

Technische Universität München
Physik-Department E17

**Strukturuntersuchungen an Metalloproteinen
mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie:
Das Kupferbindungszentrum in Prion-Proteinen,
die Dynamik von Eisen-Schwefel-Clustern in HiPIPs
und Untersuchungen am modifizierten Photosystem II**

Klaus Grantner

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. J. Friedrich

Die Dissertation wurde am 30. Juni 2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 21. August 2003 angenommen.

Meiner Frau Isabell
und
unserer gemeinsamen Zukunft

Inhalt

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
2 Experimentelle Methoden und ihre theoretischen Grundlagen	9
2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie.....	9
2.1.1 Absorption eines Photons.....	10
2.1.2 Theorie der Einfachstreuung	13
2.1.3 Der Debye-Waller Faktor.....	15
2.1.4 Die XAS-Einfachstreuformel.....	16
2.1.5 Beschreibung der Mehrfachstreuung.....	17
2.1.6 EXAFS-Datenanalyse	21
2.1.7 Mehrfachstreubeiträge.....	23
2.1.8 Verfahren zur Analyse von EXAFS-Spektren.	26
2.1.9 "pre-edge" Analyse	27
2.2 Mößbauer-Spektroskopie	29
2.2.1 Hyperfeinwechselwirkungen.....	29
2.2.2 Das Transmissionsintegral und der Lamb-Mößbauer-Faktor	31
3 Experimenteller Aufbau	33
3.1 Messapparatur XAS	33
3.1.1 Monochromator und Spiegel.....	34
3.1.2 Kryostat	36
3.1.3 Der Fluoreszenzdetektor.....	37
3.1.4 Energiekalibration	38
3.1.5 Datenreduktion	39
4 Untersuchungen am modifizierten Photosystem II	40
4.1 Der durch Fe ersetzte Mn-Cluster im Photosystem II.....	40
4.2 Probenpräparation	44
4.2.1 Präparation und Extraktion des Mn-Clusters	44
4.2.2 Proben für die XAS-Untersuchungen am PSII.....	45
4.2.3 Abschätzung des Fe-Gehalts aus dem Mößbauer-Spektrum.....	46

4.3 Experimente und Auswertung.....	47
4.4 Charakterisierung des Mn ersetzenden Fe-Clusters im PSII aus Spinat	51
5 High-Potential Iron Proteins (HiPIPs)	54
5.1 Grundlegende Eigenschaften.....	54
5.1.1 Struktur des [Fe ₄ S ₄]-Clusters im HiPIP <i>C. vinosum</i>	55
5.2 Präparation der HiPIP Proben	57
5.2.1 Isolierung und Reinigung	57
5.2.2 Herstellung der verschiedenen HiPIP-Proben.....	59
5.3 Ergebnisse und Auswertung.....	61
5.3.1 Strukturelle Untersuchungen am HiPIP aus <i>C. vinosum</i>	61
5.3.2 Temperaturabhängige Untersuchungen am HiPIP aus <i>C. vinosum</i>	64
5.4 Struktur und Dynamik von nativen, mutierten und teilweise entfalteten HiPIPs	68
5.4.1 Atomstruktur von nativem und C77S-mutiertem HiPIP <i>C. vinosum</i>	68
5.4.2 Dynamik von nativem und teilweise entfaltetem HiPIP	70
5.4.3 Beschreibung der Faltung des HiPIP aus <i>C. vinosum</i>	74
6 Kupferbindung in der N-terminalen Domäne des Prion-Proteins	77
6.1 Prion-Proteine.....	77
6.2 Probenpräparation	80
6.2.1 Modell-Komplexe für die Octa-Repeat Region des menschlichen Prion-Proteins. 80	
6.2.2 Reinigung und Herstellung von rekombinanten menschlichen PrP(23-231)-Proben	81
6.3 Ergebnisse und Auswertung.....	84
6.3.1 Untersuchungen an synthetisierten Octa-Repeat Segmenten.....	84
6.3.2 Untersuchungen an rekombinanten menschlichen PrP(23-231)	88
6.4 Diskussion	92
6.4.1 Charakterisierung des Kupferbindungsplatzes in den Octa-Repeat Segmenten	92
6.4.2 Der N-terminale Kupferbindungsplatz in menschlichen Prion-Proteinen	99
7 Ausblick.....	103
Anhang A	105
Anhang B.....	106
Anhang C	108

Anhang D	111
Anhang E.....	112
Literaturverzeichnis.....	113
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	122
Danksagung	
Lebenslauf	

Zusammenfassung

In Photosystem II-Membranfragmenten, die man nach Extraktion des Mn-Clusters mit Fe^{2+} behandelt, werden bei Belichtung drei der vier Mn-Bindungsplätze durch Fe^{3+} im high-spin-Zustand besetzt. Ein weiteres Fe-Ion bindet als Fe^{2+} im low-spin-Zustand. Mit Hilfe eines Differenz-EXAFS-Spektrums konnte der Fe_3O_x -Cluster, der anstelle des Mn-Clusters im Photosystem II bindet, näher charakterisiert werden. Unter Benützung von Ergebnissen aus der Mößbauer-Spektroskopie wurde ein Eisen-Eisen Abstand von 3.3 Å festgestellt. Die Eisenatome sind im Cluster über μ -oxo-Brücken miteinander verbunden. Zuerst bildet sich der Fe_3 -Cluster, bevor ein weiteres Fe^{2+} -Ion an der Stelle des Ca-Bindungsplatzes bindet.

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

Anhand der Bestimmung der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus temperaturabhängigen EXAFS-Messungen wurde die Struktur und Dynamik des Eisen-Schwefel-Clusters in nativem reduziertem HiPIP *C. vinosum* untersucht. Dabei wurde eine sehr schwache Temperaturabhängigkeit von strukturellen Parametern beobachtet. Daten aus einer Tieftemperaturmessung können zur Beschreibung von Systemen im Bereich physiologischer Temperaturen herangezogen werden. Es ist ein linearer Anstieg der $\langle x^2 \rangle$ -Werte mit der Temperatur zu beobachten. Ein Vergleich mit den $\langle x^2 \rangle$ -Werten aus der Mößbauer-Spektroskopie unterhalb des dynamischen Übergangs bei der charakteristischen Temperatur T_C zeigt, dass die Bewegungen des Clusters gegen das Proteinrückgrat dominant sind. EXAFS ist sensitiv auf optische Phononen, die am Eisen-Schwefel-Cluster ankoppeln. Oberhalb T_C zeigt der Vergleich mit der Mößbauer-Spektroskopie, dass die proteinspezifische Dynamik nicht auf Schwingungen des Eisens gegen seine unmittelbaren Nachbarn beruht, sondern auf Bewegungen ganzer Molekülsegmente. EXAFS liefert einen eigenständigen Beitrag zum besseren Verständnis der proteinspezifischen Dynamik.

Die Struktur und Dynamik von teilweise entfaltetem reduziertem HiPIP *C. vinosum* wird durch temperaturabhängige EXAFS-Messungen charakterisiert. Während die Sekundärstruktur des Proteins bereits weitgehend aufgelöst ist, ist der Aufbau des Clusters im

molten globule-HiPIP intakt. Die Fe-Fe-Abstände und die Fe-S-Abstände sind auch im *molten globule*-HiPIP unabhängig von der Temperatur. Der prosthetischen Gruppe scheint eine Keimbildungsfunktion bei der Proteinfaltung und eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur zuzukommen. Hinsichtlich der Auslenkungsquadrate aufgrund harmonischer Festkörperschwingungen innerhalb des Clusters unterscheiden sich natives HiPIP und *molten globule* nicht.

Die Kupferbindung an das PHGGGWGQ-Segment aus der N-terminalen Domäne des menschlichen Prion-Proteins wurde mittels EXAFS untersucht. Durch Messungen in verschiedenen Lösungsmitteln konnten die DPC-Micellen als geeignete Membranimitation für das einfache Octa-Repeat Segment identifiziert werden. SDS-Micellen sind dazu nicht geeignet. Eine Lösung aus DPC-Micellen eignet sich jedoch nicht zur Untersuchung der kompletten Octa-Repeat Region in einer membranähnlichen Umgebung.

Aufbauend auf den EPR-, ENDOR- und ESEEM-Untersuchungen an einem PHGGGWGQ-Segment in NEM wurde durch Anpassung an das EXAFS-Spektrum ein "Minimal Modell" erstellt. Dabei konnte die Lage des Imidazolrings relativ zum Kupfer und die Abstände der nächsten Liganden bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Kompatibilität der Ergebnisse aus EXAFS und ENDOR am axialen Wasser und am H ϵ 1 des Imidazolrings gezeigt. Die aus EXAFS erhaltenen Parameter für das "Minimal Modell" sind bei einer Energieminimierung als Randbedingungen einsetzbar. Die aus der Energieminimierung erhaltenen Strukturen wurden durch eine Simulation des EXAFS-Spektrums auf ihre Plausibilität überprüft.

Mit XAS-Messungen wurde der N-terminale Kupferbindungsplatz des menschlichen Prion-Proteins (23-231) genauer charakterisiert. Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten zeigten, dass die Umgebung der an die Octa-Repeat Region bindenden Kupferatome identisch ist. An die Kupferatome sind jeweils zwei Imidazolringe gebunden. Die bindenden Kupferatome sind über die Imidazolringe miteinander verbrückt und bilden zusammen ein planares System. Die maximal mögliche Kupferanzahl pro Octa-Repeat Region beträgt vier. Die erhaltenen Ergebnisse konnten in das Modell der kooperativen Bindung der Kupferatome innerhalb der N-terminalen Domäne des menschlichen Prion-Proteins eingebaut werden.

1 Einleitung

Im Human-Genom-Projekt wurde die DNS-Sequenz des Menschen entschlüsselt. Bausteine der DNS sind die vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, die sich in Form von Nukleotiden zu DNS-Fäden aneinander reihen. Unterschiedliche Dreierabfolgen dieser Basen tragen die Information für verschiedene Aminosäuren eines Proteins, dessen Struktur somit in der DNS-Sequenz kodiert ist. Zwei Aminosäuren können sich unter Wasserabspaltung miteinander verbinden. Diese Bindungsform wird als Peptidbindung bezeichnet. Durch Peptidbindungen verknüpfte Aminosäuren bilden unverzweigte Polypeptidketten. Die elementare Untereinheit dieser Peptide sind in allen Spezies dieselben, nämlich die 20 Aminosäuren (vgl. Anhang A). Die Aminosäureketten werden von einer Abfolge der drei Atome N-C α -C, der sogenannten Rückgratome, gebildet. Die Aminosäurereste, die sich in Größe, Ladung und Hydrophobie unterscheiden, sind am C α -Atom gebunden. Proteine entstehen, indem typischerweise 100 bis 1000 Aminosäuren in immer anderer Reihenfolge miteinander verknüpft werden.

Als Primärstruktur bezeichnet man die Sequenz der Aminosäuren. Durch Reihenfolge und Anteil der verschiedenen Aminosäuren wird die räumliche Struktur bestimmt. Die Aminosäurekette ist nicht linear angeordnet, sondern faltet sich in eine energiearme Konformation. Es bilden sich Sekundärstrukturelemente wie α -Helizes oder β -Faltblätter. Die komplette dreidimensionale Struktur eines Proteins wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Die Anordnung mehrerer Untereinheiten, die jeweils einer Aminosäurekette entsprechen, wird als Quartärstruktur bezeichnet. Es ist bisher nicht möglich, aus der Primärsequenz die Tertiärstruktur der Proteine vorherzusagen. Daraus ist ersichtlich, dass mit der Bestimmung der DNS-Sequenz eines Genoms zwar ein nicht zu unterschätzender Schritt zum Verständnis der Abläufe in der Natur vollzogen ist, um jedoch die Struktur und Funktion von Proteinen im Detail zu entschlüsseln und zu verstehen, sind gesonderte Untersuchungen unumgänglich.

Proteine können aufgrund ihrer Vielfalt die unterschiedlichsten Aufgaben erfüllen. Ihr Aufgabenbereich reicht von der Katalyse chemischer Reaktionen bis hin zur Speicherung und zum Transport von Elektronen und kleineren Molekülen.

Bestimmend für die Struktur und damit für die Funktion des Proteins sind die Wasserstoffbrückenbindungen, die elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminosäuren, die

Van der Waals-Kräfte und die hydrophoben Wechselwirkungen der Seitenketten mit dem umgebenden Lösungsmittel.

In die Proteinmatrix können auch Metallzentren oder prosthetische Gruppen eingebunden sein, die dann in der Regel das Reaktionszentrum für die Funktion des Proteins bilden. Es können sich auch unterschiedliche Konformationen ergeben, zum Beispiel durch unterschiedliche bindende Liganden an den Metallatomen. Metalloproteine besitzen für den Experimentator den Vorteil, dass das Metall innerhalb des Proteins als Sonde zur Untersuchung der Struktur und Funktion des Proteins dienen kann.

Ein für die Biophysik wichtiges Modellprotein ist das Hämoglobin. Hämoglobin ist für den Sauerstofftransport im Blut zuständig. Mit Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Hämoglobins konnte gezeigt werden, dass aus dem erhaltenen Modell von Hämoglobin alle Wege des Sauerstoffmoleküls aus dem Lösungsmittel an das Eisen sterisch behindert sind (Perutz und Mathews 1966; Case und Karplus 1979). Das Sauerstoffmolekül findet nur dann einen Weg durch die Proteinmatrix, wenn die Proteinmatrix fluktuiert und sich dadurch ausreichend große Kanäle öffnen. Um die Funktion eines Proteins zu verstehen, ist also neben der Struktur auch das Verständnis der Proteindynamik von entscheidender Bedeutung.

Eine Methode zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Metalloproteinen ist die Röntgenabsorptionsspektroskopie. Schon 1920 wurden erstmalig die charakteristischen Absorptionsfrequenzen und die Struktur der Absorptionskante von verschiedenen Elementen beobachtet (Fricke 1920). 1931 wurde von Kronig das Auftreten einer ausgedehnten Feinstruktur in den K-Absorptionsbanden von Kristallen und Metallen im festen Zustand beobachtet (Kronig 1931). Ein Jahr später entwickelte Kronig eine Theorie für Röntgenabsorptionsspektren kleiner Moleküle (Kronig 1932). Aber erst die Verfügbarkeit von Synchrotronstrahlung ermöglichte den experimentellen Zugang. Die theoretischen Grundlagen zur Analyse der Absorptionskanten von Röntgenstrahlung in Materie wurden erst in den siebziger Jahren entwickelt (Sayers et al. 1971; Stern 1974; Ashley und Doniach 1975; Lee und Pendry 1975). In den letzten Jahren hat diese Methode auch immer mehr an Bedeutung innerhalb der Biophysik gewonnen.

Innerhalb dieser Arbeit soll an drei unterschiedlichen biologischen Systemen die Struktur und Dynamik der Metallumgebung im Protein mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie untersucht werden. Die Untersuchungen sollen am modifizierten Photosystem II, am Eisen-Schwefel-Cluster des High-Potential Iron Proteins aus *C. vinosum* und am N-terminalen Kupferbindungsplatz des menschlichen Prion-Proteins durchgeführt werden.

Die unter Bildung von Sauerstoff ablaufende Photosynthese ist die Grundlage allen tierischen Lebens. Sowohl die pflanzliche Biomasse als auch der Sauerstoff sind zur Energiegewinnung unerlässlich. Gerade im Bereich der Sauerstoffentwicklung sind aber noch einige Details ungeklärt. Sauerstoff entsteht durch die Spaltung von zwei Molekülen Wasser an einem Cluster aus vier Manganatomen. Seine genaue Lage im Photosystem II und seine Struktur sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Der Ablauf der Wasserspaltung ist ebenfalls nicht gänzlich geklärt. Auch eine Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 3.8 Å konnte die Struktur und die Lage des Mn-Clusters im Detail nicht aufklären (Zouni et al. 2001). So ist man auf biochemische und spektroskopische Untersuchungen angewiesen. Mittels der Röntgenabsorptionsspektroskopie wurden wertvolle Erkenntnisse über den Mn-Cluster gewonnen. Eine Methode, mit der sich vor allem Details in der elektronischen Struktur aufklären lassen, ist die Mößbauer-Spektroskopie. Dazu müssen die Manganatome jedoch durch Eisen ersetzt werden. Dass diese Möglichkeit des Austausches auch in der Natur Verwendung findet, zeigt das Beispiel einer kambialistischen Superoxiddismutase. Diese sind mit Mn oder Fe im aktiven Zentrum gleichermaßen katalytisch aktiv (Martin et al. 1986). Aufbauend auf den Ergebnissen der Mößbauer-Spektroskopie soll im ersten Teil dieser Arbeit der neu entstandene Fe-Cluster mittels der Röntgenabsorptionsspektroskopie genauer charakterisiert werden.

Die Methode zur Energiegewinnung aus Sonnenlicht wurde aber nicht etwa von Pflanzen entwickelt, sondern von grünen und purpurnen Bakterien. Die Photosynthese der phototropen Bakterien läuft heute wie damals noch anaerob ab. Dabei wird mit Hilfe von Licht aus Kohlendioxid und Schwefelwasserstoff der Zellstoff CH_2O und Wasser gebildet. Aus diesem Zellstoff bauen die Bakterien ihren Körper auf. Als Abfallprodukt entsteht elementarer Schwefel, den die meisten Purpurschwefelbakterien im Inneren anhäufen, so auch das Bakterium *Chromatium vinosum*. Ein wesentlicher Unterschied zur pflanzlichen Photosynthese besteht darin, dass nur ein Reaktionszentrum auftritt. Antennenpigmente im bakteriellen Reaktionszentrum absorbieren ein Lichtquant und setzen ein Chlorophyllelektron frei. Über eine Kette von Elektronentransferproteinen gelangt das Elektron auch zu einem High-Potential Iron Protein (HiPIP). Das Elektron gelangt zum Cytochrom bc_1 Oxidoreduktase-Komplex. Gleichzeitig entsteht zwischen beiden Seiten der Zellmembran ein Protonengradient. Mit diesem Protonengradienten wird die Synthese der universellen Energieeinheit Adenosintriphosphat (ATP) angetrieben. Die Einstellung des Redoxpotentials in der Proteinkette für den Elektronentransport ist dabei von entscheidender physiologischer Bedeutung. Wie die Einstellung des Redoxpotentials erfolgt, ist weitgehend ungeklärt.

Die Rolle der HiPIPs beim Elektronentransport während der bakteriellen Photosynthese ist ebenfalls unklar. HiPIPs haben eine Molekülmasse von etwa 10 kDa und bestehen aus etwa hundert Aminosäuren. Wichtige Eigenschaften der hier untersuchten HiPIPs sind in Tab. 1.1 dargestellt.

	natives HiPIP <i>C. vinosum</i>	HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S
E_0 [mV]	+355 ¹	+330 ²
M [Da]	8888 ³	8943 ⁴
Aminosäuren	85 ³	86 ⁴

Tab. 1.1 Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten HiPIPs. Quellen: ¹(Przywiecki et al. 1985), ²(Babini et al. 1996), ³(Bertini et al. 1995b), ⁴(Bentrop et al. 1996)

Alle HiPIPs enthalten einen verzerrten würfelförmigen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, der an das Proteinrückgrat über vier Cysteinreste ligandiert ist. Mit Hilfe der Gentechnik ist es möglich, ein organisches Schwefelatom des Metallzentrums durch ein Sauerstoffatom auszutauschen. Dadurch entsteht die stabile C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* (Babini et al. 1996). Durch Zugabe einer definierten Menge Guanidiniumchlorid ist man in der Lage eine teilweise entfaltete Konformation des reduzierten HiPIP *C. vinosum* zu erzeugen (Bertini et al. 1997). Trotz des sehr ähnlichen Aufbaus des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrums in verschiedenen HiPIPs ist die Spanne der Redoxpotentiale von +90mV bis +500 mV erheblich (Przywiecki et al. 1985; Capozzi et al. 1998). Der hohe Wert des Redoxpotentials im Vergleich zu den tierischen Ferredoxinen (-430mV bis -280 mV), welche auch ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum besitzen, verleiht ihnen die Bezeichnung *High-Potential* Iron Protein. Die große Bandbreite der Redoxpotentiale von $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentren ist nicht einmal im Ansatz verstanden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen die Eigenschaften des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrums im HiPIP *C. vinosum* mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie genauer untersucht werden. Mit Bestimmung des Debye-Waller Faktors aus temperaturabhängigen Röntgenabsorptionsspektren von Myoglobin und einem Vergleich mit den Ergebnissen aus der Mößbauer-Spektroskopie konnten Informationen über die Dynamik des Cofaktors des Myoglobins erlangt werden (Scherk et al. 2001). Ähnliche Untersuchungen sollen hier am $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster des HiPIP *C. vinosum* durchgeführt werden, welcher sich im Aufbau gänzlich vom Cofaktor des Myoglobins unterscheidet und aufgrund seines hohen Eisengehaltes zu berechtigter Hoffnung auf sehr gut aufgelöste Spektren Anlass gibt. Ein Vergleich der Struktur und Dynamik von nativem und teilweise entfaltetem reduziertem HiPIP *C. vinosum* soll einen Beitrag zum Verständnis der Proteinfaltung liefern. Durch die Punktmutation kann bei der

C77S-Mutante der Einfluss der Liganden auf die Struktur und Dynamik des Eisenzentrums untersucht werden.

Eine gänzlich andere Art von Proteinen stellt die Gruppe der Prion-Proteine dar. Prionen sind der Grund für neurodegenerative Erkrankungen. Eine der interessantesten neurodegenerativen Erkrankungen ist Kuru. Das Volk der steinzeitlich lebenden Fore, die im Hochland von Papua Neuginea zu Hause sind, verzehrte bis vor wenigen Jahrzehnten die Gehirne ihrer Stammesangehörigen. Dabei infizierten sie sich mit dem im Gehirn vorhandenen Kuru-Erreger, Prionen genannt. Den Kannibalismus hatte man in den 50er Jahren verboten, nicht wegen der Prionenkrankheit "Kuru". Der Erlass bewirkte eine Unterbrechung der Kuru-Übertragungswege. Heute ist wegen bestimmter Parallelen zu inzwischen aufgetretenen Prionenkrankheiten ein breites Interesse an Kuru erwacht. Beinahe jedem ist die neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit des Menschen (nvCJD) und der "Rinderwahnsinn" mit der wissenschaftlichen Bezeichnung Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) ein Begriff. Schon 1732 wurde die Scrapie (vom engl. to scrape; sich kratzen) oder Traberkrankheit (von franz. Tremblante; Muskelzittern) bei Schafen beschrieben. Das pathologische Hauptmerkmal aller Prionenkrankheiten ist die Bildung von "Löchern" im Gewebe, die insgesamt betrachtet an die löchrige Struktur eines Schwammes erinnern. Man spricht deshalb auch von einer spongiformen (spongiosus) Durchlöcherung. Die Krankheit hat immer einen tödlichen Ausgang. Es gibt derzeit weder Schutzimpfung noch Therapiemöglichkeiten.

Die ätiologische Vielfalt von Prionkrankheiten ist durch die außergewöhnliche Natur der Prionen bedingt. Dabei handelt es sich um Erreger, die von Viren, Bakterien, Protozoen oder Pilzen abzugrenzen sind, da sie keine oder keine nachweisbare Nukleinsäure aufweisen. Mit diversen nukleinsäureschädigenden Verfahren ließ sich die Infektiosität gereinigter Extrakte nicht verringern, wohl aber mit Substanzen, die Proteine abbauen oder die natürliche Faltung auflösen (Prusiner 1982). Proteine mußten ein essentieller Bestandteil des Agens sein. Es prägte sich der Begriff Prion als Abkürzung von "Protein-aceous infectious particle", wobei die genaue Abkürzung Proin zugunsten der leichteren Sprechweise in Prion geändert wurde. Das Gen konnte als erstes an Hamsterzellen isoliert werden, welches das Prion-Protein (PrP) codiert (Oesch et al. 1985). Es zeigte sich, dass das PrP-Gen die meiste Zeit aktiv ist (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986). Dies bedeutet, dass im Normalfall jeder tierische und menschliche Organismus Prion-Protein herstellt, ohne zu erkranken. Das PrP aus scrapie-infizierten Gehirnen ist sehr resistent gegenüber Protein-abbauenden Enzymen (Proteinasen). Es wurde auch die Proteinase-sensitive Form gefunden (Barry et al. 1986). Der wesentliche

Unterschied zwischen den normalen PrP (PrP^{C} , C für cellular = zellulär) und dem Scrapie-PrP (PrP^{Sc}) liegt in ihrer Form, also in der Art ihrer Konformation. Offenbar kann das PrP^{Sc} , wenn es mit PrP^{C} in Kontakt kommt, diese veranlassen, sich aus der gewöhnlichen in die Scrapie-Konformation umzufalten. Die umgefalteten PrP bringen dann ihrerseits normale PrP dazu, ihre Form zu ändern, wodurch sich die Scrapie-Konformation repliziert (Prusiner 1991). Die infektiöse Scrapie-Form entsteht, wenn sich ein großer Teil des Moleküls zu β -Strängen streckt (Cohen et al. 1994; Cohen und Prusiner 1998).

Die pathogenetische Bedeutung des Prion-Proteins für die Spongiformen Enzephalopathien ist gut dokumentiert. Jedoch ist die physiologische Funktion des PrP^{C} unbekannt. Bei Untersuchungen an generierten Prion-Protein-Knock-out-Mäusen ($\text{PrnP}^{0/0}$), die keine Prion-Proteine mehr besitzen, konnten keine Auffälligkeiten in ihrer Entwicklung oder ihrem Verhalten beobachtet werden (Büeler et al. 1993). Daraus ist aber nicht zu schließen, dass das Prion-Protein keine Aufgaben erfüllt. Der gleiche Effekt wurde auch an Myoglobin-Knock-out-Mäusen beobachtet. Die Muskeln der Mäuse zeigten bei Standarduntersuchungen normale Funktionswerte (Garry et al. 1998). Der Organismus scheint Ersatzmechanismen zu besitzen, trotz des Fehlens scheinbar lebenswichtiger Proteine zu überleben. Unterschiedliche Befunde deuten darauf hin, dass die kupferbindende Eigenschaft von PrP^{C} von zentraler funktioneller Bedeutung ist (Stöckel et al. 1998; Viles et al. 1999).

Der N-Terminus des Prion-Proteins weist eine hoch konservierte Oktapeptid-Repeatsequenz (PHGGGWGQ) x 4 auf (Schätzl et al. 1995). Dieser Region wird eine kupferbindende Eigenschaft zugeschrieben (Miura et al. 1995; Brown et al. 1997). Bei Erhöhung oder Erniedrigung der Zahl der Octa-Repeats durch zufällige Mutationen treten schon im frühen Lebensalter neurodegenerative Erkrankungen auf (Laplanche et al. 1995; Skworc et al. 1999; Capellari et al. 2002). Dies zeigt, dass die Octa-Repeat-Region eine Rolle bei der Bildung des PrP^{Sc} beim Menschen spielen könnte.

Der Kupferbindungsplatz in der Octa-Repeat Region ist im dritten Teil dieser Arbeit das Untersuchungsobjekt. Dabei wird von zwei Seiten versucht, diesen Kupferbindungsplatz zu untersuchen. Mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie soll zum einen die Umgebung des bindenden Kupfers innerhalb eines Oktapeptides PHGGGWGQ in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht werden. Zum anderen wird der Kupferbindungsplatz des rekombinant hergestellten menschlichen PrP(23-231) mit vollständiger Octa-Repeat Sequenz untersucht.

2 Experimentelle Methoden und ihre theoretischen Grundlagen

2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Bei der Absorption eines Photons mit geeigneter Energie durch ein Atom ist es möglich, ein Elektron aus einer der Schalen in das Kontinuum anzuheben. Bei dieser Energie tritt eine sogenannte Absorptionskante auf. Entsprechend dem Aufbau der Atomhülle existiert für jede Elektronenschale ein solcher Übergang. Die energetisch höchste Kante entspricht dem Übergang eines Elektrons aus der K-Schale in das Kontinuum.

