Streuung der Bragg-Reflexe mit dem Strukturfaktor  $F(\vec{k})$  der Einheitszelle:

$$S_{\text{tot}}(\vec{k}) = e^{-\frac{1}{2}(\vec{k}\bar{A})^2} |F(\vec{k})|^2 \sum_{n,n'} e^{i\vec{k}(\bar{r}_n - \bar{r}_{n'})} \quad (66)$$

$$+ \frac{1}{4}(\vec{k}\bar{A})^2 e^{-\frac{1}{2}(\vec{k}\bar{A})^2} |F(\vec{k} \pm \vec{K})|^2 \left( \sum_{n,n'} e^{i(\vec{k}+\vec{K})(\bar{r}_n - \bar{r}_{n'})} + \sum_{n,n'} e^{i(\vec{k}-\vec{K})(\bar{r}_n - \bar{r}_{n'})} \right).$$

Während der erste Term die um den Faktor  $e^{-\frac{1}{2}(\vec{k}\bar{A})^2}$  verminderte Bragg-Streuung ergibt (Debye 1914), liefert der zweite Term Satelliten-Reflexe, die um den Wellenvektor  $\pm\vec{K}$  des Phonons neben dem eigentlichen Reflex liegen. Ihre Intensität ist um den Faktor  $\frac{1}{4}(\vec{k}\bar{A})^2$ , der sehr viel kleiner als Eins ist – dies ist die Entwicklungsbedingung für Gl. (65) –, gegenüber dem Hauptreflex vermindert. Für große Phononenwellenlängen, für die man annehmen kann, daß sich die Einheitszellen als Ganzes bewegen, und für die der Messung zugänglichen Streuwinkel ist  $\vec{K} \ll \vec{k}$  und damit  $F(\vec{k}) \approx F(\vec{k} \pm \vec{K})$ . Die Intensität der Satelliten-Reflexe ist demnach proportional zur Intensität des dazugehörigen Bragg-Reflexes. Das Auftreten der Satelliten-Reflexe kann man sich auch bildlich vorstellen, da Phononen großer Wellenlängen periodisch die Gitterkonstanten des Kristalls verändern und es dadurch zu leicht veränderten Reflexionsbedingungen kommt. Im Mittel bleibt dabei natürlich die Gleichgewichtsgitterkonstante erhalten, so daß der zentrale Bragg-Reflex nicht völlig verschwindet sondern nur in seiner Intensität gemindert wird. Da aber der Pseudoimpuls  $\vec{K}$  in

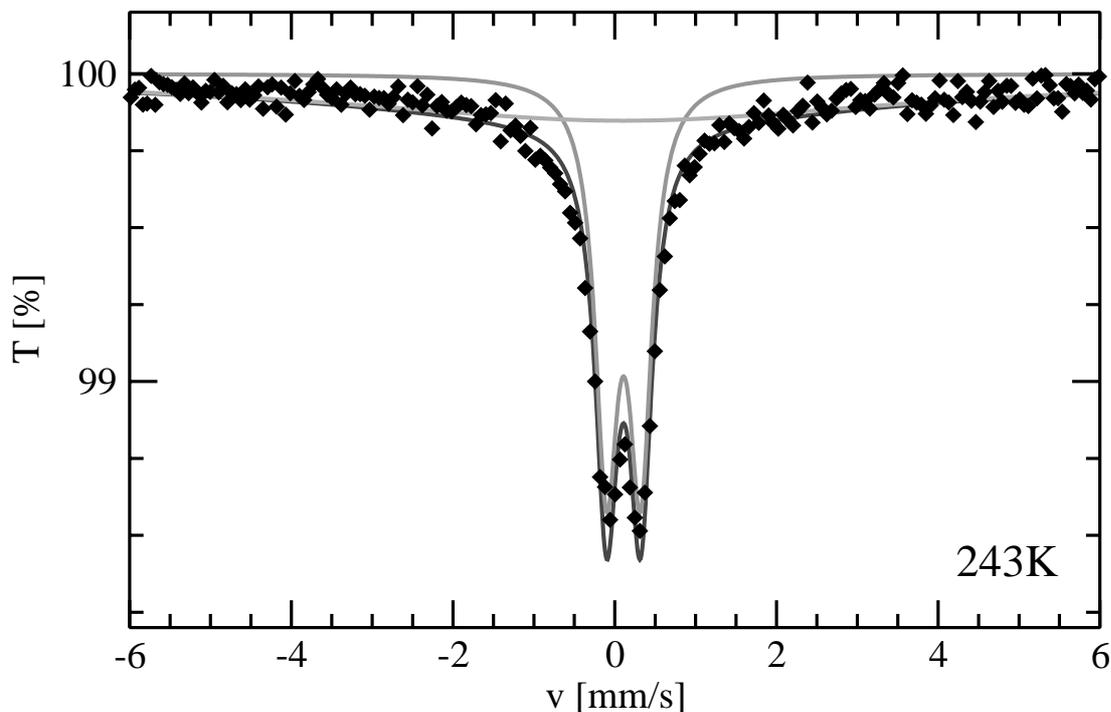
einem großen Kristall mit der Gitterkonstanten  $a$  beinahe kontinuierlich die Werte zwischen  $-\frac{\pi}{a}$  und  $\frac{\pi}{a}$  annehmen kann, erhält man in der Praxis eine kontinuierliche Verteilung aus dem Bragg-Reflex herausgestreuter Intensität (Waller 1923), die mit zunehmender Entfernung von diesem abnimmt. Dies ist einsichtig, da für die akustischen Phononen das Debye-Modell eine praktikable Näherung ist. In diesem Modell ist die Schallgeschwindigkeit  $v$  konstant, so daß für ein akustisches Phonon  $\Omega = vK$  gilt (Born und Kármán 1912). Mit der mittleren Energie  $\bar{E} = m\bar{\dot{x}}^2$  des Phonons,  $\dot{x} = -A\Omega \sin(\Omega t - \vec{K}\vec{r})$  und der Besetzungswahrscheinlichkeit  $n = \frac{1}{e^{\frac{\hbar\Omega}{k_B T}} - 1} + \frac{1}{2}$  des Phonons mit der Energie  $\hbar\Omega$  bei der Temperatur  $T$  folgt, daß das mittlere Amplitudenquadrat  $\bar{A}^2$  umgekehrt proportional zum Quadrat der Phononfrequenz (vgl. z.B. Achterhold (1995)) oder bei konstanter Schallgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Quadrat des Pseudoimpulses des Phonons ist.

$$\begin{aligned} \bar{A}^2 &\propto \frac{n\bar{E}}{\Omega^2} = \frac{\hbar}{\Omega} \coth\left(\frac{\hbar\Omega}{2k_B T}\right) \\ &\propto \frac{1}{\Omega^2} \propto \frac{1}{K^2} \end{aligned} \quad (67)$$

Je größer der Pseudoimpuls des akustischen Phonons ist und je weiter also die Satellitenreflexe vom Bragg-Reflex entfernt sind, desto geringer ist die Schwingungsamplitude dieses Phonons und damit auch die aus dem Bragg-Reflex herausgestreute Intensität. Da außerdem der Pseudoimpuls des Phonons in der ersten Brillouin-Zone liegen muß  $|\vec{K}| \leq \frac{\pi}{a}$ , sieht man, daß die aus dem Bragg-Reflex herausgestreute Intensität um diesen herum konzentriert und von diesem im reziproken Raum nicht weiter entfernt ist als der nächste reguläre Reflex. Bei der Auswertung der Debye-Scherrer-Ringe von Pulverproben wird die gestreute Intensität über einen Streuwinkelbereich hinweg integriert. Ist dieser Winkelbereich so groß, daß in ihm mehrere Reflexe liegen, wird in guter Näherung sowohl die Intensität des Reflexes selbst als auch die aus ihm herausgestreute Intensität aufsummiert. Akustische Phononen beeinflussen in dieser Art der Auswertung also trotz ihres Korrelationsterms nicht die gemessene total gestreute Intensität.

## 2.5.4 Brown'scher Oszillator

Die bisher vorgestellten Modelle behandeln ausschließlich die durch Phononen hervorgerufene Dynamik. Diese weist im klassischen Grenzfall eine lineare Abhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkungen mit der Temperatur auf. Bei Proteinen beobachtet man aber ab einer gewissen Temperatur, die etwa zwischen 180 K und 200 K liegt, eine Abweichung von diesem linearen Zusammenhang (Parak und Formanek 1971; Frauenfelder et al. 1979; Parak et al. 1980). Im Mößbauer-Spektrum zeigt sich dies durch eine Abnahme der scharfen Resonanz-Linien und durch das Auftreten zusätzlicher breiter Linien (Parak et al. 1982), wie sie z.B. bei der Diffusion der Mößbauer-Kerne beobachtbar sind (vgl. Abb. 12). Diese Bewegungsmoden werden als proteinspezifische quasi diffusive Moden bezeichnet und als Übergänge zwischen einzelnen Konformationssubzuständen interpretiert.



**Abb. 12:** Mößbauer-Spektrum von CO-Myoglobin bei 243 K aus (Parak et al. 1999). Rauten: Meßpunkte, Linien: Anpassung mit dem Brown'schen Oszillator-Modell.

Das Auftreten der breiten Linien bedeutet, daß die Energie dieser Bewegungen in derselben Größenordnung wie die Energieauflösung der Mößbauer-Spektroskopie liegt, oder im Zeitraum betrachtet, daß die Bewegungen auf einer Zeitskala ablaufen, die der Lebensdauer des angeregten Mößbauer-Niveaus entspricht. Da die Atome eines Proteins nicht wirklich diffundieren können, sondern das Protein immer seine mittlere Struktur behält – es sei denn es

denaturiert – wurde das Modell des Brown'schen Oszillators (Uhlenbeck und Ornstein 1930; Chandrasekhar 1943), das eine Diffusion auf begrenztem Raum darstellt, zur Erklärung der proteinspezifischen Bewegungen eingeführt (Knapp et al. 1982; Parak et al. 1982). Dazu wird der Langevin-Gleichung für Brown'sche Bewegungen eine zusätzliche harmonische, rücktreibende Kraft  $\omega_t^2 x_t(t)$  hinzugefügt, so daß mit einer stochastischen, zeitlich variierenden Kraft  $F(t)$ ,  $\langle F(t) \rangle = 0$ , und der Dämpfungskonstanten  $\beta_t$  die Bewegungsgleichung für den harmonischen Brown'schen Oszillator zu

$$\ddot{x}_t(t) + 2\beta_t \dot{x}_t(t) + \omega_t^2 x_t(t) = F(t) \quad (68)$$

wird. Nach Wang und Uhlenbeck (1945) ist die Selbstkorrelationsfunktion für diesen Ansatz

$$\langle x_t(0)x_t(t) \rangle = \langle x_t^2 \rangle e^{-\beta_t t} \left( \cosh(\beta'_t t) + \frac{\beta_t}{\beta'_t} \sinh(\beta'_t t) \right) \quad (69)$$

mit

$$\beta_t'^2 = \beta_t^2 - \omega_t^2. \quad (70)$$

Um die breiten Linien in den Mößbauer-Spektren zu erklären, kommt nur der stark überdämpfte Brown'sche Oszillator mit  $\beta_t \gg \omega_t$  in Frage (Knapp et al. 1983). Im Grenzfall einer verschwindenden rücktreibenden Kraft gelangt man schließlich zur freien Diffusion. Mit einer Entwicklung der Exponentialfunktion  $e^{-\frac{1}{2}k^2 \langle (x_t(0) - x_t(t))^2 \rangle}$  erhält man für den resonanten Absorptionswirkungsquerschnitt  $\sigma_r(\omega, \omega_r)$  im überdämpften Fall eine unendliche Summe von Lorentz-Linien mit zunehmender Breite und für die freie Diffusion mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  eine einzige Linie der Breite  $\Gamma + 2k^2 D$ .

$$\sigma_r(\omega, \omega_r) = e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(k^2 \langle x_t^2 \rangle)^n}{n!} \frac{\frac{\Gamma}{2} \left( \frac{\Gamma}{2} + k^2 D + n\alpha_t \right)}{(\omega - \omega_r)^2 + \left( \frac{\Gamma}{2} + k^2 D + n\alpha_t \right)^2} \quad (71)$$

Der Brown'sche Oszillator wird also mit zwei Parametern beschrieben, dem mittleren  $\langle x_t^2 \rangle$  der Brown'schen Bewegung und dem Parameter  $\alpha_t = \frac{\omega_t^2}{2\beta_t}$ . Für  $n=0$  ergibt sich dabei die schmale Absorptionslinie ohne Brown'sche Bewegungen mit der natürlichen Breite  $\Gamma$ . Oftmals kann in einer guten Näherung die Summe der breiten Linien durch eine einzige breite Lorentz-Linie ersetzt werden (Nowik et al. 1985). Zu bemerken ist, daß die Intensität der breiten Linien stark vom Quadrat des Impulsübertrags  $\hbar k$  abhängt.

Bei der Auswertung des elastisch gestreuten Anteils für die RSMR-Experimente wird die Faltung der Energieverteilung der Quelle mit der Energieänderung beim Streuprozess berechnet, bevor die Faltung mit dem Absorptionsspektrum des Schwarzen Absorbers stattfindet. Das Ergebnis der ersten Faltung ist demnach gleichbedeutend mit dem Fall, daß die Brown'sche Bewegung in der Quelle und nicht im Absorber auftritt, und daher proportional zu Gl. ( 71 ). Die Schwächung der gestreuten Intensität um den Faktor  $e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle}$  betrifft alle Atome, die an der proteinspezifischen Bewegung teilnehmen. Das Auftreten der breiten Linien dagegen kommt durch die zeitliche Korrelation in den Brown'schen Bewegungen zustande. Da die Brown'schen Bewegungen verschiedener Moleküle nicht miteinander korreliert sind, betrifft die Linienverbreiterung für eine Kristallprobe nur den Selbst- und den Paarterm der diffusen Streuung (vgl. Gl. ( 32 )). Auch der Paarterm erzeugt nur dann breite Linien, wenn alle Atome des Proteinmoleküls korreliert dieselbe Bewegung ausführen. Dies ist für die proteinspezifische Bewegung teilweise erfüllt, da die Konformationsübergänge die Umlagerung großer Proteinteile bedingen.

### 2.5.5 Diffusion

Bei der Berechnung der Streuintensitäten von diffundierenden Flüssigkeiten muß ebenfalls die Energieauflösung der Meßapparatur berücksichtigt werden, da bei freier Diffusion nur in Vorwärtsrichtung eine elastische Streuung möglich ist, in Streurichtung dagegen nur eine quasi elastische Streuung (Singwi und Sjölander 1960a). Zur Berechnung der Diffusion in Flüssigkeiten wird von der Faltungsnäherung gebrauch gemacht (Vineyard 1958). Dabei geht man davon aus, daß sich die Selbstdiffusion eines einzelnen Teilchens analog auf den Paarterm übertragen läßt, d.h. der Paarterm der van Hove'schen Paarverteilungsfunktion

$G_d(\vec{r}, t)$  kann durch eine Faltung des Selbstterms  $G_s(\vec{r}, t)$  mit dem statischen Paarterm  $G_d(\vec{r}, 0)$  dargestellt werden.

$$G(\vec{r}, t) \equiv G_s(\vec{r}, t) + \int G_d(\vec{r}', 0) G_s(\vec{r} - \vec{r}', t) d\vec{r}' \quad (72)$$

In der dynamischen Streufunktion wird das Integral in Gl. ( 72 ) nach dem Faltungstheorem der Fourier-Transformation zu einer Multiplikation. Bei der Interpretation der Korrelationen bedeutet das, daß sich die Atome der Flüssigkeit gemeinsam bewegen. Auf kurzen Distanzen ist dies sicher richtig, da sich ein diffundierendes Atom Platz schaffen muß. Bei großen Abständen geht der Paarterm gegen Null (vgl. Gl. ( 49 ) u. ( 50 )) und damit auch der Fehler in der Faltungsnäherung. Neben den Modellen der kontinuierlichen Diffusion (Vineyard 1958) und der Sprungdiffusion (Singwi und Sjölander 1960a) kann die Diffusion auch mit dem Brown'schen Oszillator beschrieben werden (Rahman et al. 1962b; Nowik et al. 1985). Im überdämpften Fall wird die Faltung der Quellfunktion mit der dynamischen Streufunktion zu (Nowik et al. 1983):

$$S(k, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-i(\omega - \omega_0)t - \frac{1}{2}\Gamma|t|) \exp\left(-\frac{k^2 D}{\alpha_t} (1 - e^{-\alpha_t|t|})\right) dt. \quad (73)$$

In dieser Darstellung sieht man die Flexibilität des Modells, das je nach Wahl der Parameter  $D$  und  $\alpha_t$  einen kontinuierlichen Übergang von der freien Diffusion, für  $\alpha_t \rightarrow 0$ , zur Diffusion auf begrenztem Raum erlaubt. Durch eine Entwicklung der Exponentialfunktion  $e^{-\alpha_t|t|}$  und mit  $\langle x_t^2 \rangle = \frac{D}{\alpha_t}$  gelangt man zu dem im Kapitel 2.5.4 beschriebenen Ergebnis,

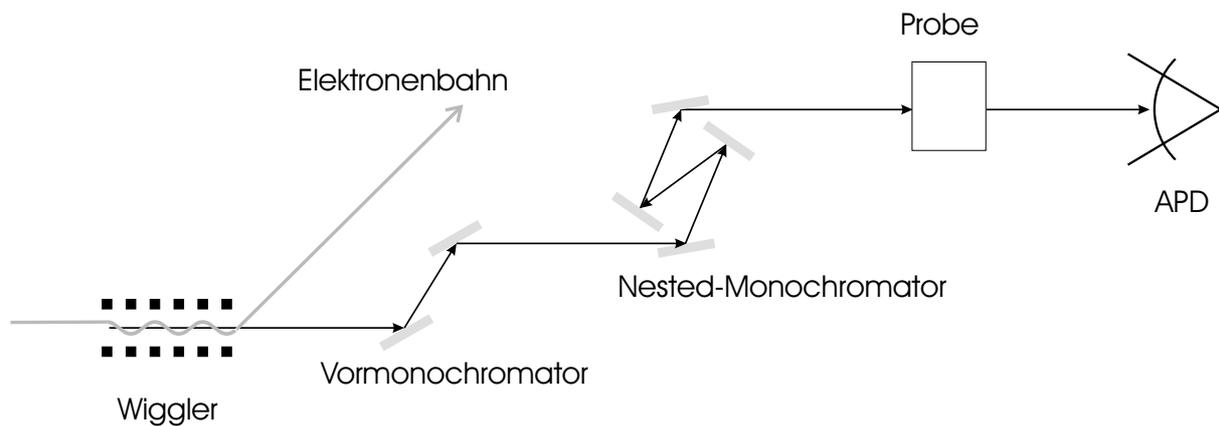
einer unendlichen Summe von breiter werdenden Lorentz-Linien. Für Werte von  $\alpha_t$ , die im Vergleich zur Lebensdauer des angeregten Mößbauer-Niveaus, der charakteristischen Zeit des Mößbauer-Effekts, groß sind, geht die Exponentialfunktion  $e^{-\alpha_t|t|}$  gegen Null, so daß nur die um den Faktor  $e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle}$  geschwächte natürliche Lorentz-Linie im Spektrum zu beobachten ist. Die zusätzlichen Linien sind so breit, daß sie sich im Spektrum nicht mehr abzeichnen. Im Vergleich mit dem Sprungdiffusions-Modell auf begrenztem Raum entspricht der Parameter  $\alpha_t$  des Brown'schen Oszillators, dessen Inverses  $\alpha^{-1} = \tau_c$  die Relaxationszeit des Ortsmittelwertes  $\langle x \rangle = x_0 e^{-t/\tau_c}$  ist (Uhlenbeck und Ornstein 1930), gerade der Sprungrate

oder eben der mittleren Wartezeit zwischen zwei Sprüngen (Shaitan und Rubin 1980). Ein von Null verschiedener Wert für  $\alpha_1$  widerspricht nicht dem Bild der Diffusion in kleinen Flüssigkeitstropfen, solange die Dämpfung so groß ist, daß keine wirklichen Schwingungen stattfinden, solange also der überdämpfte Fall gültig ist. Gerade in polaren oder ionischen Flüssigkeiten scheint eine rücktreibende Kraft auf Grund der gegenseitigen Anziehung der Moleküle sinnvoll. In kleinen Flüssigkeitstropfen findet zudem eine Einschränkung des Bewegungsraumes durch die Oberflächenspannungen statt.

## 3 Meßapparaturen

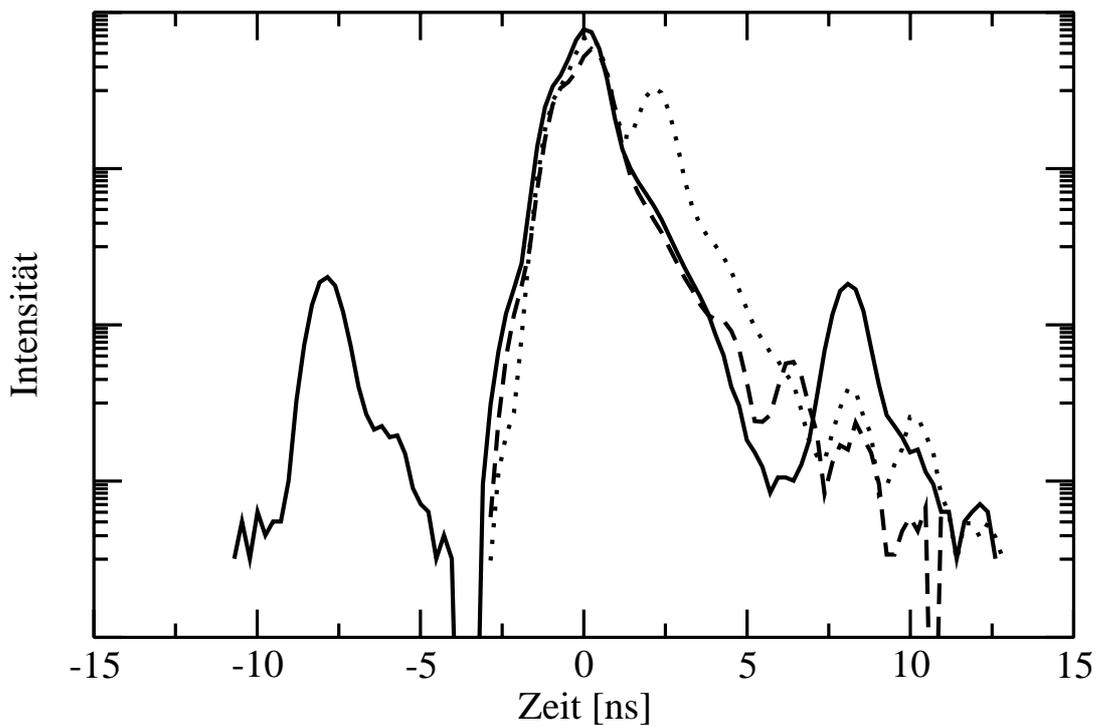
### 3.1 Nukleare Vorwärtsstreuung

Die Messungen der nuklearen Vorwärtsstreuung an Deoxy-Myoglobin wurden am Deutschen Synchrotron DESY in Hamburg am Meßplatz BW4 durchgeführt. Mittels Ablenkmagneten werden Elektronen, die sich beinahe mit Lichtgeschwindigkeit bewegen, im Speicherring auf einer geschlossenen Bahn gehalten. Um die bei der Beschleunigung der Elektronen emittierte Röntgenstrahlung optimal auszunutzen durchfliegen sie in der Nähe des Meßplatzes eine Anordnung von Ablenkmagneten, den Wiggler. Aus dem abgestrahlten Röntgenspektrum, das tangential entlang der Flugbahn der Elektronen emittiert wird, filtert ein Monochromatorsystem, bestehend aus einem Vormonochromator und einem „Nest“-Monochromator (vgl. Ishikawa et al. 1992 Abb. 7), die Strahlung des  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Übergangs mit einer Energie von  $E = 14.413 \text{ keV}$  und einer energetischen Breite von einigen meV heraus. Die Monochromatisierung der Röntgenstrahlung auf den interessierenden Energiebereich ist erforderlich, da die hohe Intensität der Synchrotronstrahlung durch Sättigungseffekte in den Detektoren und der Zähl elektronik die Zeitauflösung der Messung herabsetzt. Die monochromatische Strahlung wird hinter der Meßprobe in Transmissionsgeometrie von bis zu drei hintereinander angebrachten „Avalanche“-Photodioden detektiert (vgl. Baron 1995). Mit der Hintereinanderanordnung der Dioden wird deren Effizienz in der Quantenausbeute gesteigert. Die Photodioden besitzen eine Zeitauflösung von etwa 1 ns, mit der die von der Probe vorwärts gestreute Intensität gemessen wird. Die Probe selbst befindet sich in einem Helium-Durchfluß-Kryostat der Firma Oxford, Modell CF1208. Durch die Wahl des Kühlmittelflusses und der automatischen Regelung einer Gegenheizung im Probenraum kann die Temperatur der Probe im Bereich zwischen 5 K und Raumtemperatur auf  $\pm 0.3 \text{ K}$  genau konstant gehalten werden. Die typische Versuchsanordnung für die Messung der nuklearen Vorwärtsstreuung ist in Abb. 13 skizziert.



**Abb. 13:** Experimenteller Aufbau zur Messung der nuklearen Vorwärtsstreuung.

Auf Grund von technischen Gegebenheiten können die Elektronen nicht gleichmäßig im Speicherring verteilt werden. Stabile Umlaufbahnen im Speicherring sind alle 2 ns möglich. In der Praxis wird versucht, die Elektronen auf wenige Pakete zu konzentrieren, um lange Meßzeiten für die verzögert emittierten Quanten zu ermöglichen. Im Hamburger Synchrotron sind dies zwei bzw. fünf Elektronenpakete, die dann im Abstand von 480 ns bzw. 192 ns am Wiggler vorbeifliegen und jeweils für die Dauer von 100 ps intensitätsstarke Synchrotronstrahlung erzeugen. Der Großteil der Strahlung geht ohne Wechselwirkung mit der Probe durch diese hindurch. Die Streuung an den Elektronen der Probe, wie z.B. die Rayleigh- oder Compton-Streuung, erfolgt beinahe instantan. Der resonant absorbierte Anteil dagegen zerfällt zeitlich verzögert und kann daher leicht von den prompten Ereignissen getrennt werden. Für die Messung der Zeitspektren steht dann genau die Zeit bis zum nächsten Synchrotronpuls zur Verfügung. Das Hamburger Synchrotron ist primär nicht für die Erzeugung von Synchrotronstrahlung gebaut worden. Darum ist die Aufteilung der Elektronen in zwei bzw. fünf Pakete nicht perfekt. Um die Hauptpakete sind in den typischen 2 ns Abständen weitere Elektronen verteilt, die ebenfalls Strahlung emittieren. In Abb. 14 sind drei Beispiele für die tatsächliche Intensitätsverteilung der von den Elektronen im Speicherring emittierten Synchrotronstrahlung dargestellt. Jeweils nach der Hauptintensität und in einem Beispiel auch vor dieser ist Strahlungsintensität zu beobachten. Die typischen 100 ps Pulslängen im Abstand von 2 ns sind durch die Zeitauflösung der Photodioden verbreitert.

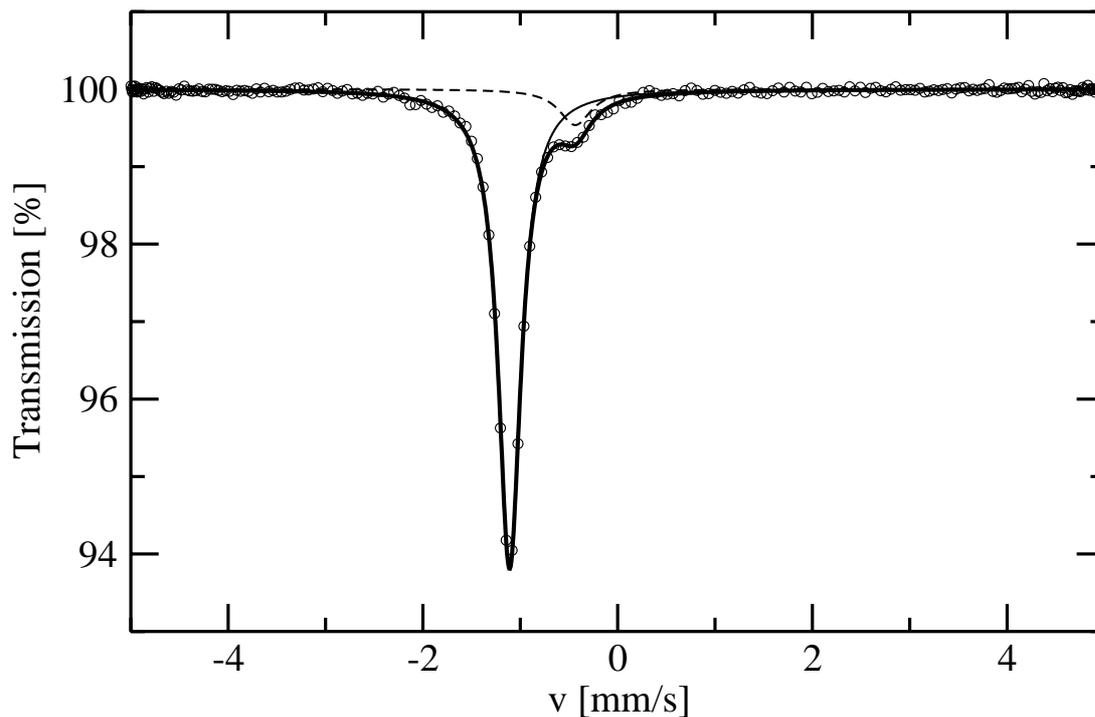


**Abb. 14:** Beispiele der Pulsstruktur der Synchrotronstrahlung am DESY in Hamburg.

Die Verunreinigung der Synchrotronpulse durch die „parasitären bunchs“ hat auf das Vorwärtsstreuungsspektrum keine meßbaren Auswirkungen, da deren Intensität sehr viel geringer ist als die Hauptintensität und demnach vernachlässigbar wenige verzögerte Quanten erzeugt. Allerdings ist ihre prompte Intensität vergleichbar mit der gestreuten Intensität, so daß eine Auswertung der Zeitspektren für gewöhnlich erst ab etwa 25 ns nach dem Maximum der Synchrotronstrahlung möglich ist, da ab dieser Zeit nach der maximalen Intensität kaum noch „Neben-bunchs“ auftreten. Ein weiterer, bei dünnen Proben wichtiger Grund dafür, daß die vorwärtsgestrene Intensität nicht unmittelbar nach dem Synchrotronpuls ausgewertet werden kann, ist die Überladung der Photodioden durch die starke Intensität des prompten Pulses. Erst nach einer Erholungsphase von einigen ns liefern die Photodioden wieder korrekte Meßdaten. Eventuelle später auftretende Synchrotronstrahlung, die von einigen zu falschen Zeiten in den Speicherring gefüllten Elektronen hervorgerufen wird, kann auf Grund ihrer scharfen Zeitstruktur eindeutig vom resonanten Vorwärtsstreuungsspektrum unterschieden werden.

## 3.2 Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung

Der schematische Aufbau einer RSMR-Meßapparatur wurde bereits in Abb. 4 gezeigt. Hier sollen nun die einzelnen Komponenten näher erläutert werden. Als Strahlungs-Quelle diente in diesen Experimenten eine  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Quelle. In der Quelle befindet sich das Isotop  $^{57}\text{Co}$  in einer Oxydverbindung als  $^{57}\text{CoO}$ , um eine Einlinien-Quelle zu erhalten. Die verwendeten Quellen wurden am Zyklotron der TU-München hergestellt (Huenges et al. 1982). Auf Grund stöchiometrischer Ungleichgewichte liegt das durch den Zerfall des Kobalts entstehende Eisen nicht nur als  $\text{Fe}^{2+}$  vor. Abhängig von den Präparationsbedingungen entsteht ein geringer Anteil an  $\text{Fe}^{3+}$ , der durch eine um ca. 0.6 mm/s verschobene Isomerieverschiebung gekennzeichnet ist (Harami et al. 1984). In den verwendeten Quellen ist dieser Anteil jedoch kleiner als 10 %, so daß dieser vernachlässigt werden kann (siehe Abb. 15).

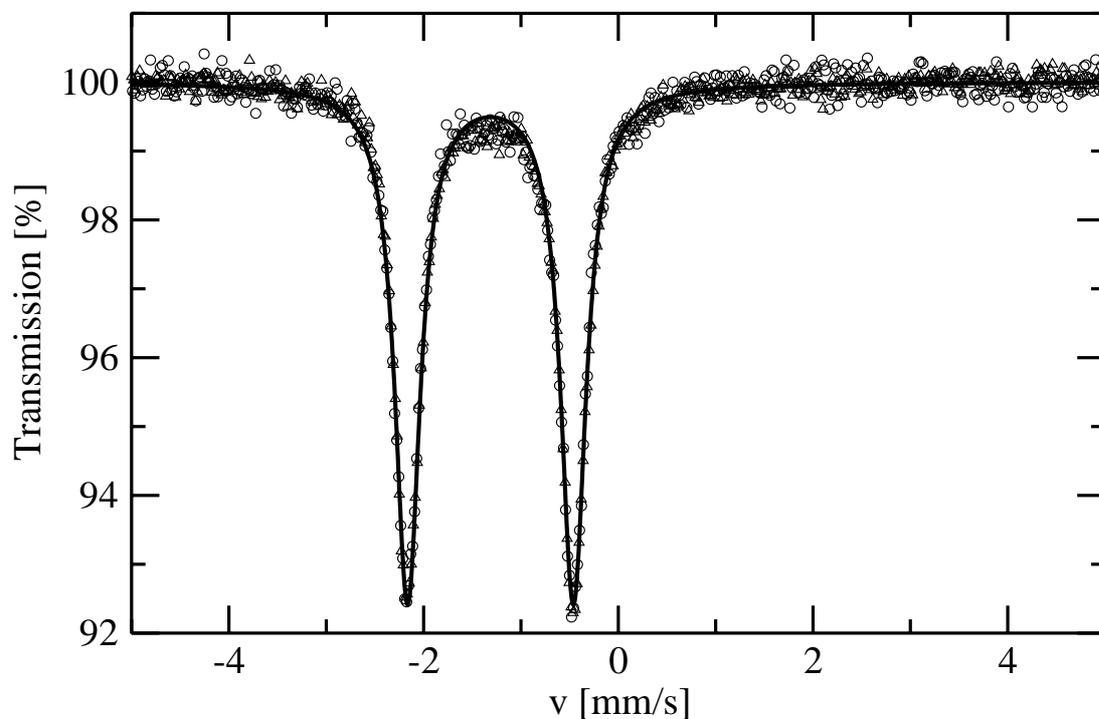


**Abb. 15:** Mößbauer-Spektrum der verwendeten  $^{57}\text{CoO}$ -Quelle gemessen mit einem  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  Einlinienabsorber. Hauptlinie:  $\text{Fe}^{2+}$ , Nebenlinie (gestrichelt):  $\text{Fe}^{3+}$

Die Quelle befindet sich auf einem Mößbauer-Antrieb innerhalb eines Bleizylinders von 47 mm Wandstärke. In diesem Zylinder sind Einschübe für Blenden verschiedener Größen sowie für den Energie-Analysator in der Position A0 vorgesehen. Als Energie-Analysator

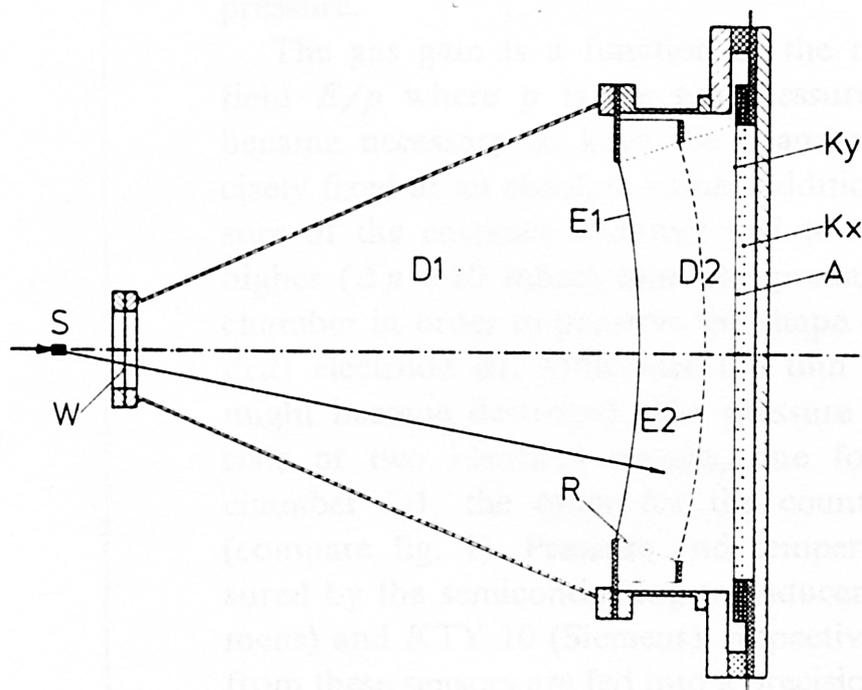
dient ein Einlinien-Mößbauer-Absorber aus Ammonium-Lithium-Fluorerrat  $\text{Li}_3\text{FeF}_6 + (\text{NH}_4)\text{F}_3(\text{FeF}_3)_2$ . Anstelle dieser Anordnung für die Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung kann eine Röntgenröhre an dieselbe Position gebracht werden, um die Streuprobe und den Zähler zum einfallenden Strahl zu justieren.