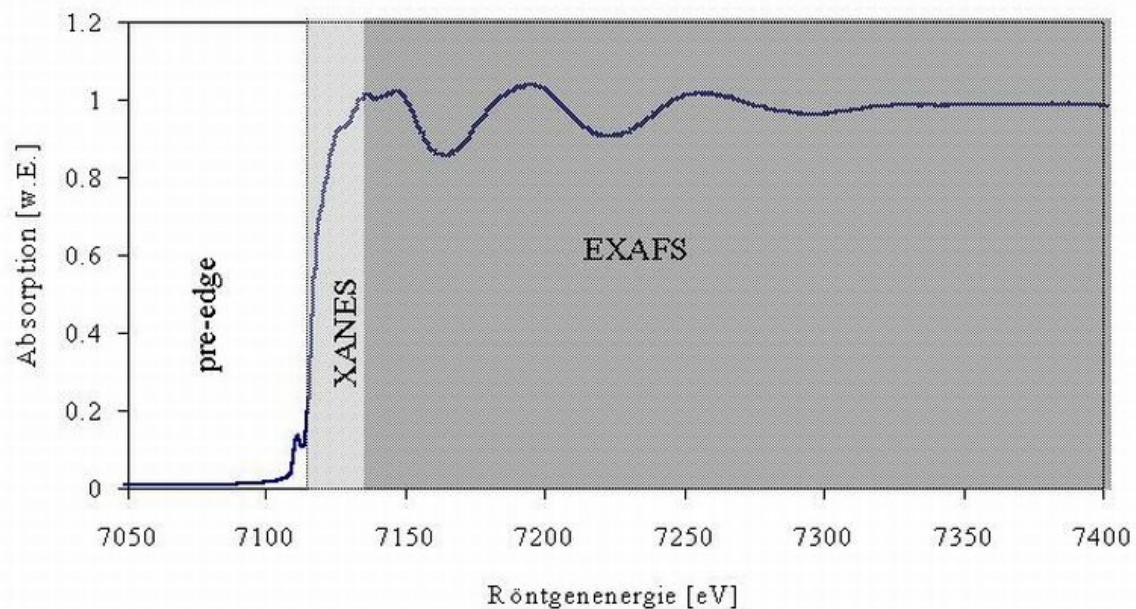


Abb. 2.1 Struktur von Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der Fe-K-Kante, in Fluoreszenz gemessen.

In Abb. 2.1 ist eine Absorptionskante im Energiebereich der Anregung eines 1s-Elektrons des Eisens ins Kontinuum dargestellt. Dabei kann das Spektrum in drei Teile unterteilt werden:

- den Vorkantenbereich ("pre-edge" Region)
- die Region mit einem sprunghaften Anstieg der Absorption, die sog. Absorptionskante (XANES, X-ray absorption near edge structure)
- den Bereich etwa 50eV oberhalb der Kante, der oszillatorisches Verhalten zeigt (EXAFS, extended X-ray absorption fine structure).

Im Vorkantenbereich ist die Energie der Röntgenstrahlung zu gering, um ein Elektron des Absorbers anzuregen. Es wird ein strukturloser Absorptionsuntergrund beobachtet. Es können jedoch Peaks in der Vorkantenregion beobachtet werden, wenn die Röntgenenergie dem Übergang zwischen gebundenen elektronischen Zuständen entspricht. Dieses Maximum tritt ausnahmslos im Spektrum von Übergangsmetallen auf, welche noch unbesetzte 3d Schalen besitzen. Daher kann bei der Zn-K-Kante kein "pre-edge" Peak beobachtet werden. Aufgrund der Dipolauswahlregeln ($\Delta l = \pm 1$) ist dieser Übergang eigentlich verboten. Je nach Symmetrie der Koordinationsumgebung kann es zu einer mehr oder weniger starken Mischung von Anteilen der p- und d-Wellenfunktion kommen, so dass die Übergangswahrscheinlichkeit von null verschieden ist (Westre et al. 1997).

Reicht die Röntgenenergie aus, um ein 1s-Elektron aus der K-Schale ins Kontinuum zu heben, erscheint im Spektrum die Absorptionskante, ein sprunghafter Anstieg der Absorption. Die Absorptionskante ist im Allgemeinen nicht strukturlos. Sie kann Schultern oder auch ein sehr spitzes Absorptionsmaximum (sog. "white line") aufweisen. Der XANES-Bereich wird entscheidend von Mehrfachstreuprozessen beeinflusst. Für die korrekte Berechnung von Mehrfachstreuung eines ganzen Systems ist die exakte dreidimensionale Struktur des untersuchten Systems Voraussetzung (Ankudinov et al. 1998). Jedoch kann die Form der Kante als Hinweis dienen, wieviel und welche Liganden das Metallatom besitzt und in welchem Oxidationszustand es sich befindet (Kau et al. 1987).

Bei noch größeren Röntgenenergien (ca. 50 - 1000 eV oberhalb der Kante) nimmt die Absorptionswahrscheinlichkeit langsam ab. Der ausgedehnte Bereich oberhalb der Kante zeigt oszillatorisches Verhalten. Für diesen Bereich des Spektrums verwendet man den Begriff EXAFS. Werden sowohl EXAFS als auch XANES Bereich gleichzeitig betrachtet so spricht man von XAFS (X-ray absorption fine structure).

2.1.1 Absorption eines Photons

Wenn ein Röntgenstrahl Materie durchläuft, treten verschiedene Prozesse auf, die miteinander konkurrieren und stark energieabhängig sind. Die Streuamplitude setzt sich aus einem Real- und einem Imaginär-Teil zusammen.

$$f = f_0 + (f' + if'') \quad (2.1)$$

Die Streuamplitude f enthält den elastischen Term der Rayleighstreuung f_0 . Der zweite Teil $f' + if''$ beschreibt die anormale Dispersion. Durch die anormale Dispersion wird die Wechselwirkung von Photonen mit Materie in der Nähe einer Absorptionskante beschrieben. Darunter fällt die Absorption eines Photons und die anschließende Reemission, die Comptonstreuung oder die Absorption eines Photons und die Emission eines Elektrons. Letzterer Beitrag bildet die Grundlage der Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS, X-ray absorption spectroscopy).

Die Absorption spiegelt sich im imaginären Anteil der Streuamplitude wider. Dies hat eine Dämpfung der Röntgenstrahlung zur Folge. Für den Streuquerschnitt der Absorption σ gilt nach dem optischen Theorem (Schwabl 1998):

$$\sigma = \frac{4\pi}{k} \text{Im} f \quad (2.2)$$

Es ist möglich, aus dem Intensitätsverlust der transmittierten Strahlung die Gesamtzahl der gestreuten bzw. absorbierten Teilchen zu bestimmen. Der Vektor \vec{k} beschreibt die einfallende Strahlung. Laut dem Lambert-Beer'schen Gesetz fällt die Intensität proportional zu $e^{-\mu x}$ ab, wobei x die Eindringtiefe darstellt und μ der Röntgenabsorptionskoeffizient ist. Den Zusammenhang zwischen μ und σ beschreibt Gleichung (2.3).

$$\mu = n \sigma \quad (2.3)$$

Hier ist n die Anzahl der Absorber pro Volumen.

Der elektronische Endzustand ergibt sich aus der Summe der ein- und auslaufenden Wellen. Abb. 2.2 soll dies verdeutlichen. In einer klassischen Betrachtung muss die Elektronenwelle zwischen den Atomen eine "stehende Welle" ausbilden. Quantenmechanisch betrachtet ist EXAFS ein Resonanzeffekt in der umgebenden Potentiallandschaft. Dabei geht das Photoelektron in einen gebundenen Zustand des Systems über, welches aus mehreren Atomen besteht.

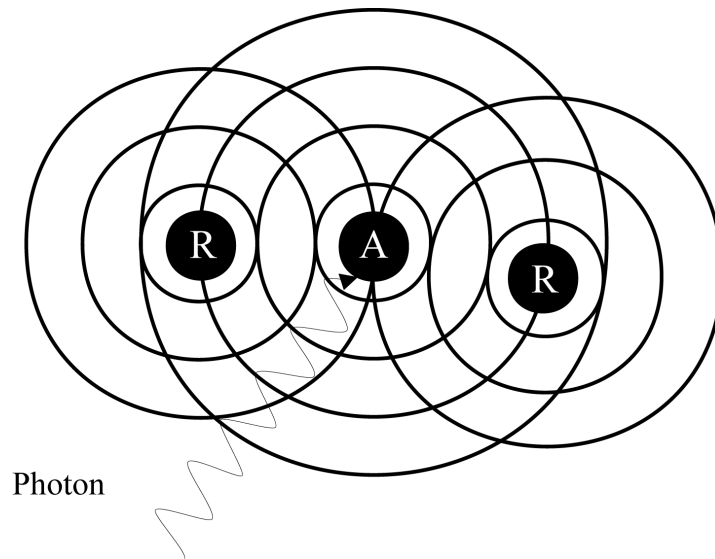


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Interferenz zwischen ein- und auslaufender Wellenfunktion

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Röntgen-Quant von einem gebundenen Elektron absorbiert wird, hängt sowohl vom Anfangs- als auch vom Endzustand des Elektrons ab. Dieser Sachverhalt wird durch Fermis Goldene Regel beschrieben (Nolting 1994). Der Absorptionsquerschnitt $\mu(E)$ ist proportional zur Übergangswahrscheinlichkeit eines Elektrons aus einem Anfangszustand $|a\rangle$ in einen Endzustand $|e\rangle$. Dieser Übergang wird in der Ein-Elektron-Approximation in zweiter Ordnung Störungstheorie durch das Quadrat des Dipolmatrixelements beschrieben (Teo 1986; Gasiorowicz 1987). Dies ergibt $\mu(E)$, den linearen Röntgenabsorptionskoeffizienten.

$$\mu(E) = \frac{4}{3} \pi^2 \alpha \hbar \omega \sum_{|e\rangle} |\langle e | e \vec{\epsilon} \vec{r} | a \rangle|^2 \delta(E_a + \hbar\omega - E_e) \propto$$

$$|\langle e | e \vec{\epsilon} \vec{r} | a \rangle|^2 D_e(\hbar\omega) \quad (2.4)$$

Dabei entspricht der Anfangszustand $|a\rangle$ dem gebundenen Elektron und der Endzustand $|e\rangle$ dem freien Elektron mit Energie E_e im Potential der Nachbaratome. Der elektrische Dipolübergang wird über den Wechselwirkungsoperator $e \vec{\epsilon} \vec{r}$ beschrieben. Mit \vec{r} wird der Ortsoperator bezeichnet, mit $\vec{\epsilon}$ der Einheitspolarisationsvektor des elektromagnetischen Feldes mit der Energie $\hbar\omega$. Die Elementarladung wird mit e bezeichnet. α ist die Feinstrukturkonstante. Der Absorptionskoeffizient μ ist direkt proportional zur Zustandsdichte $D_e(\hbar\omega)$ bei der Energie des Endzustandes $|e\rangle$. Für ein freies Atom ändert

sich die Absorption oberhalb der Kante im Vergleich zur normalen Streuung nicht. Im Falle von Molekülen, insbesondere auch von Metallo-Proteinen, ändert sich dieses Verhalten jedoch. Die Größe, die sich im Vergleich zum freien Atom ändert, ist nach Gleichung (2.4) die Zustandsdichte.

2.1.2 Theorie der Einfachstreuung

Das Photoelektron läuft vom Absorber als sphärische Welle $|o\rangle$ aus und wird am Ort \vec{R}_j des Nachbaratoms j als ebene Welle $\frac{i}{2}e^{i\vec{k}\vec{r}}$ genähert. Diese Vereinfachung wird als "plane wave approximation" bezeichnet. Für die Beschreibung wird die Position des Absorbers als Nullpunkt festgelegt. Bei der Streuung wird eine sekundäre Kugelwelle $f_j(\beta_j, k) \frac{e^{i\vec{k}(\vec{R}-\vec{R}_j)}}{|\vec{R}-\vec{R}_j|}$ mit einer Rückstreuamplitude $f_j(\beta_j, k)$ erzeugt, die jetzt vom Atom j ausläuft. Hier ist β_j der Winkel zwischen \vec{R}_j und der Ausbreitungsrichtung \vec{k} nach der Streuung. Bei Einfachstreuungsprozessen werden nur Wege vom Absorber zum Rückstreuer und vom Rückstreuer direkt zum Absorber zurück betrachtet. Dabei gilt also $\beta = \pi$.

Die Wellenfunktion des Endzustandes ergibt sich somit als die Summe der auslaufenden Welle plus alle einlaufenden bzw. zurückgestreuten Wellen

$$|e\rangle = |o\rangle + \sum_j \frac{ie^{ikR_j + i\delta}}{2kR_j} |f_j(\pi, k)| \frac{e^{ik|\vec{R}-\vec{R}_j|}}{|\vec{R}-\vec{R}_j|} \text{ für } R > R_0 \quad (2.5)$$

Hierbei ist R_0 der Radius des Absorberatoms und δ die Phasenverschiebung durch das Absorberatom. Die Aufsummierung erfolgt über alle benachbarten Atome j . Für die weitere Berechnung des Absorptionskoeffizienten muss jedoch $|e\rangle$ in der Nähe des Ursprungs betrachtet werden ($|\vec{R}| \approx 0$). Man kann die einfallende sphärische Welle am Ursprung als ebene Welle nähern. Danach wird die ebene Welle in Terme von sphärischen Wellen entwickelt und innerhalb R_0 fortgeführt.

$$|e\rangle = \left[1 + \sum_j \frac{ie^{i2kR_j + i2\delta}}{2kR_j^2} |f_j(\pi, k)| \right] |o\rangle \quad \text{für } R < R_0 \quad (2.6)$$

Das Photoelektron erfährt eine totale Phasenverschiebung um $(2kR_j + 2\delta)$ im Rückstreuprozess, weil es den Abstand R_j zweimal durchläuft und dabei zweimal die Phasenverschiebung durch das Zentralatom erfährt. Der Absorptionskoeffizient wird dann zu:

$$\mu(k) \propto \left| \langle e | \vec{r} | a \rangle \right|^2 \propto \left| \langle o | \vec{r} | a \rangle \right|^2 \left[1 + \sum_j \frac{ie^{i2kR_j + i2\delta}}{2kR_j^2} |f_j(\pi, k)| + \text{c.c.} \right] \quad (2.7)$$

Nimmt man an, dass die Welle des zurückgestreuten Photoelektrons hinreichend schwach ist, so können die quadratischen Terme aufgrund der Aufsummierung in der Klammer vernachlässigt werden. Der normalisierte oszillatorische Teil der Absorption ist dann:

$$\chi = \frac{\mu - \mu_0}{\mu_0} = - \sum_j \frac{1}{kR_j^2} \text{Im} \left[e^{i2kR_j + i2\delta} f_j(\pi, k) \right] \quad (2.8)$$

Hier ist μ_0 die Absorption eines freien Atoms. Bei einem freien Atom treten keine zurückgestreuten Wellenfunktionen auf. Diese Normierung erlaubt es, schwer oder nicht zu berechnende Komponenten abzukoppeln. Darunter fallen zum Beispiel auch die tatsächlichen Wellenfunktionen. Die komplexe Streuamplitude wird durch ihren Betrag und die Phasenverschiebung Φ_j dargestellt. Wird $f_j(\pi, k)$ durch $-|f_j(k)|e^{i\Phi_j}$ ersetzt (Minuszeichen wegen Streuung um π), erhält man die bekannte EXAFS-Formel für einfache Streuprozesse.

$$\chi(k) = \sum_j \frac{|f_j(k)|}{kR_j^2} \sin(\Phi_j + 2\delta_L + 2kR_j) \quad (2.9)$$

Die Feinstruktur stammt aus der Interferenz der auslaufenden Elektronenwelle mit von umliegenden Atomen zurückgestreuten Wellen. Sie kann im k -Raum durch eine Sinusfunktion beschrieben werden. Die Sinusfunktion hängt hauptsächlich vom doppelten Abstand der rückstreuenden Atome j ab. Zusätzlich wird das Argument des Sinus durch Phasenverschiebungen beeinflusst, die das Elektron beim Durchlaufen der Atompotentiale erfährt. Aus dem Argument des Sinus sind nun strukturelle Details der Umgebung des absorbierenden Atoms extrahierbar. Es wird aber auch deutlich, dass die Strukturinformation

immer mit Phasenverschiebungen überlagert ist. Somit ist es unumgänglich, die Phasenfunktionen mit ausreichender Genauigkeit zu bestimmen. Die Amplitude enthält ebenso nützliche Informationen. Darunter fallen die Anzahl der koordinierenden Atome, ihre Dynamik (vgl. Kapitel 2.1.3) und ihre Rückstreuamplitude. Die Atomart spiegelt sich in der Rückstreuamplitude wider. Ebenso wie für das Argument des Sinus gilt für die Amplitude, dass mehrere Effekte überlagert sind, die beim späteren Auswerten der Spektren so gut wie möglich getrennt werden müssen.

Die Herleitung von Gleichung (2.9) gilt als erster Ansatz zur Beschreibung von EXAFS-Spektren. Diese enthält einige nicht korrekte Näherungen. Zum einen werden die auslaufenden Kugelwellen nicht als Kugelwellen behandelt und zum anderen die Wellenfunktion am Absorberatom beim Wiedereinlaufen nicht exakt beschrieben. Eine Weiterentwicklung wird damit erreicht, dass die Elektronenwelle exakt beschrieben wird, die sogenannte "Curved Wave Theorie" (vgl. Kapitel 2.1.5).

2.1.3 Der Debye-Waller Faktor

Der XAFS Debye-Waller Faktor beruht auf der natürlichen Fluktuation von interatomaren Abständen. Da die Atome um ihre Gleichgewichtslage schwingen, beeinflussen sie nur leicht das Interferenzbild für einen bestimmten Streuweg. Dies führt dazu, dass Details der XAFS-Amplitude bei höheren k verschmiert sind (kürzere Wellenlänge). Der XAS Debye-Waller Faktor fügt einen exponentiell gedämpften Faktor zur XAFS-Amplitude hinzu (Crozier et al. 1988). Dieser Faktor ist stark für den exponentiellen Abfall des EXAFS-Spektrums bei größer werdenden Energien (bzw. k) und für seine Temperaturabhängigkeit verantwortlich. Seine immense Bedeutung für die quantitative XAFS Theorie wurde erstmals von Schmidt 1961 erkannt (Schmidt 1961, 1963). Sie ist ein wichtiger Teil in den modernen XAFS Gleichungen (Sayers et al. 1971).

Für ungeordnete Systeme ersetzt man die Summation in Gleichung (2.9) durch eine Integration über eine Korrelationsfunktion $g(r)$ (Daly und Penner-Hahn 1998).

$$\chi(k) = \int_0^{\infty} g(r) \frac{|f_j(k)|}{kr^2} \sin(\Phi_j + 2\delta_L + 2kr) dr \quad (2.10)$$

Für kristalline Systeme hätte $g(R)$ die Form von einer bzw. mehreren Deltafunktionen. Für den Fall kleiner Unordnung kann die EXAFS Gleichung vereinfacht werden (Beni und

Platzmann 1976). Die Paarverteilungsfunktion kann mit einer Gauß-Verteilung genähert werden (Daly und Penner-Hahn 1998).

$$g(r) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-(r-R_j)^2/2\sigma^2} \quad (2.11)$$

wobei $\sqrt{2\sigma^2}$ die e^{-1} -Breite der Verteilung ist. Dabei ist das σ^2 im Debye-Waller Faktor ein relatives mittleres Auslenkungsquadrat. Es handelt sich also um die Variation des Abstandes von Rückstreu- zu Zentralatom. Eingesetzt in Gleichung (2.10), erhält man die Funktion:

$$\chi(k) = \sum_j \frac{|f_j(k)|}{kR_j^2} e^{-2k^2\sigma_j^2} \sin(\Phi_j + 2\delta_L + 2kR_j) \quad (2.12)$$

In der Röntgenabsorptionsspektroskopie setzt sich die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle^{\text{XAS}}$ zusammen aus einer statischen $\langle x^2 \rangle_c$ und einer dynamischen, thermischen Komponente $\langle x^2 \rangle_v$ (Teo 1986; Meyer 1996). In der Auswertung der XAS Experimente wird folgende Abkürzung eingeführt.

$$\langle x^2 \rangle^{\text{XAS}} = A/2 = \sigma^2 \quad (2.13)$$

A und σ sind die in der XAS gewöhnlich benützten Parameter (Beni und Platzmann 1976; Gurman et al. 1984, 1986; Gurman 1988; Binsted et al. 1992; Scherk et al. 2001).

2.1.4 Die XAS-Einfachstreuformel

In Gleichung (2.12) sind keine inelastischen Prozesse berücksichtigt. Diese haben aber Einfluss auf die Amplitude in Gleichung (2.12). Diese Verluste werden entweder durch das Zentralatom oder die Umgebung verursacht. Man spricht auch von intrinsischen oder extrinsischen Prozessen. Ein intrinsischer Effekt wird hervorgerufen, falls durch die Anregung eines Elektrons in der Elektronenhülle das Potential des Zentralatoms eine Störung erfährt. Dies kann dazu führen, dass weitere Elektronen in andere Schalen ("shake up") oder ebenfalls in das Kontinuum ("shake off") gehoben werden. Das primäre Photoelektron gibt dabei Energie ab und trägt nicht zur Feinstruktur bei. Diesem Sachverhalt wird bei der Datenauswertung mit einem energieunabhängigen und elementspezifischen Faktor A_{fak} Rechnung getragen. Dieser liegt zwischen 0.6 und 0.99 (Carlson et al. 1968; Stern et al. 1980;

Teo 1986). Die geringe k -Abhängigkeit wird dabei vernachlässigt. Für Eisen beträgt der Wert 0.69 und für Kupfer 0.70. Die extrinsischen Verluste werden durch inelastische Streuung des Photoelektrons hervorgerufen. Darunter fallen z.B. die Anregung von Plasmonen. Sie werden phänomenologisch durch einen Dämpfungsfaktor $e^{-2R_j/\lambda(k)}$ für jeden Streubeitrag bestimmt. $\lambda(k)$ ist dabei die energieabhängige mittlere freie Weglänge des Photoelektrons (Teo 1986). Diese Verluste lassen sich auch durch einen imaginären Anteil am Potential zwischen den Atomen beschreiben (Lee und Beni 1977). Die Berücksichtigung dieser Sachverhalte führt zu folgender Gleichung, die sog. **XAS-Einfachstreuformel**:

$$\chi(k) = \sum_j^{\text{alle Atome}} A_{\text{fak}} e^{-2R_j/\lambda(k)} \frac{|f_j(k)|}{kR_j^2} e^{-2\sigma_j^2 k^2} \sin(\Phi_j + 2\delta_L + 2kR_j) \quad (2.14)$$

Die lineare Polarisation der einfallenden Strahlung wurde in dieser Gleichung nicht berücksichtigt. Sie würde einen zusätzlichen Faktor $3\cos^2\Theta_j$ ergeben. Θ_j ist dabei der Winkel zwischen der Bindung i des Zentralatoms und der Polarisationsrichtung der einfallenden Strahlung (Stern 1988). Für eine ungeordnete Probe wird der Faktor jedoch durch die Mittelung über Θ_j in drei Dimensionen zu 1.

2.1.5 Beschreibung der Mehrfachstreuung

Bisher wurden nur direkte Rückstreubeiträge von einzelnen Atomen berücksichtigt. Einen wichtigen Anteil an der beobachteten Feinstruktur haben aber Mehrfachstreuungen über zwei oder mehr Nachbaratome (Strange et al. 1987; Binsted et al. 1992).

Experimentell bestimmt man den Röntgenabsorptionskoeffizient μ_a . Seine Abhängigkeit von σ ist nach Gleichung (2.3) gegeben. Mit Gleichung (2.4), Einführung der Green'schen Operatoren G und der Matrix T_{aa} folgt (Fonda 1992):

$$\sigma_a \propto \sum_{m_j} \text{Im} \langle a | \vec{\epsilon} \vec{r} [G_a + G_a T_{aa} G_a] \vec{\epsilon} \vec{r} | a \rangle \quad (2.15)$$

$$G = 1/(E + i\epsilon - H_e), \quad (2.16)$$

wobei E die Gesamtenergie vor der Absorption und H_e der elektronisch effektive Einteilchen Hamiltonoperator ist.

Mit Gleichung (2.15) kann unter Vernachlässigung der spinabhängigen Wechselwirkungen und inelastischen Streuprozessen (vgl. Kap. 2.1.3) der Absorptionswirkungsquerschnitt vollständig beschrieben werden (Fonda 1992; Ankudinov et al. 1998; Rehr und Albers 2000). T_{aa} kann man für eine ausreichend große Photoelektronen-Energie in Mehrfachstreuterme entwickeln (Fonda 1992):

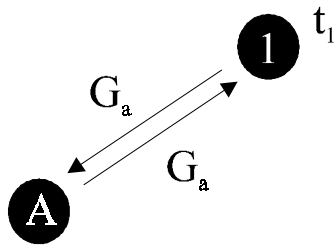
$$T_{aa} = \sum_{n \neq a} t_n + \sum_{n \neq a} t_n G_0 \sum_{\substack{m \neq n \\ m \neq a}} t_m + \sum_{n \neq a} t_n G_0 \sum_{m \neq n} t_m G_0 \sum_{\substack{k \neq m \\ k \neq a}} t_k + \dots \quad (2.17)$$

Betrachtet man den Beitrag von Gleichung (2.17) in Gleichung (2.15) so wird die physikalische Bedeutung der Green'schen Operatoren und der T-Matrizen t_n klar.

Mit Hilfe von Abb. 2.3 kann der Verlauf eines kompletten Streuvorganges wie folgt beschrieben werden:

Das Photoelektron gelangt vom Absorberatom A zum ersten Atom (G_a), wo es gestreut wird (t_1). Danach zu einem weiteren Atom über den "freien Raum" (G_0), wo es erneut gestreut wird (t_2) usw. Das Photoelektron kehrt dann nach n Streuvorgängen am n -ten Atom wieder zum Absorberatom A zurück (t_n und G_a). Die Green'schen Operatoren bezeichnet man auch als Propagatoren, welche die Ausbreitung des Photoelektrons vom Absorber weg bzw. zum Absorber hin (im Potential U_a) und die Ausbreitung im konstanten Potential zwischen den Streuatomen beschreiben. Mit den Streu-T-Matrizen wird die Streuung des Photoelektrons an den Potentialen U_n der Streuatome beschrieben. Dabei sollte beachtet werden, dass das Zentralatom in einem beliebigen Zwischenschritt auch als Streuatom auftreten kann.

(A)



(B)

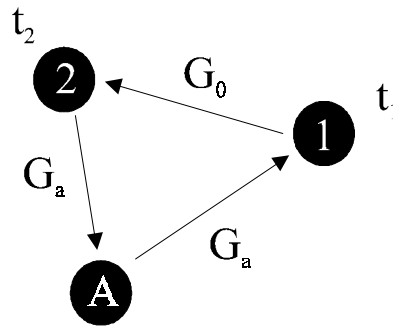


Abb. 2.3 Graphische Darstellung der Mehrfachstreuung. A: Absorberatom, 1-2: Streuatome. (A) Einfachstreuung; (B) Zweifachstreuung.

Die Matrix T_{aa} lässt sich demnach durch eine Summe ersetzen:

$$T_{aa} = \sum_{s=2}^{\infty} T_{aa}^{(s)} \quad (2.18)$$

wobei $T_{aa}^{(s)}$ der Beitrag von einem Streuvorgang auf einem geschlossenen Streuweg vom Absorber zum Absorber zurück mit $s-1$ Streuvorgängen ist.

Es ist möglich, den Absorptionswirkungsquerschnitt σ_a von Gleichung (2.15) auszuwerten (Fonda 1992). Die Ableitung führt auf die sog. Mehrfachstrefunktion $\chi_{L,L'}$, auf die der Absorptionswirkungsquerschnitt σ_a zurückgeführt wird:

$$\chi_{L,L'} = i\delta_{LL'} + \frac{2m}{\hbar^2} k e^{2i\delta_l^{(A)}} \times \int d^3r' d^3r'' Y_L^*(\vec{r}') h_l^{(+)}(kr') \langle \vec{r}' | T_{aa} | \vec{r}'' \rangle_a h_{l'}^{(+)}(kr'') Y_{L'}(\vec{r}''), \quad (2.19)$$

Dabei sind L bzw L' die Drehimpulsquantenzahlen (l,m) , Y_L die Kugelflächenfunktionen, $h_l^{(+)}$ die sphärischen Hankelfunktionen, $\delta_{LL'}$ das Kroneckersymbol und $\delta_l^{(A)}$ die vom Zentralatom verursachte Phasenverschiebung. Der erste Term in Gleichung (2.19) beschreibt den Absorptionswirkungsquerschnitt $\sigma_a^{(A)}$ des isolierten Atoms A. Mit Gleichung (2.18) folgt:

$$\chi_{L,L'} = i\delta_{LL'} + \sum_{s=2}^{\infty} \chi_{L,L'}^{(s)} \quad (2.20)$$

Die Summe in Gleichung (2.20) beinhaltet alle Beiträge durch Mehrfachstreuung in der Umgebung von Atom A.