Die Probe, die auf einem Zweikreisdiffraktometer montiert ist, kann gegebenenfalls in einen Streukryostat für temperaturabhängige Messungen eingebaut werden. Die Konstruktionszeichnungen des Durchflußkryostaten sind in Achterhold (1987) zu finden. Zur Kontrolle, daß sich die Vibrationen der angeschlossenen Pumpen nicht auf den Streukryostaten und damit auf die Probe übertragen, so daß eine Dynamikmessung unmöglich gemacht wird, wurde in den Probenraum des Kryostaten ein Mößbauer-Absorber eingebaut und jeweils ein Mößbauer-Spektrum mit aus- bzw. eingeschalteten Pumpen gemessen. Als Absorber diente dabei Natriumnitroprussit (SNP), das in geringer Konzentration sehr schmale Linien zeigt und zudem mit seiner bekannten Quadrupolaufspaltung bei Raumtemperatur  $\Delta E_Q = 1.7032 \text{ mm/s}$  zur Geschwindigkeitseichung des Mößbauer-Antriebs herangezogen werden kann. Eine Linienverbreiterung wegen der Pumpenvibrationen konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 16).



**Abb. 16:** SNP-Messung im Streukryostaten. Kreise: ausgeschaltete Pumpen, Dreiecke: eingeschaltete Pumpen, durchgezogene Linie: Anpassung mit zwei Lorentz-Linien.

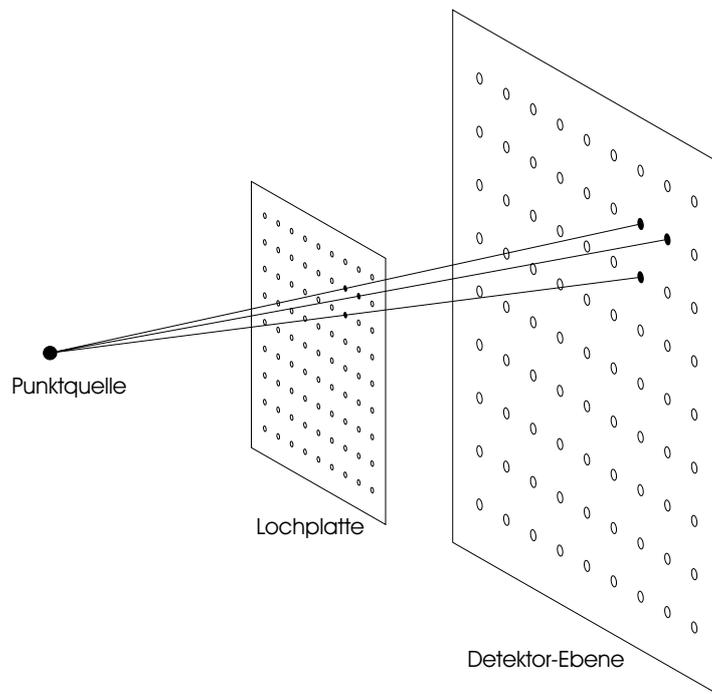
Die Proben temperatur im Kryostaten wurde durch eine Widerstandsmessung einer Diode des Typs 1N4148 bestimmt, die als Vierpunktmessung, eine Spannungsmessung bei konstantem Strom, durchgeführt wurde. Bei einer Abweichung von der Solltemperatur wird über einen elektronischen Regelkreis ein Magnetventil gesteuert, das den Stickstoffstrom durch den Kryostaten drosselt oder erhöht. Diese einfache Regelung ermöglicht das Einstellen einer konstanten Proben temperatur im Bereich zwischen 90 K und Raumtemperatur mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  K.



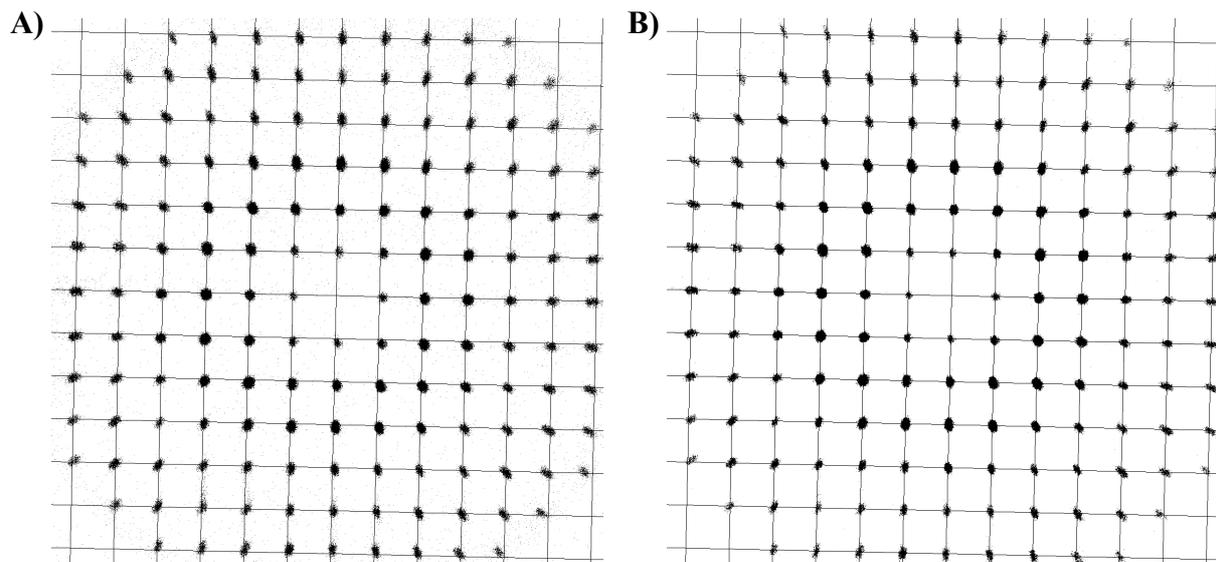
**Abb. 17:** Vieldrahtproportionalzähler, Abbildung aus Nienhaus et al. (1987). S: Probenort, W: Eintrittsfenster aus Hostaphan, D1: Eintrittskammer mit Heliumgas, D2: Zählkammer mit Xenongas, E1: Aluminiumfolie, E2: Frischgitter, Ky, Kx: Kathodendrahtgitter zur Ortsbestimmung, A: Anodengitter zur Energiebestimmung

Als Detektor wurde ein ortsauflösender Vieldraht-Flächendetektor mit einer sphärischen Driftkammer verwendet (Bade et al. 1982; Nienhaus et al. 1987). Nach dem Passieren der mit Helium gefüllten Eintrittskammer D1 gelangen die Quanten in den mit Zählgas gefüllten sphärischen Driftraum. Das Drahtgitter E2 (vgl. Abb. 17) schirmt dabei die Ladungen auf den Anoden und Kathoden ab, so daß sich die Photonen und die durch Photoeffekt und Comptoneffekt im Xenonzählgas erzeugten Elektronen zunächst in einem radialen elektrischen Feld zwischen der Aluminiumfolie E1, die auf dem Potential  $-18$  kV liegt, und dem Drahtgitter E2 mit dem Potential  $0$  kV bewegen, bevor die Elektronen auf die

Anodendrähte driften. Die Anoden- und Kathodendrähte sind in drei Ebenen paralleler Drähte angeordnet und decken eine Fläche von  $700 \times 700 \text{ mm}^2$  ab. Mit einem Abstand von ca. 1150 mm zwischen der Streuprobe und der Detektorebene besitzt der verwendete Zähler einen Öffnungswinkel von  $34^\circ$ . Damit ist mit  $^{57}\text{Fe}$  Mößbauer-Strahlung eine Messung bis  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.17 \text{ \AA}^{-1}$  möglich. Das um die Anodendrähte herum radial zunehmende elektrische Feld bewirkt in unmittelbarer Nähe der Drähte eine starke Beschleunigung der Elektronen, so daß durch Stoßionisation eine Elektronenlawine erzeugt wird. Dies wird als Gasverstärkung bezeichnet. Der von den Elektronen hervorgerufene Anodenstrom ist dabei proportional zur Energie des einfallenden  $\gamma$ -Quants und wird zur Energieanalyse verwendet. Die Xenonionen driften auf die beiden Drahtebenen  $K_x$  und  $K_y$ . Der dadurch erzeugte Kathodenstrom liefert die  $x$ - bzw.  $y$ -Ortskoordinate des einfallenden  $\gamma$ -Quants. Zur Ortsbestimmung wird der Strom von jeweils fünf benachbarten Kathodendrähten zusammengefaßt, verstärkt und in eine Widerstandskette eingespeist. Aus den Spannungen, die an den beiden Enden der Widerstandskette anliegen, kann der Ort auf dem Zähler bestimmt werden. Dies geschieht durch eine analoge Dividierschaltung. Besitzt das einfallende  $\gamma$ -Quant die Energie des Mößbauer-Übergangs, werden die  $x$ - und  $y$ -Signale digitalisiert und in einem Computer mit VME-Bus als Bild mit  $1024 \times 1024$  Bildpunkten und 2 Byte für die Intensität pro Bildpunkt gespeichert. Durch die sphärische Driftkammer ist das Zählerbild beinahe frei von Verzerrungen. Die möglichen Verzerrungen des Zählerbildes können bestimmt werden, indem vor das Eintrittsfenster eine Platte mit regelmäßig angeordneten kleinen Löchern montiert wird (vgl. Abb. 18). Dieses Lochmuster wird von einer Punktquelle bestrahlt und auf den Zähler abgebildet. Als Punktquelle dient die gestreute Strahlung an der Probe, so daß man aus den bekannten Abständen zwischen Lochplatte und Probe und den Lochabständen auf der Platte sowohl die Verzerrungen des Zählers als auch die Zuordnung der Bildpunkte zu den Streuwinkeln bestimmen kann. In Abb. 19 A ist eine Aufnahme der Lochplatte ohne Korrektur und in Abb. 19 B mit einer Korrektur der Verzerrungen zu sehen. Auch ohne Korrektur befinden sich die Bildpunkte wegen der sphärischen Driftkammer nahe an ihren Sollpositionen, die durch die Schnittpunkte der Linien in der Abbildung markiert sind. Die Intensität des Punktmusters ist von dem Streuvermögen der Streuprobe abhängig und die radiale Ausdehnung bei größeren Streuwinkeln durch die Probendicke gegeben.



**Abb. 18:** Anordnung von Probe, Lochplatte und Zähler zur Bestimmung der Bildfehler. Das Lochmuster der Platte wird gestreckt auf den Zähler abgebildet.



**Abb. 19:** Zählerbild der Lochplatte vor (A) und nach (B) der Korrektur der Verzerrungen. Die Schnittpunkte der Linien geben die Sollagen der Bildpunkte an.

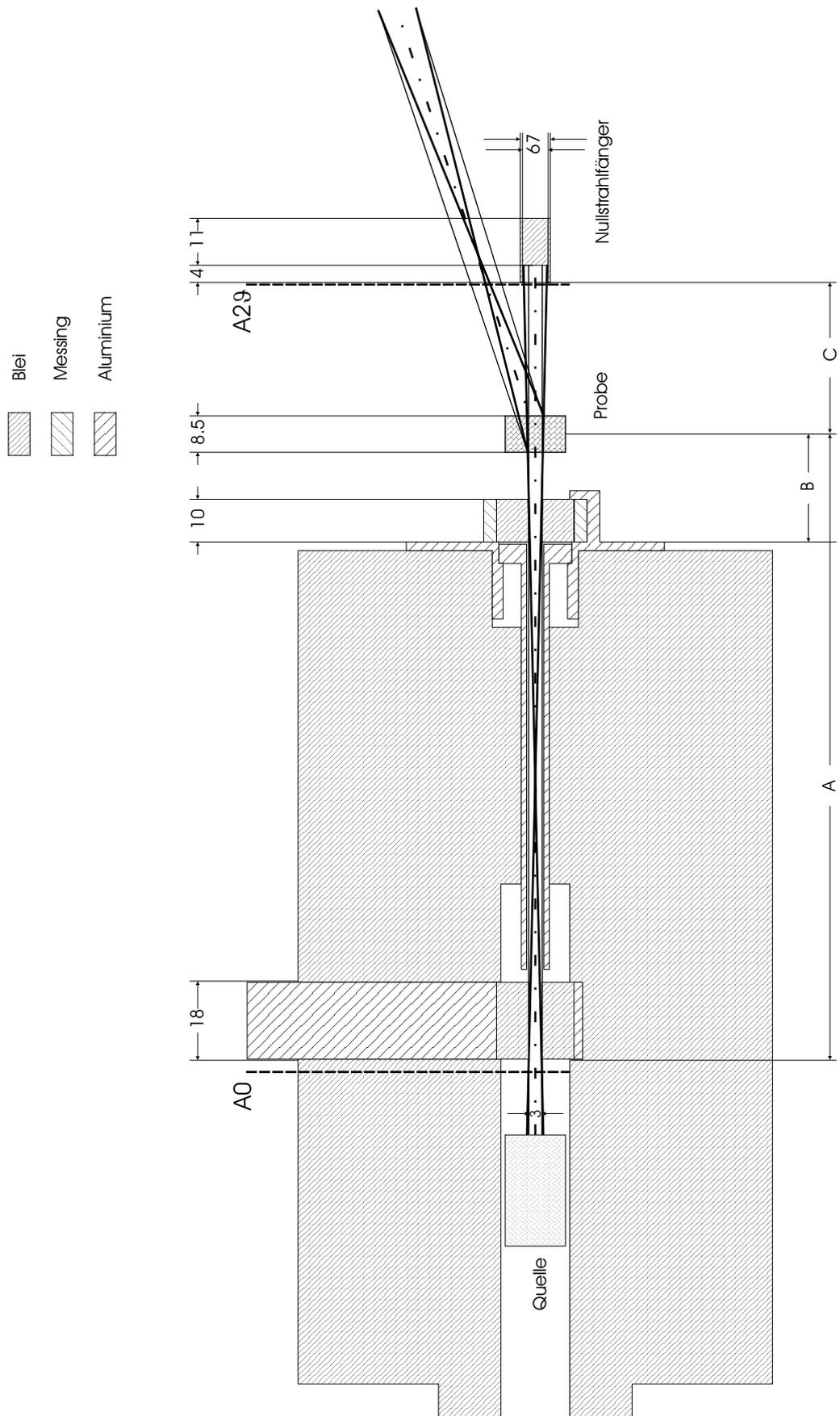
Ungleich abgestimmte Kathodenverstärker bewirken Streifen im Bild, da die Ortsinformationen jeweils um die stärker verstärkten Drähte herum konzentriert sind. Auf eine Glättung des Detektorbildes, wie sie in Achterhold (1995) zur Korrektur der Verzerrungen vorgeschlagen wird, wurde verzichtet, da die Bilder in konzentrischen Ringen um den direkten Strahl ausgewertet wurden und damit in jedem Kreisring mehr als ein

Streifen enthalten ist. Da auch das Bild der Punkte der Lochplatte durch den großen Abstand der Platte zur Detektorfläche größer ist als die typische Streifenbreite, kann die oben beschriebene Korrektur ohne eine vorherige Bildglättung vorgenommen werden. Eine genaue Beschreibung des Zähleraufbaus mit der angeschlossenen Elektronik ist z.B. in Hartmann (1992) und Burg (1994) zu finden.

Der Strahlengang der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR-Apparatur mit den verwendeten 3 mm Blenden ist in Abb. 20 zu sehen. Die Positionen der Analysatoren in den Stellungen A0 und A2 $\vartheta$  sind mit den gestrichelten Linien markiert. Die Messungen bei Raumtemperatur wurden mit zwei verschiedenen Stellungen des Analysators A2 $\vartheta$  und des Nullstrahlängers durchgeführt. Dies ist notwendig, da wegen der begrenzten Größe des Analysators der durch den Zähler abgedeckte Streuwinkelbereich bei nur einer Analysatorposition nicht vollständig ausgenutzt wird. Für die Tieftemperaturmessungen ist zudem wegen des Platzbedarfes des Kryostaten der Abstand der Probe zum Blendensystem größer. Die Abb. 20 zeigt maßstabsgetreu den Strahlengang für die 300 K-Messung mit dem Analysator in Position 1. Die Abstände für die anderen genannten Fälle sind der Tab. 1 zu entnehmen.

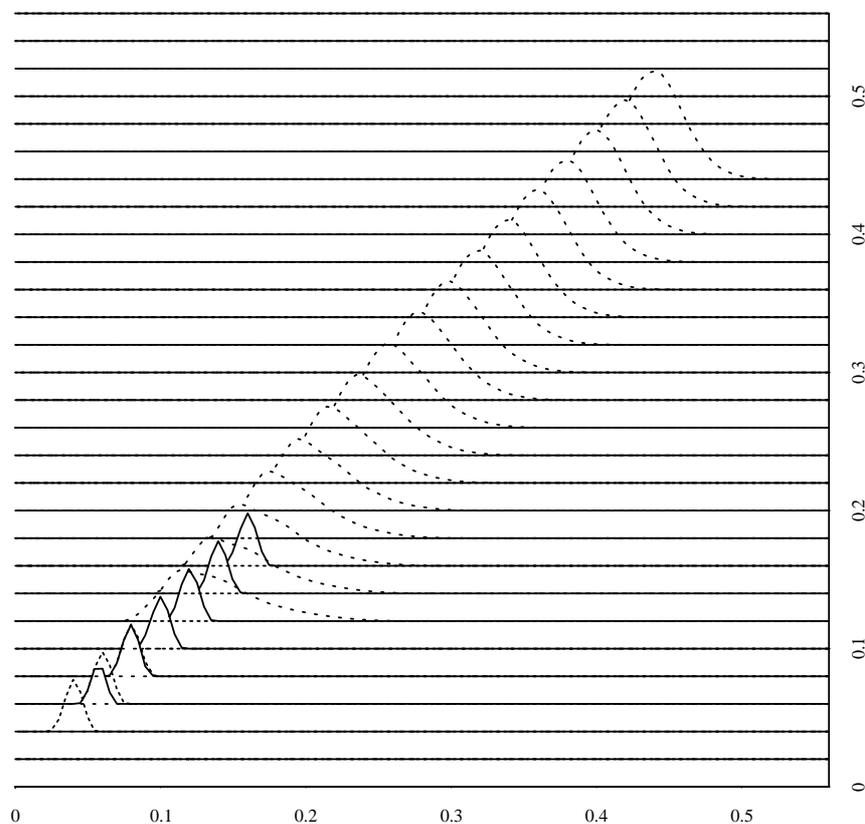
	300 K		170 K
	Pos 1	Pos 2	
A	146.25	146.25	181.5
B	25.25	25.25	60.5
C	35.5	76.75	35.5

**Tab. 1:** Abstände in mm bei den verschiedenen Messungen zu Abb. 20.



**Abb. 20:** Strahlengang der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR-Apparatur mit Bleiabschirmung, Blenden und Analysatorpositionen.

Parallel zu diesen Messungen wurde an einer zweiten RSMR-Apparatur mit  $^{183}\text{W}$ -Quellen eine Probe aus demselben Ansatz gemessen. Der Aufbau der Apparatur mit dem Strahlengang durch die Blenden und die Probe sowie die Messergebnisse sind in (Keppler 1999) dokumentiert. Auf Grund der Blendengrößen und vor allem der Probendicken fallen in jedem Detektorpunkt Streustrahlen verschiedener Streuwinkel zusammen. Die Streuwinkelverteilung ist in Abb. 21 sowohl für beide  $^{57}\text{Fe}$ -Messungen bei 300 K als auch die  $^{183}\text{W}$ -Messung dargestellt. Auf der y-Achse ist der eingestellte Detektorwinkel abzulesen, während die x- und z-Achse die Intensitätsverteilung korrigiert auf die Absorption in der Probe zeigen. Die Streuwinkel sind in Einheiten von  $\sin(\vartheta)/\lambda$  angegeben. Die Breite der Verteilungen wird dabei vorwiegend von der Probendicke dominiert, die bei der  $^{183}\text{W}$ -Messung viel größer ist, so daß deren Winkelauflösung schlechter ist als bei der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR.



**Abb. 21:** Streuwinkelverteilung auf dem Detektor in Einheiten von  $\sin(\vartheta)/\lambda$ . y-Achse: eingestellter Detektorwinkel, x-Achse: wahrer Streuwinkel, z-Achse: Intensitätsverteilung korrigiert auf Absorption in der Probe. Schmale Verteilungen:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR bei 300 K, breite Verteilung:  $^{183}\text{W}$ -RSMR.

Zwar hat die  $^{183}\text{W}$ -RSMR-Apparatur die schlechtere Winkelauflösung, besitzt jedoch gegenüber der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR den Vorteil, daß die für sie zur Verfügung stehenden Quellen um bis zu 100-mal stärker sind. Zusammen mit der kürzeren Wellenlänge ermöglicht die  $^{183}\text{W}$ -

RSMR trotz der mit  $\sin(\vartheta)/\lambda$  abnehmenden Atomformfaktoren Messungen zu sehr viel größeren Impulsüberträgen  $\hbar k = \hbar \cdot 4\pi \sin(\vartheta)/\lambda$ . Mit beiden Isotopen ist demnach zum einen ein großer  $\sin(\vartheta)/\lambda$  Bereich der Messung zugänglich, zum anderen wird auf Grund der unterschiedlichen Lebensdauern  $\tau_N$  der angeregten Zustände die elastisch gestreute Intensität mit zwei verschiedenen Energieauflösungen bestimmt. Die Eigenschaften der beiden RSMR-Quellen sind in Tab. 2 aufgelistet. Die angegebenen Energieauflösungen  $\Gamma_{\text{exp}}$  entsprechen den experimentellen Gegebenheiten und berücksichtigen die Linienbreiten der Quellen sowie der Analysatoren. Sie sind deshalb größer als die bekannten natürlichen Breiten der Mößbauer-Übergänge von  $\Gamma_{\text{nat}} = 4.7 \cdot 10^{-9}$  eV für  $^{57}\text{Fe}$  bzw.  $\Gamma_{\text{nat}} = 2.5 \cdot 10^{-6}$  eV für  $^{183}\text{W}$ .

	$^{57}\text{Fe}$	$^{183}\text{W}$
Aktivität	180 mCi	8-15 Ci
$\lambda$	0.86 Å	0.267 Å
Energie	14.4 keV	46.5 keV
$\sin(\vartheta)/\lambda$	0.04-0.17 Å <sup>-1</sup>	0.12-0.5 Å <sup>-1</sup>
$\tau_N$	141 ns	0.265 ns
$\Gamma_{\text{exp}}$	$5 \cdot 10^{-8}$ eV	$5 \cdot 10^{-6}$ eV

**Tab. 2:** Eigenschaften der  $^{57}\text{Fe}$ - und  $^{183}\text{W}$ -Quellen.  $\lambda$ : Wellenlänge,  $\tau_N$ : Lebensdauer,  $\Gamma_{\text{exp}}$ : Energieauflösung.

Zur Verkürzung der Meßzeit wurden die RSMR-Messungen jeweils als Zweipunktmessungen durchgeführt. Ist die Linienform in beiden Analysatorpositionen A0 und A2 $\vartheta$  gleich, genügt es zur Bestimmung der Absorptionsfläche die Transmission in Resonanz und weit außerhalb der Resonanz zu messen (vgl. Abb. 22). Dazu wird der Mößbauer-Antrieb mit einem rechteckigen Geschwindigkeitsprofil betrieben, einmal mit der Resonanzgeschwindigkeit  $\pm v_{\text{res}} = \pm 0.5$  mm/s und einmal mit  $\pm v_{\infty} = \pm 10$  mm/s. Da der Bildspeicher auf 1024×1024 Bildpunkte beschränkt ist, wird die Auflösung auf 512×512 Bildpunkte verringert und abhängig von der Antriebsgeschwindigkeit jeweils ein Zählerbild mit einem Viertel seiner ursprünglichen Größe gespeichert. Bei der Analysatorstellung A2 $\vartheta$  ist für jeden Bildpunkt die elastisch gestreute Intensität proportional zur Differenz der Zählraten außerhalb und in der Resonanz.

$$S_{el} \propto Z_{A2\vartheta}(v_{\infty}) - Z_{A2\vartheta}(v_{res}) \quad (74)$$

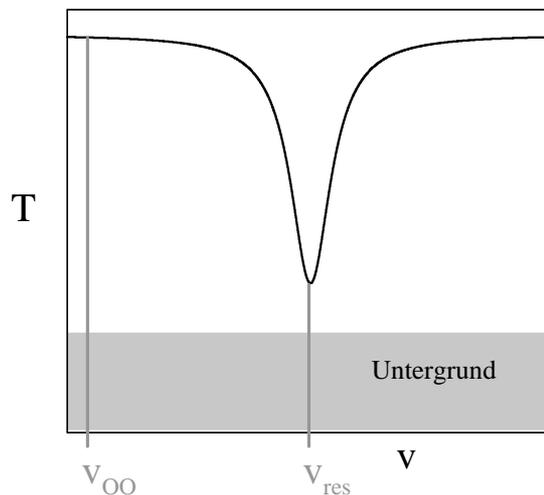
Für die total gestreute Intensität gilt dasselbe mit dem Analysator in der Position A0.

$$S_{tot} \propto Z_{A0}(v_{\infty}) - Z_{A0}(v_{res}) \quad (75)$$

Nach einer Normierung auf eventuell unterschiedliche Zählzeiten in den beiden Analysatorstellungen, die gleichbedeutend ist mit einer Normierung auf die Zählrate außerhalb der Resonanz, ergibt sich für den elastisch gestreuten Anteil:

$$f_R = \frac{(Z_{A2\vartheta}(v_{\infty}) - Z_{A2\vartheta}(v_{res})) / Z_{A2\vartheta}(v_{\infty})}{(Z_{A0}(v_{\infty}) - Z_{A0}(v_{res})) / Z_{A0}(v_{\infty})} \quad (76)$$

In dieser Darstellung entfallen auch alle Korrekturen für die Absorption in der Probe, Polarisationsfaktoren, Detektoreffizienz etc., also alle multiplikativen Korrekturfaktoren, die sich gleichermaßen auf Zähler und Nenner in Gl. ( 76 ) beziehen. Um den Effekt der Quellenalterung aus den Gleichungen zu eliminieren, wurde die Position des Analysators täglich gewechselt.



**Abb. 22:** Zweipunktmessung.

## 4 Probenpräparation

Für beide Meßmethoden wurde eine polykristalline Myoglobinprobe verwendet. In der kristallinen Phase läßt sich eine höhere Myoglobinkonzentration erzielen als für in Puffer gelöstes Myoglobin. Gefriergetrocknetes Myoglobin kam als Probenmaterial ebenfalls nicht in Frage. Trotz einer Hydratisierung der Probe – diese ist notwendig um eine physiologisch sinnvolle Umgebung für das Protein zu schaffen, in der seine Dynamik zu beobachten ist – ist die resultierende Packungsdichte durch die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der geladenen Oberflächen der Moleküle geringer als für eine polykristalline Probe.

Die Kristallisation des Pferde-Myoglobins erfolgte in einer Lösung aus 2.8 M Ammoniumsulfat und 20 mM Tris-HCl bei einem pH-Wert von 7.7. Um die Wartezeit bis zur Keimbildung abzukürzen, wurde die Lösung mit mikroskopisch kleinen Kristallbruchstücken von Pottwal-Myoglobin der Raumgruppe  $P2_1$  angeimpft (Ducruix und Giege 1992). Durch die Anzahl der Kristallisationskeime in der Lösung kann die Anzahl und Größe der wachsenden Kristalle variiert werden. Bei diesen Kristallisationsbedingungen entstehen nadelförmige Met-Myoglobinkristalle, deren Raumgruppe für diese Experimente mittels Röntgendiffraktometrie ebenfalls zu  $P2_1$  bestimmt wurde. Zur Präparation der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR-Probe wurden die Kristalle konzentriert und der überflüssige Puffer mit Filterpapier abgesaugt. Die Verwendung eines Flächendetektors legt die Geometrie des Probenhalters auf eine Rotationssymmetrie zur Strahlachse fest. Daher bestand der Probenhalter aus einem Hohlzylinder aus PVC von 8.5 mm Länge und einem Innendurchmesser von 14 mm. Die ebenen Flächen des Zylinders, das Ein- und das Austrittsfenster für die  $\gamma$ -Strahlung, waren jeweils mit einer 23  $\mu\text{m}$  starken Hostaphanfolie, die mit einem Messingrahmen am PVC verschraubt wurde, luftdicht verschlossen. Als temperaturstabile Dichtung diente hierfür Indiumdraht. Die Probenlänge ergab sich aus der Bedingung für die maximale Streuintensität, die vom Absorptionskoeffizienten des Probenmaterials abhängt (Gingrich 1943). Die Probenlänge legte wiederum den Probendurchmesser fest. Er wurde so gewählt, daß auch beim maximal zu beobachtenden Streuwinkel keine Streuung am Probenhalter erfolgt.

Nach der Durchführung der RSMR-Messungen wurde die tatsächliche Zusammensetzung der Streuprobe für die  $^{183}\text{W}$ -RSMR, die aus dem gleichen Kristallansatz nach derselben Methode präpariert war, analysiert (Keppler 1999). Der Myoglobingehalt wurde anhand optischer

Absorption in der Soret-Bande bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 408$  nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 188$  OD/(mmol·cm) nach Scheler et al. (1957) ermittelt. Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte durch Gefriertrocknen des Probenmaterials. Der Anteil an Tris-HCl kann auf Grund der geringen Menge in der Probe vernachlässigt werden. Diese Analyse ergab 80 Ammoniumsulfatmoleküle und 1106 Wassermoleküle pro Myoglobinmolekül. Die Anzahl der einzelnen Atomarten ist in Tab. 3 zusammengestellt.

	1 Mb	80 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1106 H <sub>2</sub> O
H	1244	640	2212
C	803	—	—
N	214	160	—
O	222	320	1106
S	2	80	—
Fe	1	—	—

**Tab. 3:** Zusammensetzung der RSMR-Streuprobe normiert auf ein Pferde-Myoglobinmolekül.

Die Präparation der Probe für die nukleare Vorwärtsstreuung verlief auf ähnliche Weise. Vor der Kristallisation wurde die Hämgruppe des Myoglobins durch mit <sup>57</sup>Fe angereichertes Hämin ersetzt. Dies war notwendig, um die für die Messung erforderliche Konzentration an dem Mößbauer-aktiven Eisen, das im natürlichen Isotopengemisch nur zu 2.5 % enthalten ist, in der Probe herzustellen. Die Kristallisation des Pottwal-Myoglobins erfolgte ebenfalls in einem Ammoniumsulfatpuffer bei pH 6.8. Die Zugabe des Reduktionsmittels Natrium-Dithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) reduziert das Fe<sup>3+</sup> im Myoglobin zu Fe<sup>2+</sup>. Dadurch entsteht in entgaster Pufferlösung unter sauerstofffreier Argonatmosphäre aus dem 6-fach ligandierten Met-Myoglobin das 5-fach ligandierte Deoxy-Myoglobin. Der Probenhalter, der nach demselben Prinzip wie der RSMR-Probenhalter konstruiert war, wurde ebenfalls unter Argonatmosphäre gefüllt und verschlossen. Das Probenvolumen war für den Synchrotronstrahl am DESY in Hamburg optimiert und besaß einen rechteckigen Querschnitt von 10×2 mm und eine Dicke von 10 mm. Packungsdichte muß noch berechnet werden. mM-Konzentration des Eisens aus NFS und Probenzusammensetzung.

Bei den Kristallisationsansätzen zur Herstellung der Proben wurde zur Einstellung des pH-Wertes jeweils ein Puffer mit Tris-HCl anstelle des sonst üblichen Phosphat-Puffers mit

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  verwendet. Der Vorteil liegt bei der geringeren Elektronenzahl des HCl im Vergleich zum Phosphat. Dies bedingt einen geringeren Streubeitrag des Puffers für die RSMR-Messungen und eine geringere Absorption der  $\gamma$ -Strahlung an den Elektronen des Puffers im Falle der nuklearen Vorwärtsstreuung.

## 5 Auswertung und Ergebnisse

Die Anpassung der Theoriefunktionen an die Meßwerte wurde nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichungen vorgenommen, wobei jeweils die statistischen Unsicherheiten in den einzelnen Meßpunkten berücksichtigt werden. Trotz existierender Auswertprogramme für die nukleare Vorwärtsstreuung, wie z.B. CONUSS (Sturhahn 2000) oder MOTIF (Shvyd'ko 2000), wurde ein eigenes Programm mit grafischer Bedienungsfläche entworfen. Die Eigenentwicklung ist nötig, um die proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungsmoden in den Zeitspektren berücksichtigen zu können. Darüber hinaus ermöglicht die Grafikausgabe, die Auswirkung jeder Veränderung der Parameter auf das Zeitspektrum instantan zu verfolgen.

Als Algorithmus zur Anpassung hat sich die Methode des simulierten Härten als erfolgreich herausgestellt. Im Gegensatz zum Levenberg-Marquardt Algorithmus (Marquardt 1963), der sehr effizient in der Findung eines lokalen Minimums ist und eine Verknüpfung der Gradientenmethode mit der quadratischen Näherung darstellt, sind beim simulierten Härten mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch Parameteränderungen erlaubt, die zunächst die Anpassung verschlechtern und so das Überschreiten der Barrieren zwischen den lokalen Minima ermöglichen. Im Verlauf der Anpassung wird die Wahrscheinlichkeit der gegenläufigen Parameteränderungen sukzessive verringert, bis schließlich ein Minimum gefunden ist. Die Güte der Anpassung hängt dann von dem Protokoll der Wahrscheinlichkeitserniedrigung ab. Im auf diese Art gefundenen Minimum wurde jeweils eine zusätzliche Anpassung nach der Levenberg-Marquardt-Methode durchgeführt, da diese im Gegensatz zum simulierten Härten eine Abschätzung über die Genauigkeit der gefundenen Parameter liefert. Ein Beispiel für die Implementierung der beiden Berechnungsalgorithmen ist z.B. in Press et al. (1992) zu finden. Die Kombination aus simuliertem Härten und anschließender Minimierung nach der Levenberg-Marquardt-Methode wurde zur Anpassung sowohl der Zeitspektren der nuklearen Vorwärtsstreuung als auch der RSMR-Meßdaten angewandt.

## 5.1 Nukleare Vorwärtsstreuung an Deoxy-Myoglobin

Die Berechnung der Theoriefunktion erfolgt über den komplexen Brechungsindex im Energieraum. Die anschließende Fourier-Transformation in den Zeitraum erfolgt numerisch mittels der „fast fourier transformation“ FFT-Methode. Bei der Anpassung der Theoriefunktion an die Meßwerte der nuklearen Vorwärtsstreuung ist zu beachten, daß die Anregung der Mößbauer-Kerne in der Probe periodisch erfolgt. Dadurch ist in den Zeitspektren nicht nur Intensität aus der gerade erfolgten Anregung zu beobachten, sondern auch aus den vorherigen Zyklen. Bei einem Pulsabstand von 192 ns findet sich demnach im Zeitspektrum 30 ns nach der Anregung die Überlagerung der Intensitäten für 30 ns, 222 ns, 414 ns, etc. Da im Durchschnitt bei höchstens jedem tausendsten Synchrotronpuls ein Photon in der Probe resonant absorbiert wird und dadurch Mehrfachanregungen ausgeschlossen werden können, überlagern sich diese Intensitäten additiv. In den Berechnungen werden deshalb jeweils Anregungen von bis zu fünf vorangegangenen Pulsen berücksichtigt. Von weiter zurückliegenden Anregungen ist wegen des exponentiellen Abfalls der vorwärts gestreuten Intensität kein meßbarer Beitrag zu erwarten.

Die nukleare Vorwärtsstreuung der polykristallinen Deoxy-Myoglobinprobe wurde bei neun Temperaturen zwischen 5 K und 230 K gemessen. Neben den zwei durch die elektrische Quadrupolaufspaltung verursachten Resonanzen des Deoxy-Myoglobins sind in der Probe 5 % Hämochrom enthalten. Durch den Hämochromanteil entstehen zwei weitere Resonanzen sehr viel geringerer Intensität, die bei 80 K eine Quadrupolaufspaltung von  $\Delta E_Q = 1.31 \text{ mm/s}$  besitzen (Chang 1992). Diese sind ebenfalls in Mößbauer-Absorptionsmessungen, die zur Kontrolle der Probe vor und nach den Synchrotronmessungen durchgeführt wurden, zu beobachten. Die Kontrollmessungen zeigen darüberhinaus, daß durch die Synchrotronbestrahlung keine Strahlenschäden in der Probe aufgetreten sind.

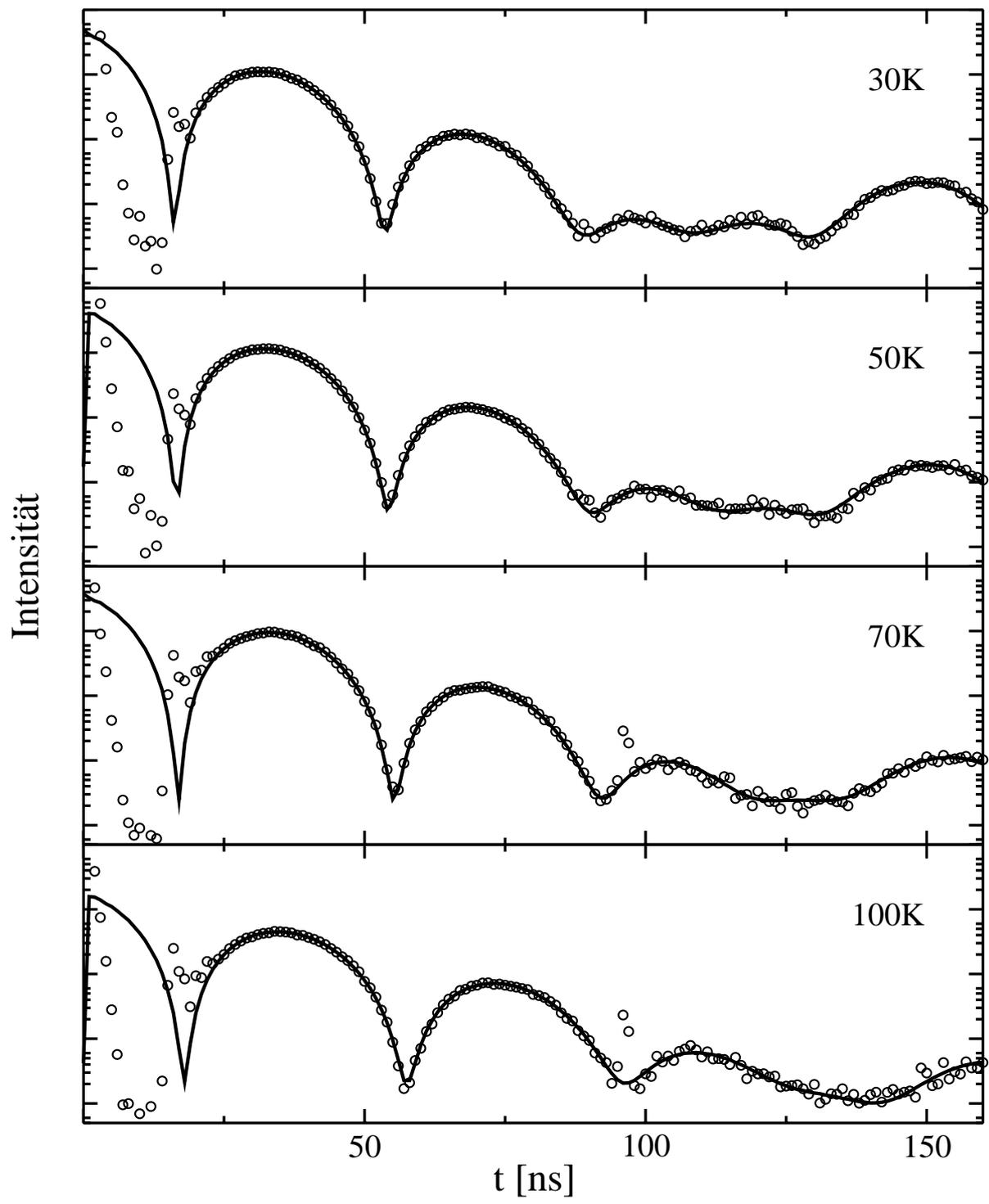
Zur Anpassung der Zeitspektren sind die Resonanzlinien, die die natürliche Linienbreite besitzen, mit einer Gauß-förmigen Verteilungsfunktion gefaltet. Die Bestimmung der Inhomogenitätsverbreiterung wurde anhand der Meßdaten bei 5 K und 180 K, die im Zeitfenster bis 440 ns vorliegen, vorgenommen. Die anderen Temperaturpunkte wurden entweder im 5 bunch modus gemessen und sind deshalb nur im Zeitfenster bis 165 ns vorhanden oder ihre effektive Dicke ist so gering, daß das Besselminimum nicht mehr zu

beobachtet ist. Anhand dieser Daten ist eine eindeutige Bestimmung der Inhomogenitätsverbreiterung nicht möglich.

Oberhalb von 180 K sind analog zur Mößbauer-Absorption zusätzliche breite Resonanzen berücksichtigt, die nach dem Modell des Brown'schen Oszillators die proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen erklären können. Die Analogie zwischen der nuklearen Vorwärtsstreuung und der Mößbauer-Absorption ist für die freie Diffusion, die ebenfalls breite Lorentz-Linien im Spektrum hervorruft, von Smirnov und Kohn (1995) gezeigt worden. In den Anpassungen der Zeitspektren sind für den Brown'schen Oszillator die ersten 100 breiter werdenden Lorentz-förmigen Resonanzen berechnet (vgl. Gl. ( 71 )). Alle weiteren breiten Resonanzen sind vernachlässigt, da deren Intensität mit dem Faktor  $\frac{(k^2 \langle x_t^2 \rangle)^n}{n!}$  schnell gegen Null geht. Die Lage der Besselminima bestimmt sich nun aus der Summe der mittleren quadratischen Auslenkungen der Festkörperschwingungen  $\langle x_v^2 \rangle$  und der quasi diffusiven Brown'schen Bewegungen  $\langle x_t^2 \rangle$ . Mit steigender Temperatur ist in den Zeitspektren an Deoxy-Myoglobin (vgl. Abb. 23) eine Verschiebung des Besselminimums zu größeren Zeiten zu beobachten. Aus diesem Grund erscheinen auch zwischen 210 K und 230 K sukzessive mehr „quantum beats“. Die zur Anpassung verwendeten Parameter sind Tab. 4 zu entnehmen.

Temperatur	$t_a$	$\Delta E_Q$ [mm/s]	$\Gamma_{inh}$ [ $\Gamma_{nat}$ ]	$\langle x_t^2 \rangle$ [ $\text{\AA}^2$ ]	$\alpha_t$ [ $\Gamma_{nat}$ ]
5 K	$38.58 \pm 0.08$	$2.297 \pm 0.001$	$2.05 \pm 0.02$	—	—
30 K	$36.41 \pm 0.21$	$2.282 \pm 0.004$	2.05	—	—
50 K	$34.32 \pm 0.20$	$2.270 \pm 0.003$	2.05	—	—
70 K	$31.27 \pm 0.20$	$2.230 \pm 0.003$	2.05	—	—
100 K	$29.08 \pm 0.19$	$2.140 \pm 0.004$	2.05	—	—
180 K	$20.45 \pm 0.10$	$1.867 \pm 0.008$	$2.17 \pm 0.02$	—	—
210 K	18.75	$1.788 \pm 0.001$	2.17	$0.0086 \pm 0.0002$	$8.48 \pm 0.18$
220 K	18.08	$1.770 \pm 0.003$	2.17	0.012	10.0
230 K	17.43	$1.719 \pm 0.001$	2.17	$0.0176 \pm 0.0003$	$11.95 \pm 0.24$

**Tab. 4:** Parameter zur Anpassung der Zeitspektren der nuklearen Vorwärtsstreuung an Deoxy-Myoglobin. Die Parameter ohne Fehlerangaben sind für diesen Temperaturpunkt festgehalten worden. Die Halbwertsbreite  $\Gamma_{inh}$  der Gauß-förmigen Inhomogenitätsverbreiterung und der Parameter  $\alpha_t$  des Brown'schen Oszillators sind in Einheiten der natürlichen Linienbreite  $\Gamma_{nat}$  angegeben.



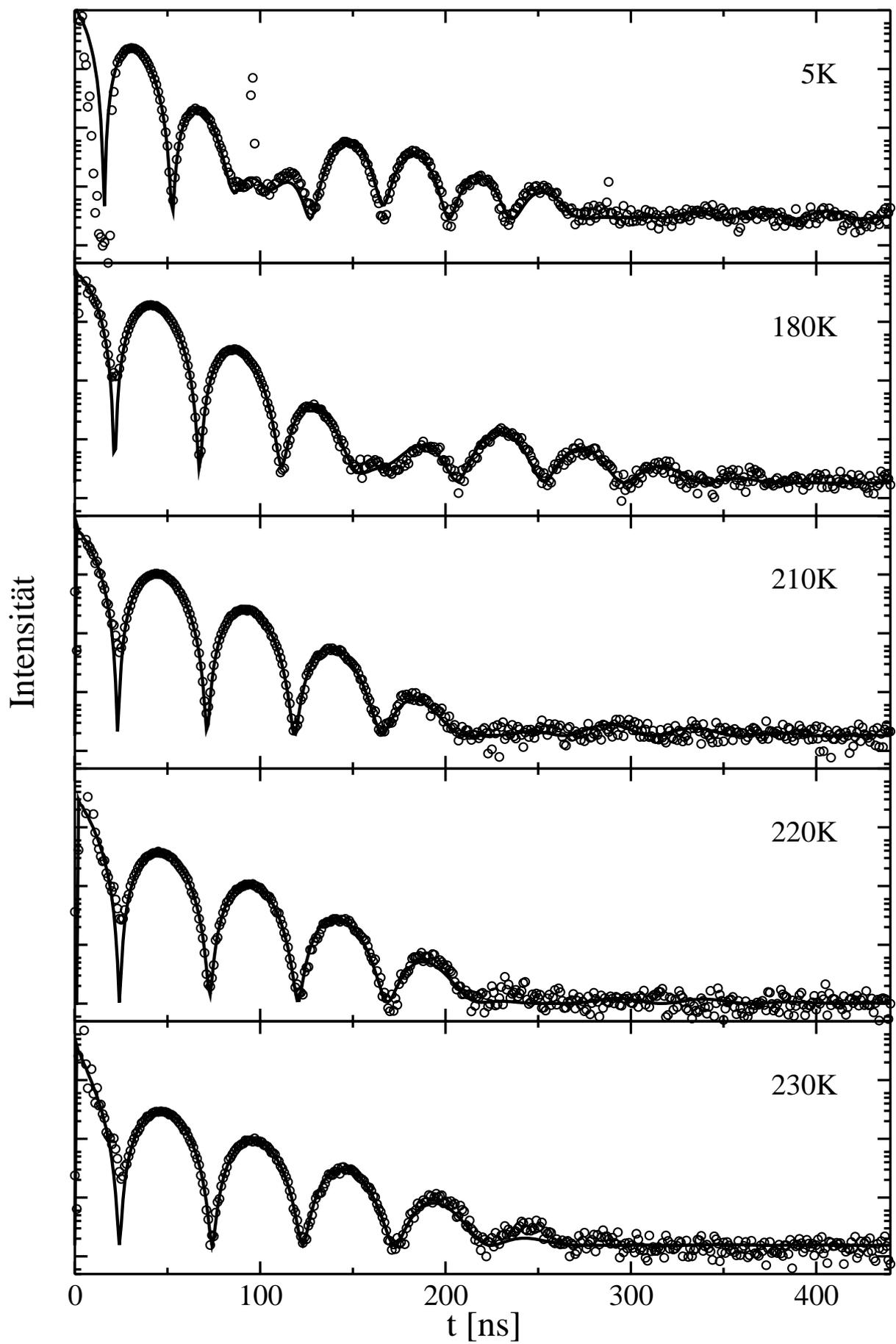


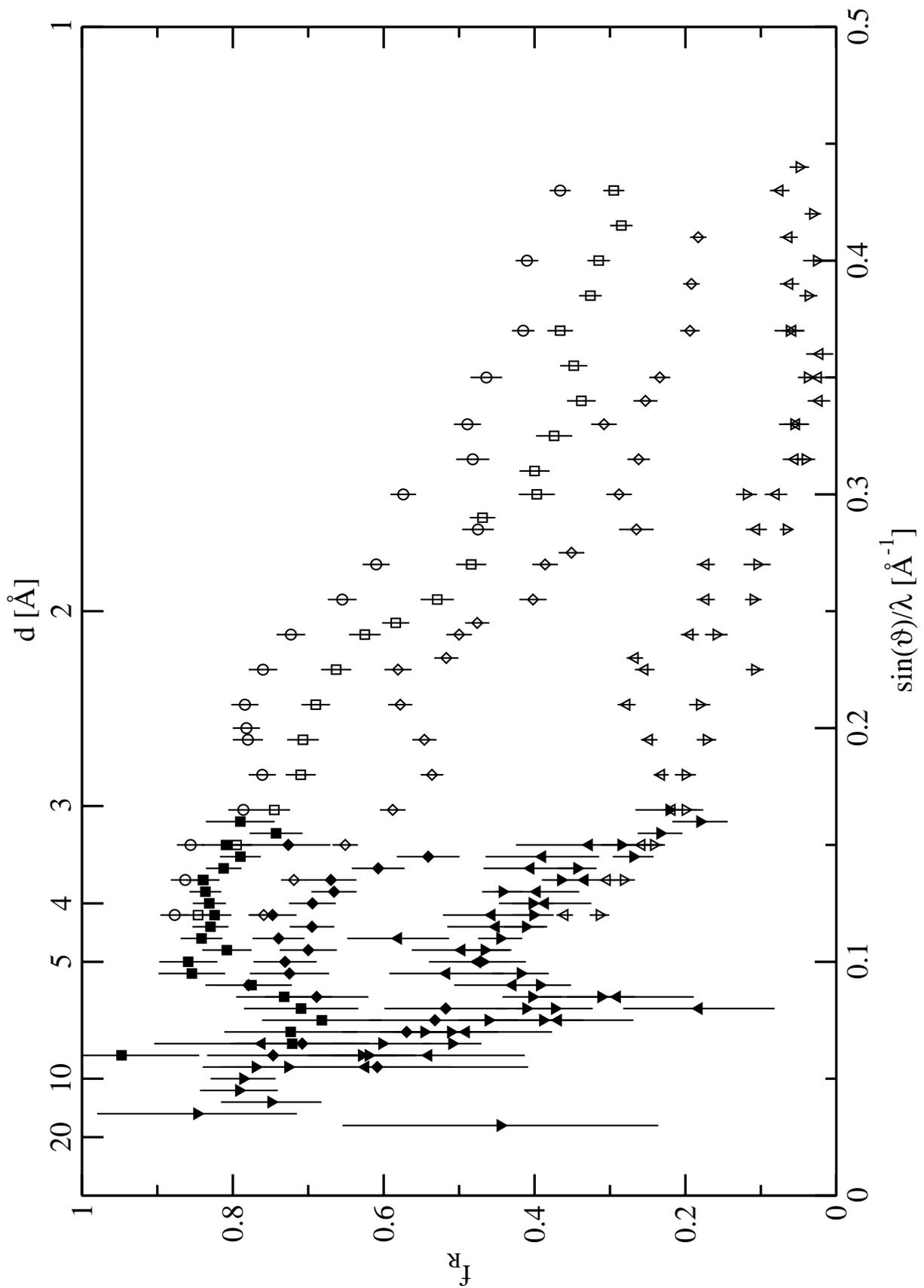
Abb. 23: Nukleare Vorwärtsstreuung an Deoxy-Myoglobin. Meßzeit pro Spektrum etwa 22 h.

## 5.2 Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung an Pferde-Myoglobin

Die Messungen wurden sowohl mit  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR als auch mit  $^{183}\text{W}$ -RSMR bei fünf Temperaturen zwischen 87 K und Raumtemperatur durchgeführt. Die Meßdaten der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR wurden jeweils in Kreisringen um den direkten Strahl in Intervallen von  $\Delta\sin(\vartheta)/\lambda = 0.005 \text{ \AA}^{-1}$  gemittelt.

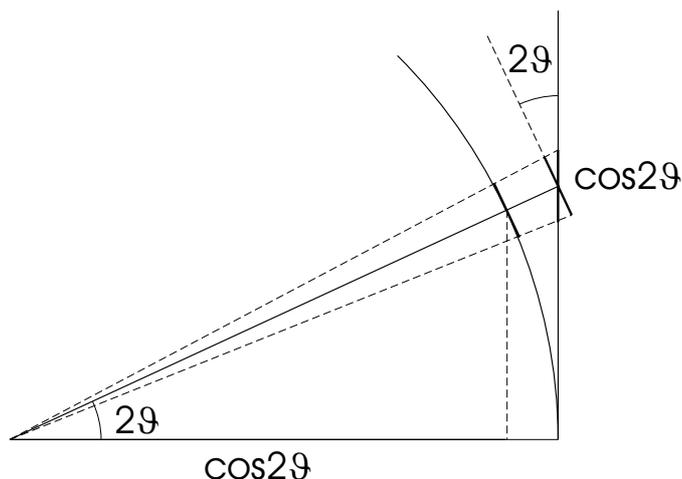
Die Streuung an den Hostaphanfenstern des Probenhalters kann wegen der geringen Dicke der Fenster gegenüber der Dicke der Probe vernachlässigt werden. Hostaphan besteht im wesentlichen aus denselben Atomen wie Myoglobin. Bei einer ähnlichen Dichte ist daher die Streustärke von Hostaphan mit der Streustärke des Myoglobins vergleichbar und die Vernachlässigung der Streubeiträge des Hostaphans auf Grund der stark unterschiedlichen durchstrahlten Volumina eine vernünftige Näherung. Darüber hinaus wurden bei Raumtemperatur RSMR-Messungen an einem leeren Probenhalter durchgeführt. Die Auswertung dieser Messungen ergibt innerhalb der Fehlerbalken keinen elastisch gestreuten Anteil  $f_r$  von den dünnen Hostaphanfenstern.

Bei der Darstellung des elastisch gestreuten Anteils  $f_r$  brauchen keine Korrekturfaktoren für die Polarisierung, die Absorption und das betrachtete Raumwinkelelement berücksichtigt werden, da diese Faktoren gleichermaßen die total und die elastisch gestreute Intensität beeinflussen. Die Ergebnisse für die Temperaturen 87 K, 170 K, 243 K, 265 K und 300 K sind in Abb. 24 zu sehen. Die Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung von  $1\sigma$ . Wie erwartet, nimmt der elastisch gestreute Anteil mit zunehmender Temperatur ab, die Probe wird flexibler. Trotz der unterschiedlichen Energieauflösungen der  $^{57}\text{Fe}$ - und der  $^{183}\text{W}$ -Messung ist der elastisch gestreute Anteil im überlappenden  $\sin(\vartheta)/\lambda$ -Bereich im Rahmen der Fehler gleich.



**Abb. 24:** Elastisch gestreuter Anteil an polykristallinem Pferdemyoglobin. Gefüllte Symbole:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, offene Symbole:  $^{183}\text{W}$ -RSMR, Probestemperatur: Kreise: 87 K, Quadrate: 170 K, Rauten: 243 K, Dreiecke nach oben: 265 K, Dreiecke nach unten: 300 K.

Für die Auswertung der total und elastisch gestreuten Intensität muß das Zählerbild skaliert werden. Der Zähler ist so ausgerichtet, daß der direkte Strahl senkrecht auf die Detektorebene fällt. Um die gemessene Intensität auf ein Raumwinkelement zu skalieren, muß die Projektion eines Flächenelements des Zählerbilds auf eine Kugelschale berechnet werden, da ein Raumwinkelement proportional zu einem Flächenelement bei konstantem Abstand ist. Dazu wird zum einen der auf dem Streustrahl senkrecht stehende Flächenanteil benötigt. Dies liefert den Faktor  $\cos(2\vartheta)$ . Zum anderen verkürzen sich die linearen Dimensionen nach dem Strahlensatz im Verhältnis  $1/\sqrt{1 + \tan^2(2\vartheta)}$ , was für ein zweidimensionales Flächenelement den Faktor  $\cos^2(2\vartheta)$  ergibt (vgl. Abb. 25). Normiert auf ein Raumwinkelement ergibt sich somit für jeden Zählerbildpunkt der streuwinkelabhängige Faktor  $\cos^{-3}(2\vartheta)$ . Diese Näherung, bei der die Krümmung der Kugelschale nicht berücksichtigt wird, ist gültig, wenn die Dimensionen des betrachteten Flächenelements sehr viel kleiner als der Radius der Kugelschale sind. Für den verwendeten Zähler ist diese Bedingung erfüllt.



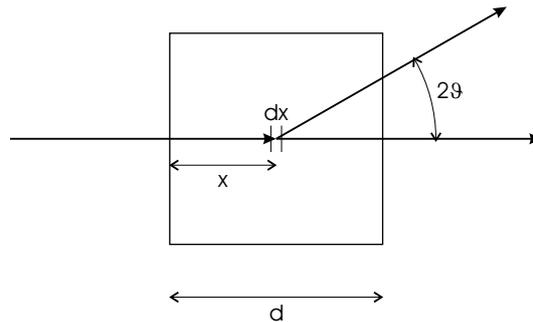
**Abb. 25:** Abbildung eines Zählerbildpunktes auf eine Kugelschale zur Bestimmung des Korrekturfaktors für ein betrachtetes Raumwinkelement.

Des weiteren ist in den Darstellungen der Meßwerte die Korrektur für die Absorption in der Streuprobe berücksichtigt. Diese Korrektur ist notwendig, da mit größer werdendem Streuwinkel der Weg der Strahlung durch die Probe länger wird. Bei einer Probendicke  $d$  und der Streuung der Strahlung von einem Probenelement  $dx$  im Abstand  $x$  nach dem Eintritt der Strahlung in die Probe ist die in den Winkel  $2\vartheta$  gestreute Strahlung um den Faktor

$$d\eta = e^{-\mu x} e^{-\mu(d-x)/\cos 2\vartheta} dx \quad (77)$$

durch die Absorption mit dem Absorptionskoeffizienten  $\mu$  geschwächt (vgl. Abb. 26). Zur Bestimmung des Korrekturfaktors für die gesamte Probe wird über die Probendicke integriert und das Ergebnis auf die Absorption für den direkten Strahl, das entspricht dem Streuwinkel  $2\vartheta = 0$ , normiert (Gingrich 1943). Dies ergibt den streuwinkelabhängigen Korrekturfaktor

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{1}{\mu d (1 - \cos 2\vartheta) / \cos 2\vartheta} \left( 1 - e^{-\mu d (1 - \cos 2\vartheta) / \cos 2\vartheta} \right). \quad (78)$$



**Abb. 26:** Skizze zur Berechnung der Absorptionskorrektur. Streuung an einem Probenelement der Dicke  $dx$  im Abstand  $x$  nach dem Eintritt der Strahlung in die Probe.

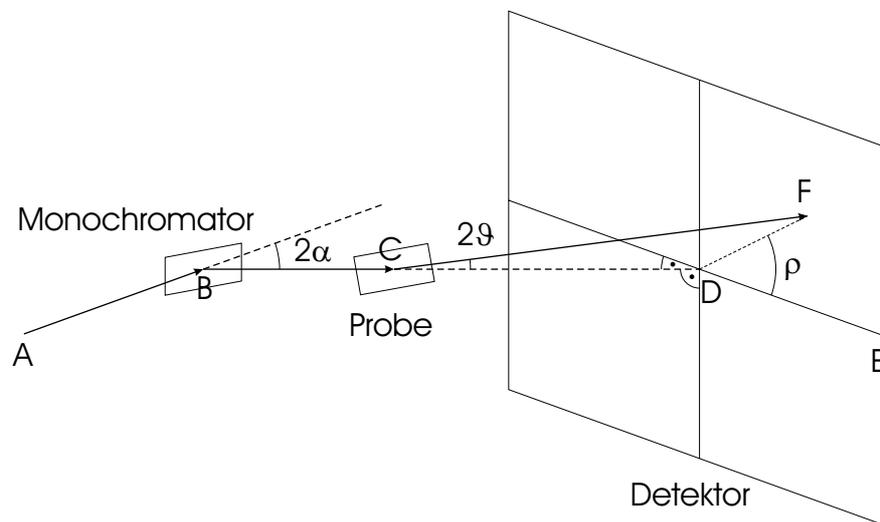
Mit dem gleichen Ansatz erhält man ohne die Normierung auf den Streuwinkel  $2\vartheta = 0$  die optimale Probendicke für die maximale Streuintensität. Unabhängig vom Streuwinkel ist die gestreute Intensität bei einer senkrechten Ausrichtung der Probe zum einfallenden Strahl genau dann maximal, wenn die Probendicke dem Inversen des Absorptionskoeffizienten  $\mu$  entspricht.

Zusätzlich zu den RSMR-Messungen wurde die total gestreute Intensität des verwendeten Puffers mit Kupfer  $K_\alpha$ -Röntgenstrahlung gemessen. Im Gegensatz zu den RSMR-Messungen ist hierbei die einfallende Strahlung durch die Verwendung eines Monochromators polarisiert.

Der Polarisationsfaktor  $P$  für unpolarisierte Strahlung,  $P = \frac{1 + \cos^2 2\vartheta}{2}$ , wird in diesem Fall durch

$$P = \frac{(\cos^2 2\alpha \cos^2 \rho + \sin^2 \rho) \cos^2 2\vartheta + \cos^2 2\alpha \sin^2 \rho + \cos^2 \rho}{1 + \cos^2 2\alpha} \quad (79)$$

ersetzt (Whittaker 1953). Hierbei ist  $2\alpha$  der Streuwinkel am Monochromator. Der Winkel  $\rho$  beschreibt die Drehung des Streustrahls um den direkten Strahl durch die Probe aus der Ebene heraus, die durch die Streuvektoren der Streuung am Monochromator aufgespannt wird (Azaroff 1955).



**Abb. 27:** Streuung von Röntgenstrahlung unter Verwendung eines Kristallmonochromators. Die Punkte A-E liegen auf einer Ebene. Der Streustrahl trifft den Detektor im Punkt F.  $2\alpha$ : Streuwinkel am Monochromator;  $2\vartheta$ : Streuwinkel an der Probe;  $\rho$ : Winkel zwischen  $\overline{DF}$  und  $\overline{DE}$ . Die Detektorebene steht senkrecht zum direkten Strahl durch die Probe  $\overline{BCD}$ .

### 5.2.1 Modell zur Beschreibung der mittleren quadratischen Auslenkungen der Atome im Myoglobinmolekül

Im Folgenden wird zunächst das zur Anpassung an die Meßdaten verwendete Modell vorgestellt. Eine genauere Analyse der einzelnen Komponenten dieses Modells erfolgen in der Diskussion. Zur Berechnung der Streuintensitäten wird angenommen, daß die Myoglobinkristalle und die Pufferlösung in der Probe statistisch orientiert und verteilt sind. Dadurch können die Streuteile dieser beiden Komponenten getrennt behandelt werden. Die Interferenzerscheinungen zwischen den Kristall- und Pufferdomänen fallen wegen der Kristalldimensionen ausschließlich in einen sehr kleinen Streuwinkelbereich um den direkten Strahl. Im den RSMR-Messungen zugänglichen Winkelbereich addieren sich wegen der fehlenden Phasenbeziehungen die Streuintensitäten der Kristalle und des Puffers und nicht die Streuamplituden.

Die nadelförmigen Myoglobinkristalle in der Probe sind mit einer Kantenlänge von höchstens 0.5 mm sehr viel kleiner als das gesamte Probenvolumen, so daß der Lorentz-Faktor für Pulverproben angewendet wird. Als Grundlage zur Bestimmung der gestreuten Intensitäten dienen die Röntgenstrukturdaten von Met-Myoglobin aus Pottwal-Muskelfleisch bei den Temperaturen 105 K, 180 K, 265 K und 300 K (Ostermann 2000). Die mittleren Atomkoordinaten sowie die mittleren quadratischen Abweichungen von diesen werden für die Anpassung der RSMR-Spektren bei 87 K, 170 K, 265 K und 300 K verwendet. Die 265 K-Struktur wird ebenfalls zur Erklärung der RSMR-Messungen bei 243 K herangezogen. Unter den gewählten Kristallisationsbedingungen kristallisiert das Myoglobin aus dem Pferdeherzen ebenso wie das Pottwal-Myoglobin in der Raumgruppe  $P2_1$ . Auch die Zellkonstanten der Pottwal- und Pferde-Myoglobinkristalle sind in dieser Raumgruppe ähnlich (vgl. Tab. 5) und werden vom Pottwal-Met-Myoglobin übernommen, da deren temperaturabhängigkeit bekannt ist.

	Pottwal-Myoglobin	Pferde-Myoglobin
a [Å]	63.80	63.6
b [Å]	30.68	28.8
c [Å]	34.26	35.6
$\alpha, \gamma$ [°]	0	0
$\beta$ [°]	105.66	106.5

**Tab. 5:** Vergleich der Zellkonstanten von Pottwal-Met-Myoglobin (Chong et al. 2001) bei 115 K und Pferde-CO-Myoglobin (Chu et al. 2000) bei 100 K der Raumgruppe  $P2_1$ .

Neben den Myoglobinmolekülen sind im Kristall Wassermoleküle sowie einige Ammonium- und Sulfationen aus der Pufferlösung vorhanden, die den Raum zwischen den Myoglobinmolekülen im Kristall ausfüllen. Die Lösungsmittelmoleküle sind aber nicht in jeder Einheitszelle des Kristalls an derselben Stelle, so daß in der Röntgenstruktur durch statische und dynamische Fehlorderungen maximal die Positionen von 160-170 Wassermolekülen und 2 Sulfationen pro Myoglobinmolekül bestimmt werden können (Hartmann et al. 1987). Um alle Wassermoleküle in der Einheitszelle zu berücksichtigen, werden daher anstelle der 170 bekannten Wassermoleküle die Wasserpositionen einer Monte-Carlo-Simulation verwendet (Parak et al. 1992). Dabei besetzt man die dem Wasser zugänglichen Orte in der Einheitszelle gleichmäßig mit Wassermolekülen und führt eine Energieminimierung des gesamten Systems durch, indem die Wasserpositionen verschoben

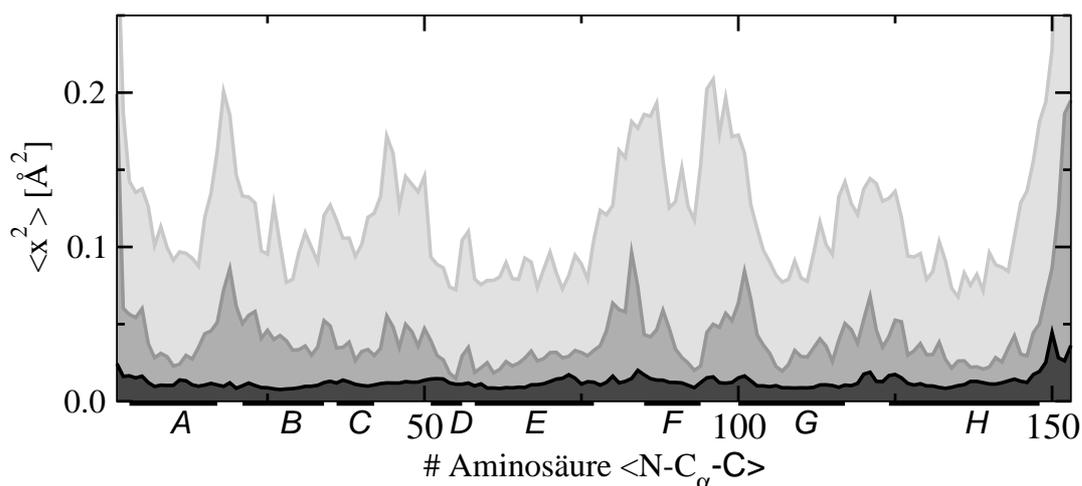
werden. Mit 397 Wassermolekülen in der asymmetrischen Einheit und einem einheitlichen Wert für die Summe aus den statischen und dynamischen mittleren quadratischen Auslenkungen der Wassermoleküle von  $\langle s^2 \rangle + \langle x^2 \rangle = 0.58 \text{ \AA}^2$  konnten die Meßwerte erklärt werden (Schmidt et al. 1996). In Übereinstimmung mit den Röntgenstrukturdaten können Atome mit einer so großen mittleren Auslenkung von ihrer Gleichgewichtsposition in der Röntgenstrukturanalyse nicht mehr aufgelöst werden. Das Fehlen der Ammonium- und der Sulfationen im Kristallwasser wird in diesem Modell durch eine erhöhte Anzahl von Wassermolekülen kompensiert.

Mit diesen Annahmen sind die Positionen der Atome in den Kristallen und ihre totalen mittleren quadratischen Auslenkungen festgelegt. Mit Hilfe einer Normal-Moden-Verfeinerung werden die Auslenkungen der Atome im Kristall in zwei Komponenten aufgeteilt: die internen Auslenkungen, die den Schwerpunkt des Moleküls unverändert lassen, und die externen Auslenkungen, die die Auslenkung des Moleküls als Ganzes betreffen. Die externen Auslenkungen werden mit dem TLS-Modell beschrieben. Die internen Auslenkungen erhält man dagegen mit Hilfe einer Normal-Moden-Analyse. Nachdem die Normal-Moden des Moleküls bestimmt worden sind, werden nur die niederenergetischsten Moden – im Fall des Myoglobins sind dies etwa 100 – verwendet, die schon den gesamten Bewegungsraum abdecken (Go 1990). Im weiteren Verlauf der Normal-Moden-Verfeinerung werden die Richtungen der Auslenkungen dieser niederenergetischen Moden festgehalten und deren Amplituden, die Atompositionen sowie die TLS-Parameter variiert, bis eine optimale Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Daten erreicht wird. Mit dieser Analyse erhält man im Gegensatz zu einer konventionellen Verfeinerung anisotrope Werte für die mittleren quadratischen Auslenkungen. Eine detaillierte Beschreibung der Normal-Moden-Verfeinerung findet sich in Kidera und Go (1992). Diese Verfeinerungstechnik wurde mit den Röntgenstrukturdaten von Myoglobin aus Parak et al. (1987) und Ostermann (2000) durchgeführt (Chong et al. 2001).