Es besteht für statistisch orientierte Proben und Absorption in der K-Schale zwischen der Feinstruktur und der Mehrfachstreuung ein einfacher Zusammenhang der Form

$$\chi \equiv \frac{\bar{\mu}_c - \bar{\mu}_c^{(A)}}{\bar{\mu}_c^{(A)}} = \frac{1}{3} \sum \text{Im} \chi_{LL'} - 1, \quad (2.21)$$

wobei $\bar{\mu}_c^{(A)}$ der Absorptionskoeffizient des isolierten Atoms A ist. Die Balken bedeuten eine Mittelung über alle Orientierungen.

Gleichung (2.21) repräsentiert somit die auf Mehrfachstreuterme zurückgeführte und auf den Absorptionsuntergrund normierte Feinstruktur im EXAFS Spektrum. Werden nur Einfachstreuereprozesse berücksichtigt, reduziert sich Gleichung (2.21) auf Gleichung (2.9).

Der Debye-Waller Faktor ist bei Berücksichtigung der Mehrfachstreuung gesondert zu behandeln. Sei nun \bar{u}_i die Auslenkung aus der Gleichgewichtslage eines Ions am Platz i, dann kann unter Vernachlässigung von quadratischen Termen die effektive Streulänge eines Streuweges j mit n_j Streufäden bestimmt werden zu (Poiarkova und Rehr 1999):

$$r_j \equiv R_j + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n_j} (\bar{u}_i - \bar{u}_{i+}) \cdot \hat{R}_{ii+} \quad (2.22)$$

Hier ist $i+ \equiv i+1$, $i = n_j + 1$ bezogen auf Position $i=1$, $R_j = (1/2) \sum_i R_{ii+}$ ist der effektive gemittelte Streuweg, wobei R_{ii+} der gemittelte Abstand zwischen zwei Atomen i und i+1 ist, und \hat{R}_{ii+} der dazugehörige normierte Verbindungsvektor. Mit Hilfe der Born-Oppenheimer Näherung kann die Bewegung eines Ions als stationär während eines Überganges betrachtet werden. Für jeden harmonischen Hamiltonian bekommt man das exakte Ergebnis (Maradudin et al. 1971).

$$\left\langle \exp \left(i 2k \sum_i (\bar{u}_i - \bar{u}_{i+}) \cdot \hat{R}_{ii+} \right) \right\rangle = e^{-2k^2 \sigma_j^2}, \quad (2.23)$$

wobei σ_j^2 für die mittlere quadratische Fluktuation in der effektiven Streulänge R_j steht (Poiarkova und Rehr 1999):

$$\sigma_j^2 = \frac{1}{4} \left\langle \left[\sum_{i=1}^{n_j} (\bar{u}_i - \bar{u}_{i+}) \cdot \hat{R}_{ii+} \right]^2 \right\rangle \quad (2.24)$$

Als Beispiel sei hier noch der Fall für die Einfachstreuung zwischen zwei Atomen an der Position $\bar{0}$ und \bar{R} angeführt:

$$\sigma_R^2 = \left\langle [(\bar{u}_R - \bar{u}_0) \cdot \hat{R}]^2 \right\rangle = \left\langle (\bar{u}_R \cdot \hat{R})^2 \right\rangle + \left\langle (\bar{u}_0 \cdot \hat{R})^2 \right\rangle - 2 \left\langle (\bar{u}_R \cdot \hat{R})(\bar{u}_0 \cdot \hat{R}) \right\rangle, \quad (2.25)$$

Die relative mittlere quadratische Auslenkung ist demzufolge eine Projektion der Auslenkung \bar{u} von Zentral- und Rückstreuatom auf den normierten Verbindungsvektor \hat{R}_{ii+} , reduziert um eine Auslenkungs-Korrelations-Funktion (Beni und Platzmann 1976; Sevillano et al. 1979; Scherk 1998).

2.1.6 EXAFS-Datenanalyse

Die EXAFS-Datenanalyse erfolgt mit dem Programm EXCURV92 und EXCURV98 des Daresbury Laboratory, England (Binsted et al. 1992). Mit diesem Programm müssen als erstes für die im Modell verwendeten Atome Potentiale bzw. Ladungsdichten ermittelt werden. Dazu bedient man sich der Einelektron-Approximation der atomaren Ladungsdichten in der Präsenz eines Loches in der K-Schale (Teo 1986) und verwendet dabei die Grundzustandsaustauschenergie (von Barth und Hedin 1972). Im Rahmen der "muffin-tin" Näherung werden die atomaren Potentiale zu einem Gesamtpotential zusammengefasst. Der Einfluss der Potentiale auf die Wellenfunktion des Photoelektrons macht sich als Phasenverschiebung bemerkbar (Nolting 1994). Mit den zuvor bestimmten Potentialen lassen sich die Phasenverschiebungen durch Lösen der Schrödinger- bzw. Dirac-Gleichung für alle im Modell vorkommenden Atome berechnen. Aus einem Modell kann nun eine theoretische EXAFS-Funktion berechnet werden. Die Parameter (vgl. Gleichung (2.14)) können in einem Verfahren zur Minimierung der mittleren quadratischen Abweichung dem experimentellen Spektrum angepasst werden. Als Maß für die Güte der Anpassung dient der sogenannte R-Faktor:

$$R = \sum_{i=1}^N (1/\gamma_i) \left| \chi^{\text{exp}}(k_i) - \chi^{\text{calc}}(k_i) \right| \times 100\% , \quad (2.26)$$

$$1/\gamma_i = k_i^n / \sum_{j=1}^N k_j^n \left| \chi^{\text{exp}}(k_j) \right| ,$$

N ist die Anzahl der Datenpunkte, exp/calc bedeutet experimentell/berechnet und $n \in \{1,2,3\}$ bei einer k^n -Gewichtung. Dabei können folgende strukturellen Parameter in der Anpassung optimiert werden: der Abstand R des Rückstreuers, die Koordinationszahl N und der A-Faktor $2\sigma^2$.

In der Röntgenabsorptionsspektroskopie hat es sich durchgesetzt, die EXAFS-Spektren im k -Raum zu analysieren. Die Transformation vom Energie-Raum in den k -Raum erfolgt durch folgende Gleichung:

$$k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2}(E - E_0)} = \sqrt{0.2625(E - E_{\text{Ref}} - E_f)} \quad (2.27)$$

E_0 entspricht dabei der Energie der Absorptionskante bzw. der Bindungsenergie des Photoelektrons mit Masse m_e . Spezifisch für das jeweilige Absorberatom wird eine Referenzenergie E_{Ref} der jeweiligen K-Kante festgelegt. Da die genaue Kantenenergie unbekannt ist, wird zusätzlich ein Korrekturterm E_f eingeführt. E_f kann Ungenauigkeiten der Phasenfunktionen kompensieren und ist mit dem Strukturparameter R_j korreliert (vgl. Gleichung (2.9)). Für höhere k -Werte spielt E_f eine immer geringere Rolle. Des Weiteren hat sich bei der Analyse von EXAFS-Spektren die Gewichtung mit k^3 durchgesetzt. Grund hierfür ist, dass in der Bornschen Näherung bei höheren Energien die Rückstreuamplitude proportional zu $1/k^2$ (Gasiorowicz 1987) ist. Durch die Gewichtung mit k^3 wird auch die explizite $1/k$ Abhängigkeit in Gleichung (2.14) ausgeglichen. Damit wird eine einheitliche Amplitude über den gesamten Datenbereich erreicht, um die Frequenz der Oszillation so gut wie möglich zu analysieren (Meyer 1996). Des Weiteren sind durch die Gewichtung die Rückstreubeiträge bei höheren k -Werten größer. Durch die Gewichtung können die Spektren über einen größeren Datenbereich ausgewertet werden.

Durch die Fourier-Transformation wird eine Transformation vom k -Raum in den Ortsraum durchgeführt.

$$\Phi(R') = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{k_{\min}}^{k_{\max}} W(k) k^3 \chi(k) e^{2ikR'} dk \quad (2.28)$$

Dabei können durch geeignete Wahl einer Fensterfunktion $W(k)$ die Nebenmaxima aufgrund des endlichen Messbereiches eliminiert werden. Da bei der Fourier-Transformation des gemessenen Spektrums keine Phasenverschiebung implementiert ist (vgl. Gleichung (2.9)), stimmt der Ort dieser Fourier-Transformation nicht mit dem tatsächlichen Ort überein. Der Abstand ist nach einer Faustregel um ca. 0.2 - 0.5 Å zu kleineren Abständen hin verschoben. Um eine korrekte Fourier-Transformation zu erhalten, ist es nötig, die Streuphasen und Rückstreuamplituden in die Fourier-Transformation zu implementieren. Diese lassen sich mit Hilfe von Modellspezies bekannter Struktur bestimmen und auf die Messung übertragen. Das gängigste Verfahren aber ist die theoretische Berechnung der Streuphasen und Rückstreuamplituden. Die Programme verwenden dazu Muffin-Tin Potentiale (Hedin und Lundquist 1969; von Barth und Hedin 1972). Dabei werden die Potentiale geeignet modelliert und daraus die Streuphasen und Rückstreuamplituden berechnet (Lee und Pendry 1975; Stern et al. 1975; Lee und Beni 1977; Teo und Lee 1979; Mustre et al. 1991). Bei dieser sogenannten phasenkorrigierten Fourier-Transformation kann man nun direkt Abstände ablesen. Anzumerken ist, dass die Anpassung immer am gemessenen EXAFS-Spektrum erfolgt. Mit Hilfe der Fourier-Transformierten ist es möglich zu entscheiden, ob es einen erheblichen Teil von Mehrfachstreubeiträgen gibt. Der Vergleich der Amplituden der Fourier-Transformierten von gemessenen Spektrum und angepasstem Spektrum gibt Hinweise auf die korrekte Anpassung der A-Faktoren und Anzahl der ligandierenden Atome. Beide Parameter können sich nach Gleichung (2.14) gegenseitig kompensieren. Dabei ist es wegen der geringen Unterschiede in den Streuphasen von im Periodensystem benachbarten Atomen möglich, die fehlende Intensität der Amplitude in der Fourier-Transformierten durch Änderung der A-Faktoren verschiedener Atome zu kompensieren.

2.1.7 Mehrfachstreubeiträge

Wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben, können auch Mehrfachstreubeiträge in den Anpassungen berücksichtigt werden. Je eher mehr als zwei Atome vom Absorberatom ausgehend kollinear angeordnet sind, desto größer ist die Amplitude der Mehrfachstreuung. Beispiele hierfür sind in Abb. 2.4 dargestellt. Die Bedeutung linearer Vielfachstreupfade rührt daher, dass die

Streuamplitude in Vorwärtsrichtung $f(0)$ recht groß sein kann. Man spricht auch vom „fokussierenden Effekt“.

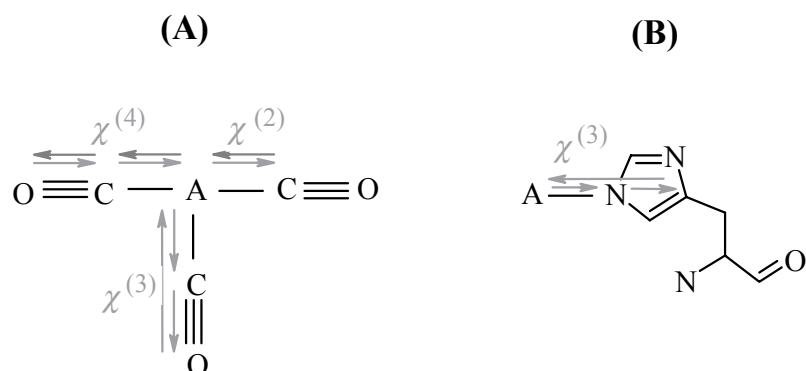


Abb. 2.4 Vielfachstreubeiträge $\chi(s)$ bei nahezu kollinearer Anordnung (Streuwinkel $\vartheta = 0^\circ$). In grau sind einige wichtige Streupfade für CO (A) und Histidin (B) eingezeichnet ($s=2$, Einfachstreuung; $s=3$, Zweifachstreuung; $s=4$, Dreifachstreuung).

Die Vielfachstreuterme $\chi^{(s)}$, $s > 2$, können als Korrekturen zum dominanten Einfachstreubeitrag $\chi^{(2)}$ aufgefasst werden. Das Auftreten signifikanter Vielfachstreuterme liefert zusätzliche geometrische Information, da die Stärke dieser Beiträge vom Streuwinkel ϑ abhängt. Als Beispiel für die Abhängigkeit vom Streuwinkel sei hier insbesondere der Imidazolring der Aminosäure Histidin angeführt (vgl. Abb. 2.5).

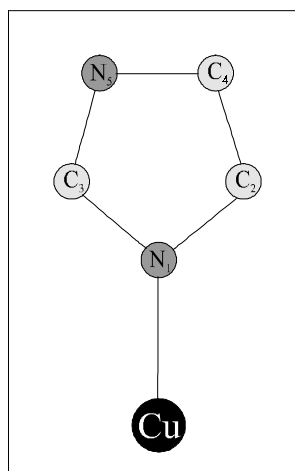


Abb. 2.5 Darstellung des Imidazolrings der Aminosäure Histidin als Ligand eines Kupferatoms zur Beschreibung der Mehrfachstreubeiträge. Das Kupfer liegt in der Ebene des Imidazolrings.

In Abb. 2.6 sind die simulierten Spektren von der Anordnung aus Abb. 2.5 dargestellt. Es befindet sich ein Imidazolring im Abstand von 1.91 \AA vom Kupfer. Das Kupferatom liegt in der Ebene des Imidazolrings. Liegen die Atome Cu-N₁-N₅ auf einer Linie, so ist der Beitrag von der Vielfachstreuung maximal und die Intensitäten in der Fourier-Transformierten von dem Atom N₅ werden verstärkt. Da aber die Wahrscheinlichkeit für den Gesamtprozess

erhalten bleiben muss, folgt auf die Zunahme der Intensität des Peaks für N_5 , dass der Peak für C_2 oder C_3 abnehmen muss (Meyer 1996). Der erste Peak in der Fourier-Transformierten repräsentiert natürlich immer die nächsten Liganden. Dieser Peak ist durch Mehrfachstreuung nicht beeinflussbar, da der Weg für das Photoelektron für Mehrfachstreuung stets länger ist als für Einfachstreuung am Liganden. In Abb. 2.6 ist deutlich zu erkennen, wie sich das EXAFS-Spektrum aufgrund der Mehrfachstreubeiträge bei einem Winkel von 180° zwischen Cu- N_1 - N_5 verändert.

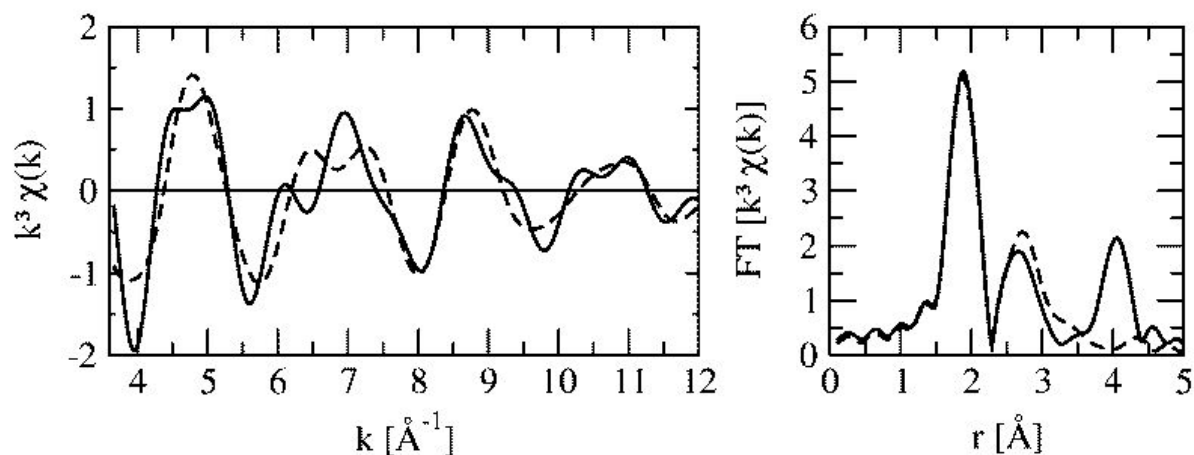


Abb. 2.6 Aus vorgegebener Geometrie berechnetes theoretisches EXAFS-Spektrum und seine Fourier-Transformierte, wobei zwischen Cu- N_1 - N_5 ein Winkel von 180° besteht und der Abstand Cu- N_1 bei 1.91 \AA liegt. (durchgezogene Linie: mit Mehrfachstreuung; gestrichelte Linie: ohne Mehrfachstreuung).

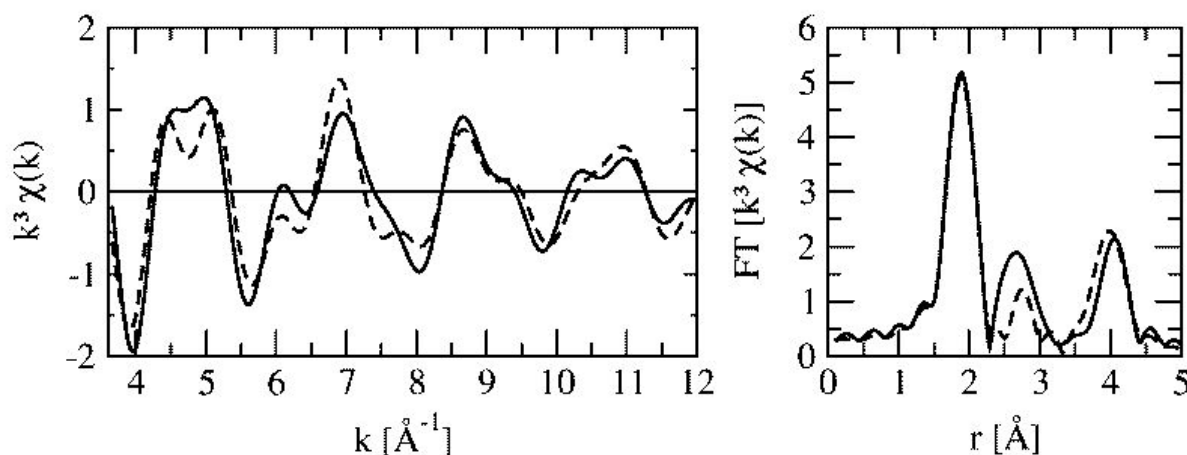


Abb. 2.7 Theoretisches EXAFS-Spektrum und seine Fourier-Transformierte der in Abb. 2.5 dargestellten Anordnung mit Mehrfachstreuung und einem Abstand Cu- N_1 von 1.91 \AA . (durchgezogene Linie: $\angle \text{Cu-}N_1\text{-}N_5 = 180^\circ$; gestrichelte Linie: $\angle \text{Cu-}N_1\text{-}N_5 = 155^\circ$).

Um zu verdeutlichen, dass mit Hilfe der Mehrfachstreubeiträge auch eine Aussage über die Lage des Imidazolringes relativ zum Absorberatom getroffen werden kann, sei auf Abb. 2.7

verwiesen. Es wurde wieder das EXAFS-Spektrum und seine Fourier-Transformierte simuliert, wobei der Abstand Cu-N₁ wieder 1.91 Å beträgt und Mehrfachstreuung berücksichtigt wird. Als Parameter werden zwei unterschiedliche Winkel zwischen Cu-N₁-N₅ festgelegt. Es ist deutlich zu erkennen, wie die Größe des Winkels zwischen Cu-N₁-N₅ das EXAFS-Spektrum und die Fourier-Transformierte erheblich beeinflussen. Man erkennt auch, dass bei Drehung des Imidazolringes um N₁ die Lage der Peaks in der Fourier-Transformierten verschoben werden.

2.1.8 Verfahren zur Analyse von EXAFS-Spektren.

Bei der Analyse der Spektren werden die einzelnen Parameter und damit das theoretische Spektrum über eine Marquart-Fit-Routine an das gemessene Spektrum angepasst. Für die EXAFS-Analyse mit EXCURV92 und EXCURV98 ist in der Regel nur wenig Vorkenntnis über die dreidimensionale Struktur des untersuchten Atomclusters vonnöten. Das liegt daran, dass man häufig nur Einfachstreubeiträge der nächsten Nachbarn des Absorbers berücksichtigen muss. Im Ergebnis erhält man dann eine radiale Abstandsinformationen. Wie bei der Röntgenstrukturanalyse besteht auch bei der Analyse von EXAFS-Spektren die Möglichkeit, externe Informationen einfließen zu lassen. Hierbei werden ganze Gruppen von Atomen zusammengefasst, deren Struktur aus anderen Untersuchungen schon bekannt sind. Dabei handelt es sich hauptsächlich um die bekannte Struktur von Aminosäuren. Die Berechnung von Streutermen höherer Ordnungen für einen Teil des untersuchten Clusters ist oft ausreichend, z.B. für einen Histidin-Liganden, während der Rest des Clusters weiterhin mit der Theorie für Einfachstreuung behandelt werden kann. Es wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um die Anzahl der Parameter zu minimieren. Falls mehrere Atome der gleichen Art mit einem vergleichbaren Abstand zum Absorberatom existieren, besteht die Möglichkeit, sie in einer Schale zusammenzufassen. Diese Atome werden mit einem Abstandsparameter und einem Debye-Waller Parameter angepasst. Zu berücksichtigen ist dabei, dass dies zu einer artifiziellen Erhöhung des A-Faktors führen kann, da über unterschiedliche Abstände gemittelt wird. Es besteht auch die Möglichkeit, einen Debye-Waller Parameter für mehrere Atome in verschiedenen Schalen gleichzeitig anzupassen. Voraussetzung hierfür ist, dass sie sich in einer ähnlichen Umgebung befinden, wie das innerhalb einer Aminosäure oder für Atome mit einem vergleichbaren Abstand der Fall ist. Besitzt man nun aber ein dreidimensionales Modell der Umgebung des absorbierenden Atoms, so kann man auch Mehrfachstreuung zwischen allen Atomen des Modells zulassen

und somit überprüfen, ob das simulierte EXAFS-Spektrum des Modells mit dem gemessenen Spektrum übereinstimmt.

2.1.9 "pre-edge" Analyse

Wie im Kapitel 2.1 erläutert, stammt die Intensität der "pre-edge" Region aus dem elektronischen $1s \rightarrow 3d$ Übergang. Die Intensität des Übergangs ist stark von der Geometrie des Absorptionszentrums abhängig. Sie hängt vom Grad der Störung eines Metallzentrums ab, welches zentrisch symmetrisch ist. Meist geht eine Variation der Koordinationszahl mit einer Geometrieänderung einher. Somit kann auf die Koordinationszahl geschlossen werden. Als Beispiel sei hier CuCl_4^{2-} angeführt. Bei diesem Komplex verändert sich die Intensität des Übergangs um den Faktor 7, wenn die Anordnung von quadratisch eben zu einem gestörten Tetraeder verschoben wird. Dabei ändert sich die Koordinationszahl aber nicht (Tierney et al. 1995). Im allgemeinen wird im Falle des Eisens die Fläche des Vorkantenmaximums an normierten Absorptionsspektren von einer sechsfach koordinierten pseudo-oktaedrischen (Fläche $< 10 \times 10^{-2}$ eV) über eine fünfach koordinierte ($12 - 18 \times 10^{-2}$ eV) zu einer vierfach pseudo-tetraedrischen ($> 21 \times 10^{-2}$ eV) Geometrie anwachsen. Bei der Bestimmung des Vorkantenmaximums im Falle des Cu(II) ist nur ein sehr schwaches Vorkantenmaximum zu beobachten (Kau et al. 1987), dessen Intensität keine Möglichkeit über eine Aussage beinhaltet.

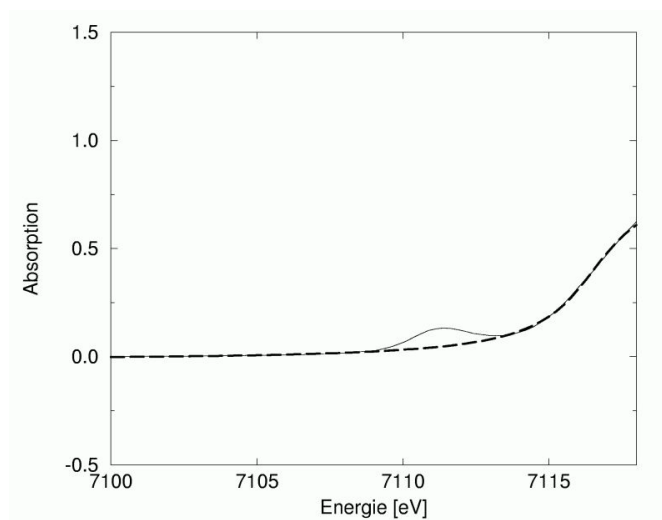


Abb. 2.8 Extraktion des "pre-edge" Bereiches aus Abb. 2.1. durchgezogene Linie: gemessenes Spektrum; gestrichelte Linie: Anpassung an das Spektrum mit Gleichung (2.29).

Die Bestimmung der Intensität erfolgt mit der Anpassung einer Untergrundfunktion an das Spektrum, welche den Verlauf ohne den $1s \rightarrow 3d$ Übergang wiedergibt. Dabei wird eine Arcustangensfunktion und ein Polynom erster Ordnung an die Messdaten angepasst.

$$y = a_0 + a_1(x - a_4) + a_2 \arctan(a_3(x - a_4)) \quad (2.29)$$

Für die Anpassung mit Gleichung (2.29) wird der Vorkantenpeak ausgenommen. Die Anpassungsbereiche liegen ungefähr von -15 eV bis -5eV unterhalb und von +5 eV bis zum Wendepunkt der Absorptionskante oberhalb des Vorkantenmaximums (vgl. Abb. 2.8). Die Fläche besteht dann aus der Differenz der Integration über die Messkurve und der berechneten Kurve.

2.2 Mößbauer-Spektroskopie

Der Mößbauer-Effekt bezeichnet die rückstoßfreie Kernresonanzabsorption und -fluoreszenz: γ -Absorption wird im Mößbauer-Spektrum nur dann nachgewiesen, wenn sowohl die Emission des Photons in der Quelle als auch die Absorption im Absorber ohne Energieübertrag rückstoßfrei erfolgt, da ansonsten die Absorptionslinie um die Rückstoßenergie gegenüber der Resonanz verschoben ist (Wegener 1965; Goldanskii und Herber 1968; Gonser 1975, 1981).

Sind Quelle und Absorber in verschiedenartigen Festkörpern eingebaut, wird man keine Resonanzabsorption beobachten, da es durch unterschiedliche Umgebungen zu kleinen Verschiebungen und/oder Aufspaltungen der Energieniveaus kommen kann, die wertvolle Informationen über die chemische Umgebung des absorbierenden Atoms liefern. Um dennoch Resonanzabsorption beobachten zu können, wird die Quelle auf einem elektromagnetischen Antrieb befestigt. Aufgrund des Dopplereffektes erfahren dadurch die emittierten Quanten eine Energieverschiebung $\Delta E = E_0 v/c$ und die Resonanzbedingung kann wieder erfüllt werden. E_0 ist die Energie, der von der Quelle emittierten γ -Strahlung, und beträgt 14.4 keV bei einem ^{57}Fe -Kern. v ist die Geschwindigkeit der Quelle und c die Lichtgeschwindigkeit.

2.2.1 Hyperfeinwechselwirkungen

Die Isomerieverschiebung ist eine Verschiebung der Absorptionslinie bezüglich $v = 0$. Da sie auch von der Quelle abhängig ist, wird ihre Größe gegenüber einer Standardsubstanz (α -Eisen) angegeben. Hervorgerufen wird Sie durch die Wechselwirkung zwischen der positiven elektrischen Ladung des Kerns und den negativ geladenen Hüllenelektronen. Sie kommt dadurch zustande, dass sich die Ausdehnungen des Kerns und damit die Potentiale, in denen sich die Elektronen bewegen, im angeregten Zustand und im Grundzustand unterscheiden. Die Isomerieverschiebung ist sensitiv auf die Elektronendichte am Kernort und damit über die Wechselwirkung der s-Elektronen mit den p- und d-Elektronen (Abschirmeffekte) auch auf den Ligandierungs- und Oxidationszustand des Eisens.