Wegen der fehlenden Energieanalyse liefert die Röntgenstrukturanalyse allerdings nur die Summe aus den statischen und dynamischen Fehlerrichtungen (vgl. z.B. Parak und Knapp (1984)). Da es zur Beschreibung der Dynamik nicht ausreicht, für alle Atome in der Probe nur einen einzigen Wert für die mittlere quadratische Auslenkung anzunehmen, werden für die Proteinatome die individuellen dynamischen  $\langle x^2 \rangle$ -Werte einer Normal-Moden-Analyse

benutzt (Melchers et al. 1996). Neben den individuellen Fluktuationen, geben die Normal-Moden die Korrelationen in den Bewegungen der Atome wieder.

Damit wird nun folgendes Modell für die mittleren quadratischen Auslenkungen der Myoglobinmoleküle im Kristall benutzt: Die dynamischen Auslenkungen der Atome werden durch die Normal-Moden aus Melchers et al. (1996) beschrieben. Aus diesen erhält man auch die Korrelationen in den Bewegungen verschiedener Atome desselben Moleküls. Korrelationen in den Bewegungen zwischen Atomen verschiedener Moleküle werden vernachlässigt. Die Differenz in den Auslenkungen zwischen den internen Fluktuationen aus der Normal-Moden-Verfeinerung (Chong et al. 2001) und den Normal-Moden wird als statisch angenommen. Das TLS-Modell gibt schließlich die Auslenkungen und die Korrelationen der externen Moden wieder. Die Größe und die Zusammensetzung der einzelnen Beiträge ist in Abb. 28 exemplarisch für die 105 K-Messung dargestellt.



**Abb. 28:** Mittlere quadratische Auslenkungen der Myoglobinrückgrat-atome, gemittelt über alle Raumrichtungen, für 105 K. x-Achse: Nummer der Aminosäure in der Sequenz, gezählt vom N-Terminus zum C-Terminus, die Buchstaben A-H markieren die Bereiche der 8  $\alpha$ -Helizes. Linien: hell: totale Auslenkungen, mittel: interne Auslenkungen, dunkel: Normal-Moden; Bereiche: hell: TLS-Moden, statisch; mittel: skalierte Normal-Moden, statisch; dunkel: Normal-Moden, dynamisch.

Um eine Näherung für die Korrelationen in den statischen internen Auslenkungen zu erhalten werden die Normal-Moden so skaliert, daß die mittleren quadratischen Auslenkungen den internen Auslenkungen entsprechen. Dieses Vorgehen entspricht in etwa demselben Verfahren wie bei der Normal-Moden-Verfeinerung. In der Normal-Moden-Verfeinerung werden die Amplituden der einzelnen Moden und einige Kopplungskonstanten zwischen den Moden verändert. Mit dem gefundenen Parametersatz sind die internen Fluktuationen aller

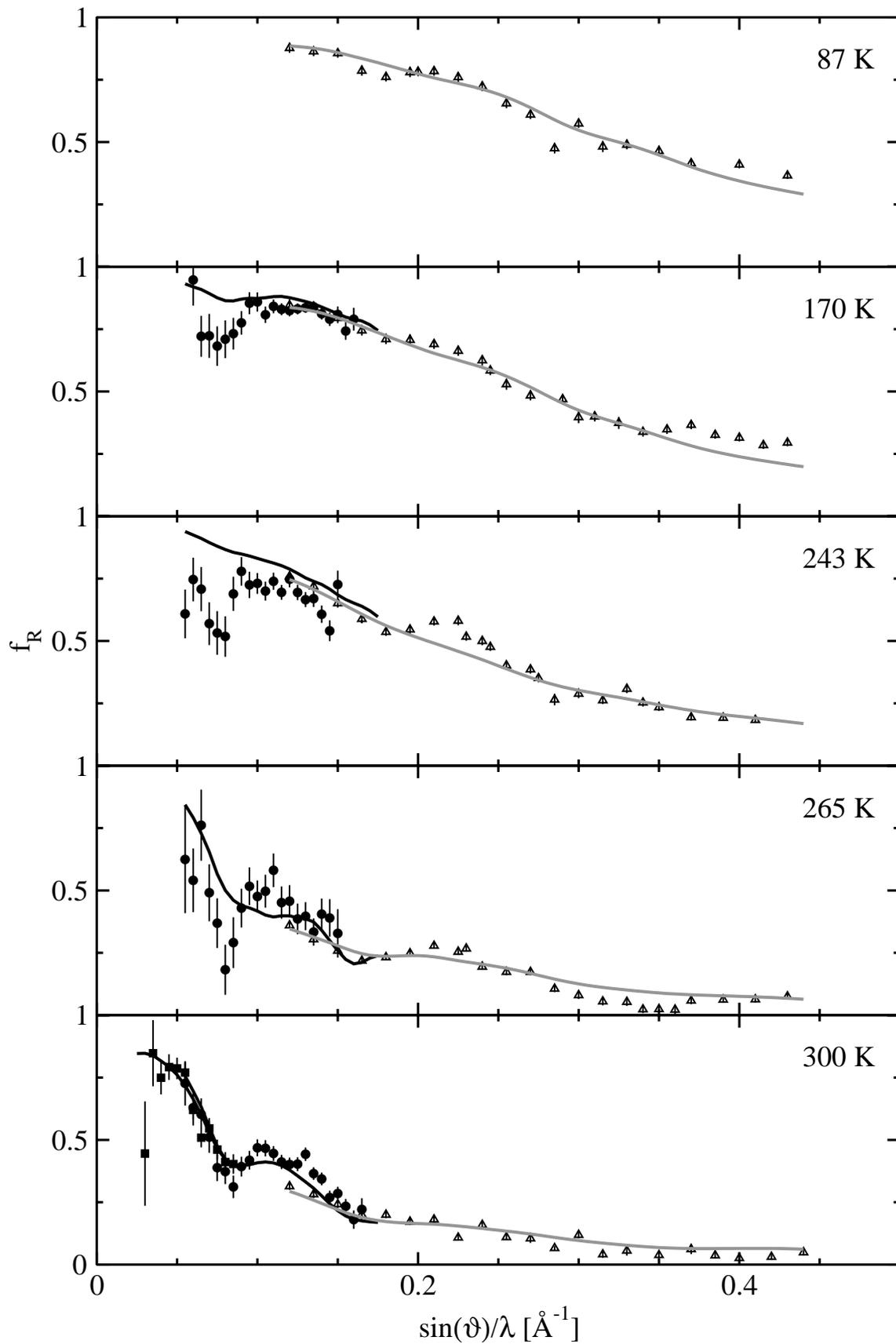
Proteinatome festgelegt. Da aber weder die verwendeten Moden noch die Kopplungskonstanten zwischen diesen bekannt sind, wird für jedes Atom ein Skalierungsfaktor bestimmt, der auf die Summe der Auslenkungen aller Normal-Moden angewendet wird. Dieses Vorgehen liefert eine Abschätzung für die Korrelationen, die sich aus der Normal-Moden-Verfeinerung ergeben.

Zuletzt muß noch die Streuintensität des Puffers bestimmt werden. Die Temperatur- und Winkelabhängigkeit der total gestreute Intensität wird von Röntgenstreuexperimenten übernommen. Die absolute Intensität erhält man aus einer Skalierung der Meßwerte, so daß für große Streuwinkel die gemessene Intensität der inkohärenten Streuung des Puffers – das ist die Summe der Quadrate der Atomformfaktoren – entspricht. Die elastische gestreute Intensität ergibt sich aus der totalen Streuintensität, indem nach der Näherung von Vineyard (1958) (vgl. S. 45 ff) ein  $\langle x^2 \rangle$ -Wert für alle Atome des Puffers angenommen wird.

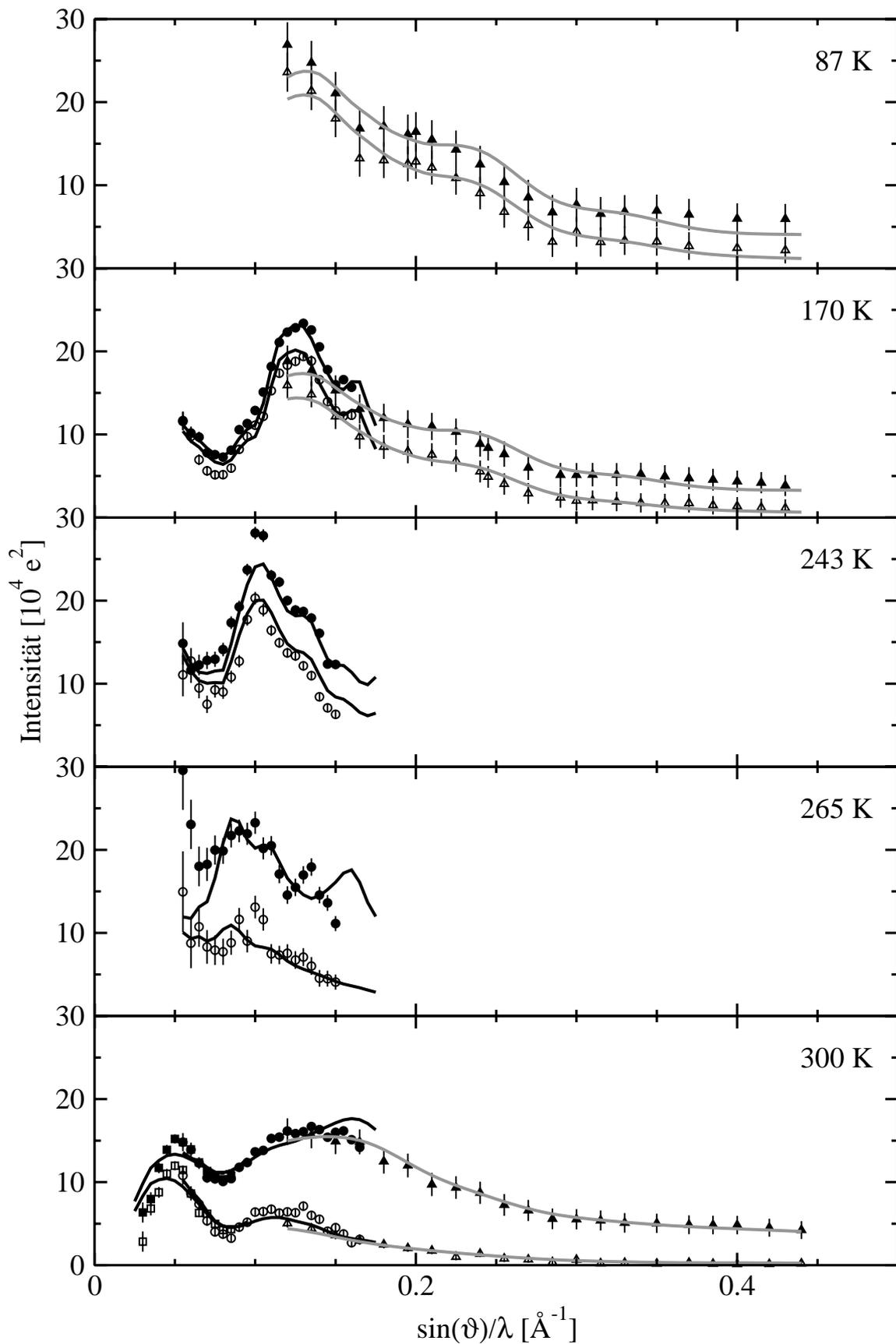
Hiermit sind beinahe alle Parameter zur Charakterisierung des Modells gegeben. Frei variierbar bleiben nur noch die  $\langle x^2 \rangle$ -Werte des Kristallwassers, wobei die Summe aus den statischen und dynamischen mittleren quadratischen Auslenkungen etwa bei  $0.58 \text{ \AA}^2$  liegt, sowie der  $\langle x^2 \rangle$ -Wert des Puffers. Die mit diesem Modell erzielten Anpassungen an die Meßdaten sind in Abb. 29 und Abb. 30 dargestellt, die Resultate für die veränderlichen Parameter in Tab. 6. Die Auswirkungen der proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen auf die Streuung werden in der Diskussion behandelt und bleiben zunächst unberücksichtigt. Die streuwinkelabhängigen Werte für die Atomformfaktoren und die Compton-Streuung sind MacGillavry und Rieck (1985) entnommen.

Temperatur [K]	$\langle x_{MC}^2 \rangle [\text{\AA}^2]$	$\langle s_{MC}^2 \rangle [\text{\AA}^2]$	$\langle x_{Puffer}^2 \rangle [\text{\AA}^2]$
87	0	0.6	$0.027 \pm 0.001$
170	0	$0.63 \pm 0.20$	$0.047 \pm 0.002$
243	—	—	0.12
265	—	—	0.79
300	$0.12 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.05$	$1.72 \pm 0.09$

**Tab. 6:** Parameter zur Anpassung des Modells an die Meßwerte.  $\langle x_{MC}^2 \rangle$  und  $\langle s_{MC}^2 \rangle$ : dynamische bzw. statische Auslenkungen der Kristallwasser mit den Positionen aus der Monte-Carlo-Simulation,  $\langle x_{Puffer}^2 \rangle$ : dynamische Auslenkungen der Pufferatome.



**Abb. 29:** Elastisch gestreuter Anteil an polykristallinem Pferde-Myoglobin. Quadrate und Kreise:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, Dreiecke:  $^{183}\text{W}$ -RSMR, Linien: Anpassung mit dem oben beschriebenen Modell für die  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR (schwarz) und die  $^{183}\text{W}$ -RSMR (grau).



**Abb. 30:** Totale (gefüllte Symbole) und elastische (offene Symbole) Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin. Quadrate und Kreise:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, Dreiecke:  $^{183}\text{W}$ -RSMR, Linien: Anpassung mit dem oben beschriebenen Modell für die  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR (schwarz) und die  $^{183}\text{W}$ -RSMR (grau).

Die gezeigten Werte sind auf den Polarisationsfaktor, die Absorption in der Probe und die effektive Quellintensität, die durch die verschiedenen Akzeptanzwinkel des Detektors hervorgerufen wird, korrigiert. Die Faltung mit der Winkelauflösungsfunktion (vgl. Abb. 21) ist in den Daten enthalten. Eine entsprechende Entfaltung würde die Daten nur verschlechtern und keinen Informationsgewinn beinhalten. Auf Grund der verschiedenen Winkelauflösungen für die  $^{57}\text{Fe}$ - und die  $^{183}\text{W}$ -RSMR-Messungen unterscheiden sich ebenfalls die Theoriefunktionen in Abb. 29 und Abb. 30 trotz gleicher Parameter. Daher sind die Anpassungen für jede Messung separat gezeigt. Das verwendete Modell ist in Tab. 7 nochmals zur besseren Übersicht zusammengefaßt.

<b>KRISTALLE</b>
------------------

**Myoglobin**

Positionen: Röntgenstrukturanalyse

Auslenkungen

totale: Röntgenstrukturanalyse

*externe:* TLS-Moden, statisch

*interne:* Normal-Moden, dynamisch

Differenz zw. internen u. Normal-Moden, statisch

**Kristallwasser**

Positionen: Monte-Carlo Simulation

Auslenkungen variiert, Summe aus statischen u. dynamischen  $\approx 0.58 \text{ \AA}^2$

<b>PUFFER</b>
---------------

Positionen: Totale Streuung aus Röntgen-Messungen

Auslenkungen Ein  $\langle x_{\text{Puffer}}^2 \rangle$ -Wert (Vineyard 1958), variiert.

**Tab. 7:** Übersicht des verwendeten Modells zur Interpretation der RSMR-Streudaten.

## 6 Diskussion

### 6.1 Nukleare Vorwärtsstreuung

Die Abnahme der Quadrupolaufspaltung mit zunehmender Temperatur erfolgt analog zu den Ergebnissen aus Mößbauer-Absorptionsmessungen. Die Übereinstimmung der Quadrupolaufspaltungen, gemessen mit der nuklearen Vorwärtsstreuung bzw. mit der Mößbauer-Absorption, ist in Keppler et al. (2000) gezeigt. Da die Frequenz der „quantum beats“, aus der die Energiedifferenz zwischen den Resonanzen bestimmt wird, weder von der effektiven Dicke der Probe noch von der Breite einer Lorentz-förmigen Inhomogenitätsverbreiterung abhängt, kann die Quadrupolaufspaltung auch mit Messungen an einer dünnen Probe in einem relativ kurzen Zeitfenster bis etwa 150 ns genau bestimmt werden.

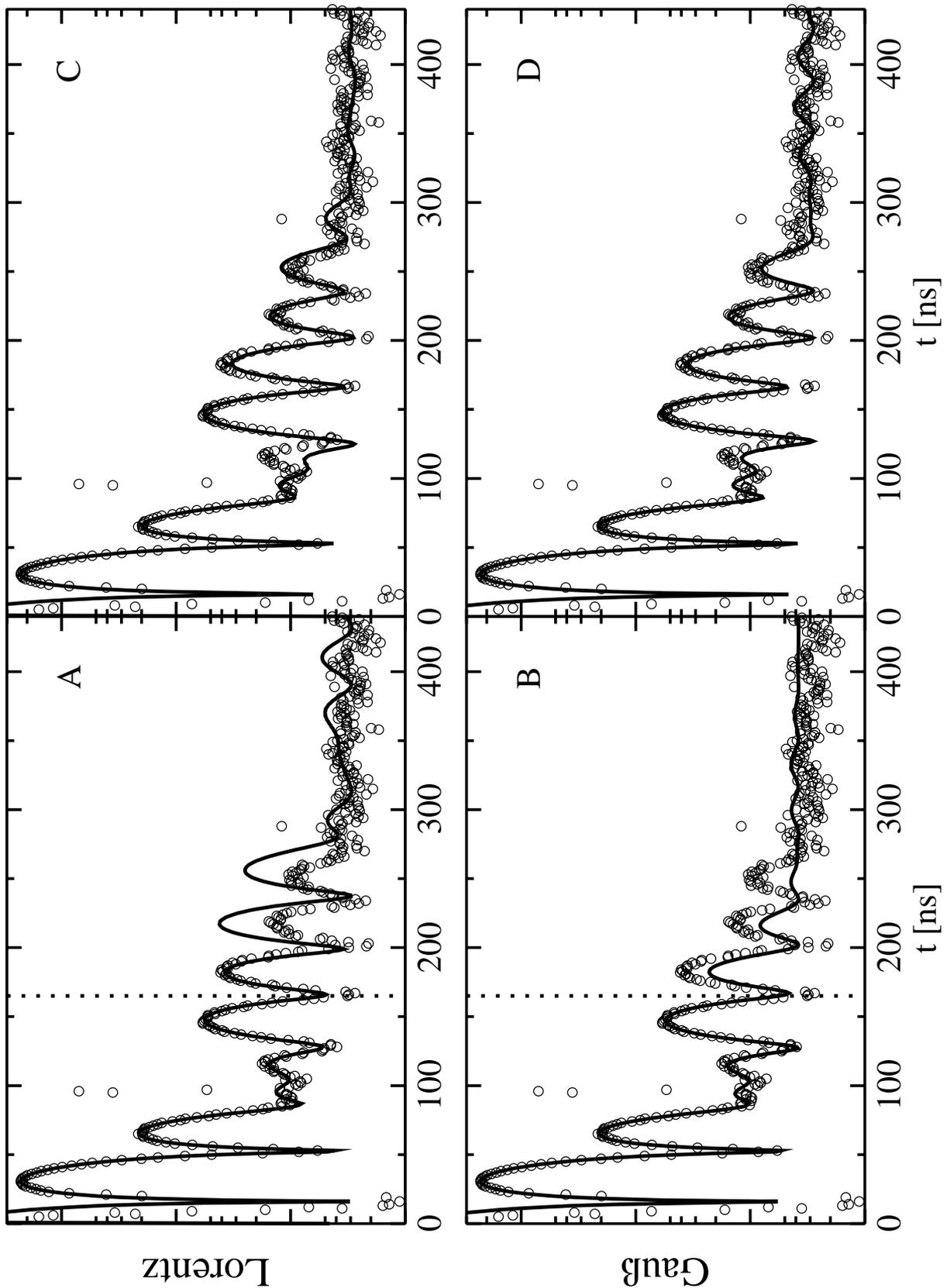
Anders verhält es sich mit der Auswertung der dynamischen mittleren quadratischen Auslenkungen des Eisenatoms. Hierzu ist eine Bestimmung der Inhomogenitätsverbreiterung notwendig, da diese bei kurzen Zeiten zu den gleichen Änderungen im Meßspektrum führt wie die effektive Dicke der Probe. Bei tiefen Temperaturen kann mit einer sinnvollen Annahme für die Breite der Verteilungsfunktion auch bei kurzen Zeiten eine gute Näherung für die  $\langle x^2 \rangle$ -Werte erzielt werden. Im Vergleich zu den bei tiefen Temperaturen großen effektiven Dicken ist die Unsicherheit in der Inhomogenitätsverbreiterung oft vernachlässigbar. Zudem wird bei der Bestimmung der dynamischen Auslenkungen bei tiefen Temperaturen die lineare Abhängigkeit der  $\langle x^2 \rangle$ -Werte von der Temperatur ausgenutzt, so daß ein systematischer Fehler in den effektiven Dicken nur geringe Auswirkungen auf die mittleren quadratischen Auslenkungen hat. Mit steigender Temperatur und abnehmender effektiver Dicke wird die genaue Kenntnis der Inhomogenitätsverbreiterung für die Bestimmung der Dynamik zunehmend wichtiger. In Keppler (1999) ist demonstriert, inwieweit bei Temperaturen über 180 K die gefundenen  $\langle x^2 \rangle$ -Werte von der Annahme über die Inhomogenitätsverbreiterung abhängen.

## 6.1.1 Inhomogenitätsverbreiterung

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen ist es erstmals gelungen, die Besselminima der „dynamical beats“ an einer Proteinprobe zu beobachten. Damit ist die getrennte Auswertung der Parameter der effektiven Dicke und der Inhomogenitätsverbreiterung möglich. Außerdem kann auch die Form der Verteilungsfunktion bestimmt werden. In Abb. 31 ist die Anpassung der Zeitspektren bei 5 K mit Lorentz- bzw. Gauß-förmigen Verteilungsfunktionen zur Berücksichtigung der Inhomogenitätsverbreiterungen gezeigt. Zur Veranschaulichung ist diese Auswertung jeweils einmal im Zeitfenster bis 165 ns und einmal bis 420 ns dargestellt. Obwohl auch im kurzen Zeitfenster das von der effektiven Dicke hervorgerufene Besselminimum zu sehen ist, kann hier noch keine definitive Entscheidung zugunsten der Lorentz- oder der Gauß-förmigen Verteilungsfunktion getroffen werden. Mit einer Lorentz-förmigen Inhomogenitätsverbreiterung, wie sie in Keppler et al. (2000) zur Interpretation der nuklearen Vorwärtsstreuung an Deoxy-Myoglobin verwendet wird, läßt sich im kurzen Zeitfenster eine geringfügig bessere Anpassung an die Meßwerte erzielen. Erst im größeren Zeitfenster bis 420 ns treten die Unterschiede zwischen den verschiedenen Verteilungsfunktionen zu Tage. Die Anpassung mit einer Gauß-förmigen Inhomogenitätsverbreiterung gibt das gemessene Zeitspektrum besser wieder. Dies ist besonders deutlich im Bereich des Besselminimums bei  $t \approx 100$  ns zu sehen (vgl. Abb. 31). Die bei der Anpassung verwendeten Parameter sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Hier wird nochmals deutlich, daß trotz verschiedener Verteilungsfunktionen die gewonnenen Werte für die Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$  gut übereinstimmen. Auch die Abhängigkeit der effektiven Dicke  $t_a$  von der Breite der Verteilungsfunktion  $\Gamma_{inh}$  wird deutlich. Je breiter die Inhomogenitätsverbreiterung ist, desto kleiner ist der resultierende Wert für die effektive Dicke.

	$t_a$	$\Delta E_Q$ [mm/s]	$\Gamma_{inh}$ [ $\Gamma_{nat}$ ]
Lorentz bis 165 ns	$41.758 \pm 0.074$	$2.307 \pm 0.002$	$0.016 \pm 0.171$
Gauß bis 165 ns	$36.099 \pm 0.240$	$2.292 \pm 0.002$	$2.819 \pm 0.062$
Lorentz bis 420 ns	$42.195 \pm 0.059$	$2.320 \pm 0.001$	$0.467 \pm 0.009$
Gauß bis 420 ns	$38.581 \pm 0.076$	$2.297 \pm 0.001$	$2.053 \pm 0.015$

**Tab. 8:** Parameter für die Lorentz- bzw. Gauß-förmige Verteilungsfunktion zur Berücksichtigung der Inhomogenitätsverbreiterung bei einer Auswertung bis 165 ns bzw. 420 ns.



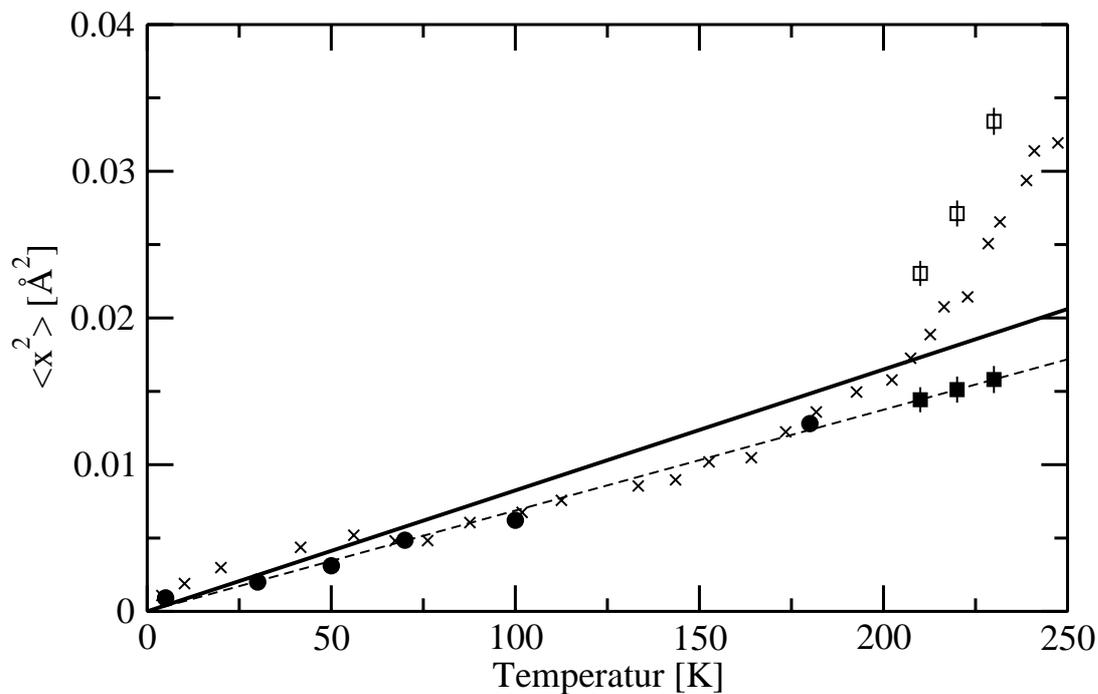
**Abb. 31:** Vergleich der Anpassung der Zeitspektren von Deoxy-Myoglobin bei 5 K mit Gauß- bzw. Lorentz-förmigen Verbreiterungen. Anpassung bis 165 ns (markiert durch die gepunktete Linie) mit einer **A:** Lorentz- und **B:** Gauß-förmigen Inhomogenitätsverbreiterung. Der weitere Verlauf ist extrapoliert. **C** und **D:** Anpassung bis 420 ns mit einer Lorentz- bzw. Gauß-förmigen Verbreiterung.

Eine Gauß-förmige Inhomogenitätsverbreiterung ist zu erwarten, wenn die Verteilung der Hyperfeinparameter des Eisenatoms statistischer Natur ist. Aus der Gauß-förmigen Verteilung der Hyperfeinparameter läßt sich ableiten, daß die strukturellen Unterschiede der Proteine, die durch die Verteilung auf die verschiedenen Konformationssubzustände entstehen, vermutlich ebenfalls Gauß-förmig verteilt sind. Als Folge davon ist die Kummulantenentwicklung, die zur Berechnung des Ensemblemittelwertes für die Interpretation der RSMR-Messungen notwendig ist (vgl. Gl. ( 25 )), zumindest für die statischen Auslenkungen des Eisenatoms aus seiner Mittellage keine Näherung mehr, sonder exakt gültig.

Die Inhomogenitätsverbreiterung ist weitgehend unabhängig von der Temperatur. Die geringfügige Zunahme von  $\Gamma_{inh} = 2.05 \Gamma_{nat}$  bei 5 K nach  $\Gamma_{inh} = 2.17 \Gamma_{nat}$  bei 100 K kann einerseits von den Meßfehlern hervorgerufen werden. Andererseits bedingt die Probendicke ein langsames Einfrieren. Damit bleibt die bei Raumtemperatur vorherrschende Verteilung der Moleküle in der Probe auf die Konformationssubzustände nicht erhalten. Während des Einfrierprozesses kann sich eine neue, der Temperatur entsprechende Gleichgewichtsverteilung einstellen. Beim anschließenden Erwärmen der Probe werden für das Protein sukzessive weitere Konformationssubzustände zugänglich. Dies bewirkt die Zunahme der Inhomogenitätsverbreiterung mit steigender Temperatur.

### 6.1.2 Dynamik des Eisenatoms in Myoglobin

Aus den gefundenen Werten für die effektive Dicke läßt sich die mittlere dynamische Auslenkung des Eisenatoms bestimmen. Für die Absolutskalierung wird die bei tiefen Temperaturen im klassischen Limit lineare Temperaturabhängigkeit der durch die Phononen bestimmten dynamischen Fluktuationen ausgenutzt. Die resultierenden Werte stimmen mit denjenigen aus Mößbauer-Absorptionsmessungen überein (vgl. Abb. 32). Die theoretischen Vorhersagen aus der Normal-Moden-Analyse von Melchers et al. (1996), die die mittleren quadratischen Fluktuationen des Eisenatoms in CO-Moyoglobin die Meßergebnisse korrekt wiedergeben, liegen in derselben Größenordnung, liefern aber für das Eisen in Deoxy-Myoglobin leicht größere Werte.

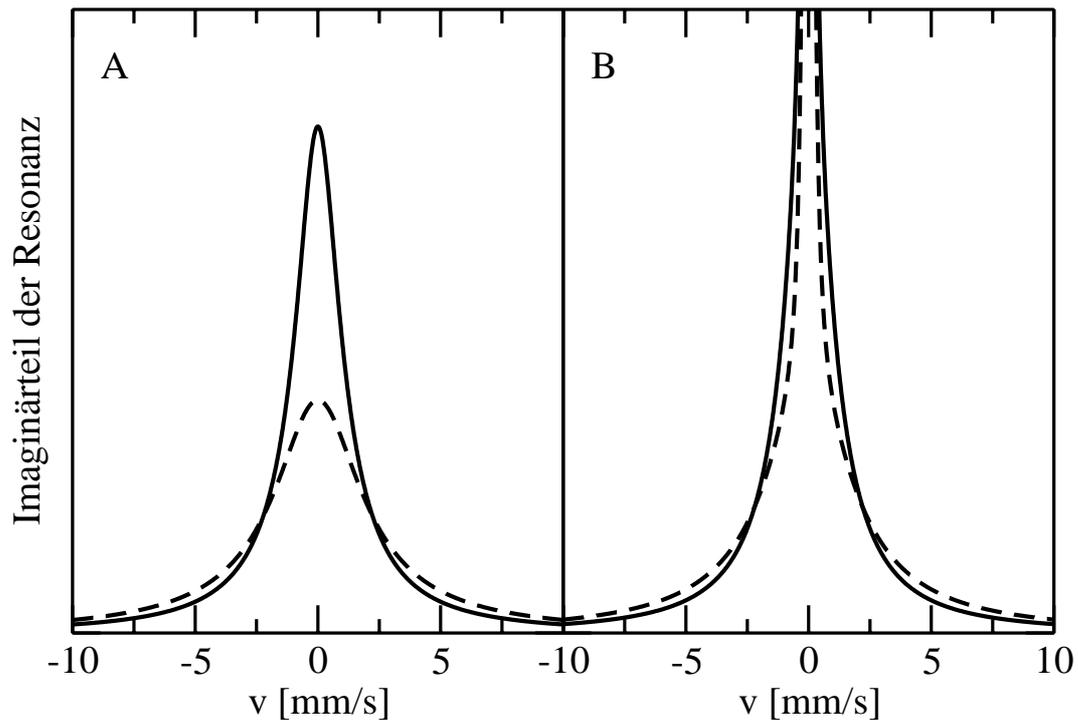


**Abb. 32:** Mittlere quadratische Auslenkungen des Eisens in Deoxy-Myoglobinkristallen. Kreise: Daten aus der nuklearen Vorwärtsstreuung, gefüllte Quadrate:  $\langle x_v^2 \rangle$  aus den tieftemperatur Meßwerten extrapoliert, offene Quadrate:  $\langle x_v^2 \rangle + \langle x_t^2 \rangle$  aus der nuklearen Vorwärtsstreuung, Kreuze:  $\langle x^2 \rangle$  aus Mößbauer-Absorption (Parak et al. 1982), durchgezogene Linie:  $\langle x^2 \rangle$  aus Normal-Moden-Analyse (Melchers et al. 1996), gestrichelte Linie: Lineare Regression an die Tieftemperaturwerte.

Für die Auswertung der  $\langle x^2 \rangle$ -Werte über 180 K wird das Modell des Brown'schen Oszillators angewendet, um den mit der Mößbauer-Absorption beobachteten breiten Linien Rechnung zu tragen. Diesem Modell nach setzen sich die dynamischen Fluktuationen aus den bei tiefen Temperaturen vorhandenen Vibrationen  $\langle x_v^2 \rangle$  und den quasi diffusiven Bewegungen  $\langle x_t^2 \rangle$  additiv zusammen. Die Anwendung des Brown'schen Oszillators bedingt das lineare Extrapolieren der  $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte aus den Tieftemperaturwerten zur Meßtemperatur. Damit wird der Anstieg in den dynamischen Fluktuationen alleine durch die quasi diffusiven Bewegungen verursacht. Die Temperaturabhängigkeit der  $\langle x_v^2 \rangle$ -Werte bestimmt im gesamten Temperaturbereich die Abnahme der Absorptionsfläche im Mößbauer-Spektrum. Daß die durch die Phononen verursachten Vibrationsbewegungen auch bei Temperaturen über 180 K auftreten, konnte mit Hilfe des phononunterstützten Mößbauer-Effekts gezeigt werden (Achterhold et al. 2001). Die zeitliche Abnahme der Intensität bei der nuklearen Vorwärtsstreuung ist nun durch die Variablen des Brown'schen Oszillators  $\alpha_t$  und  $\langle x_t^2 \rangle$  gegeben.

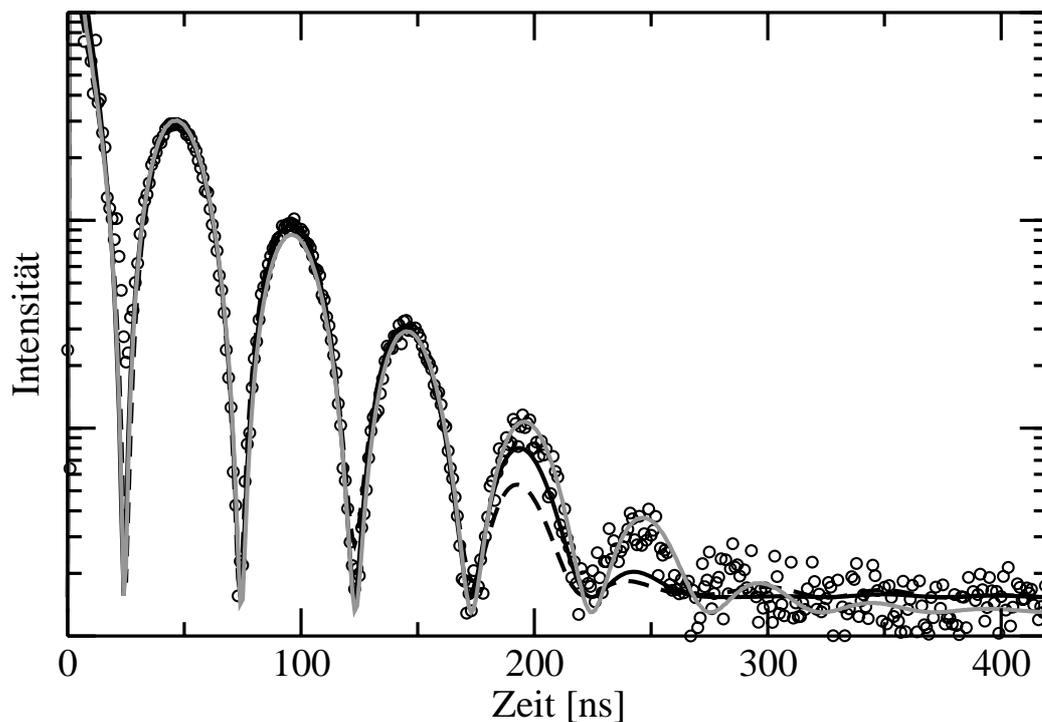
Die  $\langle x_i^2 \rangle$ -Werte, die in die Berechnung der effektiven Dicke eingehen, gewinnt man aus der jeweiligen Lage der Besselminima in den Zeitspektren. Die gefundenen Werte liegen oberhalb der mit Mößbauer-Absorption bestimmten Werte (vgl. Abb. 32). Hier zeigt sich ein Vorteil der nuklearen Vorwärtsstreuung. Die Lage des Besselminimums wird nicht vom Untergrundrauschen der Meßapparatur beeinflusst. Bei der Mößbauer-Absorption ist dagegen eine sorgfältige Behandlung der nichtresonanten Untergrundstrahlung notwendig. Der Parameter  $\alpha_i$ , der die Breite der breiten Linien bestimmt, bewirkt wegen der durch die Fourier-Transformation gegebenen Beziehung zwischen der Breite der Resonanz und der Intensitätsabnahme der Vorwärtsstreuung einen stärkeren Abfall der vorwärtsgestreuten Intensität in den Zeitspektren. Je breiter die Resonanz ist, desto schneller erfolgt die Intensitätsabnahme. Daher können sehr breite Resonanzen mit der nuklearen Vorwärtsstreuung nicht aufgelöst werden, da sie ausschließlich in das Zeitfenster unmittelbar nach der Anregung der Probe fallen. Die in den Anpassungen der Zeitspektren gefundenen Werte für  $\alpha_i$  sind deutlich kleiner als die mittels der Mößbauer-Absorption bestimmten Werte (Gaßmann 2000). Beim Vergleich der Linienbreiten ist Vorsicht geboten, da die Mößbauer-Absorptionsmessungen an mit CO ligandiertem Myoglobin durchgeführt wurden. Der im Vergleich zu Deoxy-Myoglobin zusätzliche Ligand verstärkt die Bindungskräfte am Eisen und bewirkt die Verringerung der mittleren quadratischen Auslenkungen der Vibrationsbewegungen. Dies ist in Mößbauer-Absorptionsmessungen beobachtbar. Allerdings ist zu erwarten, daß sich die Parameter des Brown'schen Oszillators, der die quasi diffusiven Bewegungen der Übergänge zwischen den Konformationssubzuständen beschreibt, einander ähnlich sind, da in die diffusiven Bewegungen große Proteinteile involviert sind.

In Abb. 33 sind die breiten Linien der quasi diffusiven Bewegungen mit den Parametern aus der nuklearen Vorwärtsstreuung und aus der Mößbauer-Absorption dargestellt. Das Zusammenspiel der größeren  $\langle x_i^2 \rangle$ -Werte mit den schmälere breiten Linien aus der nuklearen Vorwärtsstreuung gleicht die stärkere Abnahme des Maximums der schmalen Resonanz durch die größere Konzentration der breiten Linien um ihr Maximum teilweise aus. Unterschiede treten in den Flanken der Resonanz auf. Eine Anpassung der Zeitspektren mit den Werten aus der Mößbauer-Absorption ist deutlich schlechter (vgl. Abb. 34). Ebenfalls ist in dieser Abbildung die Simulation mit einem anderen Modell gezeigt. Im Gegensatz zu der bisher angenommenen Gauß-förmigen Inhomogenitätsverbreiterung ist nun die Linienbreite



**Abb. 33:** Vergleich der breiten Linien aus der nuklearen Vorwärtsstreuung (schwarz,  $\langle x_t^2 \rangle = 0.012 \text{ \AA}^2$ ,  $\alpha_t = 10 \Gamma_{\text{nat}}$ ) und der Mößbauer-Absorption (grau,  $\langle x_t^2 \rangle = 0.010 \text{ \AA}^2$ ,  $\alpha_t = 20 \Gamma_{\text{nat}}$ ) bei 220 K. **A:** breite Linien, **B:** Summe aus schmaler und breiten Linien.

der schmalen Resonanz größer ( $\Gamma = 2.4 \Gamma_{\text{nat}}$ ). Dieses Vorgehen ist in der dünnen Absorbernäherung bei der Interpretation von Mößbauer-Absorptionsspektren üblich. Auch mit diesem Modell ergibt sich derselbe  $\langle x_t^2 \rangle$ -Wert, der durch die Lage des Besselminimums im Zeitspektrum festgelegt ist. Dagegen entspricht der  $\alpha_t$ -Wert nun den mit der Mößbauer-Absorption bestimmten Werten. Das Resultat für die Breite der breiten Linien ist demnach modellabhängig während die totalen dynamischen Auslenkungen modellfrei bestimmt werden können. Die Abhängigkeit des  $\alpha_t$ -Werts vom Modell der Inhomogenitätsverbreiterung ist leicht einsichtig, da die Intensitätsverteilung in den breiten Linien die Defizite in der Linienform der schmalen Resonanzlinie kompensieren kann. Insgesamt ist das Modell mit der verbreiterten schmalen Resonanz zu verwerfen, da die Inhomogenitätsverbreiterung anhand der 5 K Daten zweifelsfrei bestimmt werden kann. Auch bei 230 K verschlechtert sich die Anpassung an die Meßdaten. Dies ist besonders im zweiten und dritten Maximum bei etwa 100 ns bzw. 150 ns zu sehen (Abb. 34). Wegen der logarithmischen Darstellung wiegen die Abweichungen bei kürzeren Zeiten schwerer als die Verbesserungen bei längeren Zeiten.



**Abb. 34:** Nukleare Vorwärtsstreuung an Myoglobin bei 230 K. Symbole: Meßdaten, schwarze Linien: Gauß-förmige Inhomogenitätsverbreiterung mit Parametern für den Brown'schen Oszillator aus der nuklearen Vorwärtsstreuung (durchgezogen) und der Mößbauer-Absorption (gestrichelt), graue Linie: Linienbreite der schmalen Resonanz  $\Gamma = 2.4 \Gamma_{\text{nat}}$ .

## 6.2 Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung

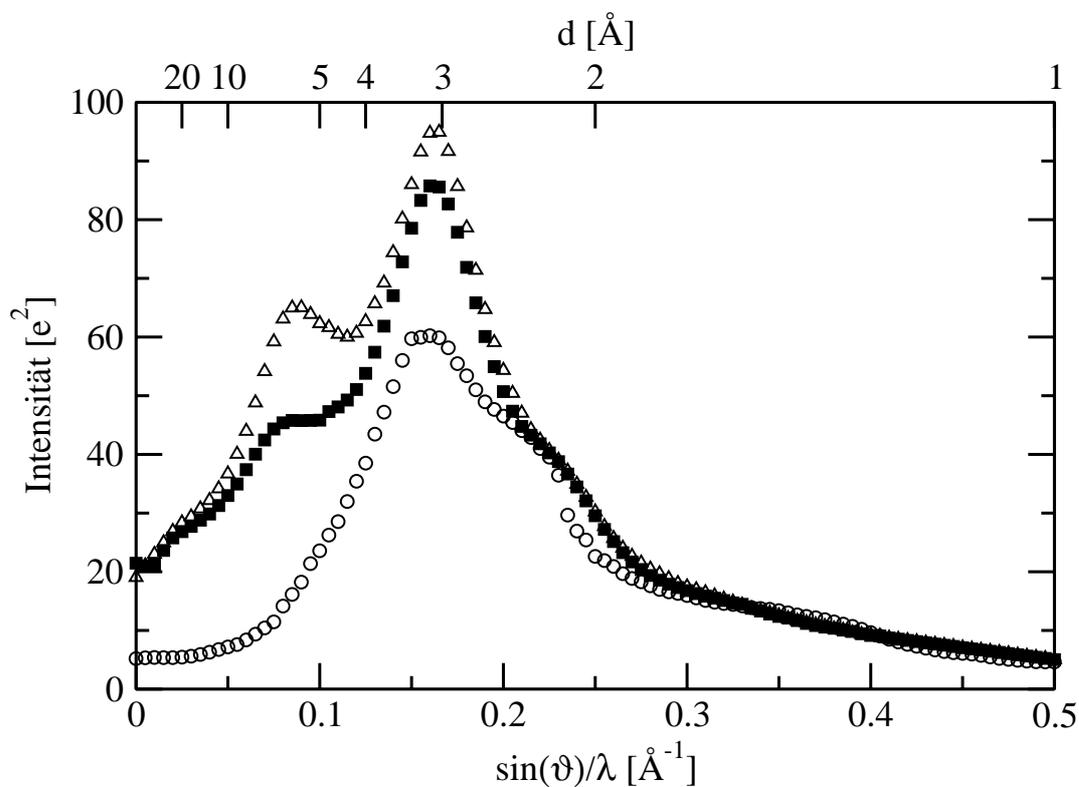
Das hier vorgestellte Modell ist eine Weiterentwicklung des Modells aus Zach et al. (2000). Es berücksichtigt zusätzlich die statischen Fehlordnungen im Kristall auf Grund der Verteilungen auf die Konformationssubzustände und die TLS-Auslenkungen. Damit ist die Summe aus den statischen und dynamischen mittleren quadratischen Auslenkungen in Übereinstimmung mit den aus der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Werten. Außerdem wird hier der Winkelauflösung der Meßapparatur Rechnung getragen. Dadurch wird die Theriefunktion geglättet und die Zacken in den Simulationen, die vornehmlich von den Streubeiträgen der Bragg-Reflexe hervorgerufen werden, verschwinden.

Im Folgenden wird das Modell zur Interpretation der total und elastisch gestreuten Intensität am Beispiel der 300 K-Meßdaten diskutiert. Der Datensatz für diese Temperatur überdeckt von allen gemessenen Temperaturpunkten den weitesten Streuwinkelbereich mit den

kleinsten statistischen Fehlern. Darüber hinaus sind die Tieftemperaturmessungen für eine Diskussion der proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen nicht geeignet.

### 6.2.1 Probenzusammensetzung

In den Simulationen der total und elastisch gestreuten Intensitäten wird die auf einer Röntgenanlage gemessene totale Streuung des 2.8 M Ammoniumsulfatpuffers verwendet. Die Myoglobinkristalle sind in einem Puffer dieser Molarität gewachsen. Pro Myoglobinmolekül sind im Kristall etwa 400 Wassermoleküle und 13 Ammoniumsulfate vorhanden (Parak et al. 1992). Legt man der Probenanalyse diese Werte zugrunde, dann ergibt sich aus den Mengenverhältnissen der Substanzen in der Probe (vgl. Kap. 4) für den die Kristalle umgebenden Puffer eine 6.85 M Ammoniumsulfatlösung. Eine so hohe Ammoniumsulfatkonzentration in der Probe ist unmöglich, da bei Raumtemperatur eine Ammoniumsulfatlösung bei 4 M gesättigt ist und eine Kristallisation der übrigen Salzionen in den 300 K-Messungen nicht beobachtbar ist. Auch mit dem gesättigten 4 M Puffer sind die

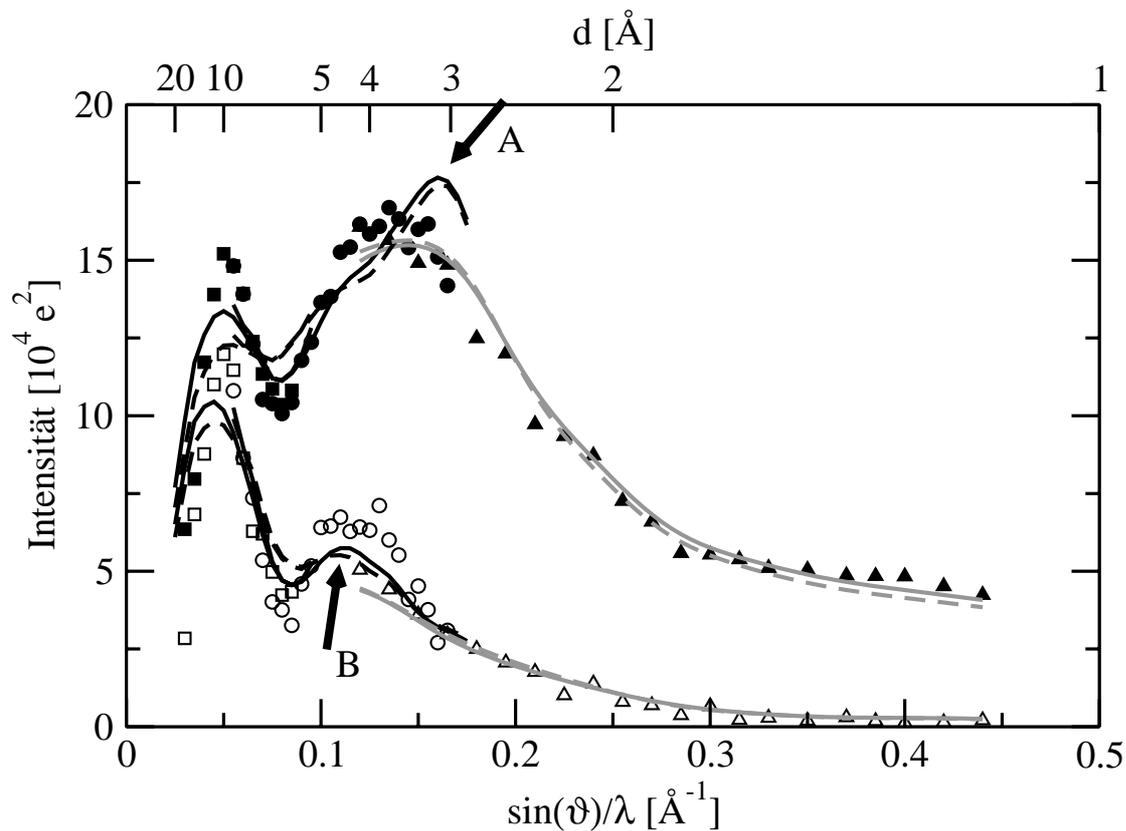


**Abb. 35:** Totale Rayleigh-Streuung des Puffers bei 300 K gemessen mit Kupfer  $K_{\alpha}$ -Strahlung. Gefüllte Quadrate: 2.8 M Ammoniumsulfatpuffer, Dreiecke: 4 M Ammoniumsulfatpuffer, Kreise: Wasser aus Albanese und Deriu (1981).

Streukurven nicht zu interpretieren. Die Unterschiede zwischen den gemessenen Streukurven der beiden Pufferlösungen mit den verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen von 2.8 M und 4 M sind in Abb. 35 zu sehen. Zum Vergleich ist ebenfalls die mit der RSMR-Methode gemessene Streukurve von reinem Wasser dargestellt (Albanese und Deriu 1981). Die gezeigten Streukurven beinhalten nur die totale Rayleigh-Streuung. Die Compton-Streubeiträge sind abgezogen. Die Einheiten auf der oberen x-Achse geben die maximale Auflösung  $d$  beim jeweiligen Streuwinkel nach  $d = (2 \sin(\vartheta)/\lambda)^{-1}$  an.

Gegenüber der Wasserstreukurve ist das Maximum der Pufferstreukurve etwas nach rechts verschoben und wesentlich ausgeprägter. Das bedeutet, daß der mittlere Atomabstand im Puffer mit 2.94 Å kleiner ist als in reinem Wasser mit 3.03 Å. Durch die geladenen Ammonium- und Sulfationen im Puffer bildet sich eine andere Nahordnung im Puffer aus, die zu etwas kleineren Abständen und zu einer definierteren Struktur führt. Dies sieht man auch im kleineren Maximum bei  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.088 \text{ \AA}^{-1}$ , das genau dem doppelten Atomabstand entspricht. Je mehr geladene Ionen im Puffer vorhanden sind, desto ausgeprägter ist die Ordnung des Puffers. Allerdings verschlechtert sich die Simulation bei der Verwendung der Streukurve des 4 M Ammoniumsulfatpuffers (vgl. Abb. 36). Bei der Umrechnung der  $\sin(\vartheta)/\lambda$ -Werte in mittlere Atomabstände ist zu beachten, daß die übliche Formel für die Auflösung  $d = (2 \sin(\vartheta)/\lambda)^{-1}$  die minimal meßbaren Atomabstände in Richtung des Streuvektors angibt. In einer ungeordneten Probe sind alle Orientierungen der Abstandsvektoren zum Streuvektor gleich wahrscheinlich, so daß sich für den mittleren Atomabstand kleinere Werte ergeben als diejenigen, die von der Auflösungsskala in den Abbildungen für die jeweiligen Maxima der Streukurven abzulesen sind.

Wegen der unterschiedlichen Winkelauflösung der  $^{57}\text{Fe}$ - und der  $^{183}\text{W}$ -RSMR werden die Simulationen für diese Messungen jeweils getrennt mit denselben Parametern berechnet. Dies sieht man deutlich an der in Abb. 36 mit dem Buchstaben A markierten Stelle. Während das Maximum bei  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ , daß durch die Streuung am Puffer entsteht (vgl. Abb. 35), auf Grund der besseren Winkelauflösung bei der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR deutlich zu sehen ist, verschwindet dieses bei der  $^{183}\text{W}$ -RSMR. In der elastischen Streuung ist dagegen bei diesem Impulsübertrag wegen des großen  $\langle x^2 \rangle$ -Wertes des Puffers kein merklicher Streubeitrag von diesem mehr zu beobachten. Es dominiert die Streuung am Myoglobin, die ihr zweites Maximum an der mit B markierten Stelle bei  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.11 \text{ \AA}^{-1}$  besitzt.

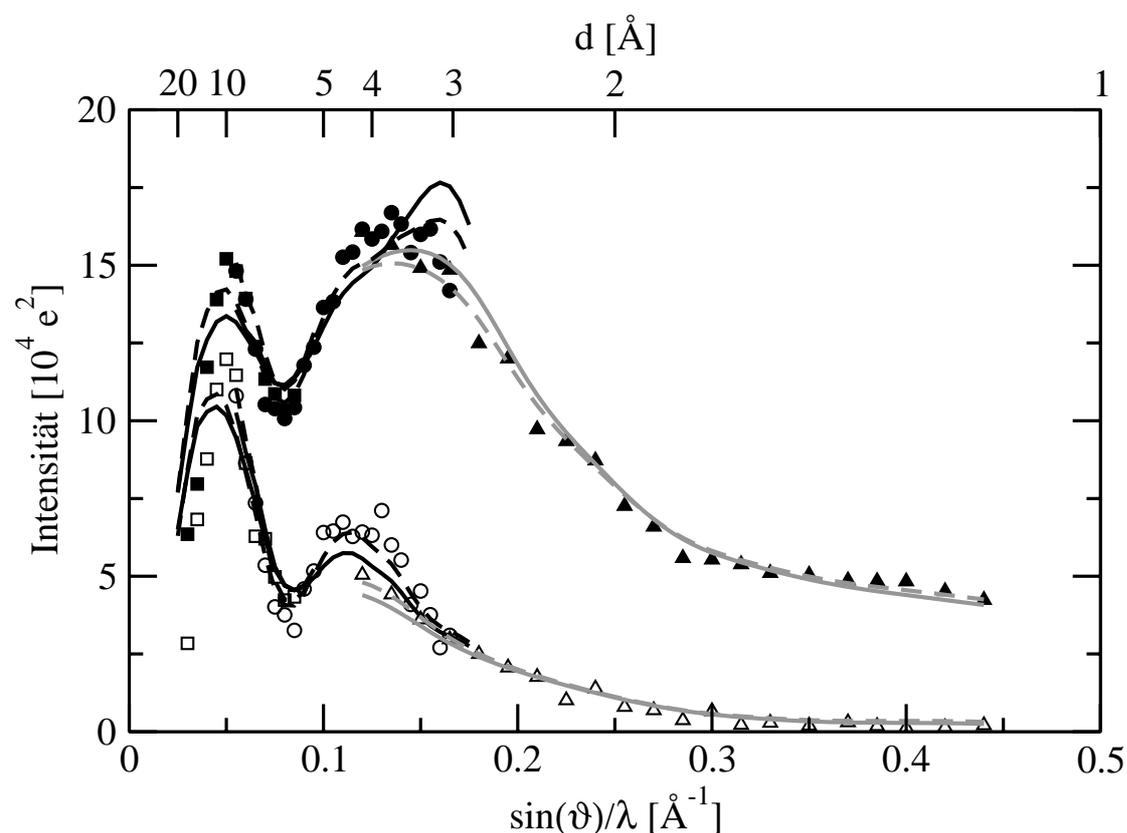


**Abb. 36:** Totale und elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin bei 300 K. Offene Symbole: elastische Streuung, gefüllte Symbole: totale Streuung, durchgezogene Linien: Anpassung mit der Streukurve des 2.8 M Ammoniumsulfatpuffers, gestrichelte Linien: 4 M Ammoniumsulfatpuffer, schwarz:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, grau:  $^{183}\text{W}$ -RSMR. Pfeile: Maximum der Streuung am A: Puffer, B: Myoglobin.

Eine mögliche Fehlerquelle, die zu den falschen Mengenverhältnissen in der Probe führt, ist die Bestimmung des Myoglobinanteils. Das Gewichtsverhältnis des Trockenmaterials, des Myoglobins und des Salzes, zum Wasser wurde durch Gefriertrocknung der Probe relativ genau ermittelt (Keppler 1999). Eine Unsicherheit besteht aber im genauen Myoglobinanteil. Dieser wurde nach Verdünnung der Probe mittels optischer Absorption gemessen. Der verwendete Literaturwert für den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 188 \text{ OD/mmol}$  (Scheler et al. 1957) gilt für einen pH-Wert von 6.4. Die nach Antonini und Brunori (1971) bestehende pH-Abhängigkeit ist von Keppler (1999) nicht berücksichtigt worden. Ein größerer Myoglobinanteil in der Probe führt dann zu einer geringeren Salzkonzentration und insgesamt zu einem geringeren Pufferanteil pro Myoglobinmolekül. Andererseits wurde die Bestimmung der Probenzusammensetzung nach Durchführung der RSMR-Messungen vorgenommen, so daß eine Diffusion von Wassermolekülen durch die Fenster des Probenhalters denkbar ist. Da diese langsam vonstatten geht, ist bei den 300 K-Messungen, die zu Beginn der Experimente durchgeführt wurden, noch keine Zunahme der

Salzkonzentration festzustellen. Allerdings ist es unwahrscheinlich, daß die Abnahme des Wassergehalts in den Proben für die  $^{57}\text{Fe}$ - und  $^{183}\text{W}$ -RSMR denselben Verlauf nimmt. Anderenfalls ginge die Übereinstimmung der Meßergebnisse auf Grund der unterschiedlichen dynamischen Eigenschaften des Myoglobins und des Puffers verloren.

Die Simulation mit einem variablen Pufferanteil in der Probe führt zu einer besseren Übereinstimmung mit den Meßdaten (vgl. Abb. 37). Die bestmögliche Anpassung erfolgt mit einem Pufferanteil von 55 Gewichtsprozent an Stelle der 64 Gewichtsprozent, die sich aus der Analyse der Probenzusammensetzung ergeben. Geht man von einem Fehler bei der Bestimmung des Proteinanteils in der Probe aus, dann entsprechen 55 Gewichtsprozent Pufferanteil bei gleicher Trockenmasse und gleichem Wasseranteil einem 3.3 M Ammoniumsulfatpuffer. Dies entspricht nicht den Bedingungen beim Kristallwachstum, ist aber ein glaubwürdiger Wert für den Ammoniumsulfatanteil.



**Abb. 37:** Totale und elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin bei 300 K. Offene Symbole: elastische Streuung, gefüllte Symbole: totale Streuung, durchgezogene Linien: Anpassung mit 64 Gewichtsprozent Pufferanteil, gestrichelte Linien: 55 Gewichtsprozent Pufferanteil, schwarz:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, grau:  $^{183}\text{W}$ -RSMR.

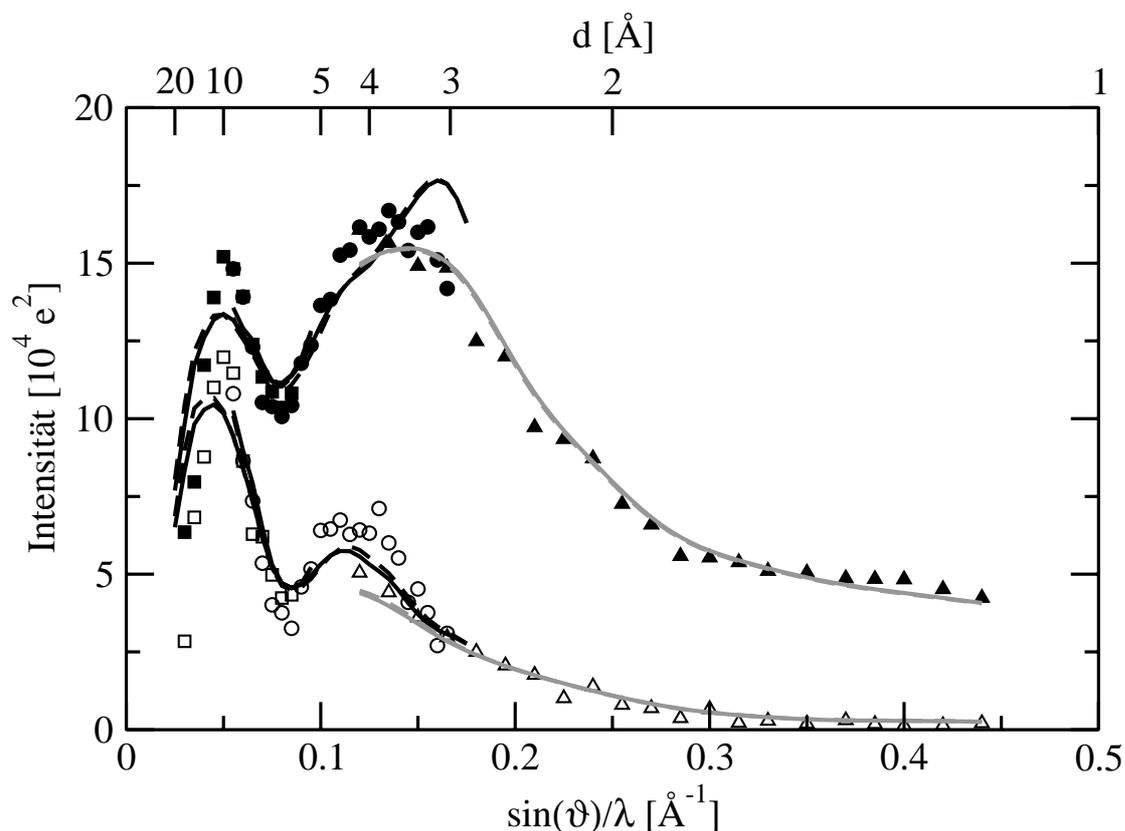
Obwohl die Anpassung mit 55 Gewichtsprozent Pufferanteil bessere Ergebnisse liefert, wird die folgende Diskussion weiterhin mit dem Pufferanteil, der sich aus der Probenanalyse ergibt, durchgeführt. Die Änderungen, die sich durch andere Annahmen im Modell bezüglich des Myoglobins ergeben, können nicht durch den Puffer kompensiert werden und sind daher auch anhand des Modells mit 64 Gewichtsprozent Pufferanteil erkennbar und auszuwerten.

## 6.2.2 Struktur der Myoglobinkristalle

In diesem Modell wird die Kristallstruktur von Pottwal-Myoglobin verwendet, obwohl die Probe Pferde-Myoglobin enthält. Von den 153 Aminosäuren des Myoglobins unterscheiden sich Pferde- und Pottwal-Myoglobin in 19 Aminosäuren. Die restliche Sequenz ist gleich und auch die räumliche Struktur der beiden ähnelt sich, wie ein Vergleich der vorliegenden Struktur mit verschiedenen Pferde-Myoglobinstrukturen aus der Protein Data Bank zeigt (z.B. 300 K-Struktur aus Maurus et al. (1997); 100 K-Struktur aus Chu et al. (2000)). Allerdings liegt keine Normal-Moden-Analyse des Pferde-Myoglobins vor, so daß wesentliche Annahmen für die Proteindynamik nicht getroffen werden können. Daher wird auf das Strukturmodell des Pottwal-Myoglobins zurückgegriffen. Die verwendeten Normal-Moden sind für Deoxy-Myoglobin berechnet worden. Das zusätzliche Wassermolekül an der sechsten Ligandierungsstelle des Eisens in der Hämgruppe von Met-Myoglobin wird von den Normal-Moden nicht berücksichtigt. Dies wirkt sich im einzelnen auf die Frequenzen der Moden und auf die Kopplung der Moden an die Atome aus. Es ist zu erwarten, daß sich diese Effekte in der Gesamtheit der Normal-Moden gegenseitig aufheben. In der gestreuten Intensität ist ein fehlendes Wassermolekül im Vergleich zu den übrigen 1260 nicht Wasserstoffatomen des Myoglobins vernachlässigbar. Wegen der Ähnlichkeit der Kristallstrukturen des Pferde- und des Pottwal-Myoglobins lassen sich die mit dem Pottwal-Myoglobinmodell gewonnenen Ergebnisse auf die Streuprobe anwenden. So sind z.B. im Vergleich der Reflexintensitäten der Pferde-Myoglobinstruktur aus Chu et al. (2000) und der Pottwal-Myoglobinstruktur aus Ostermann (2000) trotz der leichten verschiedener Aminosäureketten und Zellkonstanten keine wesentlichen Unterschiede bei einer Auswertung in Debye-Scherrer-Ringen festzustellen.

Die Näherung, das gesamte Kristallwasser mit den Monte-Carlo-Wassern zu beschreiben, berücksichtigt nicht, daß an der Oberfläche des Proteins Wassermoleküle gebunden sind.

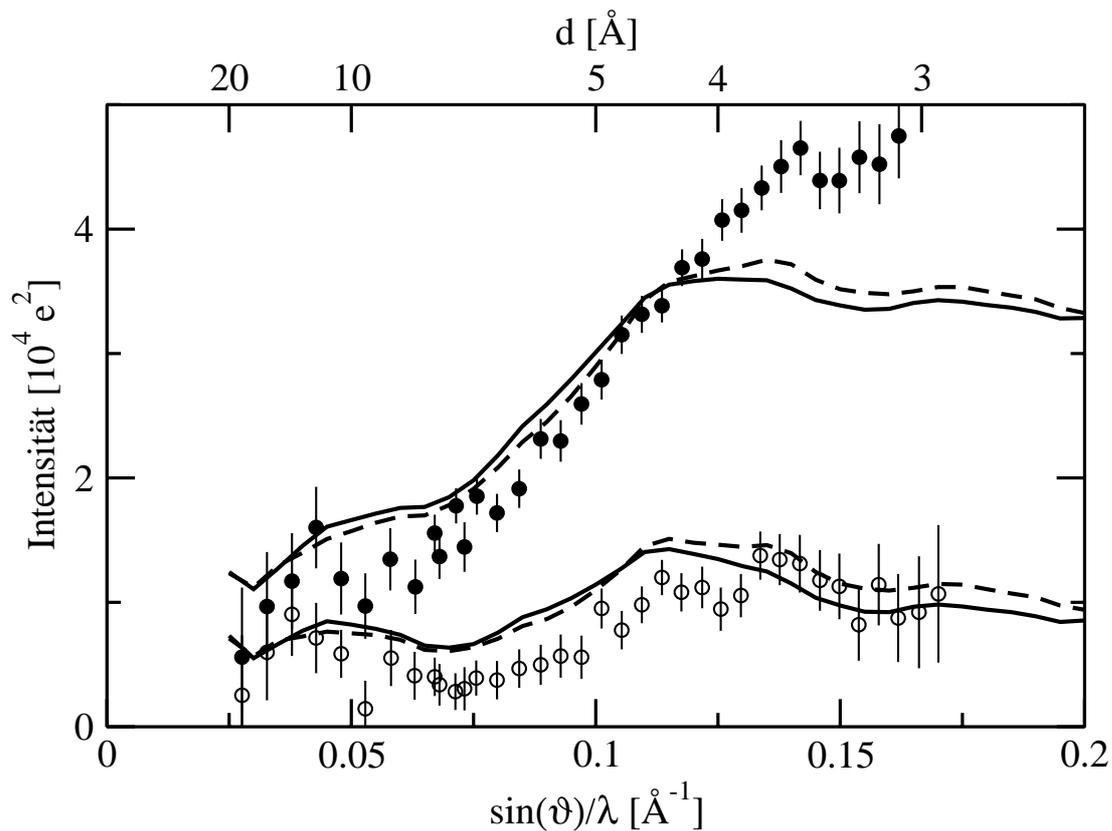
Diese Wassermoleküle unterscheiden sich von den übrigen freien Kristallwassern durch ihre festere Bindung. Ihre mittlere quadratische Auslenkung entspricht eher dem der Proteinatome als denen des freien Puffers (Cheng und Schoenborn 1990). Teilt man die Wassermoleküle in Schalen um das Protein ein und bestimmt für jede dieser Schalen unabhängige Werte für die Dichte der Moleküle und ihre mittleren quadratischen Auslenkungen, so ist mit wachsendem Abstand zum Protein ein Übergang zum freien Wasser beobachtbar (vgl. z.B. Schoenborn et al. 1995). Zur Beschreibung der Streuanteile ist demnach auch folgendes Modell denkbar: Die in der Röntgenstrukturanalyse sichtbaren Wasser sind in der Normal-Moden-Analyse berücksichtigt, so daß diese Wassermoleküle in der Berechnung wie das Protein behandelt werden können. Da sie an die Proteinoberfläche gebunden sind, folgen sie den TLS-Auslenkungen des Proteins. Das freie Kristallwasser wird weiterhin durch die Monte-Carlo-Wasser repräsentiert. Allerdings werden von den 397 Wasserpositionen diejenigen weggelassen, deren Abstand zu einem der gebundenen Wassermoleküle aus der



**Abb. 38:** Elastische und totale Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin bei 300 K. Offene Symbole: elastische Streuung, gefüllte Symbole: totale Streuung, durchgezogene Linien: Anpassung mit den Kristallwasserpositionen aus der Monte-Carlo-Simulation, gestrichelte Linien: Anpassung mit den 170 Kristallwasserpositionen aus der Röntgenstrukturanalyse, die übrigen Wasserpositionen sind der Monte-Carlo-Simulation entnommen, schwarz:  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, grau:  $^{183}\text{W}$ -RSMR.

Röntgenstruktur kleiner als  $2.5 \text{ \AA}$  ist. Ein Vergleich der beiden Modelle ist in Abb. 38 gezeigt. Beide liefern eine ähnlich gute Simulation der Meßdaten.