Der im 14,4keV Niveau angeregte ^{57}Fe -Kern besitzt ein elektrisches Quadrupolmoment Q , welches mit einem elektrischen Feldgradienten der Elektronenumgebung wechselwirkt. Beiträge liefern die inhomogene Ladungsverteilung der umgebenden 3d Elektronenhülle und

das elektrische Feld der Liganden (Kristallfeld). Tritt am Kernort ein elektrischer Feldgradient auf, so spalten die Kernniveaus nach dem Betrag der magnetischen Quantenzahl M_I auf.

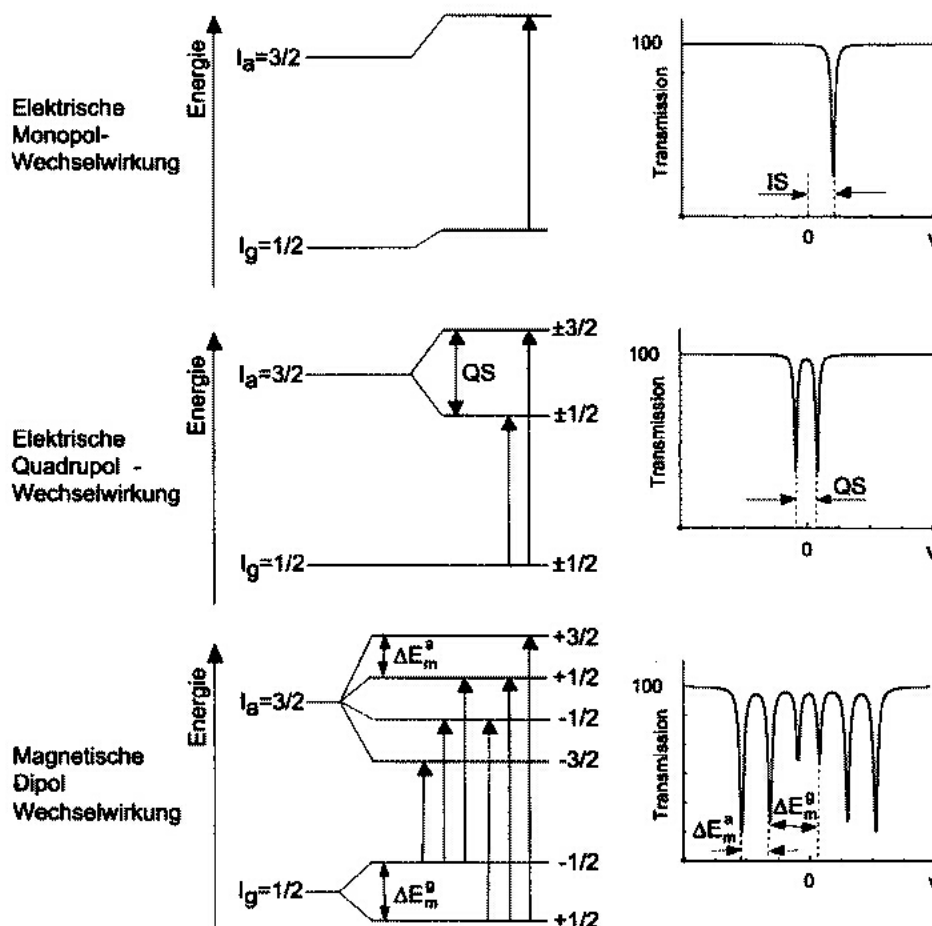


Abb. 2.9 Einfluß der Hyperfeinwechselwirkungen auf den Grundzustand (I_g) und das 14,4keV-Niveau (I_a) des ^{57}Fe -Kerns. Die jeweilige Auswirkung im Mößbauer-Spektrum ist in der rechten Spalte dargestellt. IS: Isomerieverschiebung; QS: Quadrupolaufspaltung; ΔE_m^a , ΔE_m^g : magnetische Aufspaltung des angeregten Niveaus und des Grundniveaus.

Die magnetische Hyperfeinwechselwirkung zwischen den magnetischen Momenten der Kerne und dem effektiven Magnetfeld am Kernort erzeugt die nukleare Zeemanaufspaltung. Die Entartung bezüglich der magnetischen Quantenzahl M_I wird nun vollständig aufgehoben. Das effektive Magnetfeld besteht aus Beiträgen eines von außen angelegten Feldes und des Feldes, das seinen Ursprung im Bahndrehimpuls und vor allem dem Spin der Hüllenelektronen hat. Die Messung muß relativ zur Curietemperatur bei tieferen Temperaturen erfolgen, da sich ansonsten das von den Elektronen erzeugte Magnetfeld durch schnelle Relaxation wegmittelt. Man misst in diesem Fall in einem schwachen externen B-Feld, um eine Vorzugsachse zu

definieren. Man erhält Informationen über das lokale Magnetfeld, den Spinzustand und Relaxationseigenschaften.

2.2.2 Das Transmissionsintegral und der Lamb-Mößbauer-Faktor

Im Mößbauer-Experiment wird die Transmission T der 14.4keV-Quanten in Abhängigkeit von der Antriebsgeschwindigkeit der Quelle (v) gemessen. Sie steht mit dem Absorptionsquerschnitt σ_a in folgendem Zusammenhang:

$$T(v) = \frac{Z(v)}{Z(\infty)} = 1 - R f_s \left[1 - \int_{-\infty}^{\infty} Q(v, E_s, E) e^{-\sigma_a(E_a, E) n_{Fe}} dE \right] \quad (2.30)$$

In dieser Formel bedeuten $Z(v)$ die Zählrate bei der Antriebsgeschwindigkeit v und $Z(\infty)$ die Zählrate weit ab der Resonanz. R ist ein Faktor zur Untergrundbereinigung und gibt den Anteil an γ -Quanten aus dem Mößbauer-Übergang bezogen auf die gezählten Quanten an. f_s ist der Lamb-Mößbauer-Faktor der Quelle und $Q(v, E_s, E)$ das Emissionsspektrum der Quelle. Der Absorptionsquerschnitt der Probe wird mit $\sigma_a(E_a, E)$ bezeichnet. Die Flächenbelegungsichte von ^{57}Fe in der Probe ist n_{Fe} .

Man erhält für die Fläche A unter dem Mößbauer-Spektrum für dünne Absorber (kleines n_{Fe} und f_a)

$$A = \int_{-\infty}^{\infty} (1 - T(v)) dv = \frac{1}{2} \pi R f_s t_a \Gamma_a \frac{c}{E_s} \quad (2.31)$$

mit der effektiven Dicke t_a :

$$t_a = \sigma_0 f_a n_{Fe} \frac{\Gamma_{nat}}{\Gamma_a} \quad (2.32)$$

Es sind c die Lichtgeschwindigkeit, E_s die Energie der von der Quelle emittierten Mößbauer-Quanten, Γ_{nat} die natürliche Linienbreite von ^{57}Fe , $\sigma_0 = 2.56 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$ der Einfangsquerschnitt für 14.4 keV-Quanten eines ^{57}Fe -Kerns, Γ_a die Linienbreite des Absorbers und f_s bzw. f_a der Lamb-Mößbauer-Faktor der Quelle bzw. des Absorbers. Die Fläche unter dem Spektrum ist also proportional zum Lamb-Mößbauer-Faktor. Der Lamb-Mößbauer-Faktor gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass eine γ -Absorption bzw. γ -Emission rückstoßfrei erfolgt.

$$f = e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (2.33)$$

$\langle x^2 \rangle$ sind die mittleren quadratischen Auslenkungen des Mößbauer-Kerns. Somit lässt sich aus der Fläche eines Absorptionsspektrums der Lamb-Mößbauer-Faktor der Probe bestimmen, woraus wiederum Informationen über die dynamischen Eigenschaften der Sonde ableitbar sind.

3 Experimenteller Aufbau

3.1 Messapparatur XAS

Bei der Bestimmung des linearen Absorptionskoeffizienten μ von Biomolekülen besteht das Problem, dass es sich hierbei um "sehr verdünnte Proben" handelt. Das heißt, dass die Konzentration der Absorberatome in der Probe relativ niedrig ist. Dadurch, dass in der Regel bei Proteinen die Anzahl der Absorberatome gegenüber den restlichen Atomen im Molekül sehr klein ist, ist es bei Biomolekülen oft schon schwierig eine Konzentration von 1 mM zu erreichen. Als Beispiel sei hier das Myoglobin angeführt. Auf etwa 1260 Atome der Elemente Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff und Schwefel kommt im Myoglobin ein Eisenatom als Absorber. Die Einstellung von zu großen Konzentrationen kann zu einer Aggregation der Biomoleküle führen. Als mögliche Lösung lässt sich der Absorptionskoeffizient μ auch durch Messung der unter 90° zur einfallenden Strahlung I_0 von der Probe ausgesendeten Röntgen- K_α -Fluoreszenz der Intensität I_F bestimmen (Jaklevic et al. 1977):

$$\mu \cdot d = \frac{I_F}{I_0} \quad (3.1)$$

Dabei entspricht d der Dicke der Probe. Dadurch erreicht man, dass das Messsignal nicht mehr vom Primärstrahl überlagert ist. Die Untersuchung von Proteinlösungen erfolgt daher im Fluoreszenzmodus. Im Fluoreszenzmodus ist die erreichbare Konzentration der Absorberatome in einer Proteinlösung, welche in einem Bereich größer 1 mM für das Absorberatom liegen sollte, für eine gute Messung ausreichend. Je höher die Konzentration ist, desto kürzer ist die benötigte Messzeit, um eine ausreichende Statistik zu erhalten.

Sämtliche XAS Messungen wurden am Messplatz D2 des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt. Abb. 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des apparativen Aufbaus. Der einlaufende Strahl aus dem Synchrotron wird monochromatisiert (Monochromator) und fokussiert (Spiegel und Blenden), bevor er auf die Probe fällt. Vor der Probe wird die einfallende Intensität gemessen (Ionisationskammern I_0). Gemessen wird die Absorption (Ionisationskammer I_1) und die Fluoreszenz (Detektor). Photomultiplier, Szintillator und ein Si[220]-Kristall dienen zur Energiekalibration.

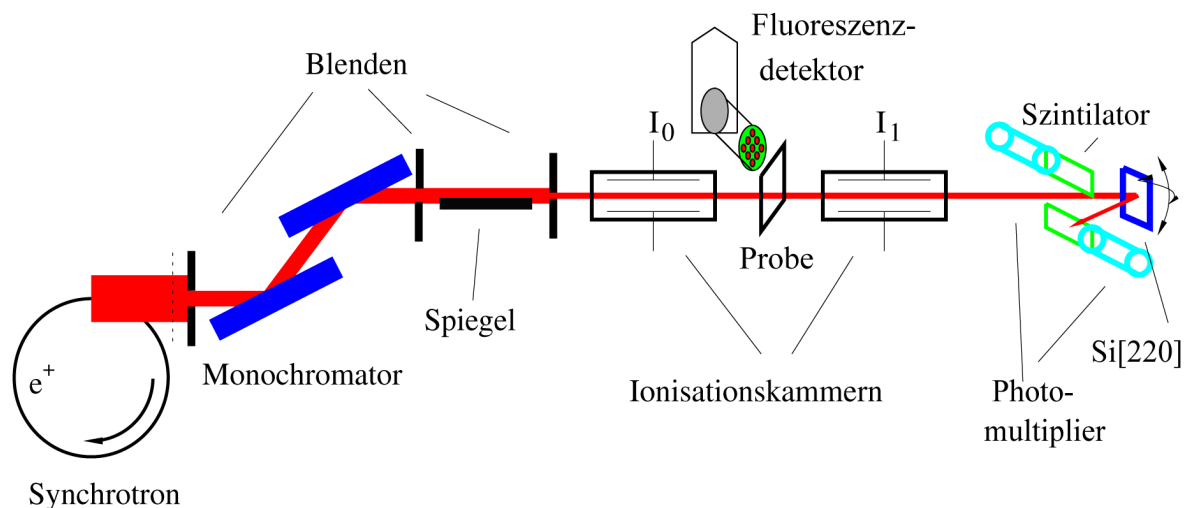


Abb. 3.1 Schema des Messplatzes an der EMBL EXAFS beam line D2. Der einlaufende Strahl aus dem Synchrotron wird monochromatisiert (Monochromator), fokussiert (Spiegel und Blenden) und seine Intensität gemessen (Ionisationskammern I_0), bevor er auf die Probe fällt. Gemessen wird die Absorption (Ionisationskammer I_1) und die Fluoreszenz (Detektor). Photomultiplier, Szintillator und ein Si[220]-Kristall dienen zur Energiekalibration.

Als Strahlungsquelle dient ein Synchrotron. Da die Amplituden der Oszillationen im XAS-Spektrum nur wenige Prozent des Kantenhubes betragen (vgl. Abb. 2.1) und die Konzentration der Absorberatome gering ist, wird sehr intensive Röntgenstrahlung benötigt, welche nur von Synchrotrons erzeugt werden kann. Als Synchrotronstrahlungsquelle diente der Positronen-Speicherring DORIS III (Double Ring Store) des HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlunglabor) am DESY. Die relativistischen Positronen mit einer Energie von 4.45 GeV und einem maximalen Strahlstrom von 145 mA werden durch Magnetstrukturen im Speicherring auf einer gekrümmten Bahn mit einem Umfang von 289.2 m gehalten. Derart beschleunigte geladene Teilchen senden u.a. tangential zu ihrer Flugbahn Synchrotronstrahlung aus. Die Beschleunigung der Teilchen an der EMBL EXAFS beam line D2 und damit die Erzeugung der Synchrotronstrahlung erfolgt am Strahlenfächer D des HASYLAB durch einen Ablenkmagneten mit einem Radius von 12 m, einer magnetischen Flußdichte von 1.2 T und einer kritischen Energie von 16.04 keV. Die kritische Energie teilt das Spektrum der Synchrotronstrahlung in zwei Bereiche gleicher Strahlungsleistung. Sie wird als Kenngröße des Spektralbereiches der Synchrotronstrahlung angegeben.

3.1.1 Monochromator und Spiegel

Der nun aus dem Speicherring austretende "weiße Strahl" wird durch zwei Silizium-Einkristalle in paralleler Anordnung monochromatisiert (vgl. Abb. 3.2).

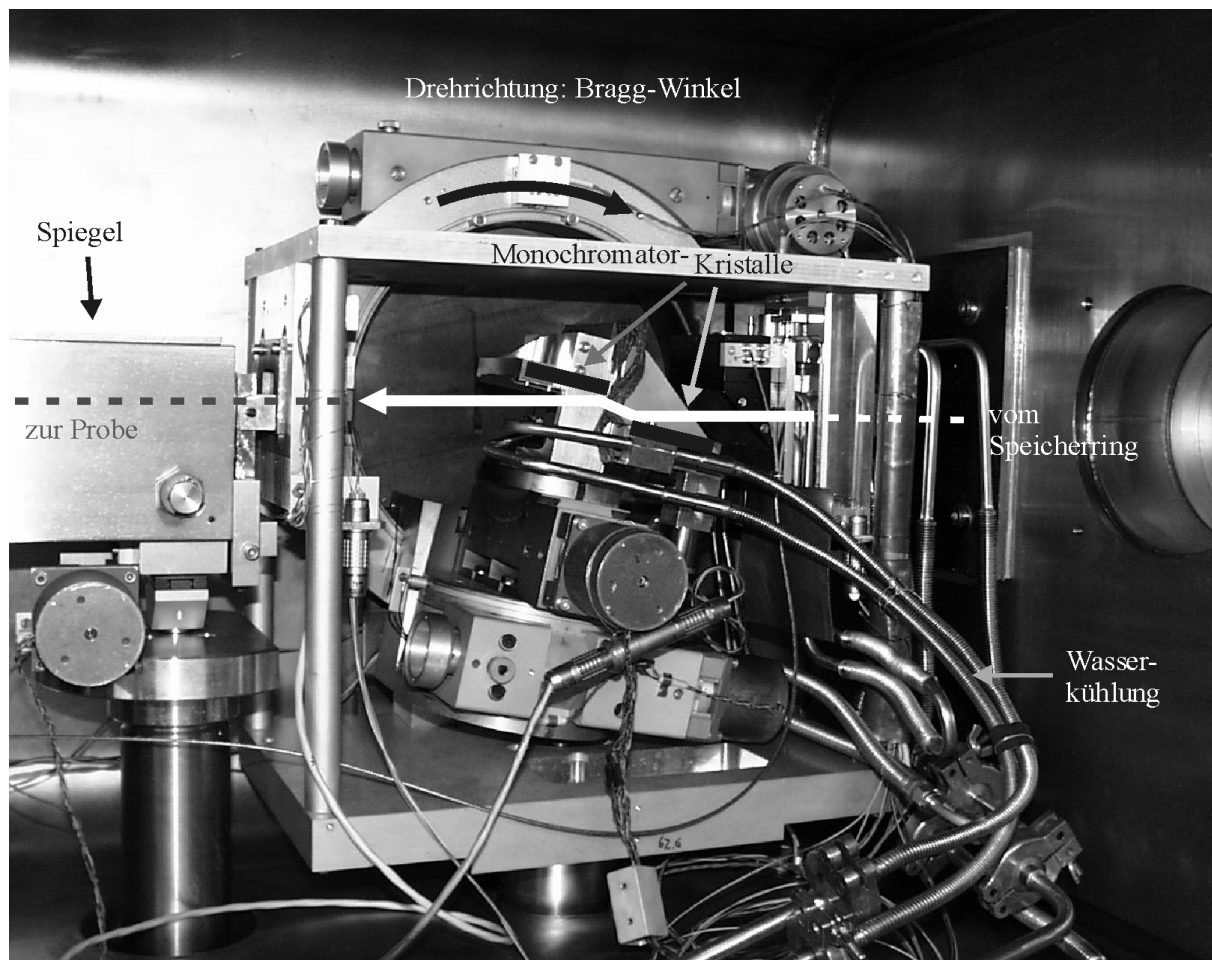


Abb. 3.2 Monochromator an der EMBL EXAFS beam line D2. Die ungefähre Position der Si(111) Kristalle ist durch schwarze Balken angedeutet (im Zentrum des Bildes); der weiße Pfeil veranschaulicht den Strahlengang.

Die Auswahl der gewünschten Wellenlänge erfolgt über das Bragg'sche Gesetz:

$$\lambda_n = \frac{2a}{n} \sin \vartheta_B \quad (3.2)$$

mit λ_n Wellenlänge, a Gitterebenenabstand des Kristalls, ϑ_B Braggwinkel und $n \in \{1,2,3,\dots\}$.

Der gewünschte Energiebereich kann dann durch schrittweise Veränderung des Bragg-Winkels verändert werden. Während eines Experiments wird der Energiebereich typischerweise um 1000 eV im Bereich einer Absorptionskante verändert. Die Absorption wird dann bei jedem Winkel gemessen.

Aus Gleichung (3.2) wird deutlich, dass auch höhere harmonische Frequenzen vom Monochromator übertragen werden. Um diese zu unterdrücken, wird der zweite Kristall nicht

exakt parallel zum Ersten ausgerichtet. Durch diese Verkippung werden die Intensitäten der höheren Frequenzen stärker gedämpft (Caciuffo et al. 1987).

Für die Messung an der Eisen- und Kupfer Kante wurde ein Si(111)-Doppelkristall-Monochromator verwendet. Das bedeutet, dass die Oberflächen der Kristalle parallel zur Si(111)-Gitterebene geschliffen sind. Mit diesem Monochromator erreicht man eine Energieauflösung $\Delta E/E$ von 14.1×10^{-4} bei einem Braggwinkel von 14.8° und einer Reflexbreite ω_S von $7.4''$ mit einer Energie von 7750 eV ($\Delta E/E = \omega_S \cot \vartheta_B$) (Caciuffo et al. 1987).

Der monochromatisierte Strahl wird durch streifenden Einfall auf einen 1.8 m langen, aus vier Segmenten bestehenden, mit Gold und Kanigen (Ni-Legierung) beschichteten, toroidalen Spiegel auf die Probe fokussiert. Da die Reflektivität bei konstantem Einfallswinkel mit wachsender Energie abnimmt, kann der Spiegel auch als Hochfrequenzfilter dienen. Bei einem Einfallswinkel von 3.8 mrad liegt die obere Grenze für eine effiziente Transmission bei 21.5 keV. Für die Übertragung höherer Energien muss der Spiegel ausgebaut werden, wie es zum Beispiel für die Cd-K-Kante bei 26.7 keV der Fall ist.

So beträgt der zugängliche Energiebereich an der EMBL EXAFS beam line D2 ca. 5 - 35 keV (Meyer-Klaucke 2002). Die untere Grenze ist durch die Absorption von Berylliumfenstern im Strahlengang bedingt. Die obere Grenze ist durch den Aufbau des Synchrotrons gegeben.

3.1.2 Kryostat

Durch die Blenden beträgt die durchstrahlte Fläche an der Probe 5 mm (horizontal) \times 1 mm (vertikal). Aufgrund der hohen Intensität der Synchrotronstrahlung sind besonders hohe Strahlungsschäden zu erwarten. Die Probe wird in einem Kryostaten von Oxford Instruments mit geschlossenem Helium-Kreislauf montiert. Mit diesem System lässt sich eine minimale Proben temperatur von 20 K erreichen. Ebenso ist ein Probenwechsel bei Kryotemperaturen möglich. Für die in dieser Arbeit auch durchgeführten temperaturabhängigen Messungen zwischen 20 – 300 K ist der Kryostat geeignet (Scherk et al. 2001).

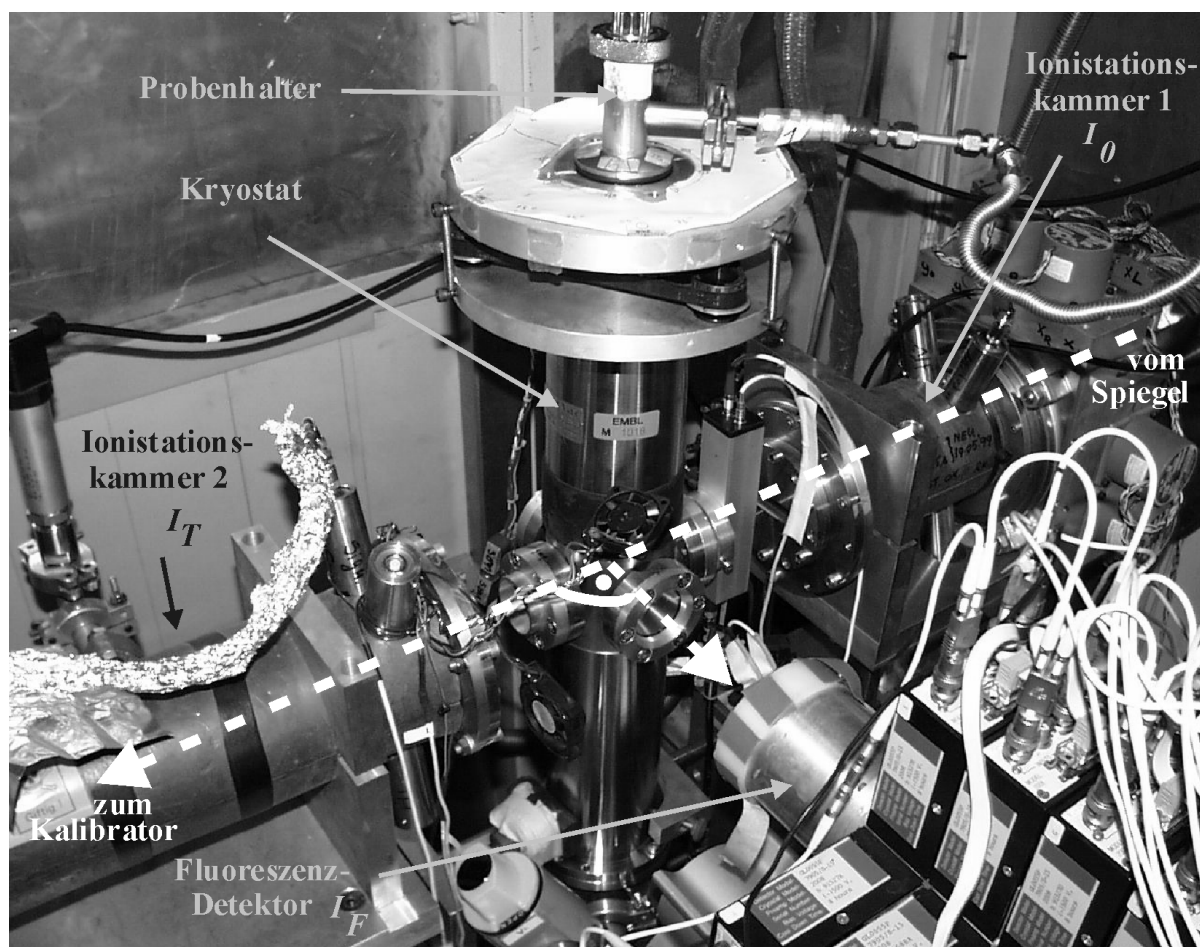


Abb. 3.3 Einblick in den EMBL EXAFS Messplatz D2. Der Strahlengang ist als gestrichelter weisser Pfeil eingezeichnet. Der Strahl durchquert zunächst die erste Ionisationskammer, dann den Kryostaten und schließlich die zweite Ionisationskammer. Die von der Probe im 90°-Winkel zum direkten Strahl ausgesendete Röntgenfluoreszenz wird mit einem Fluoreszenzdetektor aufgenommen.

3.1.3 Der Fluoreszenzdetektor

In Abb. 3.3 ist neben dem Kryostaten auch noch der Fluoreszenzdetektor zu sehen. Dabei handelt es sich um einen Germaniumdetektor von Canberra, welcher aus 13 unabhängigen Detektorelementen besteht. Der Detektor deckt einen Raumwinkel von maximal 20 % ab. Um den Absorptionskoeffizienten messen zu können, müssen neben der Fluoreszenzintensität auch die einfallende Intensität I_0 und die transmittierte Intensität I_T bestimmt werden. Zur Detektion von I_0 und I_T werden Ionisationskammern verwendet. Sie besitzen ein Gasmisch aus 70 % Argon und 30 % Kohlendioxid und arbeiten bei einem Gasdruck, bei welchem in etwa ein Drittel der Strahlenintensität absorbiert wird.

3.1.4 Energiekalibration

Während der Messung wird die Energie des monochromatischen Strahls durch die Drehung des Monochromators um ca. 1000 eV durchgestimmt. Der Röntgenabsorptionskoeffizient wird in Abhängigkeit von der Energie bestimmt. Bei der Drehung des Monochromators entstehen systematische Fehler in der Energiekalibrierung. Um nun mehrere Einzelmessungen aus derselben Probe oder Messungen von verschiedenen Proben addieren oder vergleichen zu können, ist eine absolute Energiekalibrierung vonnöten. In Abb. 3.4 ist das Kalibrationssystem am EMBL EXAFS Messplatz zu sehen (Pettifer und Hermes 1985). Das Kalibrationssystem besteht aus einem Si(220)-Kristall, welcher in Abhängigkeit von der Energie der einfallenden Strahlung Bragg-Reflexe in zwei Szintillationsdetektoren liefert. Bei Kenntnis der Kristallorientierung und somit der Winkel α und β (vgl. Abb. 3.4) lässt sich aus der Lage der Reflexe auf die absolute Strahlenenergie an jedem Punkt des XAS-Spektrums schließen. Die Genauigkeit der Energiekalibration beträgt ca. 0.2 – 0.5 eV. Damit ist es möglich, bei zwei Messungen zu unterscheiden, ob das Absorberatom seinen Oxidationszustand aufgrund von Strahlenschäden geändert hat und somit ein Probenwechsel erforderlich ist. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass die Spektren von Messungen, welche während verschiedener Messzeiten entstanden sind, auf die genaue Lage der Kante nicht verglichen werden können.