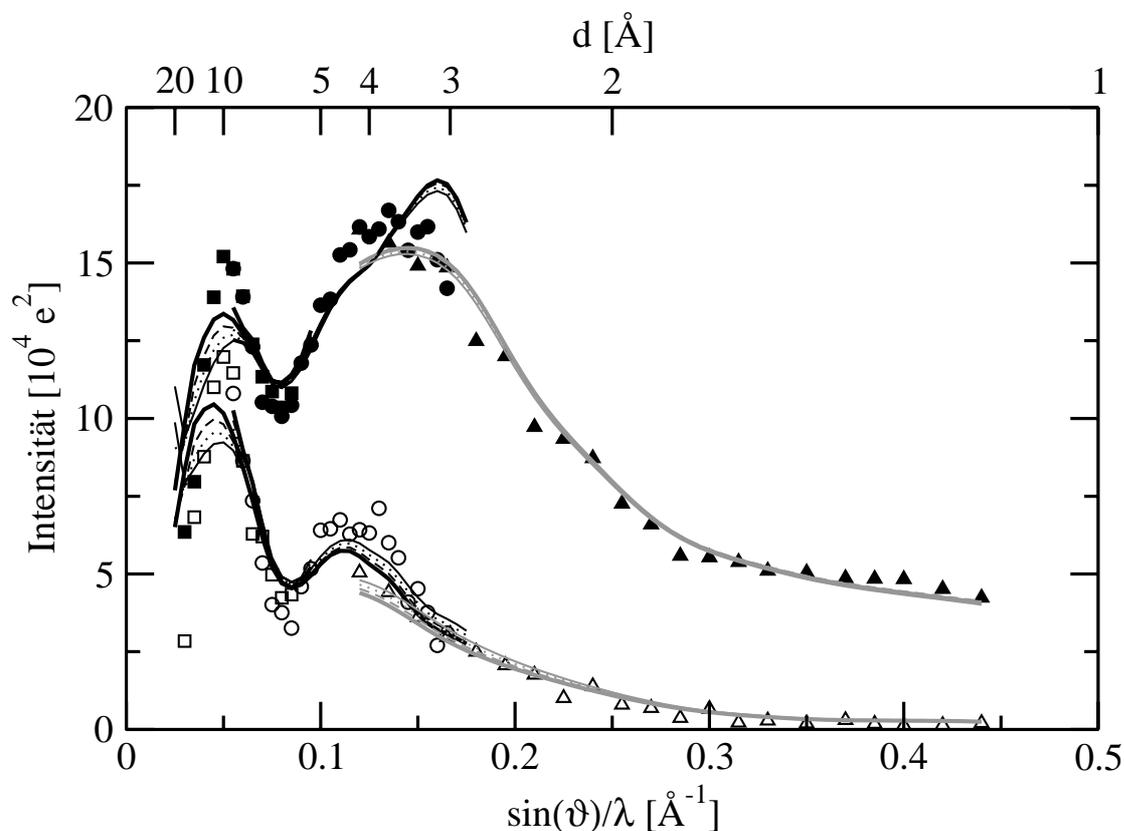
Neben den in dieser Arbeit gemessenen polykristallinen Proben sollte die hier angewandte Theorie auch auf Einkristallmessungen übertragen werden können. Bei Messungen an Einkristallen kann zwischen der Bragg-Streuung und der diffusen Streuung unterschieden werden. Da die diffuse Streuung schwach mit dem Streuwinkel variiert, entspricht diese annähernd der Streuung zwischen die Bragg-Reflexe. Sie läßt sich demzufolge durch Maskieren der Bragg-Reflexe und anschließendes Aufsummieren der Streuintensitäten mit gleichen Streuwinkeln aus der Messung extrahieren. Nicht enthalten sind in dieser Auswertung Streubeiträge akustischer Phononen, die zu inelastischen Streubeiträgen an den Orten der Bragg-Reflexe beitragen (vgl. S. 40 ff). Die diffuse Streuung wurde an einem Myoglobineinkristall bei Raumtemperatur für einige ausgewählte Orientierungen des Kristalls zum einfallenden Strahl mit der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR-Methode gemessen (Achterhold 1995). Wie in Abb. 39 gezeigt, ist mit dem vorliegenden Modell die diffuse Streuung anzupassen. Hierbei wurden im Gegensatz zu den vorherigen Rechnungen die Streubeiträge der Bragg-Reflexe weggelassen. Bei einem Einkristall ist außer dem Kristallwasser nur ein vernachlässigbar dünner Pufferfilm auf seiner Oberfläche vorhanden, so daß der Streubeitrag des Puffers ebenfalls nicht berücksichtigt werden muß. Zu Beachten ist die in dieser Abbildung gespreizte x-Achse. Bis auf die Abweichung bei  $\sin(\vartheta)/\lambda \approx 0.14 \text{ \AA}^{-1}$  in der totalen Streuung wird der Verlauf der Streukurven alleine durch die Korrelationen in den Normal-Moden und den TLS-Auslenkungen bestimmt. In Ermangelung der Normal-Moden konnten in den bisherigen Modellen ausschließlich abstandsabhängige Korrelationen in den Auslenkungen der Atome angenommen werden (Achterhold 1995), mit denen keine befriedigende Anpassung der Meßdaten möglich ist. Die Korrelationen sind nun nicht mehr nur abstandsabhängig, sondern werden auch von den Bindungskräften im Protein beeinflusst. In der Gesamtheit der Normal-Moden nehmen die Korrelationen in den Bewegungen zwar weiterhin mit dem Abstand der Atome ab, aber bei einigen niederenergetischen Moden sind Ausnahmen zu beobachten. Dies ist von Nishikawa und Go (1987) am Beispiel des Trypsin Inhibitors gezeigt worden und gilt ebenfalls für die Normal-Moden des Myoglobinmoleküls. Die gestrichelten Linien in Abb. 39 stellen wieder die Berechnung mit den 170 in der Röntgenstrukturanalyse sichtbaren Wassern dar. Die übrigen Wassermoleküle in der Einheitszelle werden durch die Monte-Carlo-Wasser repräsentiert. Auch hier ist kein wesentlicher Unterschied in den beiden Modellen zu beobachten.



**Abb. 39:** Diffuse Streuung an Pottwal-Myoglobin bei 300 K aus Achterhold (1995). Offene Symbole: elastische Streuung, gefüllte Symbole: totale Streuung, durchgezogene Linien: Anpassung mit den Kristallwasserpositionen aus der Monte-Carlo-Simulation, gestrichelte Linien: Anpassung mit den 170 Kristallwasserpositionen aus der Röntgenstrukturanalyse, die übrigen Wasserpositionen sind der Monte-Carlo-Simulation entnommen.

Bei der Auswertung der polykristallinen Probe wird die Streuung an den Kristallen von der Streuung am Puffer überlagert. Gerade der Bereich um  $\sin(\vartheta)/\lambda \approx 0.14 \text{ \AA}^{-1}$  fällt mit dem Maximum der Pufferstreukurve zusammen, so daß diese dort eine mögliche zu geringe Streuintensität in der totalen Streuung an den Myoglobinkristallen kompensiert. Dies könnte ein Hinweis sein, daß die Monte-Carlo-Wasser nicht ganz korrekt das Kristallwasser repräsentieren. Der Einfluß des Kristallwassers auf die Streukurven soll nun genauer analysiert werden. In den Simulationen in Abb. 40 wurde die Streustärke der Monte-Carlo-Wasser sukzessive erhöht. Mit zunehmenden Streuanteilen nimmt die Intensität des ersten Maximums sowohl in der totalen als auch in der elastischen Streuung ab. Dies war genau der Grund für die Einführung der Monte-Carlo-Wasser (Parak et al. 1993). Allerdings darf die Streuintensität nicht noch mehr gemindert werden, als sie dies schon durch die einfache Anzahl an Wassermolekülen in der Einheitszelle wird. Die aus dem ersten Maximum in den Streukurven herausgestreute Intensität findet sich im zweiten Maximum bei  $\sin(\vartheta)/\lambda \approx 0.11 \text{ \AA}^{-1}$  wieder. Hier fallen die Änderungen nicht so stark auf, da bei größeren

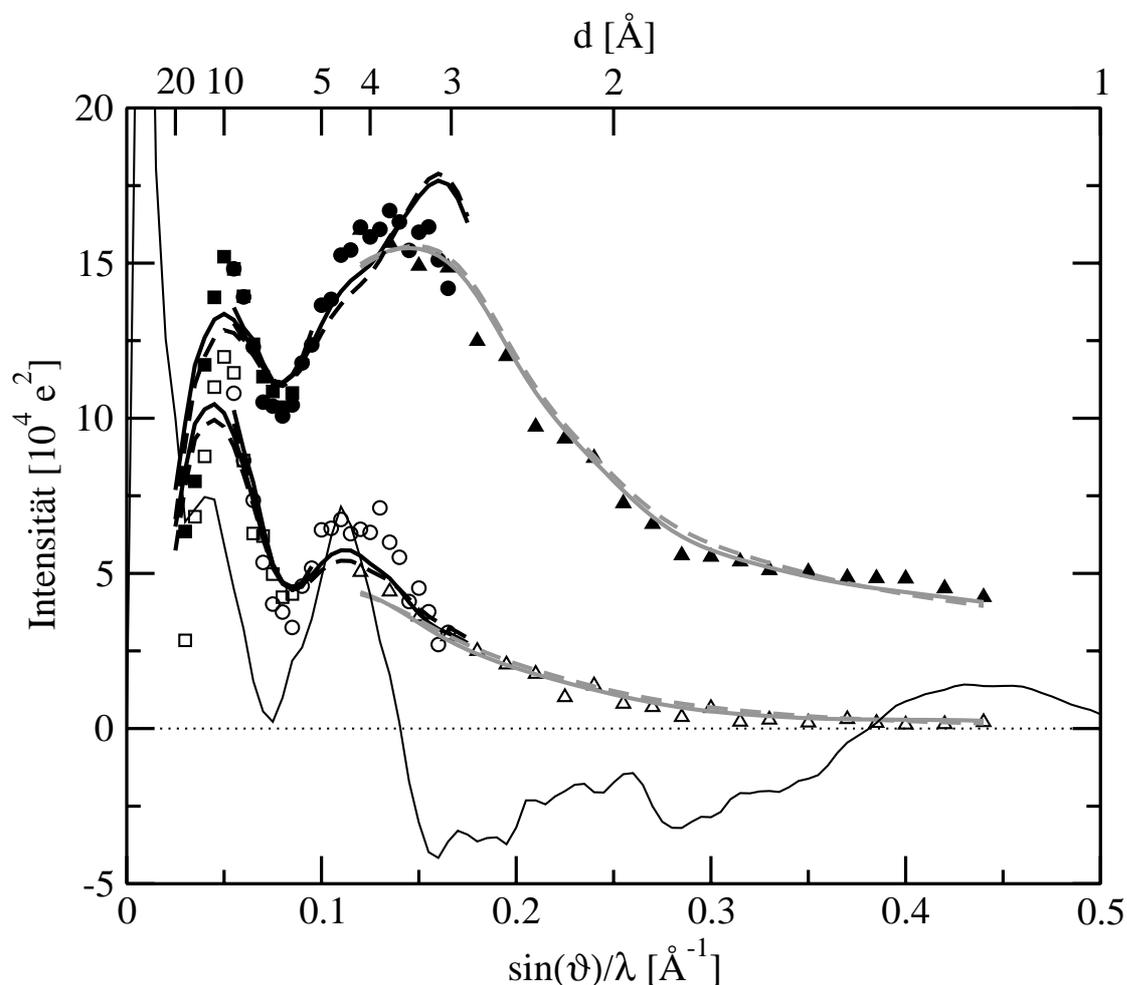
Streuwinkeln für die Streuung pro Raumwinkelelement der zur Verfügung stehende Raum zunimmt. Eine Erhöhung der gestreuten Intensität im zweiten Maximum verbessert an dieser Stelle die Anpassung an die Meßdaten. Insgesamt aber wird durch die Verstärkung der Streuintensität der Monte-Carlo-Wasser bei gleichzeitiger Verringerung des freien Pufferanteils in der Probe die Simulation verschlechtert. Ein größerer Wasseranteil im Kristall ist demnach nicht wahrscheinlich. Möglicherweise ist die Verteilung der Kristallwasser dem freien Puffer ähnlicher, als es sich aus der Monte-Carlo-Simulation ergibt. Diese könnte dann einerseits die Verringerung der Streuintensitäten im ersten Maximum der Streukurven erklären und andererseits die Streuintensität im zweiten Maximum erhöhen, was dann auch die Diskrepanz zwischen Rechnung und Experiment in Abb. 39 verringert.



**Abb. 40:** Totale und elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin. Symbole: Meßwerte, durchgezogene Linien: Anpassung mit den Kristallwasserpositionen aus der Monte-Carlo-Simulation, dünne Linien: Anpassung mit sukzessive erhöhten Streubeiträgen der Monte-Carlo-Wasser.

### 6.2.3 Korrelationen in den Auslenkungen

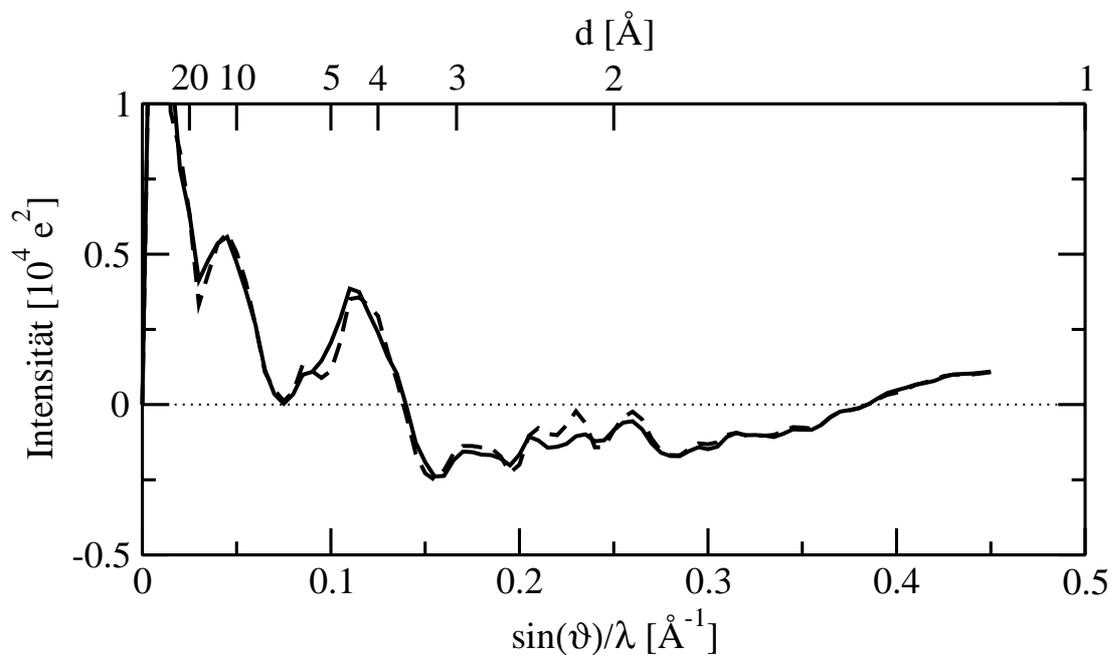
Die Normal-Moden bieten die Möglichkeit, die Korrelationen in den Auslenkungen der Atome zu berechnen. Ebenso sind auch die mit dem TLS-Modell beschriebenen Atomauslenkungen korreliert, da sie das Molekül als Ganzes betreffen. Die Auswirkungen der Korrelationen auf die Streuintensitäten sind in Abb. 41 zu sehen. Das Vernachlässigen der Korrelationen ist gleichbedeutend mit der Annahme, daß die diffuse Streuung in den gesamten Raum nur vom Selbstterm verursacht wird (vgl. Gl. ( 32 )). Die dünne Linie in Abb. 41 stellt die totale diffuse Streuung dar. Dieser Streuanteil ist zur besseren Übersicht um den Faktor 10 vergrößert. Wegen der mathematischen Aufteilung der diffusen Streuung in den Selbst- und den Paarterm sind bei alleiniger Betrachtung des Paarterms auch negative Streuintensitäten



**Abb. 41:** Totale und elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin. Symbole: Meßwerte, durchgezogene Linien: Anpassung mit dem beschriebenen Modell, gestrichelte Linien: Anpassung ohne Korrelationen in den Auslenkungen, dünne Linie: Paarterm der totalen diffusen Streuung (um den Faktor 10 vergrößert).

erlaubt. Die Summe aller Streubeiträge muß natürlich ausschließlich positive Werte ergeben. Der Paarterm der diffusen Streuung beinhaltet sowohl die statischen als auch die dynamischen Korrelationen, also die durch die TLS- und die Normal-Moden verursachten Korrelationen. Wie in Abb. 41 zu sehen ist, unterstützt er den streuwinkelabhängigen Verlauf der Streukurve.

Eine Fehlerquelle bei der Bestimmung der Korrelationsterme sind die TLS-Auslenkungen. Die Parameter für das TLS-Modell wurden aus den Differenzen der totalen und den internen Auslenkungen der Normal-Moden-Verfeinerung gewonnen. Allerdings lagen zum Zeitpunkt der Auswertung nur die über die drei Raumrichtungen gemittelten quadratischen Abweichungen der Atome aus ihrer Mittellage vor. Durch diese Mittelung können von den 21 unabhängigen TLS-Parametern nur 15 bestimmt werden, von denen wiederum 3 voneinander abhängig sind. Die übrigen 8 Parameter sind aus den gegebenen Daten nicht zu extrahieren. Das bedeutet, daß die Hauptdrehachsen und Haupttranslationsrichtungen nicht bestimmt werden können. Da aber die Datenreduktion durch die Mittelung über die Raumrichtungen erfolgt und die Auswertung der RSMR-Messungen ebenfalls über alle Orientierungen der Probe zum einfallenden Strahl mittelt und nur den Streuwinkel, nicht aber die Streurichtung berücksichtigt, hat die Unbestimmbarkeit von 8 TLS-Parametern keine großen Auswirkungen. Dies ist in Abb. 42 demonstriert. Die beiden Graphen zeigen den Paarterm der



**Abb. 42:** Paarterm der elastischen diffusen Streuung, simuliert für zwei verschiedene TLS-Parametersätze, die jeweils die externen mittleren quadratischen Auslenkungen aus der Normal-Moden-Verfeinerung erklären können.

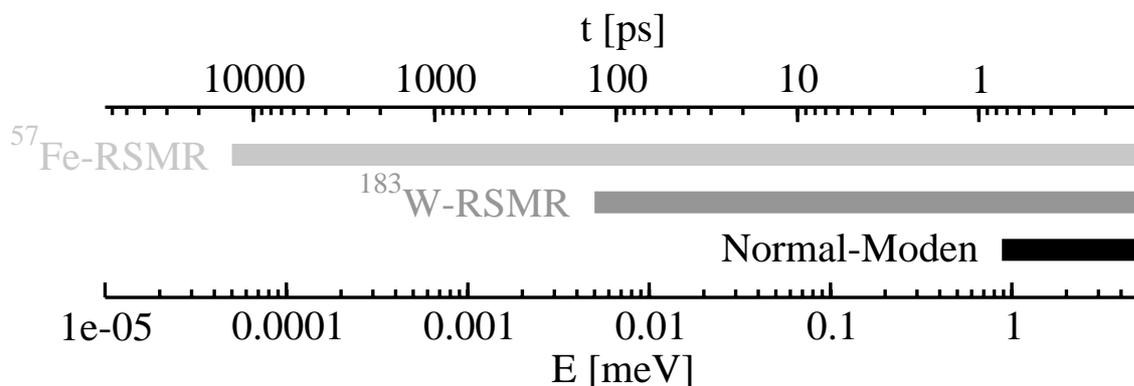
elastischen diffusen Streuung für zwei verschiedene Parametersätze des TLS-Modells. Beide Parametersätze beschreiben die Differenz der mittleren quadratischen Abweichungen zwischen den totalen und den internen Auslenkungen der Normal-Moden-Verfeinerung von Myoglobin bei 300 K. Hier ist der Paarterm der elastischen diffusen Streuung gezeigt, da für diesen nur die statischen Korrelationen, also vorwiegend die Korrelationen durch die TLS-Auslenkungen, in die Berechnung eingehen. Die Streubeiträge für eine polykristalline Probe mit den unterschiedlichen TLS-Parametern weichen zwar leicht voneinander ab, zeigen aber prinzipiell den gleichen Verlauf. Kleine Korrekturen durch die Verwendung der richtigen TLS-Auslenkungen sind demnach zu erwarten, aber keine grundlegenden Veränderungen im berechneten Streumuster.

#### 6.2.4 Dynamik des Myoglobins

Betrachtet man den elastisch gestreuten Anteil genauer (vgl. Abb. 24), dann sieht man, daß die mit der  $^{57}\text{Fe}$ - und der  $^{183}\text{W}$ -RSMR gemessenen Daten im gemeinsamen  $\sin(\vartheta)/\lambda$ -Bereich im Rahmen der Fehlerbalken überlappen. Die Bewegungen in der Probe laufen folglich größtenteils auf Zeitskalen ab, die der Messung mit den beiden verschiedenen Mößbauer-Isotopen zugänglich sind. Analog zur Mößbauer-Absorption sind dies jeweils Bewegungen, die schneller als die Lebensdauer des angeregten Zustandes sind. Die Zeitskalen können sich durch die Linienbreiten der Quelle bzw. des Analysators geringfügig verkürzen. Dagegen stehen Bewegungsmoden, die auf Zeitskalen zwischen 0.13 ns und 13 ns, den Grenzen der  $^{183}\text{W}$ - bzw. der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR, ablaufen, im Widerspruch zu den Meßergebnissen, da anderenfalls der elastisch gestreute Anteil nicht überlappen würde. Bewegungsmoden, die wesentlich langsamer ablaufen, erscheinen für die RSMR statisch und sind daher nicht detektierbar. Ein Vergleich mit den Energien bzw. Zeitskalen der Schwingungen der Normal-Moden-Analyse an Myoglobin (Melchers et al. 1996) zeigt, daß sämtliche Schwingungen schneller als 1 ps ablaufen, also mit beiden RSMR-Messungen meßbar sind (vgl. Abb. 43).

Im Vergleich zu der Röntgenstrukturanalyse erklären die Normal-Moden nur einen Teil der mittleren quadratischen Auslenkungen. Es bleibt noch zu klären, ob die Normal-Moden die dynamischen Auslenkungen vollständig beschreiben und der im Vergleich zur Röntgenstrukturanalyse fehlende Anteil ausschließlich auf statischen Fehlern sowie

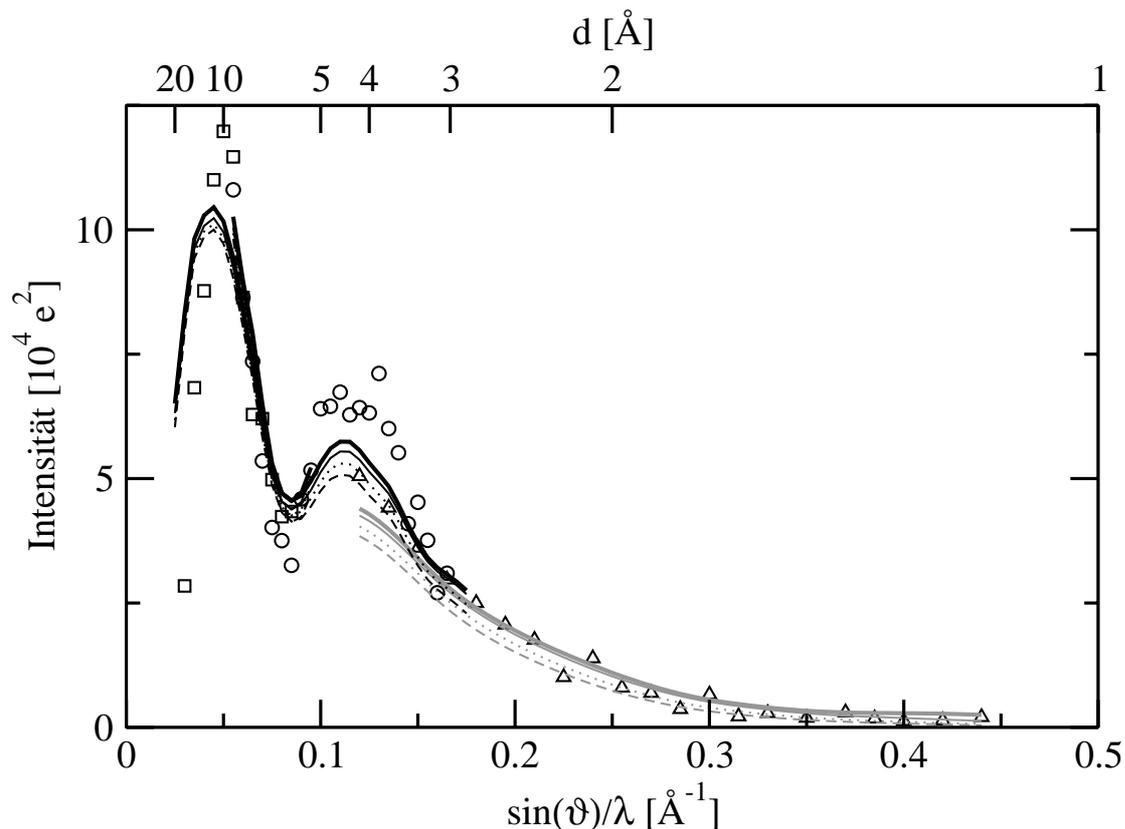
auf Verteilungen auf Konformationssubzustände beruht, oder ob außer den Normal-Moden weitere Bewegungsmoden existieren.



**Abb. 43:** Zeit- bzw. Energieauflösung der RSMR-Messungen. Von oben nach unten: Zeitauflösung der  $^{57}\text{Fe}$ - und der  $^{183}\text{W}$ -RSMR, Energien der Normal-Moden. Die Bereiche sind jeweils am rechten Rand abgeschnitten.

Unterhalb von 180 K wird die Dynamik des Myoglobins von den Normal-Moden bestimmt. Für das Eisenatom ist diese Tatsache durch Mößbauer-Absorptions-Messungen (Melchers et al. 1996), nukleare Vorwärtsstreuung (vgl. Abb. 32) und inelastische Streuung von Synchrotron-Strahlung (Parak und Achterhold 1999) bewiesen. Ähnlich verhält es sich mit den übrigen Atomen des Proteins. Bis auf wenige Ausnahmen entspricht die temperaturabhängige Zunahme der internen Fluktuationen der Atome aus der Normal-Moden-Verfeinerung den Vorhersagen der Normal-Moden-Analyse (Chong et al. 2001). Anders verhält es sich mit den totalen Auslenkungen. Diese nehmen mit der Temperatur stärker zu als die internen Auslenkungen und damit stärker als die Normal-Moden. Diese Zunahme ist zwar nicht groß, aber dennoch signifikant. Das bedeutet, daß ein Teil der TLS-Auslenkungen, die den Unterschied zwischen den internen und den totalen Auslenkungen in der Normal-Moden-Verfeinerung ausmachen, dynamischer Natur ist. In Abb. 44 ist die streuwinkelabhängige elastisch gestreute Intensität für verschiedene dynamische Anteile an den TLS-Auslenkungen simuliert. Die dünnen Linien repräsentieren die Streukurven mit 10 %, 30 % bzw. 50 % elastischem Anteil an den TLS-Auslenkungen. In der totalen Streuung, die hier nicht gezeigt ist, sind keine Änderungen zu beobachten, da der Gesamtbetrag der TLS-Auslenkungen nicht variiert wurde. Bei der elastischen Streuung ist die Verringerung der Streuintensität besonders deutlich im zweiten Maximum bei  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.11 \text{ \AA}^{-1}$  zu beobachten. Das ist leicht verständlich, da die elastisch gestreute Intensität exponentiell mit  $e^{-k^2\langle x^2 \rangle}$  abnimmt; d.h. mit zunehmendem Impulsübertrag  $\hbar k = \hbar 4\pi \sin(\vartheta)/\lambda$  an die Probe, oder gleichbedeutend mit

zunehmendem Streuwinkel  $2\vartheta$ , wird die Abschwächung deutlicher. Bei sehr großen Streuwinkeln verschwindet dieser Effekt wieder, da auch mit kleineren dynamischen Fluktuationen die Exponentialfunktion praktisch auf Null abgefallen ist. Je größer der dynamische Anteil an den TLS-Auslenkungen ist, desto schwächer ist das zweite Maximum in der elastischen Streuung ausgeprägt. Eine akzeptable Anpassung an die Meßdaten ist nicht mehr möglich. Allenfalls ein dynamischer Anteil von maximal 10 % an den TLS-Auslenkungen kann mit den RSMR-Messungen in Einklang gebracht werden.



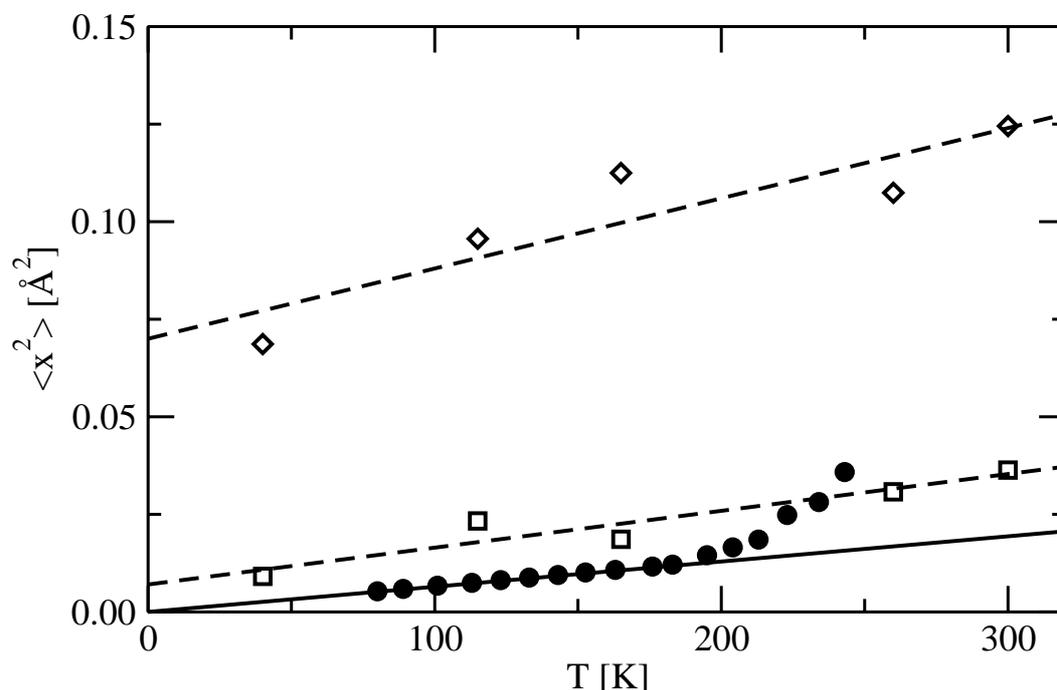
**Abb. 44:** Elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin bei 300 K. Symbole: Meßwerte, durchgezogene Linien: Anpassung mit dem beschriebenen Modell, dünne Linien: TLS-Auslenkungen werden als teilweise elastisch angenommen.

Da aus den Meßwerten kein merklicher dynamischer Anteil an den TLS-Auslenkungen abgelesen werden kann, können diese nicht alle akustischen Phononen beinhalten. Dennoch sind die niederenergetischen akustischen Phononen langwellige Gitterschwingungen. Sie betreffen das Protein als ganze Einheit und können als korrelierte TLS-Bewegungen verstanden werden. Ein Vergleich der mittleren quadratischen Auslenkungen des Eisenatoms aus Mößbauer-Absorptions-Messungen mit den am Eisen angreifenden Normal-Moden zeigt eine gute Übereinstimmung. Da die Mößbauer-Spektroskopie auf alle dynamischen

Bewegungen, die schneller als 141 ns ablaufen, sensitiv ist, enthalten ihre Werte für die dynamischen Auslenkungen auch die akustischen Phononen. Demnach sagen die Normal-Moden zumindest für das Eisenatom die optischen Phononen mit zu großen mittleren quadratischen Auslenkungen voraus. Dieser Effekt ist ebenfalls bei der phononunterstützten nuklearen Streuung von Synchrotronstrahlung zu beobachten (Achterhold et al. 2001), mit der die Zustandsdichte der am Eisenatom angreifenden Phononen bestimmt werden kann. Eine phononenenergieabhängige Analyse der mittleren quadratischen Auslenkungen zeigt eine deutliche Verschiebung des Schwerpunkts der Normal-Moden-Auslenkungen zu kleineren Energien im Vergleich zu den Meßdaten. Gegenüber der Messung, die sowohl akustische als auch optische Phononen berücksichtigt, geben die optischen Phononen aus der Normal-Moden-Analyse zu große Fluktuationen bei den niederenergetischen Moden an. Bei einer Aufsummierung aller Moden wird dagegen wieder derselbe Endwert erreicht. Die Normal-Moden sagen zwar nicht die korrekten optischen Phononen voraus, ergeben in ihrer Summe aber einen plausiblen Wert für die akustischen und die optischen Phononen. Daraus resultiert die gute Übereinstimmung mit den Meßdaten.

Oberhalb von etwa 180 K beginnen die Fluktuationen von der Voraussage der Normal-Moden-Analyse abzuweichen und werden größer. Je nach Protein (z.B. Dilg (2000)), umgebendem Lösungsmittel (z.B. Parak und Frauenfelder (1993); Gaßmann (2000)) und Ligandierungszustand (z.B. Gaßmann (2000)) kann die Übergangstemperatur etwas variieren. Diese Bewegungen, die bei allen bisher untersuchten Proteinen auftreten, gehen mit der Funktionalität der Proteine einher (Parak et al. 1980; Garbers et al. 1998). Sie werden deshalb auch proteinspezifische Bewegungen genannt und können als Übergänge zwischen verschiedenen Konformationssubzuständen interpretiert werden (Parak et al. 1982). Mit diesem Bild lassen sich die dynamischen mittleren quadratischen Auslenkungen des Eisens aus der Mößbauer-Spektroskopie mit den Ergebnissen der Normal-Moden-Verfeinerung verknüpfen (vgl. Abb. 45). Oberhalb der Übergangstemperatur von etwa 180 K steigen die dynamischen Fluktuationen des Eisens mit der Temperatur stärker an als dies anhand der Normal-Moden-Analyse vorausgesagt wird. Sie bewegen sich in dem Bereich der internen Auslenkungen, die als Verteilung auf die Konformationssubzustände interpretiert werden. Das stimmt mit der Annahme überein, daß die proteinspezifischen Bewegungen die Übergänge zwischen den Konformationssubzuständen darstellen. Beim höchsten Temperaturpunkt bei 243 K liegt die dynamische mittlere quadratische Auslenkung des

Eisens aus der Mößbauer-Spektroskopie sogar oberhalb der internen Auslenkungen. Somit ist zumindest für das Eisenatom ein Teil der TLS-Auslenkungen in die Dynamik involviert.



**Abb. 45:** Mittlere quadratische Auslenkung des Eisenatoms in Myoglobin aus Parak et al. (1999). Kreise: Mößbauer-Absorptions-Messungen, Quadrate: interne Auslenkungen, Rauten: totale Auslenkungen aus der Normal-Moden-Verfeinerung, durchgezogene Linie: Normal-Moden, gestrichelte Linien: lineare Regression an die internen und totalen Auslenkungen.

Daß zumindest ein geringer Anteil der TLS-Auslenkungen dynamisch sein kann, wurde bereits oben diskutiert. Wie verhält es sich aber mit den proteinspezifischen Bewegungen? Die Simulationen mit dem bisherigen Modell zeigen, daß die 300 K-RSMR-Daten alleine mit den dynamischen Bewegungsmoden aus der Normal-Moden-Analyse erklärt werden können. Die proteinspezifische Dynamik verursacht in der Mößbauer-Spektroskopie und der nuklearen Vorwärtsstreuung eine Abnahme der schmalen Resonanzlinie und das Auftreten zusätzlicher breiter Linien. RSMR-Experimente an polykristallinem Myoglobin mit  $^{183}\text{W}$  (Keppler 1999) bzw. an lyophilisiertem Myoglobin mit  $^{57}\text{Fe}$  (Zach 1996), bei denen in Streurichtung komplette Mößbauer-Spektren aufgenommen wurden, zeigen im Rahmen der Fehlergrenzen keine Linienverbreiterung und keine zusätzlichen breiten Linien. Dies ist aus zwei Gründen leicht zu verstehen.