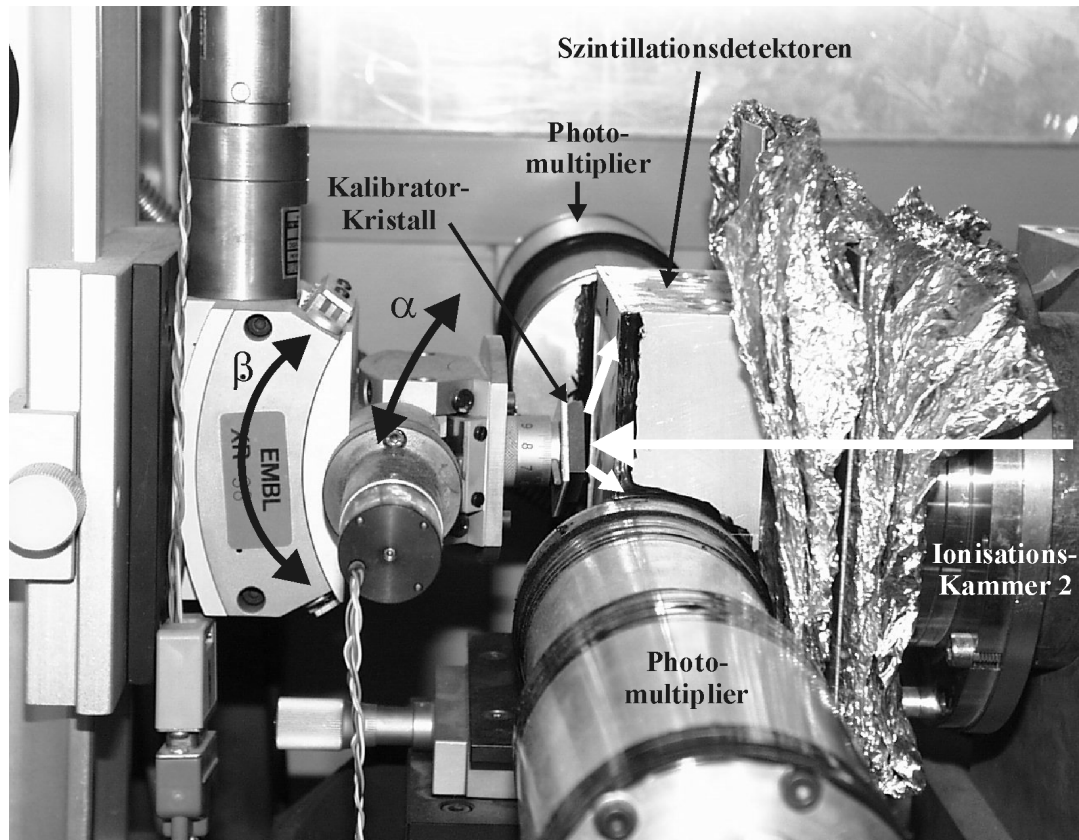


Abb. 3.4 Kalibrationssystem am EMBL EXAFS Messplatz D2. Die weißen Pfeile illustrieren den Strahlengang.

3.1.5 Datenreduktion

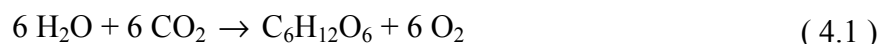
Alle Intensitäten werden in Abhängigkeit von der Motorschrittzahl des den Monochromator antreibenden Motors bestimmt. Diese Daten müssen in ein geeignetes Format gebracht werden, damit die spätere Auswertung erfolgen kann. Dieser Vorgang wird als Datenreduktion bezeichnet. Die Datenreduktion erfolgte in dieser Arbeit mit dem Programmpaket EXPROG (Nolting und Hermes 1992). Sie sei nun kurz skizziert:

1. Als erstes erhält man den Röntgenabsorptionskoeffizienten als Funktion der Motorschrittzahlen. Die Motorschrittzahlen können in ungefähre Bragg-Winkel bzw. unkalibrierte Energien übersetzt werden.
2. Durch Kenntnis der Lage der Kalibrationsreflexe bezüglich der Motorschrittzahlen ist eine absolute Kalibration der Energieachse möglich.
3. Die 13 Fluoreszenzkanäle des Detektors liefern 13 unabhängige Signale. Die störungsfreien Kanäle werden zu einem Gesamtspektrum aufsummiert.
4. Mittelung mehrerer Einzelmessungen zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (vgl. Abb. 2.1).
5. Für die Analyse des Kantenbereiches inklusive des "Pre-edge" Peaks und zum Vergleich der Absorptionskanten verschiedener Proben muss die Absorptionskante normiert werden, da der Kantenhub von mehreren Faktoren wie z.B. der Absorberkonzentration oder den geometrischen Verhältnissen zwischen Strahl, Probe und Detektor abhängig ist. Dazu wird unterhalb der Kante im Fluoreszenzmodus ein Polynom nullter Ordnung und oberhalb der Kante ein Polynom der Ordnung zwei bis drei angepasst. Die Differenz der beiden Polynome wird dann auf eins gesetzt.
6. Den Absorptionsuntergrund im Vorkantenbereich passt man durch ein Polynom nullter oder erster Ordnung an, das man in den EXAFS-Bereich hinein extrapoliert. Oberhalb der Kante wird der Absorptionsuntergrund durch einen "Spline" (Teo 1986) mit bis zu sechs Knoten simuliert. Nach erfolgreicher Extraktion des EXAFS-Bereiches aus dem XAS-Spektrum wird das Signal in den k-Raum transformiert (vgl. Gleichung (2.27)).

4 Untersuchungen am modifizierten Photosystem II

4.1 Der durch Fe ersetzte Mn-Cluster im Photosystem II

Bei der Photosynthese wird aus Kohlendioxid und Wasser der C₆-Zucker (Hexose) Fructose-6-phosphat gebildet. Dabei entsteht als "Abfallprodukt" Sauerstoff. Die Nettogleichung lautet:



Der gesamte Ablauf der Photosynthese ist an die Chloroplasten, die bei Pflanzen in den Mesophyllzellen der Blätter vorkommen, gebunden. In der Lichtreaktion wird mit Hilfe von Licht Wasser oxidiert.



Die Energie, die notwendig ist, um Elektronen von Wasser auf das NADP⁺ (Nicotinamidadenindinucleotid) zu übertragen, wird in Form von Sonnenlicht aufgenommen. Die beiden Photosysteme PSI und PSII absorbieren die notwendigen Lichtquanten, der Cytochrom-b₆/f-Komplex leitet Elektronen weiter, und am CF₁/CF₀-Komplex wird ATP synthetisiert. Die beiden Photosysteme tragen je ein photochemisches Reaktionszentrum aus zwei Molekülen Chlorophyll a. Nach dem Absorptionsmaximum wird dieses sog. "special pair" im PSI mit P₇₀₀ und im PSII mit P₆₈₀ bezeichnet. Die vier Elektronen, die bei der Bildung eines Sauerstoffmoleküls frei werden, werden in einem Cluster aus vier Manganionen (Mn₄) zwischengespeichert und über das Tyrosin Z (Y_Z) einzeln an das P₆₈₀ weitergeleitet. Die Weiterleitung des Elektrons zwischen dem angeregten PSII und dem oxidierten Reaktionszentrum P₇₀₀⁺ des PSI erfolgt über den Cytochrom-b₆/f-Komplex entlang eines Potentialgefälles. Über ein weiteres Potentialgefälle werden die Elektronen auf das NADP⁺ übertragen.

Erstmals konnte 2001 die Kristallstruktur des PSII aus *Synechococcus elongatus* bis zu einer Auflösung von 3.8 Å gelöst werden (Zouni et al. 2001). In Abb. 4.1 ist der Aufbau des PSII, wie sie aus der Kristallstruktur bestimmt worden ist, dargestellt. Die Hauptfunktion der chlorophyllbindenden Proteine CP43 und CP47 ist die Absorption von Lichtenergie und ihre Weiterleitung an das P₆₈₀ bzw. die Übertragung der von den Lichtsammelkomplexen

absorbierten Energie zum P_{680} (Bricker 1990; Krugh und Miles 1995). Das Cyt b-559 dient als Schutz des PSII bei zu intensivem Lichteinfall (Aro et al. 1993; Poulson et al. 1995).

Die extrinsischen Proteine PsbO und PsbV spielen eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Mn-Clusters innerhalb des PSII, wobei das PsbV ein Eisenatom innerhalb einer Häm-Ebene besitzt. Gebunden wird der Mn-Cluster über die transmembranen α - Helices von D1 und D2 an das PSII. D1 und D2 binden die wichtigsten Cofaktoren und Pigmente für die Ladungstrennung (Barber et al. 1997). Nicht in Abb. 4.1 eingezeichnet ist das sog. non-häm Eisen zwischen D1 und D2.

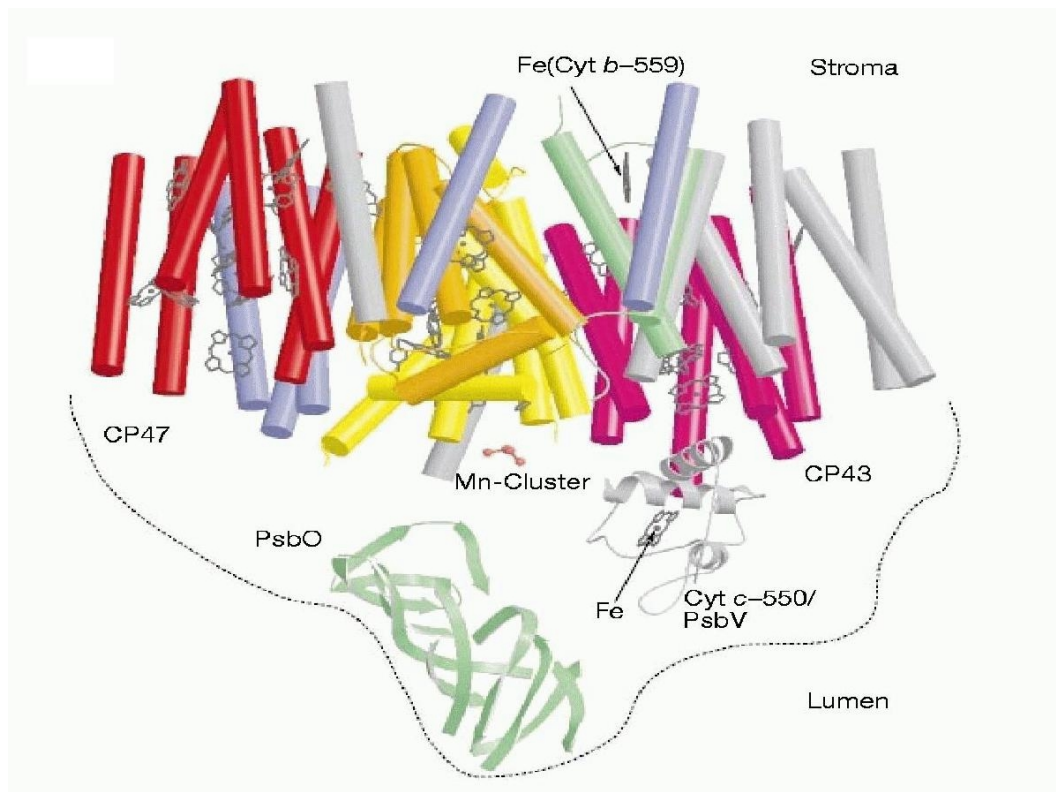


Abb. 4.1 Struktur des Photosystems II: Dargestellt ist die Lage der transmembranen α - Helices von D1 und D2 (gelb), der extrinsischen Proteine PsbO und PsbV, des Mn-Clusters, von zwei Häm-Eisen und der beiden Antennenkomplexe CP47 (rot) und CP43 (rosa) (Zouni et al. 2001).

Heute geht man davon aus, dass die Wasserspaltung an vier Mn-Atomen stattfindet (Debus 1992; Yachandra et al. 1996; Zouni et al. 2001). Aus den Experimenten an dunkeladaptierten, isolierten Chloroplasten folgerte man, dass die Rate, mit der sich Sauerstoff entwickelt, mit einer Periode von vier Lichtblitzen oszilliert (Kok et al. 1970). Dieses Ergebnis führte zur Aufstellung des Modells der S-Zustände. Dabei sammelt eine Redoxkomponente S (vom engl. store) durch aufeinanderfolgende Absorption von vier Lichtquanten vier Oxidationsäquivalente an. Durch Abgabe von molekularem Sauerstoff kehrt das System in

den Anfangszustand zurück. Mit den S-Zuständen werden die Redoxzustände des Mn-Clusters bezeichnet (Ono et al. 1992; Roelofs et al. 1996; Yachandra et al. 1996; Iuzzolino et al. 1998).

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte die Struktur des Mn-Clusters nicht eindeutig geklärt werden (Zouni et al. 2001). Abstände der Atome im Mn-Cluster erhält man über die Röntgenabsorptionsspektroskopie. Diese Untersuchungen wurden am S_2 -Zustand durchgeführt (Yachandra et al. 1986; MacLachlan et al. 1992; Yachandra et al. 1993; DeRose et al. 1994). Alle Ergebnisse wurden im sog. Berkeley-Modell (vgl. Abb. 4.2) zusammengefasst.

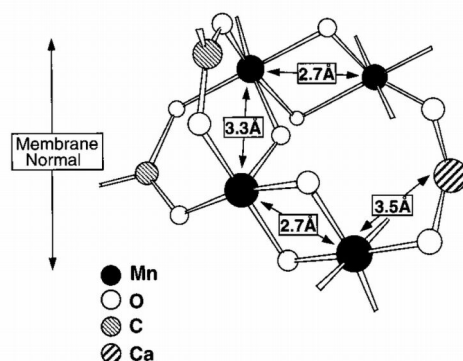


Abb. 4.2 Das Berkeley-Modell für den Mn-Cluster (Cinco et al 1998).

In diesem Modell sind zwei Paare von Mn-Atomen über eine Carboxylatobrücke verbunden. Sie haben einen Abstand von 3.3 Å. Die beiden Mn-Atome innerhalb eines Paares sind durch zwei Sauerstoffatome über eine μ -oxo-Brücke und einen Abstand von 2.7 Å verbunden. Der Abstand eines Mn-Atoms von einem Sauerstoffatom einer μ -oxo-Brücke beträgt 1.8 Å. Liganden des Mn-Clusters wird ein Abstand von 2.1 Å zugeordnet, sie stammen von Stickstoff- und Sauerstoffatomen. Im Mittel binden pro Mn-Atom 2 ± 1 Stickstoff- bzw. Sauerstoffatome in einem Abstand von 1.8 Å und 3 ± 1 Stickstoff- bzw. Sauerstoffatome in einem Abstand von 2.1 Å. Neben Mangan ist Kalzium essentiell für die Wasserspaltung (Yocum 1992). Die Röntgenstrukturanalyse konnte nicht klären, ob und wie viele Ca^{2+} -Ionen mit dem Mn-Cluster assoziiert sind. Nachdem das Ca extrahiert und durch Sr ersetzt wurde, konnte mittels der Röntgenabsorptionsspektroskopie an der Sr-Kante ein Abstand von 3.5 Å bestimmt werden (Cinco et al. 1998). Detaillierte Erkenntnisse über Liganden des Mn-Clusters von D1 und D2 wurden durch ortsspezifische Mutagenese gewonnen. Die Art der Liganden sind aber für die Auswertung der experimentellen Daten dieser Arbeit nicht von

Belang. Es wird deshalb auf die Fachliteratur verwiesen (Debus et al. 1991; Debus 1992; Pakrasi und Vermaas 1992).

Ein neuer Ansatz, Informationen über den wasserspaltenden Komplex zu erhalten, ist es, die Mn-Atome des Clusters durch Fe-Atome zu ersetzen. Mit Hilfe des DPC/DCIP-Inhibitionsansatzes wurde von Semin et al. (1995) gezeigt, dass Fe an Stelle des Mn binden kann, wenn die Mn-Atome vorher extrahiert wurden. Gibt man zu einer Lösung von PSII, dessen Mn-Cluster entfernt wurde, und dem künstlichen Elektronenakzeptor 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) den Elektronendonator 1,5-Diphenylcarbazid (DPC) und belichtet diese dann, so stellt man eine Reduktion des DCIP fest. Diese läßt sich optisch bei 600 nm verfolgen.

Des weiteren ist bekannt, dass nach Extraktion der Mn-Atome zum Wiedereinbau Mn^{2+} und Licht (Photoreaktivierung) nötig sind (Tamura und Cheniae 1987). Das Licht dient zum Elektronentransport durch das PSII, da Mn^{2+} beim Einbau oxidiert werden muss. Höhere Oxidationsstufen des Mn bauen nicht ein. Analog dazu bindet Fe^{2+} unter Belichtung, Fe^{3+} hingegen nicht. Es gibt gute Gründe anzunehmen, dass Untersuchungen an Fe-ersetzten Clustern auf den nativen Mn-Cluster übertragbar sind:

- Fe und Mn bevorzugen die Koordinationszahl sechs und die Oxidationszahlen II bzw. III, wobei Mn im Gegensatz zu Fe noch in höheren Oxidationsstufen vorkommt.
- Fe und Mn besitzen in diesen Oxidationszuständen sehr ähnliche Ionenradien.
- Es gibt Enzyme, die sowohl mit Fe als auch mit Mn im katalytischen Zentrum aktiv sind, wie es z.B. die kammialistischen Superoxiddismutasen sind (Martin et al. 1986).
- Kinetische Messungen zu Photoaktivierung des PSII haben gezeigt, dass unter dem Einfluß von Licht zunächst zwei Mn-Ionen binden. Die übrigen beiden Mn-Atome können auch im Dunkeln binden, allerdings weniger fest (Tamura und Cheniae 1987; Ahlbrink et al. 2001). Umgekehrt ist es ebenso, dass sich zwei Mn-Atome leicht aus dem Mn-Cluster extrahieren lassen (Miyao und Murata 1984; Ono und Inoue 1984). Der Bindungsplatz der beiden stärker bindenden Mn-Atome wird als "high-affinity Mn-binding site" bezeichnet. Aus der Hemmungskinetik im DPC/DCIP-Ansatz für Fe^{2+} kann geschlossen werden, dass bei Fe mindestens zwei Ionen binden. Die Fe-Atome besetzen die gleichen hochaffinen Bindungsplätze (Semin et al. 1995; Semin et al. 1998; Ahlbrink et al. 2001).

4.2 Probenpräparation

4.2.1 Präparation und Extraktion des Mn-Clusters

Die Präparation der gemessenen PSII Proben wurde von Dr. Boris Semin von der Universität Moskau bei seinen Gastaufenthalten an unserem Institut durchgeführt.

Die PSII-Membranfragmente wurden aus den Chloroplasten von Blattspinat (*Spinacia oleracea*) gewonnen (Berthold et al. 1981; Ghanotakis und Babcock 1983). Dazu werden die Spinatblätter zunächst gewaschen und eine Stunde bei 4 °C im Dunklen gelagert. Anschließend werden die Zellen der zerkleinerten Blätter mittels eines Ultra-Turrax aufgebrochen. Durch Zentrifugation bei 300g werden die größeren Zellbruchstücke abgetrennt. Der Überstand wird dann nochmals mit 4000g zentrifugiert, wobei sich die Chloroplasten im Pellet ansammeln. Das Pellet wird in einer geringen Salzkonzentration resuspendiert, so dass die Chloroplasten auf Grund des osmotischen Drucks platzen. Durch Zugabe von Triton X-100 (1 Triton/20 Chl) erreicht man das Solubilisieren der Membranen. Wählt man eine geeignete Inkubationszeit (25 min), so lösen sich nur die Stromalamellen auf, während die gestapelten Granathylakoide noch intakt bleiben. Zentrifugiert man diese Suspension bei 3500g, so erhält man einen weißen Niederschlag, der hauptsächlich aus Stärkekörnern besteht. Den Überstand zentrifugiert man nochmals mit 40000g. Das entstehende Pellet enthält die PSII-reichen Membranfragmente. Zur Aufbewahrung suspendiert man diese in einem Puffer aus 0.4 M Sucrose, 10 mM NaCl, 50 mM MES/NaOH pH 6.0 und friert sie in flüssigem Stickstoff ein. Die auf diese Weise erzeugten PSII-Membranfragmente weisen unter Belichtung typischerweise eine Sauerstoffentwicklungsrate von 300 bis 400 $\mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl} \cdot \text{h})$ auf, gemessen mit einer Hansatech Sauerstoffelektrode mit 0.4 mM Phenyl-p-benzoquinone als Elektronenakzeptor. Zur Bestimmung des Chl-Gehalts mischt man 1 ml der zu bestimmenden Chl-Lösung mit 4 ml Aceton und misst anschließend die Absorption bei 652 nm. Die Chl-Konzentration c_{Chl} in $\mu\text{g/ml}$ berechnet sich dann zu: $c_{\text{Chl}} = 5 (29D_{652})$ (Arnon 1949).

Die Extraktion des Mn-Clusters erfolgt nach der Methode von Hsu (Hsu et al. 1987). Dazu werden PSII-Membranfragmente in einer Konzentration von 0.5 mg Chl/ml für 15 min bei 20 °C in 0.8 M Tris und pH 8.5 inkubiert. Anschließend werden die Membranen abzentrifugiert, gewaschen und in einem Puffer aus 0.4 M Sucrose, 15 mM NaCl, 50 mM MES (4-

Morpholinethansulfonsäure)/NaOH pH 6.5 resuspendiert. Bei dieser Prozedur gehen neben den 4 Mn-Atomen des Mn-Clusters auch noch das Ca^{2+} -Ion und die extrinsischen Proteine verloren.

4.2.2 Proben für die XAS-Untersuchungen am PSII

Für die XAS-Experimente wurden 1mm dicke PVC-Plättchen mit herausgefrästen Fenstern verwendet, auf die mit Zweikomponentenkleber (Uhu plus schnellfest) auf einer Seite eine Mylar-Folie aufgeklebt wurde. Darauf wurden knappe 150 μl eines Pellets aus PSII-Membranfragmenten mit einem kleinem Spatel aufgebracht. Die andere Seite wurde dann mit selbstklebender Mylar-Folie luftdicht abgeschlossen und die Probe in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Alle EXAFS-Proben mit PSII-Fragmenten wurden aus ehemaligen Mößbauer-Proben hergestellt. Damit wird sichergestellt, dass Ergebnisse aus dem Mößbauer-Experiment ohne Einschränkungen auf die Auswertung der EXAFS-Daten übernommen werden können. Insbesondere der Fe-Gehalt pro PSII ist von entscheidender Bedeutung. Für Mößbauer-Proben wird das Isotop ^{57}Fe benötigt. Für XAS-Untersuchungen ist es nicht von Relevanz, welches Isotop verwendet wird.

Das für diese Experimente benötigte ^{57}Fe -Salz erhält man durch Auflösen von metallischem ^{57}Fe in konzentrierter Schwefelsäure. Nach dem Eintrocknen erhält man das Salz $^{57}\text{FeSO}_4$. In diesem Salz, das durch Schwefelsäurereste sauer ist, ist Fe in der Oxidationsstufe II stabil und neigt nicht zur Oxidation. Für die Inkubation von PSII mit Fe^{2+} wurde dieses Salz kurz vor der Präparation in 0.6 M Sucroselösung gelöst. Zur Herstellung einer Fe^{3+} -Lösung verdünnt man obige Lösung soweit, dass der Fe-Gehalt etwa 160 μM beträgt. Dann stellt man den pH-Wert mit HCl auf ca. 1.5 ein und versetzt das Ganze mit soviel 30 %-iger Wasserstoffperoxidlösung bis der H_2O_2 -Gehalt etwa 200 μM ist. Dann bringt man die Lösung mit NaOH auf einen pH-Wert von 5.5, wobei sich kein Niederschlag von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bilden sollte. Trotzdem empfiehlt es sich, für 10 min bei 15000g zu zentrifugieren.

Es wird solange eine 160 μM ^{57}Fe -in-Sucrose-Lösung zu PSII-Membranfragmenten in 0.4 M Sucrose, 15 mM NaCl, 50 mM MES/NaOH pH 6.5 zugegeben, bis eine Konzentration von 1.5 μM Fe erreicht wird. Inkubiert werden die PSII-Fragmente unter schwachem Licht. Anschließend werden sie für eine halbe Stunde bei 26000g zentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 0.4 M Sucrose, 15 mM NaCl, 50 mM MES/NaOH pH 6.5 gewaschen und

anschließend in 25 ml desselben Puffers resuspendiert. Nun wird für eine Stunde bei 100000g zentrifugiert. Das Pellet wird nochmals gewaschen und in den jeweiligen Probenhalter überführt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Je nach gewünschter Probe setzt man unterschiedlich präparierte Membranfragmente ein und für die Fe-Lösung $^{57}\text{Fe}^{2+}$ oder $^{57}\text{Fe}^{3+}$.

4.2.3 Abschätzung des Fe-Gehalts aus dem Mößbauer-Spektrum

Mit Hilfe der Gleichung (2.31) und (2.32) läßt sich aus der Fläche des Mößbauer-Spektrums der Eisengehalt der Probe berechnen:

$$n_{\text{Fe}} = \frac{2A}{\pi\sigma_0\Gamma_{\text{nat}}Rf_s f_a} \quad (4.3)$$

A ist die Fläche des Mößbauer-Spektrums. n_{Fe} ist die Anzahl der Fe-Atome pro Absorptionsfläche der Probe. Da der Chl-Gehalt der Probe bekannt ist, läßt sich über dessen molare Masse (900 g/mol) und der Tatsache, dass etwa 220 Chl-Moleküle pro PSII in der Präparation vorliegen, der PSII-Gehalt der Probe und somit auch das Verhältnis von Fe zu PSII ermitteln.

Allerdings tritt das Problem auf, dass der Lamb-Mößbauer-Faktor f_a der Probe unbekannt ist. Aus Untersuchungen an Myoglobin bei etwa 5 K ist bekannt, dass für Myoglobin f_a um 0.8 liegt (Parak et al. 1987; Gaßmann 2000). Dieser Wert für f_a wurde auch hier verwendet. Aus den 5K-Spektren läßt sich also der Fe-Gehalt abschätzen. R liegt für alle Proben ebenfalls bei 0.8 und der Lamb-Mößbauer-Faktor der verwendeten Quellen f_s beträgt 0.75.

4.3 Experimente und Auswertung

Da XAS auf alles Eisen in der Probe sensitiv ist, wurde versucht, mit Hilfe von Vergleichsproben den Anteil des Fe-Clusters, welcher an Stelle des Mn-Clusters bindet, zu isolieren. Es wurden folgende Proben untersucht:

Probe 1: (PSII-4Mn)

Probe 2: (PSII-4Mn)+Fe²⁺+☞

Probe 3: (PSII-4Mn)+Fe³⁺+☞

Probe 4: Fe²⁺ in 0.6 M Sucrose

Die Bezeichnung PSII-4Mn steht dafür, dass vor Inkubation der Mangancluster extrahiert wurde. Das Symbol ☞ zeigt, dass die Probe bei der Zugabe von Fe²⁺ oder Fe³⁺ mit Licht bestrahlt wurde. Die Zugabe von Fe²⁺ oder Fe³⁺ erfolgte wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben in einer Sucrose-Lösung. Aufbauend auf den Ergebnissen der Mößbauer-Spektroskopie, konnte für Probe 2 und Probe 3 die genaue Anzahl an spezifisch und unspezifisch gebundenen Eisen nach Gleichung (4.3) ermittelt werden.

Die Spektren von Probe 1-4 wurden bei etwa 35 K bestimmt und zeigen signifikante Unterschiede im Bereich $k = 8 \text{ \AA}^{-1}$. Die Güte der Daten ließ eine Auswertung bis $k = 11 \text{ \AA}^{-1}$ zu.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
"pre-edge" Fläche [10^{-2} eV]	4	7	6	8

Tab. 4.1 Wert für die "pre-edge" Fläche des XAS-Spektrums von Probe 1, 2, 3 und 4.

Die Fläche des Vorkantenpeaks konnte für alle Spektren mit einem Wert kleiner $8 \times 10^{-2} \text{ eV}$ bestimmt werden (vgl. Tab. 4.1). Die EXAFS-Spektren und ihre nicht phasenkorrigierte Fourier-Transformierten von Probe 1, 2 und 3 sind im Abb. 4.3 dargestellt.

Alle Proben, die das PSII enthalten, besitzen das Nichthäm-Fe und das Fe des Cytochroms. Darüber hinaus binden beim Fe-Austausch die Metallionen nicht nur an die freien Bindungsstellen, sondern auch unspezifisch, z. B. an Carboxylgruppen von Aminosäuren an der Proteinoberfläche. In isolierter Form findet man diese unspezifisch gebundenen Fe-Spezies, wenn intakte PSII-Membranfragmente oder (PSII-4Mn)-Membranfragmente direkt mit Fe³⁺ behandelt werden. Außerdem tritt unspezifisch gebundenes Eisen auch auf, wenn die Proben bei der Rekonstitution nicht belichtet werden. Probe 2 enthält zusätzlich pro PSII im

Mittel zwei unspezifisch gebundene Fe-Atome und vier spezifisch gebundene Fe Atome. Probe 3 enthält neben den nativ gebundenen Fe-Atomen im Mittel nur 6 unspezifisch gebundene Fe-Atome. Um die Spektren voneinander abziehen zu können, wurden für jedes Spektrum 250 äquidistante Wertepaare bestimmt, wobei für jedes Spektrum die gleichen Abszissen-Werte zugrunde lagen. Die Spektren wurden mit ihrem jeweiligen Eisenanteil gewichtet. Ein Spektrum A (bzw. B) erhält man durch Subtraktion des Spektrums der Probe 1 von dem der Probe 2 (bzw. der Probe 3). In Spektrum A ist der Anteil des nicht-Häm-Fe und des Fe des Cytochroms nicht mehr vertreten. Spektrum B representiert lediglich das an der Proteinoberfläche unspezifisch gebundene Fe. Die Differenz von Spektrum A und B spiegelt nun die spezifisch gebundenen Fe-Atome wider.