Wendet man die Theorie des Brown'schen Oszillators auf die Proteindynamik an (vgl. Kapitel 2.5.4), so ergeben sich die breiten Linien im Spektrum aus der zeitlichen

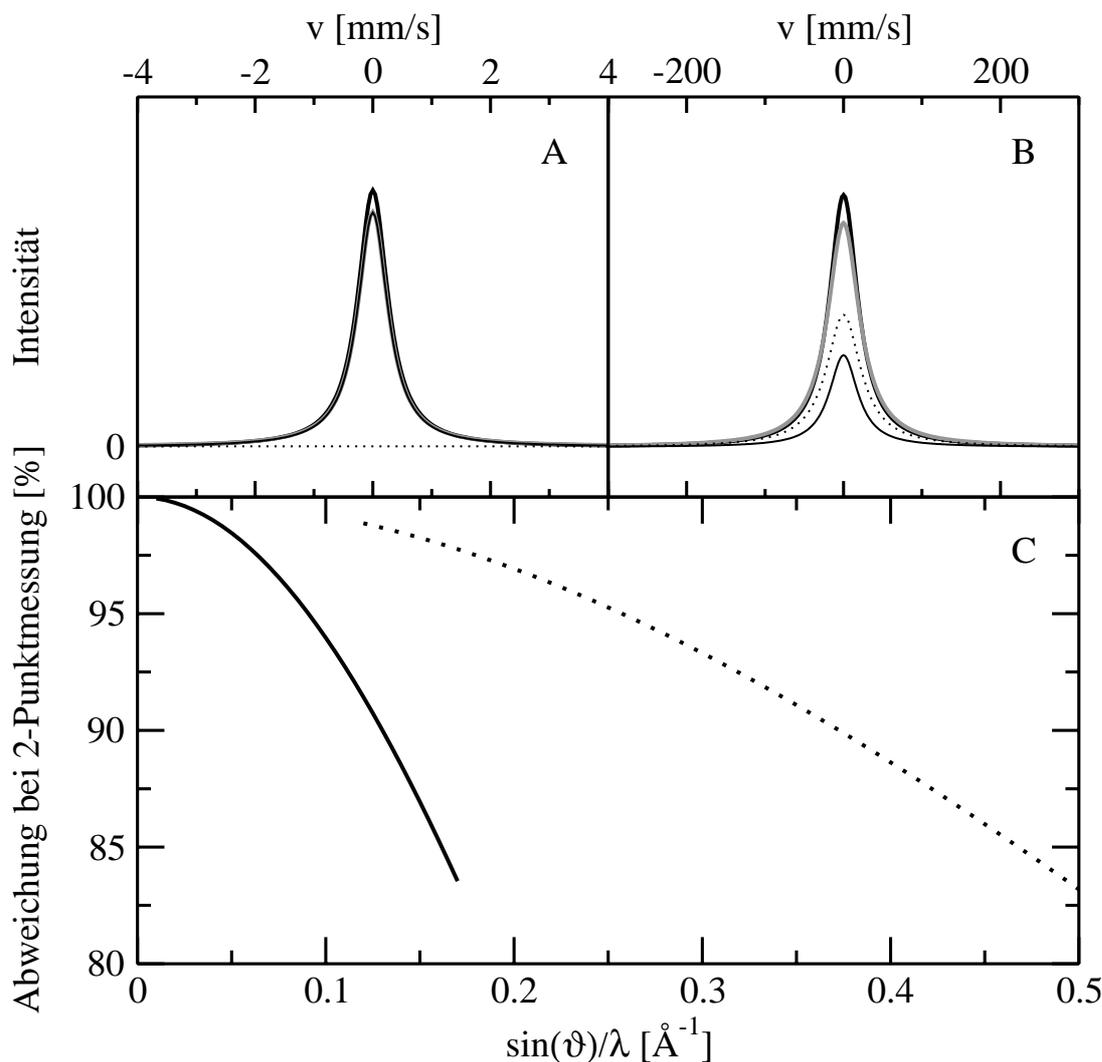
Selbstkorrelation der Bewegung eines Atoms. Nimmt man zusätzlich an, daß die proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen größere Proteinsegmente betreffen, so daß die Bewegungen verschiedener Atome miteinander streng korreliert sind, dann beeinflussen die breiten Linien den Selbstterm und eventuell den Paarterm der diffusen Streuung, nicht aber den Term, der die Bragg-Streuung beschreibt. In der Bragg-Streuung, die die Streuung in einer polykristallinen Probe dominiert, wären die breiten Linien nur zu beobachten, wenn die proteinspezifischen Bewegungen über weite Teile des Kristalls hinweg korreliert abliefen, d.h. wenn die meisten Proteine des Kristalls gleichzeitig die Übergänge zwischen den Konformationssubzuständen vollführten. Ebenso wenig beeinflussen die proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen die totale Streuung, da die Summe der mittleren quadratischen Auslenkungen durch diese nicht verändert wird. Lediglich ein Teil der bisher als statisch angenommenen Auslenkungen wird nun dynamisch. Beim Selbst- und beim Paarterm der elastischen diffusen Streuung sind jeweils ein zusätzlicher Faktor für die korrelierten Brown'schen Bewegungen zu berücksichtigen. Im Gegenzug werden die statischen Auslenkungen, die unter anderem die Verteilung auf die Konformationssubzustände repräsentieren, um die dynamischen Auslenkungen der proteinspezifischen Dynamik  $\langle x_t^2 \rangle$  verringert. Verwendet man zur Erklärung der quasi diffusiven Bewegungen einen isotropen  $\langle x_t^2 \rangle$ -Wert für das gesamte Proteinmolekül, wird die elastische Streuung an einer polykristallinen Probe nach Gl. ( 46 ) zu

$$\begin{aligned}
S_{el}(\vec{k}) = & \sum_j f_j^2 e^{-k^2 \langle x_j^2 \rangle} \left( e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle} e^{k^2 \langle x_t(0)x_t(\infty) \rangle} - e^{-k^2 \langle s_j^2 \rangle} \right) \\
& + \sum_{j \neq j'} f_j f_{j'} e^{i\vec{k}(\vec{R}_j - \vec{R}_{j'})} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_j^2 \rangle + \langle x_j^2 \rangle)} e^{-\frac{1}{2}k^2(\langle s_{j'}^2 \rangle + \langle x_{j'}^2 \rangle)} \\
& \cdot \left( e^{k^2 \langle s_j s_{j'} \rangle} e^{-k^2 \langle x_t^2 \rangle} e^{k^2 \langle x_t(0)x_t(\infty) \rangle} - 1 \right) \\
& + \frac{\lambda^3}{8\pi V \sin \vartheta \sin 2\vartheta} \sum |F_{hkl}|^2 .
\end{aligned} \tag{ 80 }$$

In dieser Darstellung erkennt man, daß die elastisch gestreute Intensität nicht davon abhängt, welche statischen Auslenkungen in die proteinspezifischen Bewegungen übergehen. Die TLS-Moden und die statischen internen Fluktuationen sind in dieser Beziehung äquivalent.

Eine weitere Begründung dafür, daß die breiten Linien in den RSMR-Experimenten nicht zu beobachten sind, liefert zum einen die Abhängigkeit der Intensität der breiten Linien vom

Quadrat des Impulsübertrags  $\hbar k$  und zum anderen die Breite der zusätzlichen Linien im Verhältnis zur natürlichen Linienbreite. Während bei der Mößbauer-Absorption der gesamte Impuls des  $\gamma$ -Quants übertragen wird, ist der Impulsübertrag bei der RSMR streuwinkelabhängig. Für den größten der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR-Messung zugänglichen Streuwinkel ist mit  $k_{\text{max}}^2 = (4\pi \sin(\vartheta_{\text{max}})/\lambda)^2 \approx 4.84 \text{ \AA}^{-2}$  die Intensität der ersten breiten Linie um mehr als den Faktor 10 geringer als bei der Mößbauer-Absorption mit  $k^2 = (2\pi/\lambda)^2 \approx 53.38 \text{ \AA}^{-2}$ . Die Intensität der breiten Linien ist zu gering, um im RSMR-Spektrum sichtbar zu sein, sie sind von der Grundlinie nicht zu unterscheiden (vgl. Abb. 46 A). Bei der  $^{183}\text{W}$ -RSMR liegen auf

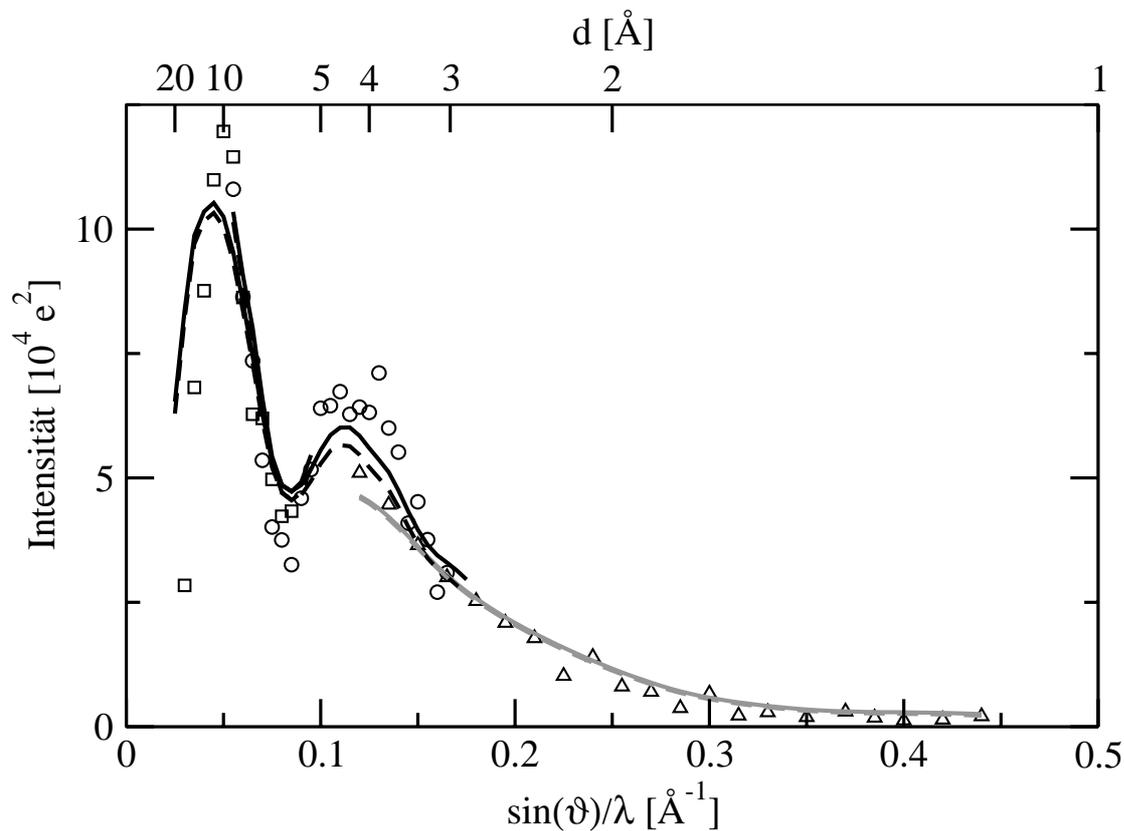


**Abb. 46:** Brown'scher Oszillator in Streurichtung in der dünnen Absorbernäherung. A und B:  $^{57}\text{Fe}$ - bei  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.12 \text{ \AA}^{-1}$  bzw.  $^{183}\text{W}$ -RSMR bei  $\sin(\vartheta)/\lambda = 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ . Dicke durchgezogene Linie: Streuspektrum ohne, graue Linie: mit Brown'schem Oszillator, dünne durchgezogene Linie: schmale Linie, gepunktete Linie: breite Linie; C: streuwinkelabhängiges Verhältnis der gemessenen Intensität mit und ohne Brown'sche Bewegungen in der Zweipunktmessung. Durchgezogene Linie:  $^{57}\text{Fe}$ -, gepunktete Linie:  $^{183}\text{W}$ -RSMR.

Grund der kleineren Wellenlänge die Impulsüberträge auf die Streuprobe in der gleichen Größenordnung wie bei der Mößbauer-Spektroskopie. Allerdings ist hierbei die Linienverbreiterung sehr viel kleiner als die natürliche Linienbreite des Mößbauer-Übergangs, so daß die erste breite Linie komplett unter die natürliche Linie fällt und von dieser nicht zu unterscheiden ist (vgl. Abb. 46 B).

Auch wenn die breiten Linien im Spektrum nicht meßbar sind, bewirken sie dennoch eine Schwächung der Resonanzlinie (graue und schwarze Linie in Abb. 46 A u. B). Auf Grund der oben genannten Gegebenheiten wirkt sich diese Abschwächung auf die RSMR-Messungen mit den beiden verschiedenen Isotopen unterschiedlich aus. Das ist in Abb. 46 C in der dünnen Absorbernäherung für eine Zweipunktmessung (vgl. S. 59 f) simuliert. Die dünne Absorbernäherung ist für die RSMR mit ihren schwarzen Absorbern als Energieanalysatoren sicherlich nicht richtig. Dennoch können aus dieser Simulation erste Rückschlüsse auf die zu beobachtenden Streukurven gezogen werden. Die Werte für die Parameter  $\alpha_t$  und für  $\langle x_t^2 \rangle$  sind aus Mößbauer-Messungen für das Eisenatom auf 300 K extrapoliert (Gaßmann 2000). Dies ergibt  $\langle x_t^2 \rangle = 0.04 \text{ \AA}^2$  und  $\alpha_t = 10 \text{ mm/s}$  für die  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR bzw.  $\alpha_t = 3.1 \text{ mm/s}$  für die  $^{183}\text{W}$ -RSMR. Der Unterschied in  $\alpha_t$  resultiert aus den verschiedenen Energien der Mößbauer-Übergänge, bezieht sich aber auf dieselbe Bewegungsgleichung für die quasi diffusive proteinspezifische Bewegung. Auf Grund des Brown'schen Oszillators ist im gemeinsamen  $\sin(\vartheta)/\lambda$ -Bereich ein größerer elastisch gestreuter Anteil für die  $^{183}\text{W}$ -RSMR zu erwarten als für die  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR. Dies widerspricht den Meßergebnissen.

Die beste Anpassung an die Meßdaten bei 300 K ergibt einen verschwindenden Wert für die mittlere quadratische Auslenkung  $\langle x_t^2 \rangle$  der quasi diffusiven Bewegungsmoden. In Abb. 47 ist die Simulation nach Gl. ( 80 ) mit einem Parametersatz  $\alpha_t$  und  $\langle x_t^2 \rangle$  für das gesamte Protein dargestellt. Die verwendeten Werte für den Brown'schen Oszillator sind wie oben aus den Mößbauer-Absorptionsmessungen extrapoliert. Im zweiten Maximum der elastischen Streuung, das von der Streuung am Myoglobin dominiert wird, ist die Verschlechterung der Anpassung zu erkennen.



**Abb. 47:** Elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin bei 300 K. Symbole: Meßwerte, durchgezogene Linien: Anpassung ohne Brown'sche Bewegungen, gestrichelte Linien: mit Brown'schen Bewegungen.

Hierbei ist anzumerken, daß für die Beschreibung der quasi diffusiven Bewegungen nur ein einziger Parametersatz, bestehend aus  $\langle x_t^2 \rangle$  und  $\alpha_t$ , für das gesamte Protein verwendet wurde. Wie in Kap. 2.5 Abb. 11 gezeigt, ist die Näherung, nur einen  $\langle x^2 \rangle$ -Wert für alle Atome in der Probe anzunehmen, zur Beschreibung der Vibrationsbewegungen im Protein nicht ausreichend. Dies gilt ebenfalls für die proteinspezifischen Bewegungen. Allerdings führt jede dieser quasi diffusiven Bewegungen zu einer Verringerung der elastischen Streuung bei unveränderter total gestreuter Intensität. Die Verringerung der elastischen Streuung durch die proteinspezifischen Bewegungen wird vom Selbstterm dominiert. Der Paarterm der diffusen Streuung spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle, so daß auch mit sich gegenläufig bewegenden Domänen im Protein keine Änderung in der elastischen Streuung zu erwarten ist. Ein Ausgleich durch eine geringere Flexibilität des Puffers ist nicht wahrscheinlich, da in der Literatur für Wasser bei Raumtemperatur eine komplett inelastische Streuung angegeben wird (Albanese und Deriu 1981). Auch bei einer freien Variation des  $\langle x^2 \rangle$ -Wertes des Puffers und des  $\langle x_t^2 \rangle$ -Wertes für die proteinspezifischen Bewegungen verschwinden für die beste Anpassung die quasi diffusiven Bewegungen. Die Dynamik des Puffers wird in Kap. 6.2.5

eingehend diskutiert. Die aus der Mößbauer-Absorption für das Eisenatom bestimmten Werte stellen demnach eine Obergrenze für die quasi diffusiven Bewegungen des gesamten Proteins dar.

Die spektroskopischen Methoden, mit denen die proteinspezifischen Bewegungsmoden in Myoglobin beobachtet werden, untersuchen zumeist das Eisenatom (Mößbauer-Spektroskopie, Nukleare Vorwärtsstreuung) oder seine direkte Umgebung, die Hämgruppe (Optische Spektroskopie, Raman-Spektroskopie). Damit wäre es denkbar, daß beim Myoglobin der Teil in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums stärker in die proteinspezifischen Bewegungen involviert ist, als der überwiegende Rest des Proteins. Gemittelt über alle Atome ergäbe sich somit ein geringerer  $\langle x_i^2 \rangle$ -Wert, der daraufhin mit den RSMR-Messungen nicht zu beobachten ist. Temperaturabhängige Röntgenstrukturanalysen zeigen für fast alle Myoglobinatome eine Verteilung auf Konformationssubzustände. Mit der obigen Interpretation bedeutet dies, daß auch bei Raumtemperatur das Protein nicht alle Energiebarrieren zwischen den möglichen Konformationssubzuständen überwinden kann. Für die These, daß nur ein geringer Teil des Proteins bei 300 K die Übergänge zwischen den Konformationssubzuständen vollführt, spricht, daß in Belichtungsexperimenten an der L29W-Myoglobinmutante größere strukturelle Umlagerungen nur in einer kleinen Domäne in der Nachbarschaft der Hämgruppe zu beobachten sind (Ostermann et al. 2000). Allerdings sind diese nicht als Übergänge zwischen Konformationssubzuständen, sondern ausschließlich als Konformationsänderung zu bezeichnen. Ein zwingender Zusammenhang zwischen den Konformationsänderungen und den Barrierenhöhen zwischen den Konformationssubzuständen, die für die proteinspezifischen Bewegungen verantwortlich sind, ist nicht gegeben und läßt sich nur vermuten. Gegen die Interpretation, daß die Übergänge zwischen verschiedenen Konformationssubzuständen auf einen kleinen Proteinbereich beschränkt sind, spricht jedoch ein möglicher Migrationsweg eines Liganden von seiner Bindungsstelle am Eisen durch die Proteinmatrix ins Lösungsmittel. Dieser von Molekulardynamiksimulationen vorhergesagte Weg (Elber und Karplus 1990) führt über das auf der proximalen Seite der Hämebene gelegene Xenonloch 1, einen Hohlraum im Protein (Tilton et al. 1984), durch Proteinteile, die von den oben beschriebenen Umlagerungen nicht betroffen sind, und beschreibt damit nicht den kürzesten Weg entlang der Hämgruppe ins Lösungsmittel. Zumindest die Besetzung des Xenonloches als Zwischenstation ist durch Röntgenstrukturanalysen erhärtet (Ostermann et al. 2000). Für jeden möglichen Migrationsweg sind Umlagerungen im Protein erforderlich, da

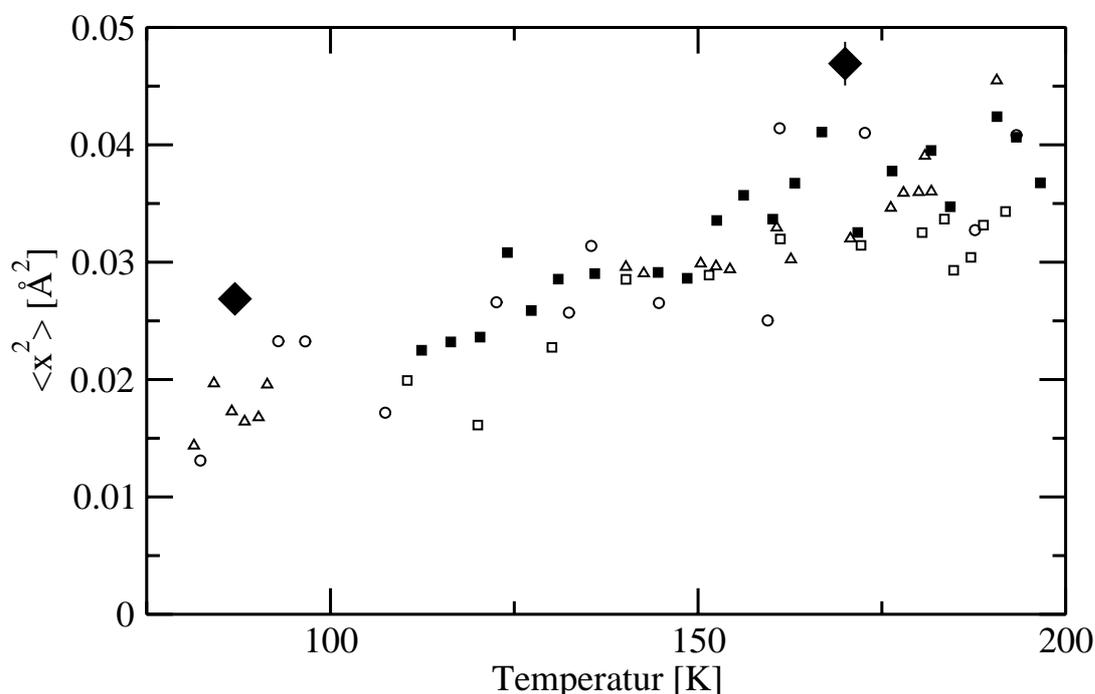
in der mittleren Proteinstruktur der Zugang vom Lösungsmittel zur Bindungsstelle im Protein für einen Liganden sterisch gehindert ist.

Auch wenn die bestmögliche Anpassung an die Meßdaten keine proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen vorhersagt, steht dennoch ein kleiner Anteil von diesen Bewegungsmoden nicht im Widerspruch zu den Meßergebnissen. Die Übertragung der aus der Mößbauer-Spektroskopie am Eisenatom gewonnenen Werten für den Brown'schen Oszillator auf das gesamte Protein liefert im Rahmen der Meßfehler eine Obergrenze für die quasi diffusiven Bewegungen. Größere Werte für  $\langle x_t^2 \rangle$  und  $\alpha_t$  sind ohne eine deutliche Verschlechterung der Simulation nicht möglich.

### 6.2.5 Dynamik des Puffers

Die Dynamik des Puffers läßt sich bei allen Temperaturen mit der Näherung von Vineyard (1958) für die Diffusion beschreiben (vgl. Gl. ( 72 )). Ein zusätzliches  $\langle x^2 \rangle$  für die Vibrationen der Moleküle ist auch bei tiefen Temperaturen nicht beobachtbar (vgl. Gl. ( 49 ) u. ( 50 )). Die Tieftemperaturwerte für die mittlere quadratische Auslenkung der Puffermoleküle können mit den Resultaten aus Mößbauer-Absorptionsmessungen verglichen werden. Dazu ist es notwendig, die Literaturwerte umzurechnen, da diese die Dynamik der im Wasser gelösten Mößbauer-Isotope und nicht der Wassermoleküle angeben. Für den Fall, daß einige wenige Fremdatome in ein kubisches Wirtsgitter eingebunden sind, sagen theoretische Betrachtungen voraus, daß die mittleren quadratischen Fluktuationen der beiden Atomsorten im Verhältnis  $\langle x_O^2 \rangle / \langle x_{Mos}^2 \rangle = \sqrt{m_{Mos}/m_O}$  zueinander stehen (Kagan und Iosilevskii 1962). Hierbei bezeichnet  $m_O$  die Masse eines Sauerstoffatoms, also eines Wirtsgitteratoms, und  $m_{Mos}$  die Masse eines Fremdatoms, in diesem Fall das Mößbauer-Isotop. Sowohl Maradudin und Flinn (1962) als auch Mannheim und Simopoulos (1968) geben dagegen in erster Ordnung keine Massenabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkungen an. Korrekturen zweiter Ordnung entstehen durch die Berücksichtigung der veränderten Kraftkonstanten und der unterschiedlichen Massen. Aus den Normal-Schwingungen folgt für dieses Verhältnis  $m_{Mos}/m_O$ , wobei noch die Kraftkonstanten zwischen den Atomen zu berücksichtigen sind. Mit den Mößbauer-Daten von  $FeCl_2$  in Wasser von Dézsi et al. (1965) und von Brunot et al. (1971) bzw. von  $SnCl_4$  in Wasser von Pelah und Ruby (1969) ergibt

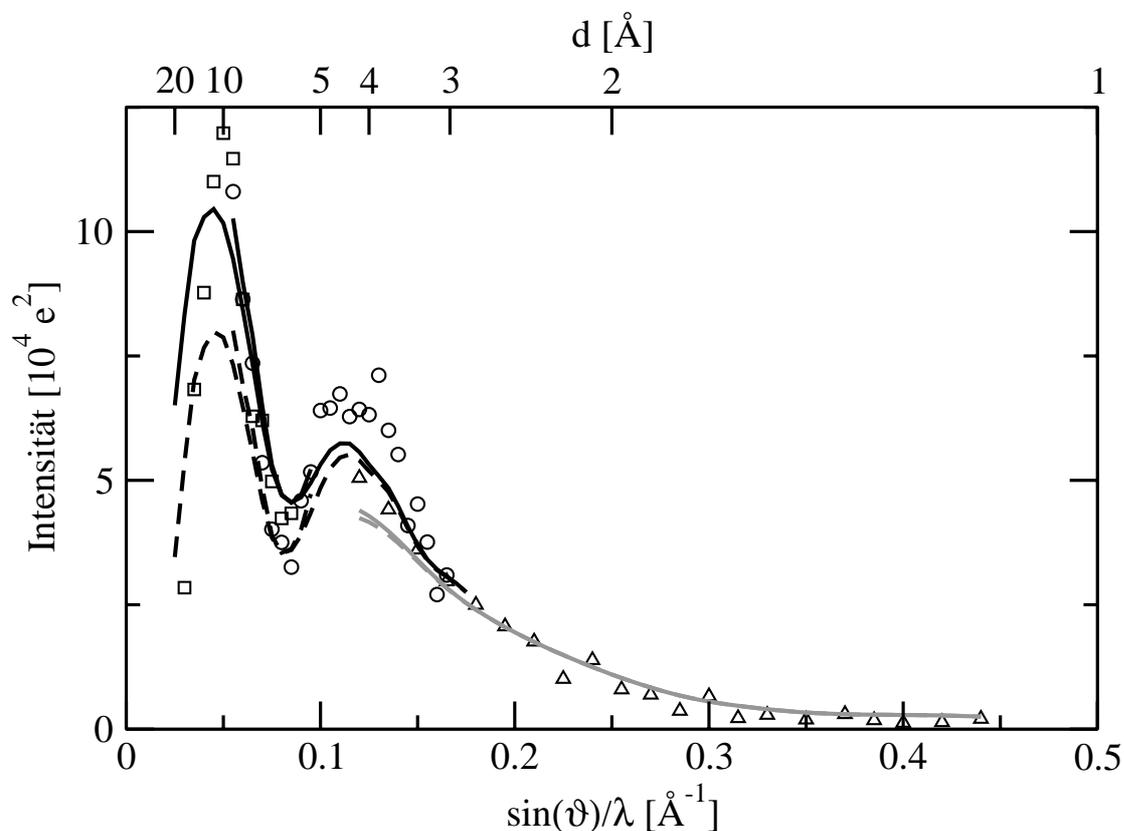
sich folgendes Bild: die Umrechnung der mittleren quadratischen Auslenkungen der Fremd- bzw. der Mößbauer-Atome in die Fluktuationen der Wassermoleküle erfolgt in geringer Konzentration mit dem Skalierungsfaktor  $\sqrt{m_{\text{Mos}}/m_{\text{O}}}$ , in höheren Konzentrationen mit  $m_{\text{Mos}}/m_{\text{O}}$ . Die mit diesen Faktoren umgerechneten mittleren quadratischen Fluktuationen der Wassermoleküle sind in Abb. 48 den aus der Anpassung der RSMR-Daten gewonnenen Werten des Ammoniumsulfatpuffers gegenübergestellt. Berücksichtigt man, daß durch die Unsicherheit in den Kraftkonstanten die Werte aus den Mößbauer-Absorptionsmessungen um den Faktor 0.75-1.5 variieren können (Shirley et al. 1961; Roy und Bhattacharya 1984), ist eine gute Übereinstimmung festzustellen.



**Abb. 48:** Mittlere quadratische Auslenkungen von Wasser. Kreise:  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Absorption aus Dézsi et al. (1965), Dreiecke:  $^{119}\text{Sn}$ -Mößbauer-Absorption aus Pelah und Ruby (1969), Quadrate:  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Absorption Brunot et al. (1971), offene Symbole: skaliert mit  $m_{\text{Mos}}/m_{\text{O}}$ , gefüllte Symbole: skaliert mit  $\sqrt{m_{\text{Mos}}/m_{\text{O}}}$ , Rauten:  $\langle x^2 \rangle$ -Werte des Puffer aus den RSMR-Messungen.

Der starke Anstieg der mittleren quadratischen Fluktuationen des Puffers bei Temperaturen über 180 K – 190 K ist durch einen Phasenübergang zu erklären. Dieser ist ebenfalls in Mößbauer-Absorptionsmessungen zu beobachten (Dézsi et al. 1965). Bei Raumtemperatur konnten Albanese und Deriu (1981) mit der RSMR-Methode keine elastische Streuung an Wasser mehr messen. Das stimmt mit Ergebnissen aus der inelastischen Neutronenstreuung überein. Die dort gefundenen Diffusionskonstanten für freie Diffusion bewirken in den

RSMR-Spektren eine so große Linienverbreiterung, daß eine resonante Absorption auch beim kleinsten, den RSMR-Messungen zugänglichen Impulsübertrag  $\hbar k$  praktisch nicht mehr beobachtbar ist. Allerdings ist eine Anpassung der Meßdaten bei 300 K mit einem komplett inelastisch streuenden Puffer nicht möglich, wie die Abb. 49 zeigt.



**Abb. 49:** Elastische Streuung an polykristallinem Pferde-Myoglobin bei 300 K. Symbole: Meßwerte, durchgezogene Linien:  $\langle x_{\text{Puffer}}^2 \rangle = 1.7 \text{ \AA}^2$ , gestrichelte Linien: Puffer total inelastisch.

Krupyanskii et al. (1980) und Kurinov et al. (1988) geben dagegen einen geringen elastischen Streuanteil von Wasser bei 300 K an. Da aber diese RSMR-Messungen integral über einen großen Streuwinkelbereich durchgeführt wurden, ist nur eine grobe Abschätzung für die mittlere quadratische Auslenkung möglich. Diese ergibt einen Wert von  $\langle x_{\text{H}_2\text{O}}^2 \rangle = 1.3 \text{ \AA}^2$  und ist damit im Bereich des in dieser Arbeit gemessenen Wertes. Nimmt man statt der freien Diffusion der Puffermoleküle eine Diffusion auf begrenztem Raum an, dann läßt sich der gefundene  $\langle x^2 \rangle$ -Wert mit dem Brown'schen Oszillator Modell in eine Diffusionskonstante umrechnen (vgl. Kap. 2.5.5). Mit den in der Literatur angegebenen Bereichen für die Relaxationszeiten  $\tau_c = 1.5 \cdot 10^{-12} \text{ s} - 8.3 \cdot 10^{-12} \text{ s}$  und die Diffusionskonstanten

$D = 1.85 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} - 3.4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Page 1972) wird der Wert aus den RSMR-Messungen von  $\langle x_{\text{Puffer}}^2 \rangle = 1.7 \text{ \AA}^2$  plausibel. Die Diffusion der Puffermoleküle auf begrenztem Raum ist dann sinnvoll, wenn der Puffer in der Probe in Form von kleinen Tröpfchen vorliegt, die durch die Oberflächenspannung und die Ammonium- und Sulfationen zusammengehalten werden. Die Dimensionen der Puffertröpfchen sind mit Sicherheit kleiner als 0.1 mm, da sie sonst mit bloßem Auge sichtbar und somit bei der Probenpräparation aufgefallen wären. Allerdings entspricht das vom Puffer ausgefüllte Volumen in der Probe, legt man die Mengenangaben aus der Probenanalyse zugrunde, in etwa dem Volumen der Myoglobinkristalle.

Bei der Interpretation der Streukurven bei 243 K und 265 K ist zu beobachten, daß das Maximum in der totalen und elastischen Streuung zu kleineren Streuwinkeln hin verschoben ist. An der Position des bei den übrigen Temperaturen gemessenen Maximums ist lediglich ein kleiner Streubeitrag zu erkennen, der von der Streuung am Protein stammt. Das neue Intensitätsmaximum wird von der Streuung am aus dem Puffer auskristallisierten Ammoniumsulfat verursacht. Während die Streukurven bei 87 K und 170 K mit der Pufferstreu Kurve, die bei tiefen Temperaturen aufgenommen wurde, angepaßt werden können, ist dies bei weiterer Erwärmung der Probe nicht mehr möglich. Die sich beim Einfrieren der Probe ergebende Eisstruktur des Puffers ändert sich offensichtlich beim Wiedererwärmen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Messungen von Sartor et al. (1995), der ebenfalls eine Veränderung der Debye-Scherrer-Streuringe in einem Protein-Lösungsmittel-Gemisch sowohl bei langsamen Einfriergeschwindigkeiten als auch bei Wiedererwärmung der Probe beobachtet. Die Positionen der Maxima in den Streukurven bei 243 K und 265 K stimmen mit den Streuwinkeln der Bragg-Reflexe von kristallinem Ammoniumsulfat überein (Schlemper und Hamilton 1966), so daß bei der Wiedererwärmung vermutlich das Salz aus dem Puffer ausgefallen ist und das Ammoniumsulfat sowie das Wasser jeweils separat eigene Kristallstrukturen bilden. Daher ist eine weitere Interpretation der beiden Streukurven bei 243 K und 265 K wegen der großen Unsicherheit in den Streubeiträgen des Puffers nicht sinnvoll.

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das dynamische Verhalten des Myoglobins temperaturabhängig mit der nuklearen Vorwärtsstreuung von Synchrotronstrahlung und mit der Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung untersucht. Während die nukleare Vorwärtsstreuung nur auf die dynamischen Fluktuationen des Eisens in Myoglobin sensitiv ist, detektiert die RSMR-Methode die gesamte Struktur der Probe und separiert die statischen Auslenkungen aller Atome von den dynamischen.