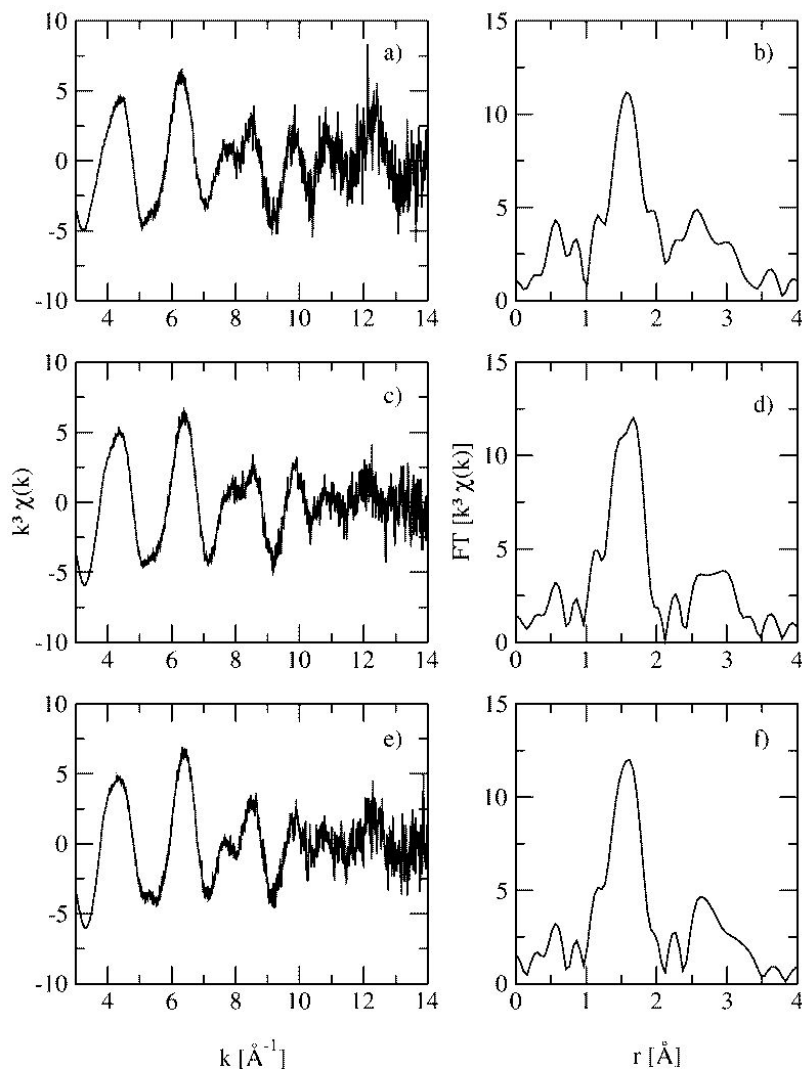


Abb. 4.3 k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren nach der Datenreduktion und ihre nicht phasenkorrigierte Fourier-Transformierte von Probe 1 (a, b), Probe 2 (c, d) und Probe 3 (e, f). Die Transformation der Spektren in den k -Raum erfolgte nach Bestimmung der Kantenlage E_0 (vgl. Gleichung (2.27))

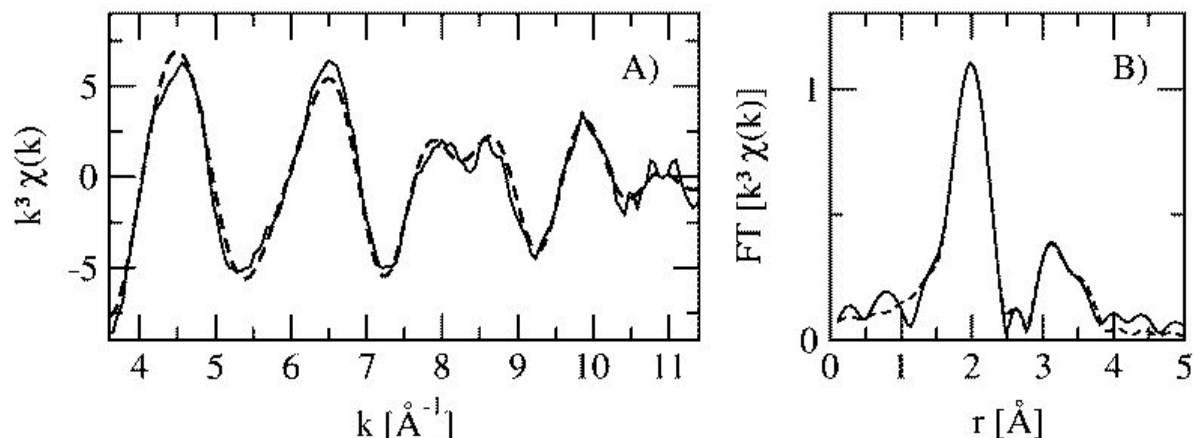


Abb. 4.4 A) k^3 -gewichtetes Fe-Differenz-EXAFS-Spektrum (durchgezogene Linie) und Anpassung eines Modells aus der Mößbauer-Spektroskopie (gestrichelte Linie); B) Fourier-Transformierte.

Abb. 4.4 zeigt das k^3 -gewichtete Differenz-EXAFS-Spektrum und seine Fourier-Transformierte mit der Anpassung eines Modells aus der Mößbauer-Spektroskopie. Die Anpassung wurde mit dem Programm EXCURV92 erstellt (Binsted et al. 1992) und an das k^3 -gewichtete Fe-Differenz-EXAFS-Spektrum angepasst. Das Modell aus der Mößbauer-Spektroskopie geht von einem trinuclearen Eisen-Cluster aus. Ein weiteres Eisenatom bindet wahrscheinlich an den Ca-Bindungsplatz (Reiner 2000). Da zwischen den Mn-Bindungsplätzen und dem Ca-Bindungsplatz nicht unterschieden werden konnte und auch die Umgebung der 3 Fe-Atome an den Manganbindungsplätzen unterschiedlich ist, konnten lediglich Mittelwerte bestimmt werden.

	N	r [Å]	A [Å ²]
Fe-O/N	2.53±0.10	1.94±0.02	0.003±0.0008
Fe-O/N	3.65±0.13	2.07±0.02	0.003±0.0008
Fe-O/N	2.03±0.22	2.99±0.02	0.003±0.0008
Fe-O/N	2.18±0.44	3.36±0.02	0.003±0.0008
Fe-Fe	1.0	3.38±0.02	0.011±0.003
E_F [eV]		-9.58	
R [%]		18.43	

Tab. 4.2 Koordinationszahlen N, Bindungsabstände r, A-Faktoren $A = 2 \langle \chi^2_{XAS} \rangle$, Kantenverschiebungsenergie E_F und der R-Faktor der Anpassung des Differenz-EXAFS-Spektrums.

Durch Vergleich mit dem Modell des Mn-Clusters (vg. Kap. 4.1) konnten mögliche mit den Fe-Atomen ligandierete Atome und Aminosäuren bestimmt werden. Ähnlich streuende Atome (z.B. N, O) mit gleichem Abstand zum Absorberatom wurden in 5 Schalen zusammengefasst. Mit diesem Ansatz wurden durch Anpassung der Besetzungszahlen, der Abstände, einem A-

Faktor für den Eisen-Eisen-Abstand und einem A-Faktor für alle anderen Schalen die in Tab. 4.2 dargestellten Werte bestimmt. Dabei wurde die Besetzungszahl für den Fe-Fe Abstand auf 1 fixiert. In einem trinuklearen Cluster, der linear angeordnet ist, sieht im Mittel jedes Eisenatom 1.33 Eisenatome als Nachbarn. Mit noch einem Fe-Atom am Ca-Bindungsplatz, welches kein Fe-Atom als Nachbarn besitzt, sieht somit jedes Fe-Atom im Mittel ein Fe-Atom als Nachbarn. Es konnte ein Eisen-Eisen-Abstand von 3.38 Å bestimmt werden. Durch Anpassung der einzelnen Schalen (vgl. Abb. 4.4) konnte der R-Faktor auf 17.43 % gesenkt werden.

Das k^3 -gewichtete Fe-EXAFS-Spektrum von Probe 4 in Abb. 4.5 A konnte bei 35 K bis $k = 14 \text{ \AA}^{-1}$ ausgewertet werden. Es wurde mit einem Modell aus einem Fe-Atom, umgeben von sechs Sauerstoffatomen, angepasst. Alle Sauerstoffatome wurden in einer Schale zusammengefasst und mit einem gemeinsamen A-Faktor angepasst (vgl. Tab. 4.3). In der Fourier-Transformierten des k^3 -gewichteten Fe-EXAFS-Spektrum von Probe 4 in Abb. 4.5 B kann außer dem Peak bei etwa 2 Å kein weiterer Peak beobachtet werden.

	N	r [Å]	A [Å ²]	E _F [eV]	R-Faktor [%]
Fe-O	6	2.11 ± 0.02	0.006 ± 0.001	-4.35	23.3

Tab. 4.3 Koordinationszahl N, Bindungsabstand r und A-Faktor $A = 2 \langle x^2 \rangle$ für die Anpassung an das k^3 -gewichtete Fe-EXAFS-Spektrum von Probe 4 in Abb. 4.5 A.

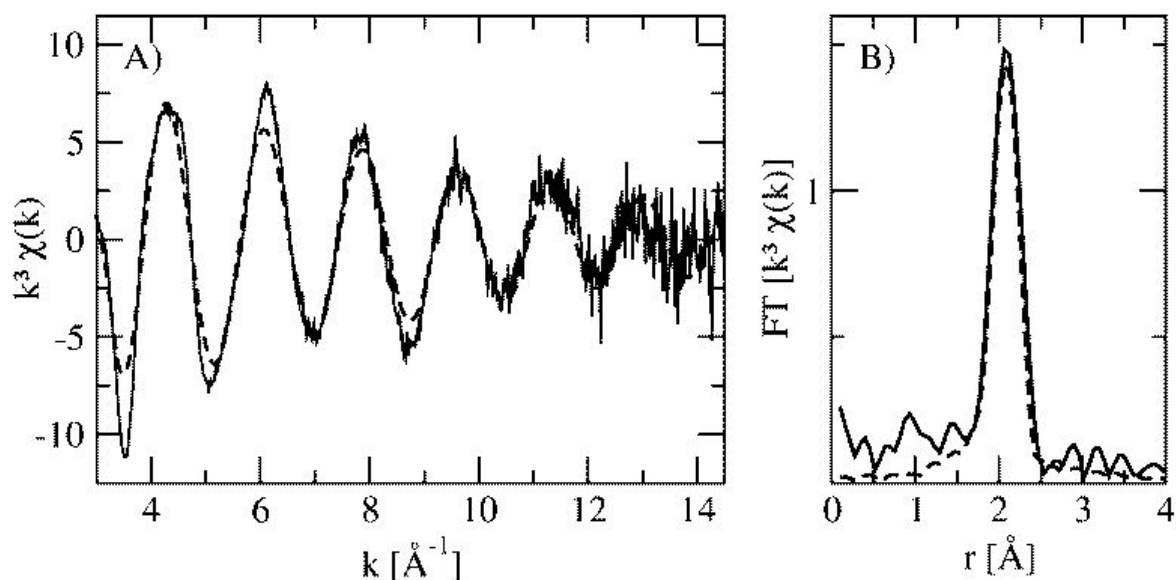


Abb. 4.5 A) k^3 -gewichtetes Fe-EXAFS-Spektrum von Fe^{2+} in Sucrose (durchgezogene Linie) und Anpassung mit einem Fe-Atom, umgeben von sechs Sauerstoff-Atomen (gestrichelte Linie); B) Fourier-Transformierte

4.4 Charakterisierung des Mn ersetzenden Fe-Clusters im PSII aus Spinat

Mittels Mößbauer-Spektroskopie wurde folgendes Bild über die Bindung des Eisens gewonnen (Reiner 2000): Bei Behandlung von (PSII-4Mn)-Membranfragmenten mit Fe^{2+} und Belichtung bildet sich an Stelle des Mn-Clusters ein $[\text{Fe}_3\text{O}_x]$ -Cluster aus drei Fe^{3+} -Ionen im high-spin-Zustand, in dem die Spins der drei Fe-Ionen zu einem Gesamtspin von $S = 1/2$ koppeln. Zusätzlich bindet noch ein Fe^{2+} -Ion im low-spin-Zustand entweder an den vierten, noch freien Mn-Bindungsplatz oder an die Ca-Bindungsstelle. Letzteres ist möglich, da bei der Prozedur zur Entfernung des Mangans auch das Kalzium mit entfernt wird. Es wurden für solch einen $[\text{Fe}_3\text{O}_x]$ -Cluster keine Beispiele in der Literatur gefunden.

Von entscheidender Bedeutung dafür, dass Eisen anstelle des Mn-Clusters bindet, ist es, die Zugabe von Fe^{2+} -Ionen unter Belichtung durchzuführen. Die Fe^{2+} -Ionen werden in einer 0.6 M Sucroselösung zugegeben. Die Rückbindung von Mn-Atomen nach Extraktion des Mn-Clusters erfolgt in einzelnen Schritten (Ahlbrink et al. 2001). Die Eisenionen besitzen eine vergleichbare hohe Affinität zu den Mn-Bindungsplätzen und werden auch an dieser Stelle oxidiert. So liegt die Vermutung nahe, dass auch die Eisenionen schrittweise eingebaut werden. Wichtig dabei ist, dass die Eisenionen in der Sucroselösung keine Eisen-Cluster bilden. An das k^3 -gewichtete Fe-EXAFS-Spektrum von Probe 4 konnte ein Modell aus einem Fe-Atom, umgeben von sechs Sauerstoffatomen, angepasst werden (vgl. Abb. 4.5 A). Für die sechsfache Ligandierung spricht die Fläche des "pre-edge" Peaks. Es wurde kein Eisen-Eisen-Abstand festgestellt (vgl. Abb. 4.5 B). Das zeigt, dass Sucrose fähig ist, isolierte Fe^{2+} -Ionen zu stabilisieren. Somit sind die Rahmenbedingungen für den schrittweisen Einbau der Fe^{2+} -Ionen bei Zugabe in Sucrose gegeben.

Grundlage für die Bestimmung des Differenz-EXAFS-Spektrum ist die genaue Kenntnis der Anzahl der Eisenatome in den Proben 1-3. Gewährleistet wird dies dadurch, dass sowohl bei Probe 2 und Probe 3 an denselben Proben gemessen wird, an denen zuvor Mößbauer-Untersuchungen durchgeführt wurden. Anhand der Fläche unterhalb des Mößbauer-Spektrums konnte die Anzahl der Eisenatome pro PSII bestimmt werden. Die Zahl der Eisenatome für Probe 2 und Probe 3 stimmt auch mit dem Verhältnis aus zugegebener Menge an Eisenatomen in der Sucroselösung und der Anzahl von PSII in der Probe überein. Die Eisenanzahl von Probe 1 ist aus der Literatur bekannt. Wichtig ist, dass bei der Extraktion des Mn-Clusters das Psb V mit einem Häm-Eisen ebenfalls verloren geht (vgl. Abb. 4.1). Das erhaltene Differenz-EXAFS-Spektrum unterscheidet sich stark von den gemessenen EXAFS-

Spektren. Bei der Anpassung des Differenz-EXAFS-Spektrums diene auch die Besetzungszahl der einzelnen Stickstoff/Sauerstoffschalen als Parameter. Bei EXAFS-Untersuchungen am Mn-Cluster konnte eine Verkürzung des Sauerstoffabstandes bei Mn-verbrückenden Sauerstoffen beobachtet werden (Dittmer 1999). Dies legt die Unterscheidung in zwei Schalen von Stickstoff/Sauerstoffschalen im Bereich von 2 Å nahe. Zum einen ist dies eine Schale, in der sich die verbrückenden Sauerstoffatome befinden, und zum anderen eine Schale, in der sich die Ligandierenden Sauerstoffe/Stickstoffe der Aminosäurereste befinden. Der bestimmte Unterschied von 0.13 Å der beiden Schalen liegt im Bereich der Auflösung der Röntgenabsorptionsspektroskopie und rechtfertigt dieses Vorgehen. Betrachtet man die "pre-edge" Fläche, so zeigt jedes Spektrum eine eindeutige sechsfache Ligandierung der in ihr enthaltenen Eisenatome. Dies lässt den Schluß zu, dass auch die Fe-Atome, die den Mn-Cluster ersetzen, sechsfach ligandiert sind. Die Summe der Besetzungszahlen von den nahen Sauerstoffschalen ergibt ungefähr die Zahl 6. Somit passt auch dieser durch die Anpassung erhaltene Wert in das Bild der sechsfachen Ligandierung. Aus der Anpassung des Differenz-EXAFS Spektrums konnte der nähere Eisen-Sauerstoff-Abstand zu 1.94 Å bestimmt werden. Die Besetzungszahl von 2.53 für diese Schale deutet auf eine zweifache Verbrückung der Eisenatome im Cluster hin. Für eine di- μ -oxo-Brücke ohne weitere Liganden müßte bei diesem Abstand die Besetzungszahl 2.66 betragen. Bei einer μ -oxo-Brücke wäre er 1.33. Es ist aber nur eine Verkürzung des Abstandes beobachtet worden und nicht, dass es keine weiteren Liganden gibt, die ebenfalls einen solchen Abstand haben. Somit ist aus der Besetzungszahl nicht darauf zu schließen, ob die Eisenatome über μ -oxo-Brücken oder über di- μ -oxo-Brücken verbunden sind.

Es konnte ein Eisen-Eisen-Abstand von 3.38 Å bestimmt werden. Mit dem Fe-O-Abstand von 1.94 Å ergäbe dies einen Winkel zwischen den verbrückenden Sauerstoffen bei einer di- μ -oxo-Brücke und dem Eisen (\angle O-Fe-O) von knapp 60°. Gezeigt wurde, dass die Eisenatome im Cluster sechsfach ligandiert sind. Dies würde bei einer di- μ -oxo-Brücke für einen Winkel von 90° sprechen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Eisenatome innerhalb des Clusters über μ -oxo-Brücken verbunden sind. Bestätigt wird dieses Ergebnis noch durch den Vergleich des Eisen-Eisen-Abstandes mit dem Mangan-Mangan-Abstand im Mn-Cluster. Es wurden zwei Abstände beobachtet. Ein Abstand von 2.7 Å, der mit zwei Sauerstoffatomen überbrückt wird, und einen Abstand von 3.3 Å, welcher mit einem Sauerstoffatom überbrückt wird (vgl. Abb. 4.2). Dieser Vergleich und der Fe-Fe-Abstand von 3.38 Å liefert das Ergebnis, dass die Eisenatome im Cluster über μ -oxo-Brücken miteinander verbunden sind.

Aus Gleichung (2.14) ist die Korrelation zwischen Besetzungszahl und A-Faktor ersichtlich. Eine Erhöhung der Besetzungszahl kann durch eine Erhöhung des A-Faktors kompensiert werden, um die gleiche Güte der Anpassung des EXAFS-Spektrums zu erreichen. Der erhaltene A-Wert von 0.011 ± 0.003 der Fe-Fe-Schale stimmt mit Literaturwerten gut überein (Schiller et al. 1998; Dittmer 1999). Dieser Wert ist in diesem Fall ein Maß dafür, dass die Besetzungszahl richtig gewählt wurde.

Zu betrachten ist noch das vierte bindende Eisenatom. Es wurde gezeigt, dass Eisen auch die Ca-Bindungsstelle besetzen kann (Sandmann 1993). Mit den Mößbauer-Untersuchungen konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das Fe^{2+} -Ion den noch freien Mn-Bindungsplatz oder den Ca-Bindungsplatz besetzt. Aus dem Berkley-Modell wurde ein Mn-Ca-Abstand von etwa 3.5 \AA (vgl. Abb. 4.2) bestimmt. Die EXAFS-Ergebnisse konnten mit einem Modell angepasst werden, bei dem das vierte Eisen Atom keinen Beitrag zum Eisen-Eisen-Abstand liefert. Bei einem Abstand größer als 3.5 \AA wurde kein weiterer Peak in der Fourier-Transformierten beobachtet (vgl. Abb. 4.4). Sollte es an Stelle des vierten freien Mn-Bindungsplatzes binden, sollte ein Wert von 1.5 für die Besetzungszahl der Fe-Fe-Schale festgelegt werden. Bei einem Anpassungsversuch, bei der die Besetzungszahl der Fe-Fe-Schale freigelassen wurde, wurde eher eine Tendenz zu Besetzungszahlen kleiner eins festgestellt. Daraus kann der Schluß gezogen werden, dass das vierte Eisen an der Stelle des Ca-Bindungsplatzes bindet.

Zu klären ist nun noch die Tatsache, warum Fe^{2+} nur in belichteten Proben zu finden ist, obwohl überhaupt keine Oxidation notwendig ist. Man würde daher zunächst annehmen, dass es an (PSII-4Mn)-Membranfragmenten auch im Dunklen bindet. Wie beschrieben läuft die Photoreaktivierung des extrahierten Mn-Clusters in mehreren Schritten ab. Ebenso wird die Affinität des Ca-Bindungsplatzes zu Ca^{2+} erhöht, wenn zunächst die Mn-Bindungsstellen besetzt werden (Tamura und Cheniae 1987; Yocum 1991). Ein ähnlicher kooperativer Prozeß dürfte bei der Bindung von Fe^{2+} ablaufen. Zuerst müssen einige der Mn-Bindungsstellen von Fe^{2+} eingenommen und das Fe^{2+} oxidiert werden, d.h. erst bildet sich der Fe_3 -Cluster, bevor Fe^{2+} binden kann.

Die EXAFS-Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Mößbauer-Spektroskopie. Die Mößbauer-Ergebnisse können in einem in sich konsistenten Bild zusammengefasst werden. Sie sind aber mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Es ist nicht gänzlich ausgeschlossen, dass sich zusätzliche Fe_x -Cluster auch an anderen Stellen als an der des Mn-Clusters bilden.

5 High-Potential Iron Proteins (HiPIPs)

5.1 Grundlegende Eigenschaften

HiPIPs sind Elektronentransport-Proteine. Sie sind in der Proteinkette angesiedelt, welche das durch Lichtabsorption während der bakteriellen Photosynthese erzeugte freie Elektron zum Cytochrom bc_1 Oxidreduktase-Komplex transportiert. Aufgrund der Redoxverhältnisse innerhalb der Kette nimmt das unbeladene oxidierte HiPIP ein Elektron auf. Um den Transportprozess weiterlaufen zu lassen, muss das HiPIP das Elektron an ein Protein mit einer noch höheren Elektronenaffinität weiterleiten.

Man ordnet sie in die Kategorie der Eisen-Schwefel-Proteine ein (Carter et al. 1972; Cammack und Sykes 1992). Ihre leichte Bildung und thermische Robustheit sowie die weite Verbreitung in nahezu allen Organismen und die Übereinstimmung wesentlicher Aminosäuresequenzen lassen auf eine wichtige Rolle schon früh während der Evolution in Abwesenheit von O_2 schließen (Kaim und Schwederski 1991).

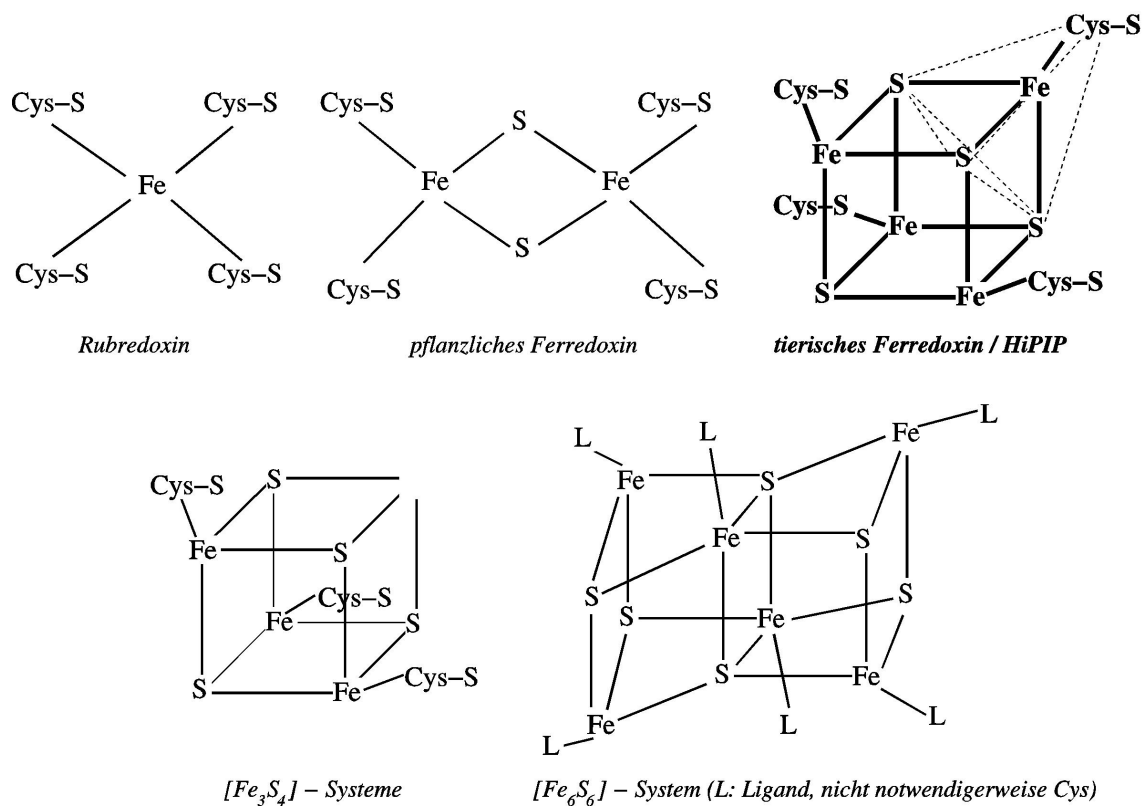


Abb. 5.1 Schematische Darstellung der prosthetischen Gruppen in Eisen-Schwefel-Proteinen und ihre Verbindung zum Proteinrückgrat.

Bei allen Eisen-Schwefel-Proteinen besteht das aktive Zentrum aus einer Anordnung von Eisen- und Schwefelionen. Typische prosthetische Gruppen von Eisen-Schwefel-Proteinen sind in Abb. 5.1 dargestellt (Bertini et al. 1995a). Der Eisen-Schwefel-Cluster liegt in erster Näherung in tetraedrischer Symmetrie vor. Die Eisenatome sind zumeist über das Schwefelatom der Cystein-Liganden mit dem Proteinrückgrat verbunden. Es existiert beispielsweise aber auch ein Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus* mit einem $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -Cluster und je zwei Cystein- und Histidin-Liganden (Fee et al. 1984). Auch gibt es $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -haltige Proteine mit drei Cystein- und einem Asparagin-Liganden. Als Beispiel sei hier das Ferredoxin III aus *Desulfovibrio africanus* angeführt (George et al. 1989). Bekannt sind darüber hinaus Mutationen von Eisen-Schwefel-Proteinen mit vier Cystein-Liganden im nativen Zustand, die unter einem Cys→Ser-Austausch stabil bleiben. Beispiele hierfür sind die C42S-Mutante des Rubredoxin von *Clostridium pasteurianum* (Meyer et al. 1995) und die hier untersuchte C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* (Babini et al. 1996; Bentrop et al. 1996).

5.1.1 Struktur des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters im HiPIP *C. vinosum*

Die Struktur des Metallzentrums des nativen HiPIPs aus *C. vinosum* ist aus Röntgenstrukturanalysen und NMR-Strukturbestimmungen bekannt (Carter et al. 1974; Bertini et al. 1995b). Ebenso ist die Struktur an der C77S-Mutante mit Hilfe der NMR (Bentrop et al. 1996) und der Röntgenstrukturanalyse (Mansy et al. 2002) bestimmt worden. In der stabilen C77S-Mutante des HiPIPs aus *C. vinosum* ist die Aminosäure Cystein 77 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht. Dies hat zur Folge, dass ein organischer Schwefel-

	NMR		Röntgenstruktur		
	oxidiert ¹	reduziert ²	oxidiert ³	reduziert ³	C77S ⁴
Fe-S _γ	2.02±0.2	2.06±0.2	2.21±0.03	2.22±0.03	2.35±0.01
Fe-S _ε	2.15±0.2	2.15±0.2	2.25±0.06	2.32±0.08	2.27±0.05
Fe-Fe	2.47±0.2	2.49±0.2	2.73±0.04	2.81±0.05	2.74±0.05
Fe-O _γ					2.16±0.08

Tab. 5.1 Bindungsabstände (in Å) für verschiedene $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster in HiPIPs von *C. vinosum* mit Hilfe der NMR oder der Röntgenstrukturanalyse bestimmt; S_γ = Cysteinschwefel, S_ε = Clusterschwefel, O_γ = Sauerstoff der an den Cluster bindenden Aminosäure Serin. Quellen: ¹(Bertini et al. 1995b), ²(Banci et al. 1995), ³(Jensen 1987), ⁴(Mansy et al. 2002)

ligand vom Cystein 77 des Metallzentrums gegen einen organischen Sauerstoffligand des Serins ausgetauscht ist (Babini et al. 1996). Das Metallzentrum in HiPIPs hat die Form eines verzerrten Würfels, der von vier Eisen- und vier Schwefelionen aufgespannt wird. Dabei sind die Eisenionen in Richtung des Würfelschwerpunktes und die Schwefelionen nach Außen verschoben (vgl. Abb. 5.2). Die Bindung zum Proteinrückgrat erfolgt über einen negativ geladenen Cystein-Liganden an jedem Eisenatom des Clusters. Die Sequenznummern I, II, III, IV der Cystein-Liganden variieren von HiPIP zu HiPIP. Für das HiPIP *C. vinosum* gilt I = 43, II = 46, III = 63, IV = 77. Strukturdaten des Eisen-Schwefel-Clusters in HiPIPs von *C. vinosum* sind in Tab. 5.1 angegeben.

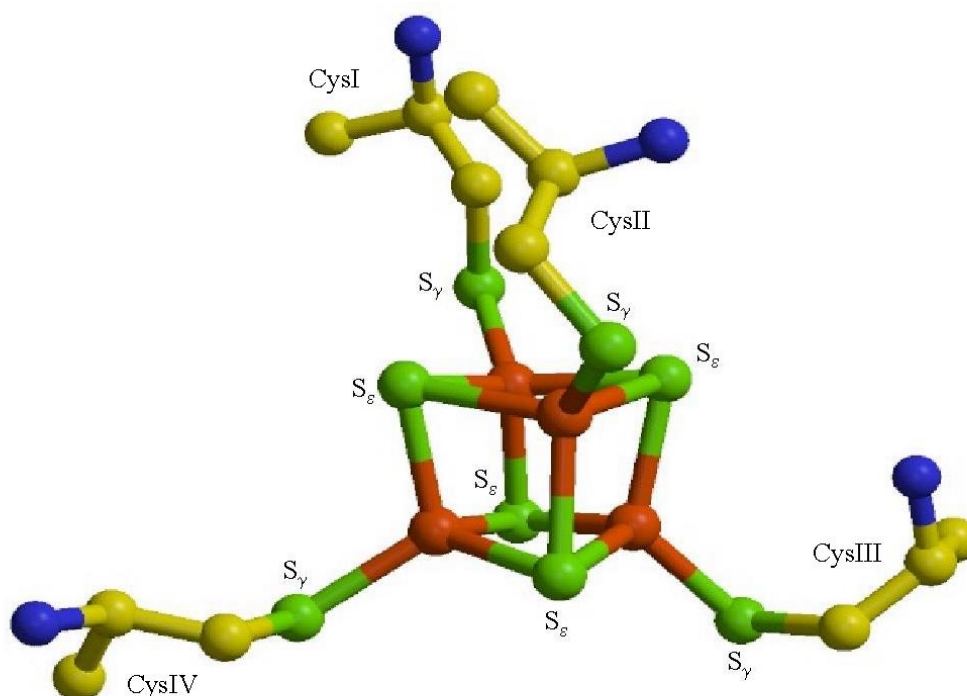


Abb. 5.2 Schematische Darstellung des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters aus HiPIPs mit vier Cystein-Liganden. Blau: Stickstoff; rot: Eisen; gelb: Kohlenstoff; grün S_γ : Cysteinschwefel; grün S_ϵ : Clusterschwefel.

5.2 Präparation der HiPIP Proben

5.2.1 Isolierung und Reinigung

Die Herstellung einer ^{57}Fe -angereicherten und damit auch für XAS-Messungen geeigneten Probe von nativen HiPIP *C. vinosum* wird im Weiteren beschrieben. Die Verfahren zur Erzeugung der *C. vinosum* C77S-Mutante (Babini et al. 1996) sind dem an dieser Stelle dokumentierten Protokoll sehr ähnlich. Die entsprechenden Proben wurden innerhalb einer Kooperation an den Lehrstühlen von Prof. Bertini in Florenz und Prof. Capozzi in Cesena hergestellt.

Die HiPIPs wurden nicht in dem Organismus produziert, der die Proteine *in vivo* erzeugt, sondern in *Escherichia coli*-Bakterien, in welche man das entsprechende *C. vinosum*-Gen eingeschleust hat (Ausubel et al. 1999; Sambrook et al. 2000). Grund dafür ist, dass *E. coli*s robuster sind, schneller wachsen und der Reinigungsprozess aufgrund des gentechnisch angefügten His₆-Tags einfacher ist.

In einer Petrischale mit sterilem LB-Medium, Amphicillin und Agar-Medium werden 50 µl der klonierten und gegen Amphicillin resistenten *E. coli*-Zellen aufgebracht. Diese lässt man 16 h lang bei 37 °C wachsen. Die Vermehrung der Bakterien erfolgt in einer „Minimal Medium“-Nährlösung. Für 500 ml "Minimal Medium"-Nährlösung werden 390 ml Wasser, 50 µl 1 M CaCl₂ und 10 ml 20 % (Massenanteil) Glukoselösung hinzugefügt. Hierzu gibt man 100 ml „M9 Salz“, das auf 1 l Gesamtvolumen 64 g Na₂HPO₄ 7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2.5 g NaCl und 5.0 g NH₄Cl enthält. Nun gibt man in die Mischung 1 ml 1 M MgSO₄, bevor 50 µl 10 mM „Tiamina“ (Vitamin B1) hinzugefügt werden. Zwei „Goodies“ werden beigegeben: „Goodies A“ enthält 214 mg MgO, 40 mg CaCO₃, 13.4 mg MnSO₄ H₂O, 30 mg ZnSO₄ 7H₂O, 5 mg CuSO₄ 5H₂O, 5 mg CaCl₂ 6H₂O, 1 mg H₃BO₃, 1 ml 37 % HCl und 20 ml ultrasteriles Wasser. Hiervon sind 625 µl dem Gemisch hinzuzufügen. „Goodies B“ besteht aus 12.5 mg in 0.5 ml Wasser gelöstem 90 %- ^{57}Fe -isotopenreinem Mohrschen Salz ($^{57}\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$). Dieses annähernd isotopenreine Mohrsche Salz ist die einzige eisenhaltige Chemikalie im "Minimal Medium“. Erzeugen die klonierten *E. coli*s HiPIP, so müssen sie das hierfür erforderliche Eisen dem Mohrschen Salz entnehmen. Letzter Bestandteil des "Minimal Medium“ sind 500 µl Lösung mit 0.1 µg/ml des Antibiotikums Amphicillin. Aus der Petrischale mit den gewachsenen Bakterien entnimmt man eine Kolonie, gibt diese mit 5 ml

der "Minimal Medium"-Nährlösung in ein Reagenzglas und lässt die Bakterien wiederum 16 h bei 37 °C wachsen. Die Lösung wird 15 Minuten bei 3150 rpm abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit den Bakterien in 0.5 ml Wasser wieder aufgelöst. Die Lösung wird für den letzten Wachstumsschritt in 500 ml "Minimal Medium" eingerührt und 20 h unter ständigem Schütteln bei 37 °C gehalten. Ist die optische Dichte auf 0.7 gefallen, so ist eine ausreichende Zahl von Bakterien gewachsen. Die Nährlösung mit den gewachsenen Bakterien wird 20 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgeschüttet worden ist, werden der Zellpaste 1 mM EDTA (Ethyldiaminotetraacetylsäure) beigegeben, durch welches restliche freie Eisenatome gebunden werden. Es wird so viel EDTA zugegeben bis das Pellet wieder verflüssigt ist. Das gesamte Material wird danach 1 h lang bei 4 °C und 3200 rpm zentrifugiert. Die Zellpaste wird danach in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Zellpaste wird mit 100 ml Pufferlösung (20 mM Tris 100 mM KCl 1 mM MgSO₄ 1 mM CaCl₂ pH 8.0) verdünnt und eine Spatelspitze DNase hinzugegeben. Die Suspension wird in eine French Press eingefüllt und unter Hochdruck durch ein winziges Loch expandiert. Durch den Druckunterschied reißen die Bakterienwände auf und die Zellflüssigkeit wird freigegeben. Die Flüssigkeit wird nun in der Ultrazentrifuge 1 h lang bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wird abgeschöpft.

Eine kommerziell erhältliche HiTrap-Säule mit 5 ml Fassungsvermögen (Firma Pharmacia Biotech) wird mit 5 ml 0.1 M NiCl aufgeladen. Das mit sechs Histidinen modifizierte HiPIP ligandiert mit hoher Affinität ans Nickel und wird als Bande von der HiTrap-Säule aufgehalten. Um die HiPIP-Fraktion von den Bindungsplätzen zu lösen, leitet man durch die Säule etwa 20 ml 20 mM Tris 300 mM Imidazol. Letzteres hat eine noch höhere Affinität zum Nickel als das Poly-Histidin am HiPIP, so dass das Protein von den Nickel-Bindungsstellen verdrängt wird. Um das Imidazol zu entfernen, wird die Lösung bei einem Cutoff von 3500 Da gegen 500 ml 40 mM Tris pH 6.0 im Eisbad viermal 30 Minuten dialysiert. Mit einem 10ml-Amicon wird die Lösung im Eisbad auf etwa 4 ml aufkonzentriert.

Mit Hilfe des Enzyms Restriktionsprotease Faktor Xa (Firma Boehringer Mannheim) werden die sechs Histidine vom modifizierten HiPIP abgetrennt. Danach wird die Proteinlösung erneut dialysiert, um das Enzym auszuspülen.

Es folgt eine Anionen-Austausch-Chromatographie an einer DEAE-Säule aus 15 g pulverförmigen Diethylaminoäthyl (DE52, Firma Whatman). Die Säule wird mit 100 ml 40

mM Tris pH 8.0 gespült. Füllt man die Proteinlösung ein, so bleibt diese aus elektrostatischen Gründen als dunkelgrünes Band hängen. Mit einem Gradientenbad KCl wird nun ein Puffer mit sukzessive steigender Kaliumchlorid-Konzentration durch die Säule gepumpt. Bei einer Konzentration von etwa 100mM KCl beginnt das Protein sich von der Säule zu lösen. Die Lösung ist nun von Bestandteilen mit anderen elektrischen Ladungszuständen gereinigt. Das Protein wird gegen 50 mM Phosphat pH7.5 dialysiert und wiederum auf etwa 4ml eingengt .

Diese Prozedur wird ausgehend von der HiTrap-Säule wiederholt. HiPIPs, dessen Histidin-Enden abgetrennt wurden, gleiten die Säule hinab. Der HiPIP-Anteil, dessen Poly-Histidin durch das Enzym nicht abgetrennt wurde, wird an das Nickel gebunden. Er wird getrennt durch Imidazol von der Säule gelöst, bevor er abermals mit dem Enzym behandelt wird. Man engt die Lösung mit dem erfolgreich vom His₆-Tag befreiten HiPIP abermals im 10 ml-Amicon auf etwa 4 ml ein und dialysiert das Konzentrat gegen den entgültigen Puffer aus 20 mM Phosphat bei pH6.8. Aus der Absorption des Eisenzentrums bei 388 nm, $A_{388} = 0.449$, kann die Endkonzentration des Proteins bestimmt werden.

5.2.2 Herstellung der verschiedenen HiPIP-Proben

Die Totalreduktion einer HiPIP-Probe erfolgt mittels Natriumdithionit, Na₂O₄S₂ (Dickson et al. 1974). Dieses gibt man in fünffachem Überschuss zu einer möglichst hoch konzentrierten HiPIP-Probe und stellt diese für 10 min in den Kühlschrank. Das Natriumdithionit entfernt man, indem man die Lösung in ein Centricon mit Abschneidemasse 5000 Da gibt, mit Puffer auffüllt und das Gemisch in einer Zentrifuge mit 5700 rpm auf das gewünschte Endvolumen einengt. Probleme durch Rückoxidation des Proteins treten dabei nicht auf, da HiPIPs im reduzierten Zustand stabil sind. Die beschriebene Präparation lieferte reduziertes HiPIP *C. vinosum* in 20 mM Phosphatpuffer bei pH6.8 bei einer Endkonzentration von 8.95 mM des Proteins. Die Probe der reduzierten C77S Mutante besaß eine Endkonzentration an Protein von 1.05 mM.

Das native reduzierte HiPIP *C. vinosum* wurde auch in einem stabilen Zwischenzustand untersucht. Die unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführte Zugabe von Guanidiniumchlorid (GdmCl, CH₆ClN₃) zu reduziertem nativem HiPIP *C. vinosum* bewirkt eine reversible teilweise Entfaltung des Proteins (Bertini et al. 1997; Bentrop et al. 1999). Über die GdmCl-Konzentration kann gesteuert werden, welcher Anteil des Proteins sich im teilweise entfaltenen Zustand und welcher sich im nativen Zustand befindet. Die Relation

zwischen "Intermediate"-Anteil und GdmCl-Konzentration ist mittels NMR aus dem Intensitätsverhältnis der überlagerten NMR-Muster beider Komponenten bestimmbar. Zur Herstellung einer Probe von teilweise entfaltetem reduziertem HiPIP *C. vinosum* präpariert man zunächst eine bis nahe der Löslichkeitsgrenze aufkonzentrierte 8.6 M GdmCl-Lösung in 20 mM Phosphatpuffer bei pH6.8. Zweite Mischungskomponente ist 8.95 M reduziertes natives HiPIP *C. vinosum* im selben Puffer. Bei einer Konzentration des GdmCl von 4.05 M erreicht man eine 100% teilweise Entfaltung der Probe. Damit das Protein intakt bleibt, ist eine Mischung zweier beiderseits entgaster Komponenten unter strikt anaeroben Bedingungen erforderlich. Die Mischung kann unter ständiger Argonatmosphäre in den Probenhalter gefüllt werden. Dieser wird verschlossen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Endkonzentration an Protein betrug 4.86 mM.

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

5.3 Ergebnisse und Auswertung

5.3.1 Strukturelle Untersuchungen am HiPIP aus *C. vinosum*

Abb. 5.3 zeigt k^3 -gewichtete, an der Eisen-Kante und einer Temperatur von etwa 35 K aufgenommene EXAFS-Spektren von reduziertem HiPIP *C. vinosum* im nativen, im teilweise entfalteten und im C77S-mutierten Zustand sowie dessen Fourier-Transformierte. Die Rohdaten weisen eine hohe statistische Güte auf und konnten bis $k = 14 \text{ \AA}^{-1}$ ausgewertet werden. Die Anpassung der Experimente erfolgte mit dem Softwarepaket EXCURV92 (Binsted et al. 1992). Hierzu wurden die EXAFS-Parameter gemäß Gleichung (2.14) ohne Berücksichtigung der Mehrfachstreuung an das Experiment angepasst.

Abb. 5.3 a zeigt das Fe-EXAFS-Spektrum von nativem reduziertem HiPIP *C. vinosum*. An dessen Fourier-Transformierten (Abb. 5.3 b) erkennt man die Bindungsabstände der Eisennachbarn bis etwa 3 \AA . Für die theoretische Auswertung wurden drei Schalen von Nachbarn berücksichtigt: die drei vom betrachteten Eisenatom aus sichtbaren anderen Eisenionen, der direkt ans Eisen ligandierte Cysteinschwefel und die drei unmittelbar benachbarten anorganischen Schwefelatome (vgl. Abb. 5.2). Auf das vom betrachteten Eisenatom aus am weitesten entfernte anorganische Schwefelatom, das Röntgenstrukturdaten zufolge bei etwa 3.5 \AA liegt, ist EXAFS offenbar nicht mehr sensitiv. So sieht man bei diesem Atomabstand weder in b eine merkliche Resonanz noch bei den anderen beiden Fourier-Transformierten HiPIP-Spektren (Abb. 5.3 d, f). Folglich blieb dieser Fe-S-Abstand bei der Anpassung der Experimente ebenso unberücksichtigt wie bei EXAFS-Untersuchungen an verwandten Systemen (Stephans et al. 1985; McDermott et al. 1988; George et al. 1989). Entsprechendes gilt für die noch weiter entfernten Eisennachbarn mit Abständen von bereits über 4 \AA , nämlich die Kohlenstoffe der Cysteine und diejenigen Cysteinschwefel, die an ein anderes als das betrachtete Eisenatom angelagert sind. Zwecks Parameterreduktion wurde hinsichtlich des A-Faktors nur zwischen Eisen und Schwefel unterschieden. Cystein- und anorganischer Schwefel wurden diesbezüglich gleich behandelt. Mit diesem Modell verbleiben nur sechs freie Parameter: drei Atomabstände, zwei A-Faktoren und die Kantenverschiebungsenergie E_F . Mit dieser für EXAFS sehr niedrigen Zahl freier Variablen wurde das in Abb. 5.3 a, b als gestrichelte Linie gezeichnete Theoriespektrum erhalten, das die experimentellen Daten sehr gut erklärt und die Parameter von Tab. 5.2a liefert.

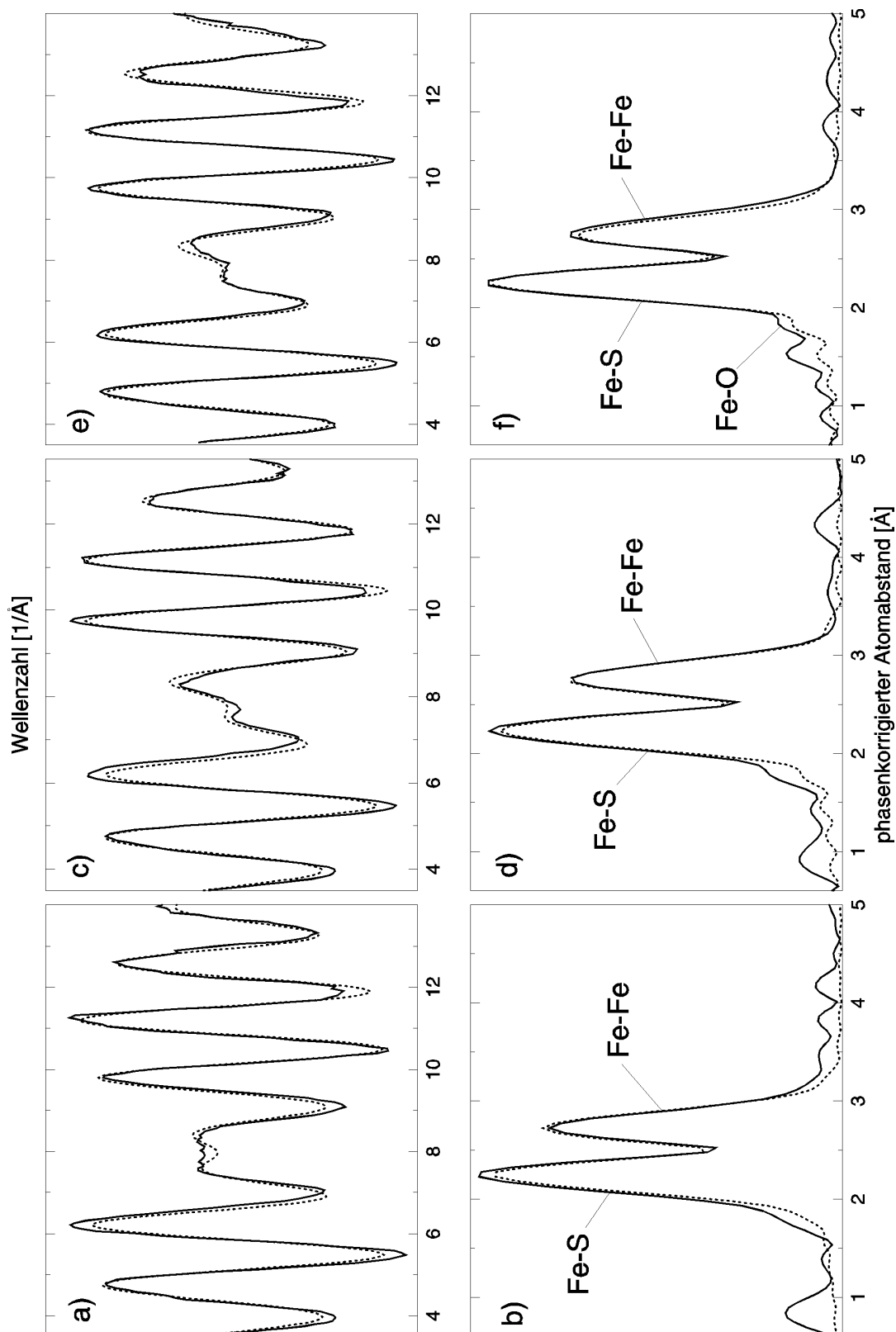


Abb. 5.3 durchgezogene Linien: k^3 -gewichtete Fe-EXAFS-Spektren bei $T = 35$ K (obere Reihe) und deren Fourier-Transformierte (untere Reihe) von reduziertem HiPIP *C. vinosum* a), b) nativ c), d) teilweise entfaltet e), f) C77S-Mutante; gestrichelte Linien: Least-Squares-Fits mit Softwarepaket EXCURV92 (Binsted et al. 1992) entsprechend der Parameter von **Tab. 5.2**.

In Abb. 5.3 c, d sind experimentelle und theoretische EXAFS-Kurven im Impuls- und im Ortsraum für das teilweise entfaltete reduzierte HiPIP *C. vinosum* zu sehen. Diese weisen im Vergleich zum nativen Protein kleine aber doch signifikante Änderungen auf. Die Experimente wurden mit demselben Modell wie im Fall des nativen HiPIPs angepasst, und es wurden die in **Tab. 5.2** b dargestellten Parameter erhalten.

	a) nativ			b) teilweise entfaltet			c) C77S-Mutante		
	N	r [Å]	A [Å ²]	N	r [Å]	A [Å ²]	N	r [Å]	A [Å ²]
Fe-Fe	3	2.71	$5.16 \cdot 10^{-3}$	3	2.73	$5.62 \cdot 10^{-3}$	3	2.72	$6.08 \cdot 10^{-3}$
Fe-S _ε	3	2.29	$1.86 \cdot 10^{-3}$	3	2.27	$5.21 \cdot 10^{-3}$	3	2.29	$1.92 \cdot 10^{-3}$
Fe-S _γ	1	2.20	"-"	1	2.27	"-"	0.75	2.22	"-"
Fe-O _γ	0	-	-	0	-	-	0.25	1.98	"-"
E _F [eV]	-5.04			-5.20			-4.61		
R (k ³)	19.6			15.6			15.3		
"pre-edge" [10 ⁻² eV]	23.19			22.26			21.95		

Tab. 5.2 Koordinationszahlen N, Bindungsabstände r und A-Faktoren $A = 2 \langle x^2_{XAS} \rangle$ für reduziertes HiPIP *C. vinosum* a) nativ b) teilweise entfaltet c) C77S-mutiert entsprechend der EXAFS-Anpassungen von Abb. 5.3; Fe: Eisen, S_ε: anorganischer Clusterschwefel, S_γ: Cysteinschwefel, O_γ: Serinsauerstoff

Schließlich sind in Abb. 5.3 e, f EXAFS-Spektrum und Fourier-Transformierte der reduzierten C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* dargestellt. Für die Anpassung musste der Sauerstoffligand des serinkoordinierten Eisens als eigene Komponente behandelt werden. Denn einerseits sind Fe-O- und Fe-S-Bindungsabstände typischerweise deutlich verschieden, andererseits sind die EXAFS-Streuphasen α_i (vgl. Gleichung (2.14)) für Sauerstoff und Schwefel stark unterschiedlich. Hinsichtlich des A-Faktors wurden wiederum die Eisenionen als eine Spezies und Schwefel- und Sauerstoffatome als andere Spezies behandelt. Den erhaltenen Parametersatz zeigt Tab. 5.2 c. Passt man alternativ den A-Faktor des Sauerstoffs separat an, so läuft dieser in ein artifizielles Minimum ein und nimmt ein unphysikalisches negatives Vorzeichen an. Optisch unterscheidet sich das EXAFS-Spektrum des nativen Proteins nur wenig vom EXAFS-Spektrum der Mutante. Es könnte eine Anpassung mit dem Modell des nativen HiPIPs versucht werden. Nimmt man aber statt des Sauerstoffes ein Schwefelatom an, so liefert die Anpassung einen höheren R-Faktor, in der Fourier-Transformierten kann die Schulter an der linken Flanke der Fe-S-Resonanz nicht reproduziert

werden und es läuft der Fe-S-Bindungsabstand auf einen untypisch niedrigen Wert. Dies motiviert die vorgenommene Unterscheidung zwischen Fe-O und Fe-S bei der Anpassung des EXAFS-Spektrums der Mutante.

5.3.2 Temperaturabhängige Untersuchungen am HiPIP aus *C. vinosum*

Beim nativen HiPIP wurden bei 40 K, 80 K, 130 K, 180 K, 200 K, 220 K und 260 K Spektren an der Eisen-Kante aufgenommen. Abb. 5.4 A zeigt bei einer Temperatur von etwa 40 K bzw. 260 K aufgenommene k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren von reduziertem nativem HiPIP. Das reduzierte teilweise entfaltete HiPIP wurde bei Temperaturen von 40 K, 130 K, 190 K und 245 K untersucht. Die Spektren bei Temperaturen von 40 K bzw. 245 K im teilweise entfalteten Zustand sind in Abb. 5.4 B zu sehen. Sowohl Abb. 5.4 A als auch Abb. 5.4 B zeigen eine deutliche Änderung der Amplitude mit der Temperatur. Es ist aber keine Änderung des Verlaufes zu beobachten. Abb. 5.5 A zeigt die Fourier-Transformierten der im Temperaturbereich gemessenen Spektren des nativen HiPIPs und Abb. 5.5 B zeigt die Fourier-Transformierten der im Temperaturbereich gemessenen Spektren des teilweisen entfalteten HiPIPs. Die Rohdaten weisen eine sehr hohe statistische Güte auf und konnten bis $k = 16 \text{ \AA}^{-1}$ ausgewertet werden (vgl. R-Faktor in Tab. 5.3 und Tab. 5.4). Die Anpassung der Experimente erfolgte mit dem Softwarepaket EXCURV98 (Binsted et al. 1992).