Die Messungen der nuklearen Vorwärtsstreuung wurden an Pottwal-Deoxy-Myoglobin durchgeführt. Dabei konnte erstmals bei einer Proteinprobe das durch die effektive Dicke bestimmte Besselminimum, die „dynamical beats“, im Zeitspektrum beobachtet werden. Damit ist eine klare Trennung der Parameter der effektiven Dicke und der Inhomogenitätsverbreiterung möglich. Im Gegensatz zu früheren Messungen konnte dadurch eine Gauß-förmige Inhomogenitätsverbreiterung aufgeklärt werden. Da sich die Inhomogenitätsverbreiterung durch leicht verschiedene Hyperfeinparameter des Eisens ergibt, die ihrerseits von kleinen strukturellen Unterschieden hervorgerufen werden können, wird die Vermutung nahe gelegt, daß die statischen Auslenkungen des Eisens und seiner Nachbaratome aus ihrer mittleren Lage ebenfalls eine Gauß-förmige Verteilung besitzen. Ausgeweitet auf alle Atome in der Probe ist dies eine Verifizierung für die Gültigkeit der Gauß-Näherung in der Kummulantenentwicklung, die für die Berechnung der Rayleigh-Streubeiträge nötig ist. Die mit dieser Methode bestimmte Quadrupolaufspaltung von Deoxy-Myoglobin ist ebenso in guter Übereinstimmung mit den Meßwerten aus der Mößbauer-Absorption wie die dynamischen mittleren quadratischen Auslenkungen des Eisens bei tiefen Temperaturen. Das durch die Phononen bestimmte dynamische Verhalten des Eisens kann durch die Normal-Moden-Analyse gut vorhergesagt werden. Aus der nuklearen Vorwärtsstreuung ergibt sich für die proteinspezifischen quasi diffusiven Bewegungen über 180 K dagegen ein größerer Beitrag dieser Bewegungen an den totalen dynamischen Auslenkungen als aus Mößbauer-Absorptionsmessungen. Gleichzeitig laufen die quasi diffusiven Bewegungen langsamer oder stärker gedämpft ab, was sich in der schmälere Linienbreite der breiten Linien zeigt. Die mittlere quadratische Auslenkung des Eisens ist unabhängig vom Modell für die Inhomogenitätsverbreiterung durch die Lage des

Besselminimums eindeutig festgelegt, während die Breite der Linien von diesem Modell beeinflusst wird.

Die mittlere Struktur des Pferde-Myoglobins sowie die totalen Auslenkungen der Atome aus ihrer mittleren Position sind aus der Röntgenstrukturanalyse bekannt. Mittels der Normal-Moden-Verfeinerung konnten die Auslenkungen in interne und externe Fluktuationen weiter aufgeteilt werden. Mit der Messung der Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung (RSMR) ist nun eine Unterscheidung zwischen den statischen und dynamischen Auslenkungen bzw. der elastischen und der totalen Streuung möglich. Ein Vergleich des elastisch gestreuten Anteils gemessen mit der  $^{57}\text{Fe}$ - und mit der  $^{183}\text{W}$ -RSMR zeigt beim selben Impulsübertrag an die Streuprobe eine gute Übereinstimmung. Da mit diesen beiden Mößbauer-Isotopen die Dynamik mit zwei verschiedenen Energieauflösungen gemessen wird, können deshalb Bewegungen auf Zeitskalen zwischen 0.13 ns und 13 ns, den Auflösungsgrenzen der  $^{183}\text{W}$ - bzw. der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR ausgeschlossen werden. Zusammengenommen überdecken die Messungen mit den beiden Mößbauer-Isotopen einen größeren Bereich von Impulsüberträgen an die Probe. Eine Beschreibung der Winkelabhängigkeit der Rayleigh-Streuung ist mit einem einzigen dynamischen  $\langle x^2 \rangle$ -Wert für alle Atome nicht möglich. Die individuellen anisotropen Werte aus der Normal-Moden-Analyse können diese dagegen gut erklären. Einen wesentlichen Beitrag zur gestreuten Intensität liefert der Paarterm der diffusen Streuung, der die Korrelationen in den statischen und dynamischen Auslenkungen der Atome beinhaltet. Die Normal-Moden beschreiben neben den individuellen dynamischen Auslenkungen auch die Korrelationen in denselben. Die Korrelationen in den statischen Auslenkungen ergeben sich größtenteils aus den externen Bewegungsmoden der Normal-Moden-Verfeinerung, den TLS-Moden. Ebenso wie die von den Phononen verursachten dynamischen Fluktuationen der Atome lassen sich auch die proteinspezifischen Bewegungen nicht mit einem einzigen Wert erklären. Obwohl in die proteinspezifischen Bewegungen große Proteinbereiche involviert sind, ist dies eine zu grobe Näherung. Die aus der Mößbauer-Absorption und der nuklearen Vorwärtsstreuung am Eisenatom des Myoglobins bestimmten Werte für die quasi diffusiven Bewegungen stellen eine Obergrenze dieser Bewegungen für das gesamte Protein dar.

# Anhang

## Meßdaten der $^{57}\text{Fe}$ -RSMR an Pferde-Myoglobin:

Angegeben sind die total und elastisch gestreute Intensität sowie der elastisch gestreute Anteil mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Daten sind korrigiert auf die Polarisierung, die Absorption in der Probe und den Akzeptanzwinkel des Detektors. Der elastisch gestreute Anteil wird erst für jeden Detektorbildpunkt separat berechnet bevor die Mittelung über alle Bildpunkte im Streuwinkelintervall durchgeführt wird.

Probentemperatur: 170 K

$\sin(\vartheta)/\lambda [\text{\AA}^{-1}]$	$I_{\text{tot}}$	$\Delta I_{\text{tot}}$	$I_{\text{el}}$	$\Delta I_{\text{el}}$	$f_{\text{R}}$	$\Delta f_{\text{R}}$
0.055	11.56	1.09	11.67	1.10	1.00	0.13
0.06	10.17	0.78	9.75	0.78	0.95	0.10
0.065	9.67	0.66	6.96	0.66	0.72	0.08
0.07	7.80	0.57	5.62	0.57	0.72	0.09
0.075	7.56	0.50	5.14	0.50	0.68	0.08
0.08	7.26	0.46	5.16	0.46	0.71	0.08
0.085	8.12	0.43	5.94	0.43	0.73	0.06
0.09	10.57	0.41	8.21	0.41	0.78	0.05
0.095	11.32	0.40	9.74	0.40	0.85	0.04
0.1	12.89	0.39	11.11	0.39	0.86	0.04
0.105	15.10	0.40	12.18	0.40	0.81	0.03
0.11	18.17	0.40	15.27	0.41	0.84	0.03
0.115	21.08	0.41	17.37	0.41	0.83	0.02
0.12	22.31	0.41	18.32	0.41	0.82	0.02
0.125	22.83	0.41	18.81	0.41	0.83	0.02
0.13	23.38	0.40	19.39	0.40	0.84	0.02
0.135	22.59	0.40	18.83	0.40	0.84	0.02
0.14	20.55	0.40	16.58	0.40	0.81	0.02
0.145	17.79	0.39	13.95	0.40	0.79	0.03
0.15	15.97	0.41	12.85	0.41	0.81	0.03
0.155	16.60	0.48	12.23	0.49	0.74	0.04
0.16	15.69	0.58	12.32	0.58	0.79	0.05

Probentemperatur: 243 K

0.055	14.84	2.55	11.06	2.59	0.61	0.10
0.06	11.63	1.54	12.72	1.56	0.75	0.09
0.065	12.25	1.24	9.49	1.25	0.71	0.09
0.07	12.80	1.04	7.52	1.04	0.57	0.09
0.075	12.94	0.91	9.25	0.92	0.53	0.09
0.08	14.11	0.82	9.00	0.82	0.52	0.08
0.085	17.34	0.76	10.79	0.77	0.69	0.07
0.09	19.25	0.73	12.70	0.74	0.78	0.06
0.095	23.70	0.73	17.73	0.73	0.72	0.05
0.1	28.14	0.75	20.29	0.75	0.73	0.04
0.105	27.82	0.76	18.86	0.77	0.70	0.04
0.11	23.05	0.65	16.41	0.66	0.74	0.03
0.115	22.24	0.62	14.92	0.62	0.69	0.03
0.12	20.01	0.59	13.71	0.60	0.75	0.03
0.125	18.87	0.57	13.36	0.58	0.69	0.03
0.13	18.68	0.57	12.15	0.57	0.67	0.03
0.135	17.90	0.58	10.96	0.58	0.67	0.03
0.14	16.06	0.56	8.43	0.57	0.61	0.03
0.145	12.36	0.52	7.08	0.52	0.54	0.04
0.15	12.31	0.49	6.32	0.49	0.73	0.06

Probentemperatur: 265 K

0.055	29.58	4.77	14.95	4.87	0.62	0.22
0.06	23.07	2.96	8.76	3.02	0.54	0.13
0.065	18.01	2.39	10.73	2.41	0.76	0.14
0.07	18.25	2.00	8.32	2.02	0.49	0.11
0.075	19.98	1.75	7.93	1.79	0.37	0.10
0.08	19.87	1.56	7.73	1.58	0.18	0.10
0.085	21.73	1.43	8.82	1.46	0.29	0.10
0.09	22.28	1.37	11.62	1.39	0.43	0.08
0.095	21.94	1.33	9.01	1.36	0.52	0.08
0.1	23.27	1.34	13.11	1.37	0.48	0.06

0.105	20.17	1.32	11.61	1.34	0.50	0.07
0.11	20.50	1.16	7.48	1.18	0.58	0.07
0.115	17.09	1.10	7.34	1.11	0.45	0.06
0.12	14.57	1.06	7.55	1.08	0.46	0.06
0.125	15.49	1.05	6.74	1.07	0.39	0.06
0.13	16.98	1.05	7.09	1.07	0.40	0.06
0.135	17.94	1.05	6.02	1.07	0.33	0.05
0.14	14.56	0.99	4.54	1.01	0.41	0.06
0.145	13.61	0.94	4.49	0.95	0.39	0.08
0.15	11.12	0.90	4.07	0.91	0.33	0.10

Probentemperatur: 300 K, Analysator in Pos. 2 (vgl. S. 56)

0.03	6.35	1.21	2.84	1.22	0.45	0.21
0.035	7.97	0.82	6.83	0.82	0.85	0.13
0.04	11.73	0.64	8.78	0.65	0.75	0.07
0.045	13.90	0.59	11.01	0.59	0.79	0.05
0.05	15.21	0.54	11.98	0.55	0.79	0.04
0.055	14.82	0.50	11.47	0.51	0.77	0.04
0.06	13.94	0.47	8.64	0.48	0.62	0.04
0.065	12.39	0.44	6.29	0.45	0.51	0.04
0.07	11.35	0.42	6.21	0.43	0.55	0.04
0.075	10.87	0.40	4.98	0.40	0.46	0.04
0.08	10.36	0.39	4.24	0.39	0.41	0.04
0.085	10.82	0.40	4.34	0.40	0.40	0.04

Probentemperatur: 300 K, Analysator in Pos. 1 (vgl. S. 56)

0.055	14.82	1.09	10.81	1.10	0.73	0.09
0.06	13.91	0.85	8.64	0.86	0.63	0.07
0.065	12.31	0.70	7.36	0.70	0.60	0.06
0.07	10.53	0.60	5.36	0.60	0.51	0.06
0.075	10.40	0.52	4.02	0.53	0.39	0.05
0.08	10.07	0.48	3.76	0.48	0.37	0.05
0.085	10.43	0.45	3.26	0.46	0.31	0.05
0.09	11.79	0.44	4.59	0.44	0.39	0.04

0.095	12.37	0.43	5.17	0.44	0.42	0.04
0.1	13.65	0.43	6.41	0.43	0.47	0.03
0.105	13.83	0.42	6.46	0.43	0.47	0.03
0.11	15.26	0.41	6.74	0.42	0.45	0.03
0.115	15.43	0.41	6.28	0.42	0.41	0.03
0.12	16.17	0.41	6.43	0.42	0.40	0.03
0.125	15.85	0.41	6.32	0.42	0.40	0.03
0.13	16.09	0.40	7.11	0.41	0.44	0.03
0.135	16.70	0.40	6.01	0.41	0.37	0.03
0.14	16.34	0.40	5.52	0.41	0.34	0.03
0.145	15.41	0.40	4.09	0.41	0.27	0.03
0.15	16.00	0.41	4.52	0.42	0.29	0.03
0.155	16.18	0.46	3.76	0.47	0.23	0.03
0.16	15.11	0.53	2.71	0.55	0.18	0.04
0.165	14.19	0.61	3.10	0.62	0.22	0.04

# Literaturverzeichnis

- Achterhold K (1987) Entwicklung einer Apparatur zur Durchführung von Rayleigh Streuexperimenten mit Mößbauer Strahlung. Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Achterhold K (1995) Untersuchung der Dynamik von Myoglobin Kristallen durch Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung. Dissertation an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
- Achterhold K, Keppler C, Ostermann A, van Bürck U, Ruffer R, Sturhahn W, Alp EE, Parak F (2001) Vibrational Dynamics of Myoglobin determined by Phonon Assisted Mössbauereffect. in Vorbereitung
- Albanese G, Deriu A (1979) High Energy Resolution X-Ray Spectroscopy. Riv. d. Nuovo Cim. 2:1-40
- Albanese G, Deriu A (1981) Influence of Low Frequency Excitations on the Rayleigh Scattering of Mössbauer Radiation. Phys. Stat. Sol. B107:K115-K117
- Ansari A, Berendzen J, Bowne SF, Frauenfelder H, Iben IET, Sauke TB, Shyamsunder E, Young RD (1985) Protein states in proteinquakes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5000-5004
- Antonini E, Brunori M (1971) Hemoglobin and myoglobin in their interactions with ligands. Horth-Holland Publishing Company, Amsterdam and London
- Austin RH, Beeson KW, Eisenstein L, Frauenfelder H, Gunsalus IC (1975) Dynamics of Ligand Binding to Myoglobin. Biochemistry 14:5355-5373
- Azaroff LV (1955) Polarization Correction for Crystal-Monochromatized X-radiation. Acta Cryst. 8:701-704
- Bade D, Parak F, Mößbauer RL, Hoppe W, Levai N, Charpak G (1982) Development of a multiwire proportional chamber as an area sensitive detector for X-ray protein crystallography. Nucl. Instr. and Meth. 201:193-196
- Baron AQR (1995) Report on the X-ray efficiency and time response of a 1 cm<sup>2</sup> reach through avalanche diode. Nucl. Instr. and Meth. A 352:665-667
- Bloch F (1932) Zur Theorie des Austauschproblems und der Remanenzerscheinung der Ferromagnetika. Z. Physik 74:295-335
- Born M, Kármán T, v. (1912) Über Schwingungen und Raumgitter. Physikal. Zeit. 13:297-309

- Bragg WL (1913) The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. Proc. Camb. Phil. Soc. 17:43-57
- Breit G, Wigner E (1936) Capture of Slow Neutrons. Phys. Rev. 49:519-531
- Brunot B, Hauser U, Neuwirth W (1971) Observation and Analysis of a Glass Transition in Amorphous Frozen Solutions of Iron-II Chloride. Z. Physik 249:134-144
- Burg T (1994) Weiterentwicklung eines Vieldrahtproportionalzählers zur Strukturbestimmung von Proteinen. Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biophysik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Champeney DC, Woodhams FWD (1968) Investigation of molecular motions in supercooled liquids by Mossbauer scattering. J. Phys. B: Atom. Molec. Phys. 1:620-631
- Champeney DC, Dean GW (1975) Molecular vibrations in glassy glycerol measured by Mössbauer scattering. J. Phys. C: Solid St. Phys. 8:1276-1286
- Champeney DC (1979) The scattering of Mössbauer radiation by condensed matter. Rep. Prog. Phys. 42:1017-1054
- Chandrasekhar S (1943) Stochastic Problems in Physics and Astronomy. Rev. Mod. Phys. 15:1-89
- Chang I (1992) Mößbauerspektroskopie an Myoglobin: Untersuchung der Dynamik von Deoxy-Myoglobin-Kristallen. Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biophysik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Cheng X, Schoenborn BP (1990) Hydration in Protein Crystals. A Neutron Diffraction Analysis of Carbonmonoxymyoglobin. Acta Cryst. B46:195-208
- Chong S-H, Joti Y, Kidera A, Go N, Ostermann A, Gassmann A, Parak F (2001) Dynamical transition of myoglobin in a crystal: comparative studies of X-ray crystallography and Mössbauer spectroscopy. Eur. Biophys. J. 30:319-329
- Chu K, Vojtechovský J, McMahon BH, Sweet RM, Berendzen J, Schlichting I (2000) Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin. Nature 403:921-923
- Chumakov AI, Smirnov GV, Zelepukhin MV, van Bürck U, Gerdau E, Ruffer R, Rüter HD (1992) Nuclear Diffraction of Synchrotron Radiation in Laue Geometry: Quantum Beat Shift. Europhys. Lett. 17:269-274
- Compton AH, Allison SK (1935) X-Rays in Theory and Experiment, Second Edition edn. D. van Nostrand Company, INC., Princeton, New Jersey
- Cruickshank DW (1956) The analysis of the anisotropic thermal motion of molecules in crystals. Acta Cryst. 9:754-756

- Darwin CG (1914) The Theory of X-Ray Reflexion. *Phil. Mag.* 27:315-333 & 675-690
- Debye P (1914) Interferenz von Röntgenstrahlen und Wärmebewegung. *Ann. d. Physik* 43:49-95
- Dézsi I, Keszthelyi L, Molnár B, Pócs L (1965) Mössbauer effect study of phase transition in ice. *Phys. Letters* 18:28-29
- Dietrich S, Fenzl W (1989) Correlations in disordered crystals and diffuse scattering of x rays or neutrons. *Phys. Rev. B* 39:8873-8899
- Dilg A (2000) Struktur und Dynamik natürlicher, mutierter und entfalteter Eisen-Schwefel-Proteine (HiPIPs) untersucht mit fünf spektroskopischen Methoden. Dissertation an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
- Ducruix A, Giege R (1992) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*. Oxford University Press
- Elber R, Karplus M (1990) Enhanced Sampling in Molecular Dynamics: Use of the Time-Dependent Hartree Approximation for Simulation of Carbon Monoxide Diffusion through Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 112:9161-9175
- Frauenfelder H, Petsko GA, Tsenoglou D (1979) Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature* 280:558-563
- Fritsch K, Friedrich J, Parak F, Skinner JL (1996) Spectral diffusion and the energy landscape of a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15141-15145
- Garbers A, Reifarth F, Kurrek J, Renger G, Parak F (1998) Correlation between Protein Flexibility and Electron Transfer from QA\* to QB in PSII Membrane Fragments from Spinach. *Biochemistry* 37:11399-11404
- Gaßmann A (2000) Proteinspezifische Dynamik und Relaxation in Myoglobin. Dissertation an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
- Gerdau E, DeWaard H (1999) Nuclear resonant scattering of synchrotron radiation. In: DeWaard H (ed) *Hyperfine Interactions*, vol 123/124. Baltzer Science Publishers BV, Bussum, The Netherlands
- Gingrich NS (1943) The Diffraction of X-Rays by Liquid Elements. *Rev. Mod. Phys.* 15:90-110
- Go N (1990) A theorem on amplitudes of thermal atomic fluctuations in large molecules assuming specific conformations calculated by normal mode analysis. *Biophys. Chem.* 35:105-112
- Gonser U (1975) *Mössbauer Spectroscopy Topics in Applied Physics*, vol 5. Springer-Verlag, Berlin

- Harami T, Looock J, Huenges E, Fontcuberta J, Obradors X, Tejada J, Parak F (1984) The influence of the semiconductor properties on the Mössbauer emission spectra of  $^{57}\text{Co}$  cobalt oxide. *J. Phys. Chem. Solids* 45:181-190
- Hartmann H, Steigemann W, Reuscher H, Parak F (1987) Structural disorder in proteins: A comparison of myoglobin and erythrocyruorin. *Eur. Biophys. J.* 14:337-348
- Hartmann TG (1992) Zeitaufgelöste Strukturbestimmung mit Flächendetektoren - Aufbau einer Zählapparatur. Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biophysik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Hastings JB, Siddons DP, van Bürck U, Hollatz R, Bergmann U (1991) Mössbauer Spectroscopy Using Synchrotron Radiation. *Phys. Rev. Letters* 66:770-773
- Hill JR, Dlott DD, Rella CW, Peterson KA, Decatur SM, Boxer SG, Fayer MD (1996) Vibrational Dynamics of Carbon Monoxide at the Active Sites of Mutant Heme Proteins. *J. Phys. Chem.* 100
- Huenges E, Looock J, Morinaga H, Parak F (1982) The development of strong  $^{57}\text{Co}$  Mössbauer sources for scattering experiments on  $^{57}\text{Fe}$ ; I. The production of large activities of  $^{57}\text{Co}$  at the compact cyclotron at Munich. *Nucl. Instr. and Meth.* 203:527-531
- Ishikawa T, Yoda Y, Izumi K, Suzuki CK, Zhang XW, Ando M, Kikuta S (1992) Construction of a precision diffractometer for nuclear Bragg scattering at the Photon Factory. *Rev. Sci. Instrum.* 63:1015-1018
- James RW (1948) *The Optical Principles of The Diffraction Of X-Rays*. G. Bell and Sons LTD, London, England
- Kagan Y, Iosilevskii YA (1962) The Mössbauer effect for an impurity nucleus in a crystal. I. *JETP* 42:259-272
- Kagan Y, Afanas'ev AM, Kohn VG (1978) Time delay in the resonance scattering of synchrotron radiation by nuclei in a crystal. *Phys. Letters* 68A:339-341
- Kagan Y, Afanas'ev AM, Kohn VG (1979) On excitation of isomeric nuclear states in a crystal by synchrotron radiation. *J. Phys. C: Solid St. Phys.* 12:615-631
- Kasper JS, Lonsdale K (1985) *Mathematical Tables*. In: Lonsdale K (ed) *International Tables for X-Ray Crystallography*, vol II. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland
- Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, Hart RG, Davies DR, Phillips DC, Shore VC (1960) Structure of Myoglobin. A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. *Nature* 185:422-427

- Kepler C (1999) Untersuchung der Dynamik von Myoglobin mit inelastischer Streuung von Synchrotronstrahlung und  $^{183}\text{W}$ -RSMR. Dissertation an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
- Kepler C, Achterhold K, Ostermann A, van Bürck U, Chumakov AI, Ruffer R, Sturhahn W, Alp EE, Parak F (2000) Nuclear forward scattering of synchrotron radiation by deoxymyoglobin. *Eur. Biophys. J.* 29:146-152
- Kidera A, Go N (1992) Normal Mode Refinement: Crystallographic Refinement of Protein Dynamic Structure - I. Theory and Test by Simulated Diffraction Data. *J. Mol. Biol.* 225:457-475
- Knapp EW, Fischer SF, Parak F (1982) Protein Dynamics from Mössbauer Spectra. The Temperature Dependence. *J. Phys. Chem.* 86:5042-5047
- Knapp EW, Fischer SF, Parak F (1983) The influence of protein dynamics on Mössbauer spectra. *J. Chem. Phys.* 78:4701-4711
- Krupyanskii YF, Parak F, Hannon J, Gaubman EÉ, Gol'danskii VI, Suzdalev IP, Hermes K (1980) Determination of the mean square displacement of the atomic vibrations in myoglobin molecules by measuring Rayleigh scattering of the Mössbauer radiation. *JETP* 79:63-68
- Kubo R (1962) Generalized Cumulant Expansion Method. *J. Phys. Soc. Jpn.* 17:1100-1120
- Kurinov IV, Krupyanskii YF, Genkin MV, Davydov RM, Suzdalev IP, Gol'danskii VI (1988) Study of the effect of composition and viscosity of the solvent on the molecular dynamics of human serum albumin using rayleigh scatter of Mössbauer radiation. *Biofizika* 33:407-412
- Lamb WE, Jr. (1939) Capture of Neutrons by Atoms in a Crystal. *Phys. Rev.* 55:190-197
- Lynch FJ, Holland RE, Hamermesh M (1960) Time Dependence of Resonantly Filtered Gamma Rays from  $\text{Fe}^{57}$ . *Phys. Rev.* 120:513-520
- MacGillavry CH, Rieck GD (1985) Physical and Chemical Tables. In: Lonsdale K (ed) *International Tables for X-Ray Crystallography*, vol III. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland
- Mannheim PD, Simopoulos A (1968) Influence of Force-Constant Changes and Localized Modes on the  $\text{V:Fe}^{57}$  Mössbauer System. *Phys. Rev.* 165:845-849
- Maradudin AA, Flinn PA (1962) Debye-Waller Factor for Mössbauer Resonant Impurity Atoms. *Phys. Rev.* 126:2059-2071
- Marquardt DW (1963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 11:431-441

- Maurus R, Overall CM, Bogumil R, Luo Y, Mauk AG, Smith M, Brayer GD (1997) A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket. *Biochim. Biophys. Acta* 1341:1-13
- Melchers B, Knapp EW, Parak F, Cordone L, Cupane A, Leone M (1996) Structural Fluctuations of Myoglobin from Normal-Modes, Mössbauer, Raman, and Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.* 70:2092-2099
- Mößbauer RL (1958) Kernresonanzfluoreszenz von Gammastrahlung in Ir<sup>191</sup>. *Z. Physik* 151:124-143
- Mößbauer RL (1959) Kernresonanzabsorption von  $\gamma$ -Strahlung in Ir<sup>191</sup>. *Z. Naturf.* 14a:211-216
- Nienhaus GU, Drepper F, Parak F, Mößbauer RL, Bade D, Hoppe W (1987) A multiwire proportional counter with spherical drift chamber for protein crystallography with X-rays and gamma-rays. *Nucl. Instr. and Meth.* A256:581-586
- Nishikawa T, Go N (1987) Normal Modes of Vibration in Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Its Mechanical Property. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 2:308-329
- Nowik I, Cohen SG, Bauminger ER, Ofer S (1983) Mössbauer Absorption in Overdamped Harmonically Bound Particles in Brownian Motion. *Phys. Rev. Letters* 50:1528-1531
- Nowik I, Bauminger ER, Cohen SG, Ofer S (1985) Spectral shapes of Mössbauer absorption and incoherent neutron scattering from harmonically bound nuclei in Brownian motion: Applications to macromolecular systems. *Phys. Rev. A* 31:2291-2299
- Ostermann A (2000) Untersuchung der Proteindynamik und metastabiler Proteinzustände mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse. Dissertation an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
- Ostermann A, Waschipky R, Parak F, Nienhaus GU (2000) Ligand binding and conformational motions in myoglobin. *Nature* 404:205-208
- Page DI (1972) The Scattering of Neutrons by Liquid Water. In: Franks F (ed) *Water: A comprehensive treatise, vol 1 The Physics and Physical Chemistry of Water*. Plenum Press, New York - London, pp 333-362
- Parak F, Formanek H (1971) Untersuchung des Schwingungsanteils und des Kristallgitterfehleranteils des Temperaturfaktors in Myoglobin durch Vergleich von Mössbauerabsorptionsmessungen mit Röntgenstrukturdaten. *Acta Cryst. A* 27:573-578
- Parak F, Frolov EN, Kononenko AA, Mößbauer RL, Gol'danskii VI, Rubin AB (1980) Evidence for a correlation between photoinduced electron transfer and dynamic

- properties of the chromatophore membranes from *Rhodospirillum rubrum*. FEBS Letters 117:368-372
- Parak F, Knapp EW, Kucheida D (1982) Protein Dynamics - Mössbauer Spectroscopy on Deoxymyoglobin Crystals. J. Mol. Biol. 161:177-194
- Parak F, Knapp EW (1984) A consistent picture of protein dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7088-7092
- Parak F, Hartmann H, Aumann KD, Reuscher H, Rennekamp G, Bartunik H, Steigemann W (1987) Low temperature X-ray investigation of structural distributions in myoglobin. Eur. Biophys. J. 15:237-249
- Parak F, Hartmann H, Schmidt M, Corongiu G, Clementi E (1992) The hydration shell of myoglobin. Eur. Biophys. J. 21:313-320
- Parak F, Frauenfelder H (1993) Protein dynamics. Physica A 201:332-345
- Parak F, Hartmann H, Schmidt M, Corongiu G (1993) The Hydration of Myoglobin Molecules. In: Palma MU, Palma-Vittorelli MB, Parak F (eds) Water-Biomolecule Interactions, vol 43, SIF, Bologna, pp 115-122
- Parak F, Achterhold K (1999) Protein dynamics studied on myoglobin. Hyp. Int. 123/124:825-840
- Parak F, Ostermann A, Gassmann A, Scherk C, Chong S-H, Kidera A, Go N (1999) Biomolecules: Fluctuations and Relaxations. In: Frauenfelder H, Hummer G, Garcia R (eds) Biological Physics: Third International Symposium, vol 487, AIP, pp 117-127
- Pelah I, Ruby SL (1969) Conductivity and Mössbauer Measurements in Doped Ice. J. Chem. Phys. 51:383-387
- Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP (1992) Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, Cambridge
- Rahman A, Singwi KS, Sjölander A (1962a) Theory of Slow Neutron Scattering by Liquids. I. Phys. Rev. 126:986-996
- Rahman A, Singwi KS, Sjölander A (1962b) Stochastic Model of a Liquid and Cold Neutron Scattering. II. Phys. Rev. 126:997-1004
- Roy SK, Bhattacharya DL (1984) Debye-Waller Factor for Small Concentration of Mössbauer Impurities in Metallic Solids. Phys. Stat. Sol. B123:45-51
- Sartor G, Hallbrucker A, Mayer E (1995) Characterizing the Secondary Hydration Shell on Hydrated Myoglobin, Hemoglobin, and Lysozyme Powders by Its Vitrification Behavior on Cooling and Its Calorimetric Glass -> Liquid Transition and Crystallization Behavior on Reheating. Biophys. J. 69:2679-2694

- Scheler W, Schoffa G, Jung F (1957) Lichtabsorption und paramagnetische Suszeptibilität bei Derivaten des Pferde- und Chironomus-Methämoglobins sowie des Pferde-Metmyoglobins. *Biochem. Z.* 329:232-246
- Schlemper EO, Hamilton WC (1966) Neutron-Diffraction Study of the Structures of Ferroelectric and Paraelectric Ammonium Sulfate. *J. Chem. Phys.* 44:4498-4509
- Schmidt M, Parak F, Corongiu G (1996) Density Distributions in the Water Shell of Myoglobin. *Int. J. Quantum Chem.* 59:263-269
- Schoenborn BP, Garcia A, Knott R (1995) Hydration in protein crystallography. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 64:105-119
- Schomaker V, Trueblood KN (1968) On the Rigid-Body Motion of Molecules in Crystals. *Acta Cryst. B* 24:63-76
- Shaitan KV, Rubin AB (1980) Theory of the Mossbauer effect in proteins. *Biophysics* 25:809-816
- Shirley DA, Kaplan M, Axel P (1961) Recoil-Free Resonant Absorption in Au<sup>197</sup>. *Phys. Rev.* 123:816-830
- Shvyd'ko YV, van Bürck U, Potzel W, Schindelmann P, Gerdau E, Leupold O, Metge J, Rüter HD, Smirnov GV (1998) Hybrid beat in nuclear forward scattering of synchrotron radiation. *Phys. Rev. B* 57:3552-3561
- Shvyd'ko YV (2000) MOTIF: Evaluation of time spectra for nuclear forward scattering. *Hyp. Int.* 125:173-188
- Singwi KS, Sjölander A (1960a) Diffusive Motions in Water and Cold Neutron Scattering. *Phys. Rev.* 119:863-871
- Singwi KS, Sjölander A (1960b) Resonance Absorption of Nuclear Gamma Rays and the Dynamics of Atomic Motions. *Phys. Rev.* 120:1093-1102
- Smirnov GV, Kohn VG (1995) Theory of nuclear resonant scattering of synchrotron radiation in the presence of diffusive motion of nuclei. *Phys. Rev. B* 52:3356-3365
- Smirnov GV (1996) Nuclear resonant scattering of synchrotron radiation. *Hyp. Int.* 97/98:551-588
- Sturhahn W (2000) CONUSS and PHOENIX: Evaluation of nuclear resonant scattering data. *Hyp. Int.* 125:149-172
- Tilton RF, Kuntz ID, Jr., Petsko GA (1984) Cavities in Proteins: Structure of a Metmyoglobin-Xenon Complex Solved to 1.9 Å. *Biochemistry* 23:2849-2857
- Trammell GT (1962) Elastic Scattering at Resonance from Bound Nuclei. *Phys. Rev.* 126:1045-1054

- Trammell GT, Hannon JP (1978) Quantum beats from nuclei excited by synchrotron pulses. Phys. Rev. B 18:165-172
- Trammell GT, Hannon JP (1979) Erratum: Quantum beats from nuclei excited by synchrotron pulses. Phys. Rev. B 19:3835-3836
- Uhlenbeck GE, Ornstein LS (1930) On the Theory of the Brownian Motion. Phys. Rev. 36:823-841
- van Bürck U, Mößbauer RL, Gerdau E, Ruffer R, Hollatz R, Smirnov GV, Hannon JP (1987) Nuclear Bragg Scattering of Synchrotron Radiation with Strong Speedup of Coherent Decay, Measured on Antiferromagnetic  $^{57}\text{FeBO}_3$ . Phys. Rev. Letters 59:355-358
- van Bürck U, Siddons DP, Hastings JB, Bergmann U, Hollatz R (1992) Nuclear forward scattering of synchrotron radiation. Phys. Rev. B 46:6207-6211
- van Hove L (1954) Correlations in Space and Time and Born Approximation Scattering in Systems of Interacting Particles. Phys. Rev. 95:249-262
- Vineyard GH (1958) Scattering of Slow Neutrons by a Liquid. Phys. Rev. 110:999-1010
- Waller I (1923) Zur Frage der Einwirkung der Wärmebewegung auf die Interferenz von Röntgenstrahlen. Z. Physik 17:398-408
- Wang MC, Uhlenbeck GE (1945) On the Theory of the Brownian Motion II. Rev. Mod. Phys. 17:323-342
- Wegener H (1965) Der Mössbauer-Effekt und seine Anwendungen in Physik und Chemie. Bibliographisches Institut AG, Mannheim
- Whittaker EJW (1953) The polarization factor for inclined-beam photographs using crystal-reflected radiation. Acta Cryst. 6:222-223
- Young RD, Frauenfelder H, Johnson JB, Lamb DC, Nienhaus GU, Philipp R, Scholl R (1991) Time- and temperature dependence of large-scale conformational transitions in myoglobin. Chem. Phys. 158:315-327
- Zach C (1996) Proteindynamikuntersuchungen an Myoglobin durch Rayleigh-Streuung von Mößbauer-Strahlung. Diplomarbeit an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
- Zach C, Keppler C, Huenges E, Achterhold K, Parak F (2000) Angular- and temperature-dependent RSMR on myoglobin using  $^{183}\text{W}$  and  $^{57}\text{Fe}$ . Hyp. Int. 126:83-86
- Zernike F, Prins JA (1927) Die Beugung von Röntgenstrahlung in Flüssigkeiten als Effekt der Molekülanordnung. Z. Physik 41:184-194

# Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. F. Parak für die Überlassung des spannenden Themas. Sein stetes Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft, die die Durchführung dieser Arbeit begleitete, waren eine wertvolle Unterstützung.

Herrn Dr. K. Achterhold danke ich für die vielen Diskussionen und Anregungen. Darüber hinaus trug sein Mitwirken an den Synchrotron-Messungen in Hamburg zu einem besseren Verständnis dieser Meßmethode bei und half bei der Überwindung von Schwierigkeiten.

Herrn Dr. E. Huenges und allen Mitarbeitern des Zyklotrons danke ich für die Herstellung und Bereitstellung der CoO-Quellen, ohne die die Durchführung der  $^{57}\text{Fe}$ -RSMR-Messungen nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. C. Keppler danke ich für die Überlassung seiner  $^{183}\text{W}$ -RSMR-Meßdaten, die zu einer sehr viel weiterreichenden Interpretation der Streudaten beitrugen.

Den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen Hilfestellungen. Namentlich erwähnt seien hier besonders Dr. A. Ostermann und Dipl. Phys. N. Engler, die mir bei der Probenpräparation mit Rat und Tat zur Seite standen.

# Lebenslauf

**Name:** Zach  
**Vorname:** Christian  
**Geburtsdatum:** 16.10.70  
**Geburtsort:** München  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Konfession:** evangelisch  
**Eltern:** Karin Zach geb. Hardt und Hans-Peter Zach  
**Familienstand:** ledig  
**Zivildienst:** 03.09.90 – 31.11.91 im Klinikum rechts der Isar München

## **Bildungsweg:**

1977 – 1981 Städt. Maria-Ward-Grundschule in München  
1981 – 1983 Städt. Luise-Schröder-Gymnasiums in München  
1983 – 1990 Städt. Käthe-Kollwitz-Gymnasiums in München,  
Abschluß: Abitur  
11.1991 – 12.1996 Studium der Allgemeinen Physik an der Technischen  
Universität München, Abschluß: Diplom  
01.1997 Beginn der Promotion an der Fakultät für Physik, E17, der  
Technischen Universität München