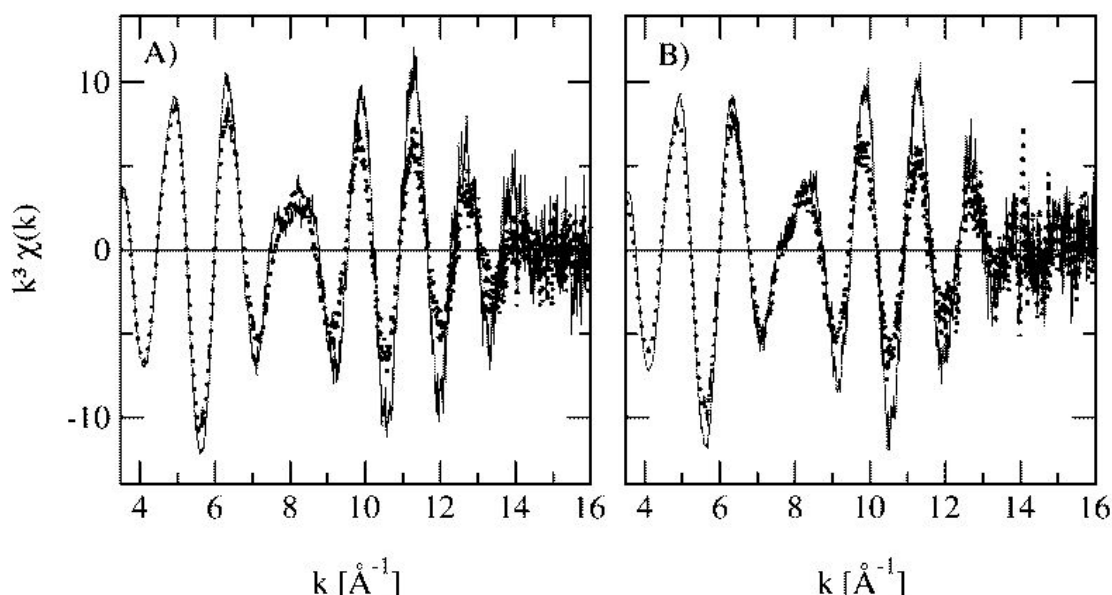


Abb. 5.4 A) natives HiPIP: durchgezogene Linie: k^3 -gewichtetes EXAFS-Spektrum bei $T = 40 \text{ K}$; gepunktet: $T = 260 \text{ K}$; B) teilweise entfaltetes HiPIP: durchgezogene Linie: k^3 -gewichtetes EXAFS-Spektrum bei $T = 40 \text{ K}$; gepunktet: $T = 245 \text{ K}$

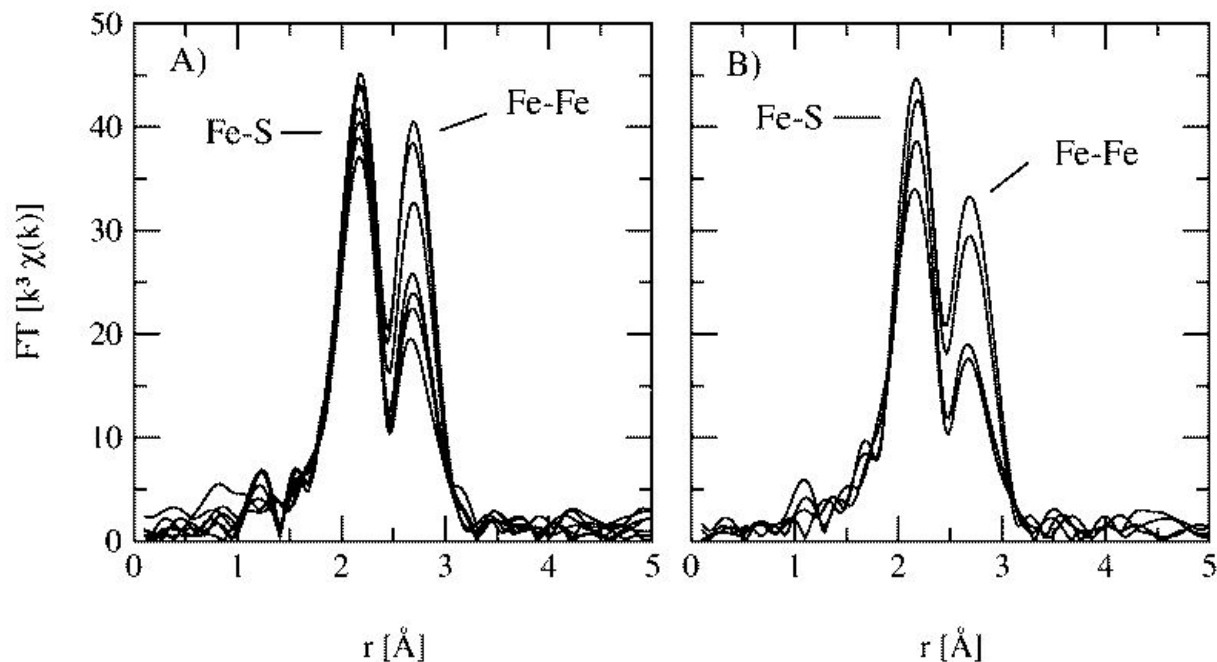


Abb. 5.5 A) natives HiPIP: phasenkorrigierte Fourier-Transformierte der experimentellen Spektren: stetig abnehmende Fläche mit steigender Temperatur, gemessen bei 40 K, 80 K, 130 K, 180 K, 200 K, 220 K und 260 K; B) teilweise entfaltetes HiPIP: Fourier-Transformierte der experimentellen Spektren: stetig abnehmende Fläche mit steigender Temperatur, gemessen bei 40 K, 110 K, 190 K, 245 K.

An den Fourier-Transformierten erkennt man die Bindungsabstände der Eisennachbarn bis etwa 3 Å. Für die Anpassung wurden zwei Schalen von Nachbarn berücksichtigt: zum einen wurden die drei benachbarten Eisenatome und zum anderen die drei unmittelbar benachbarten anorganischen Schwefelatome gemeinsam mit dem direkt ans Eisenatom ligandierten Cysteinschwefel in einer Schale zusammengefasst. Der Grund für das Zusammenfassen aller ligandierenden Schwefelatome in einer Schale im Vergleich zu den Messungen in Kapitel 5.3 liegt darin, dass mit Veränderung der Temperatur auch eine leichte Abstandsvariation einzelner Schwefelatome einher gehen kann. Der Abstand aller Schwefelatome bleibt im Mittel und im Rahmen der Fehlergrenzen aber gleich (vgl. Tab. 5.3 und Tab. 5.4). Die Kantenverschiebungsenergie E_F , der Abstand einer jeden Schale und der $\langle x^2 \rangle$ -Wert einer jeden Schale dienen als Parameter zur Anpassung der Theoriespektren. Die temperaturabhängigen Spektren und ihre Anpassungen von nativem und teilweise entfaltetem HiPIP sind in Anhang C zu finden, wie auch deren Fourier-Transformierten. In Tab. 5.3 sind die Parameter für die Anpassung der temperaturabhängigen Spektren vom reduzierten nativem HiPIP dargestellt. Hervorzuheben ist der stetige Anstieg der $\langle x^2 \rangle$ -Werte mit der Temperatur. Dies ist sowohl für die Fe-S-Schale als auch die Fe-Fe-Schale der Fall. Dabei ist keine Änderung der beiden mittleren Abstände mit steigender Temperatur zu beobachten. Die

Kantenverschiebungsenergie E_F bleibt mit der Temperatur konstant. Ebenso zeigt ein Vergleich der Absorptionskanten bei verschiedenen Temperaturen keine Änderung der Lage der Kante. Der R-Faktor liegt für alle Anpassungen in der gleichen Größenordnung. Die Fläche des Vorkantenmaximums nimmt mit steigender Temperatur ab. Diese ist aber immer deutlich über 21×10^{-2} eV.

Temperatur [K]	Fe-Fe r [Å]	Fe-S r [Å]	Fe-Fe $\langle x^2 \rangle$ [10^{-2} Å ²]	Fe-S $\langle x^2 \rangle$ [10^{-2} Å ²]	E_F [eV]	R [%]	"pre-edge" Fläche [10^{-2} eV]
40	2.709	2.273	0.229	0.252	-5.58	22.3	23.19
80	2.709	2.275	0.262	0.246	-5.50	23.0	22.75
130	2.708	2.274	0.342	0.250	-5.12	23.5	22.46
180	2.709	2.274	0.449	0.298	-4.97	23.3	22.38
200	2.712	2.274	0.485	0.313	-5.02	26.0	21.85
220	2.711	2.273	0.510	0.320	-5.03	22.4	22.08
260	2.709	2.271	0.613	0.350	-4.98	20.6	22.03
Ausgleichsgerade Fe-S: $\langle x^2 \rangle = (4.86 \cdot 10^{-6} \pm 8.1 \cdot 10^{-7}) \text{ Å}^2 \text{ K}^{-1} T + (0.212 \cdot 10^{-2} \pm 0.014 \cdot 10^{-2}) \text{ Å}^2$							
Ausgleichsgerade Fe-Fe: $\langle x^2 \rangle = (1.76 \cdot 10^{-5} \pm 9.8 \cdot 10^{-7}) \text{ Å}^2 \text{ K}^{-1} T + (0.133 \cdot 10^{-2} \pm 0.017 \cdot 10^{-2}) \text{ Å}^2$							

Tab. 5.3 Bindungsabstände r, $\langle x^2 \rangle$ -Werte ($A = 2 \langle x^2 \rangle$), Kantenverschiebungsenergie E_F , resultierender R-Faktor und "pre-edge" Fläche für die Anpassung der temperaturabhängigen Messungen des reduzierten nativen HiPIPs aus *C. vinosum* mit XAS (vgl. Anhang C); Fe: Eisen, S: Schwefel. Parameter der Ausgleichsgeraden der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale und der Fe-S-Schale mit der Temperatur.

Temperatur [K]	Fe-Fe r [Å]	Fe-S r [Å]	Fe-Fe $\langle x^2 \rangle$ [10^{-2} Å ²]	Fe-S $\langle x^2 \rangle$ [10^{-2} Å ²]	E_F [eV]	R [%]	"pre-edge" Fläche [10^{-2} eV]
40	2.720	2.270	0.295	0.261	-5.38	23.7	22.26
110	2.721	2.277	0.375	0.274	-5.68	24.1	21.59
190	2.717	2.274	0.611	0.338	-4.55	25.8	20.67
245	2.716	2.271	0.659	0.389	-4.25	27.2	19.84
Ausgleichsgerade Fe-S: $\langle x^2 \rangle = (6.39 \cdot 10^{-6} \pm 1.1 \cdot 10^{-6}) \text{ Å}^2 \text{ K}^{-1} T + (0.221 \cdot 10^{-2} \pm 0.019 \cdot 10^{-2}) \text{ Å}^2$							
Ausgleichsgerade Fe-Fe: $\langle x^2 \rangle = (1.93 \cdot 10^{-5} \pm 2.9 \cdot 10^{-6}) \text{ Å}^2 \text{ K}^{-1} T + (0.202 \cdot 10^{-2} \pm 0.046 \cdot 10^{-2}) \text{ Å}^2$							

Tab. 5.4 Bindungsabstände r, $\langle x^2 \rangle$ -Werte ($A = 2 \langle x^2 \rangle$), Kantenverschiebungsenergie E_F , resultierender R-Faktor und "pre-edge" Fläche für die Anpassung der temperaturabhängigen Messungen des reduzierten teilweise entfalteteten HiPIPs aus *C. vinosum* mit XAS (vgl. Anhang C); Fe: Eisen, S: Schwefel. Parameter der Ausgleichsgeraden der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale und der Fe-S-Schale mit der Temperatur.

Tab. 5.4 zeigt die Parameter für die Anpassung der temperaturabhängigen Spektren vom reduzierten teilweise entfalteteten HiPIP. Die Parameter verhalten sich vergleichbar zu den Anpassungen der Spektren vom nativen HiPIP. Die Kantenverschiebungsenergie E_F ändert

sich mit der Temperatur um über 1 eV. Es wurde aber ebenfalls an den Absorptionskanten keine Verschiebung der Lage der Kante mit der Temperatur beobachtet. Die "pre-edge" Fläche nimmt aber stärker als beim nativen HiPIP mit der Temperatur ab.

Der Verlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte mit der Temperatur der Fe-Fe-Schale und der Fe-S-Schale sowohl für das reduzierte native HiPIP als auch das reduzierte teilweise entfaltete HiPIP ist in Abb. 5.6 zu sehen. Die Parameter der Ausgleichsgeraden sind in Tab. 5.3 und Tab. 5.4 angegeben. Die Steigung der Ausgleichsgeraden der Fe-Fe-Schale ist höher als für die Fe-S-Schale für beide HiPIPs. Vergleicht man die Steigung der Ausgleichsgeraden der Fe-Fe-Schale von nativen und teilweise entfaltenen HiPIP, so verlaufen diese parallel. Das gleiche gilt in erster Näherung auch für die Fe-S-Schale. Alle Ausgleichsgeraden können auf 0 K extrapoliert werden (vgl. Tab. 5.3, Tab. 5.4 und Abb. 5.6). Der daraus erhaltene statische Anteil am $\langle x^2 \rangle$ -Wert aus EXAFS ist sowohl bei der Fe-Fe-Schale als auch bei der Fe-S-Schale für das reduzierte teilweise entfaltete HiPIP höher.

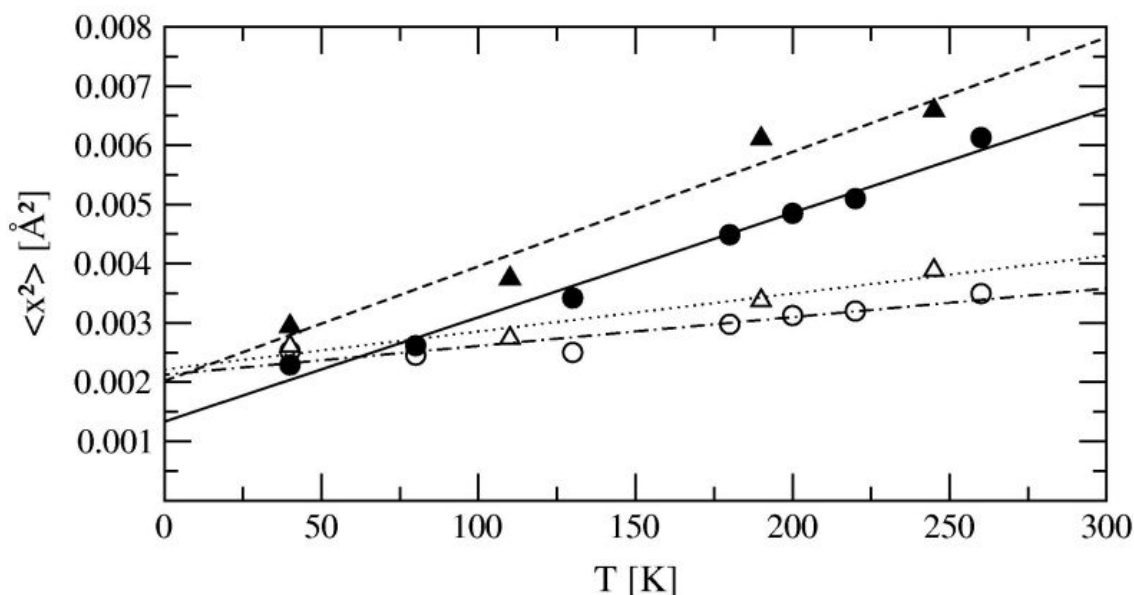


Abb. 5.6 Verlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale (ausgefüllte Symbole) und der Fe-S-Schale (offene Symbole) mit der Temperatur; Kreise: reduziert nativ, Dreiecke: reduziert teilweise entfaltet; durchgezogene/gepunktete Linien: lineare Regression für die Fe-Fe-Schale aus EXAFS reduziert nativ / reduziert teilweise entfaltet; strichpunktiert / gepunktet: lineare Regression für die Fe-S-Schale aus EXAFS reduziert nativ / reduziert teilweise entfaltet.

5.4 Struktur und Dynamik von nativen, mutierten und teilweise entfalteten HiPIPs

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

Die in Kap. 5.3 beschriebenen EXAFS-Experimente liefern für natives und C77S-mutiertes reduziertes HiPIP *C. vinosum* die in Tab. 5.2 a, c dargestellten Strukturdaten für das Metallzentrum samt angrenzenden Cysteinschwefeln (Dilg et al. 2002). Diese wurden bei 35 K aufgenommen. Die Eisen-Eisen- und Eisen-Schwefel-Abstände aus EXAFS unterscheiden sich von der Röntgenstruktur des nativen HiPIPs (Jensen 1987) (Tab. 5.1 und Tab. 5.2 a) nur unwesentlich. Allerdings sind die Unbestimmtheiten bei der EXAFS-Methode mit etwa ± 0.02 Å geringer als bei der Röntgenstrukturanalyse. Dass die Fe-Fe-Abstände um nahezu 1 Å größer sind als die S_{ϵ} - S_{ϵ} -Abstände, die sich aus den Daten von Tab. 5.2 a zu 3.69 Å berechnen, unterstützt das Bild eines verzerrten Würfels, dessen Schwefelecken nach außen und dessen Metallecken in Richtung des Schwerpunktes verschoben sind. Die Cystein-Schwefelionen sind um etwa 0.1 Å näher bei den Eisenionen als die anorganischen Schwefelatome, was die Abweichung von tetraedrischer Eisensymmetrie quantifiziert. Die "pre-edge" Fläche ist ein deutlicher Beweis für die pseudo tetraedische Eisensymmetrie (Tab. 5.2).

NMR-Strukturuntersuchungen an der reduzierten C77S-Mutante des HiPIP *C. vinosum* liefern eine Familie von fünfzehn Strukturen, die sich vom nativen Protein nur unwesentlich unterscheiden (Bentrop et al. 1996). Der Fe-O-Abstand konnte anhand der NMR-Analyse nur grob eingegrenzt werden (2.3 ± 0.6 Å). Dieses Ergebnis sieht mit einer großen Unsicherheit den mittleren Fe-O-Abstand im Bereich des Fe-S-Abstandes, oder sogar oberhalb des entsprechenden Fe-S-Abstandes im nativen HiPIP. Vergleiche mit Literaturdaten für Eisen-Schwefel- und Eisen-Sauerstoff-Abstände in biologischen Systemen stützen das EXAFS-Ergebnis (Scott et al. 1992; Scherk et al. 1996; Xiao et al. 1998). Fe-S-Abstände liegen im Intervall von 2.17 Å bis 2.36 Å, Fe-O-Abstände zwischen 1.86 Å und 2.15 Å. Damit sollte Fe-O im Vergleich zu Fe-S einen um etwa 0.2 - 0.3 Å verkürzten Bindungsabstand haben. Die EXAFS-Werte von 1.98 ± 0.02 Å für die Eisen-Serinsauerstoff-Bindungslänge und von 2.22 ± 0.02 Å für Eisen-Cysteinschwefel liegen innerhalb dieser Bereiche. Das Sauerstoffatom liegt näher beim Eisenatom als das entsprechende Schwefelatom. Im Vergleich zur NMR-Aussage kann mit EXAFS die Unsicherheit stark reduziert werden. Auch die unter einer

C42S-Mutation im reduzierten FeCys₄-Zentrum des Rubredoxins *C. pasteurianum* beobachteten Strukturänderungen sind mit den für die HiPIP-Mutante erhaltenen voll kompatibel (Xiao et al. 1998).

Dagegen sind die Strukturdaten für die C77S-Mutante aus EXAFS nur innerhalb des Clusters mit den Daten aus der Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 1.9 Å kompatibel (Tab. 5.1 und Tab. 5.2 c). Die Cysteinschwefel sind, bestimmt mit der Röntgenstrukturanalyse, im Mittel weiter vom Eisen entfernt als die Clusterschwefel. Mit EXAFS wird genau das Gegenteil beobachtet. Der Abstand von 2.35 Å für die Clusterschwefel aus der Röntgenstrukturanalyse liegt am oberen Grenzbereich der aus der Literatur bekannten Fe-S-Abstände. Ebenso ist der Abstand des Serinsauerstoffs mit 2.16 Å aus der Röntgenstrukturanalyse gravierend größer als der Abstand des Serinsauerstoffs aus EXAFS mit 1.98 Å. Ein Abstand von 2.16 Å für den Eisen-Serinsauerstoff-Abstand ist knapp oberhalb des aus der Literatur bekannten Wertebereichs. Mit beiden Methoden wird aber eine Reduzierung des Abstandes der Eisen-Serinsauerstoff-Bindung im Vergleich zum Abstand der Eisen-Cysteinschwefel-Bindung beobachtet. Auch wenn die angegebenen Fehlergrenzen beider Methoden in Betracht gezogen werden, kann die Differenz der mit beiden Methoden bestimmten Abstände nicht erklärt werden. Dazu ist zu sagen, dass eine Auflösung von 1.9 Å bei einer Röntgenstrukturanalyse von Proteinen einen größeren Fehler bei der Abstandsbestimmung zulässt, als in dieser Veröffentlichung angegeben.

Die anderen Strukturparameter der Mutante entsprechen recht genau jenen des nativen Proteins. Der Cluster scheint als Ganzes leicht in Richtung des Serins verschoben zu sein, was auf die starke ionische Eisen-Sauerstoff-Bindung zurückgeführt werden könnte. Zu dieser Deutung passt auch die sehr kurze Bindungslänge von Fe-Ser. Der Wert für die "pre-edge" Fläche der C77S-Mutante bestätigt, dass keine gravierenden Geometrie-Änderungen des Eisen-Schwefel-Clusters durch die Mutation entstanden sind. Es bleibt bei einer pseudo tetraedischen Eisensymmetrie. Die $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Mutante gleichen denen des nativen HiPIPs. Wiederum ist die Eisen-Eisen-Korrelation deutlich geringer als die der Eisen-Schwefel- und der Eisen-Sauerstoff-Paare. Die Absolutwerte von $\langle x^2 \rangle$ sind gegenüber dem nativen Protein leicht erhöht. Dies ist Ausdruck eines Zuwachses an statischer Unordnung und nicht etwa einer ausgeprägteren Tieftemperaturdynamik. Letzteres ist aufgrund der sehr ähnlichen Steigungen der aus Mößbauer-Messungen erhaltenen $\langle x^2 \rangle$ -Kurven beider Proteine bei tiefen Temperaturen ausgeschlossen (Anhang B) (Dilg et al. 2002). Der Zuwachs an statischer Unordnung ist auch ein Hinweis auf die erhöhte Inhomogenität der C77S-Mutante.

Mit EXAFS konnte gezeigt werden, dass der Cluster auch bei Mutationen ein stabiles Zentrum bildet.

5.4.2 Dynamik von nativem und teilweise entfaltetem HiPIP

Zieht man Gleichung (2.14) heran, so bleibt als Parameter zur Erklärung der Änderung der EXAFS-Spektren mit der Temperatur nur noch der Debye-Waller-Parameter. Dieser dient als Messgröße für die Dynamik des HiPIPs. Im Fall von XAS sind die mittleren quadratischen Auslenkungen, $\langle x^2 \rangle$, ein Maß für die Abstandsschwankungen des Eisens zu seinen Nachbarn. Diese können entweder statisch infolge von leicht unterschiedlichen Molekülstrukturen oder durch dynamische Effekte $\langle x^2 \rangle_v$ bedingt sein. Mit Hilfe temperaturabhängiger Messungen können die jeweiligen Beiträge voneinander getrennt werden. Statische Unordnungen sind von der Temperatur unabhängig. Durch Extrapolation der linearen Regression der gemessenen $\langle x^2 \rangle$ -Werte auf 0 K erhält man den statischen Anteil $\langle x^2 \rangle_{cs}$ (Ausgleichsgerade in Tab. 5.3 und Tab. 5.4). Der statische Anteil ist sowohl für die Fe-Fe-Schale als auch die Fe-S-Schale für das teilweise entfaltete HiPIP höher als für das native HiPIP. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die größere Inhomogenität der teilweise entfaltenen HiPIP-Probe. Die größere Steigung der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale im Vergleich zur Fe-S-Schale mit der Temperatur sowohl für das native als auch für das teilweise entfaltete HiPIP deuten darauf hin, dass die direkt benachbarten Eisen-Schwefel-Paare stärker korreliert sind als die Eisen-Eisen-Paare ohne gemeinsame chemische Bindung. Die Parameter für die Anpassung der EXAFS-Spektren zeigt keine Abstandsänderung der Fe-Fe-Schale und der Fe-S-Schale mit der Temperatur für beide HiPIPs. Der mittlere Eisen-Schwefel-Abstand vom nativen HiPIP zum Beispiel variiert mit der Temperatur nur um 0.004 Å. Diese sehr schwache Temperaturabhängigkeit von strukturellen Parameteren beweist, dass Daten aus Tieftemperaturmessungen zur Beschreibung von Systemen im Bereich physiologischer Temperaturen herangezogen werden können. Die Genauigkeit von EXAFS zeigt an zwei verschiedenen Präparationen eines HiPIPs, dass dieses Vorgehen mehr als gerechtfertigt ist.

Die Temperaturabhängigkeit des mittleren Auslenkungsquadrates der Eisenkerne wurde zwischen 80 K und etwa 250 K für jeweils reduziertes natives HiPIP aus *C. vinosum* und reduziertes teilweise entfaltetes HiPIP auch mittels Mößbauer-Spektroskopie bestimmt (Dilg et al. 2002). Die erhaltenen $\langle x^2 \rangle$ -Werte sind zusammen mit den $\langle x^2 \rangle$ -Werten der Fe-Fe Schale aus EXAFS dargestellt (vgl. Abb. 5.7). Das mittlere Auslenkungsquadrat aus der

Mößbauer-Spektroskopie ist auf alle Bewegungen sensitiv, die sich auf einer Zeitskala schneller als 100 ns abspielen und an das Eisen ankoppeln.

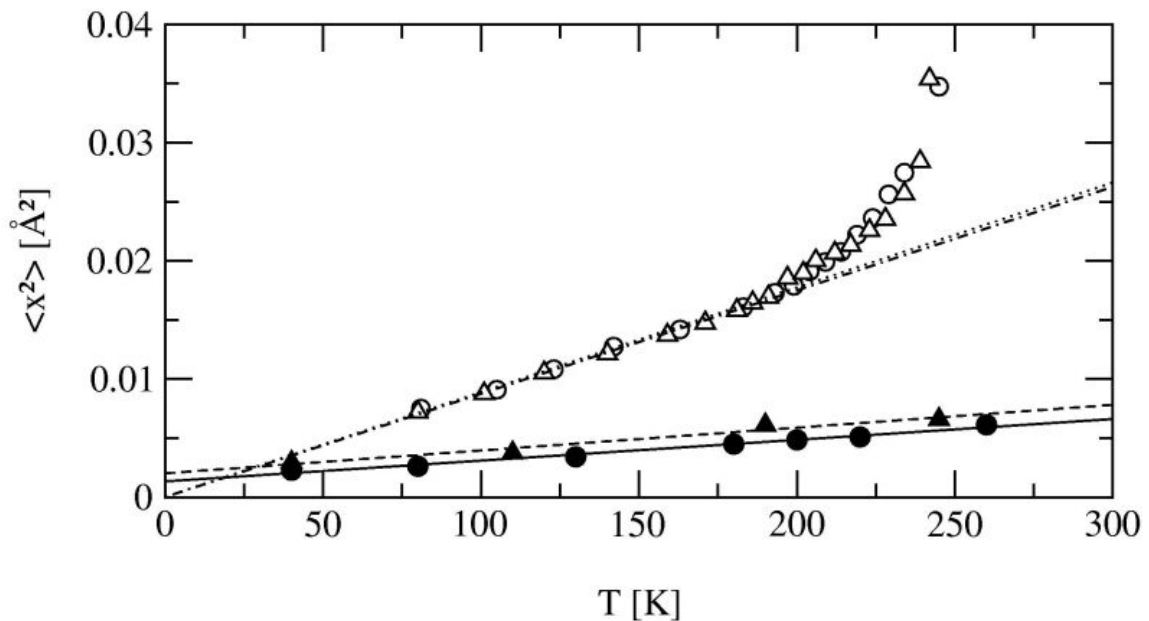


Abb. 5.7 Vergleich von $\langle x^2 \rangle$ -Werten der Fe-Fe Schale aus EXAFS (ausgefüllte Symbole) und Mößbauer-Spektroskopie (offene Symbole); Kreise: reduziert nativ, Dreiecke: reduziert teilweise entfaltet; durchgezogene / gestrichelte Linie: lineare Regression reduziert natives HiPIP / reduziert teilweise entfaltetes HiPIP aus EXAFS; strichpunktiert / gepunktet: lineare Regression reduziert natives HiPIP / reduziert teilweise entfaltetes HiPIP des Tieftemperaturbereiches aus Mößbauer-Spektroskopie (Dilg et al. 2002).

Die Temperaturabhängigkeit der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Eisenkerne, bestimmt mittels Mößbauer-Spektroskopie, zeigt die beiden für Proteine typischen Bereiche. Unterhalb einer charakteristischen Temperatur, T_C , die für HiPIPs zwischen 190 und 200 K liegt, nehmen die $\langle x^2 \rangle$ -Werte für alle HiPIPs linear mit der Temperatur zu. Hier liefern harmonische Gitterschwingungen den alleinigen Beitrag $\langle x^2 \rangle_v$ zum mittleren Auslenkungsquadrat. Oberhalb der charakteristischen Temperatur weicht der $\langle x^2 \rangle(T)$ -Verlauf bei der Mößbauer-Spektroskopie vom linearen Verhalten ab, und es ist ein dramatischer Anstieg des mittleren Auslenkungsquadrates der Eisenkerne zu verzeichnen (vgl. Abb. 5.7). Dieser Effekt wurde auch beim Myoglobin (Parak und Formanek 1971; Parak et al. 1982; Gaßmann 2000), der Superoxiddismutase (Scherk 1998) oder Membranfragmenten des Photosystems II (Garbers 1997) beobachtet. Dieses für Makromoleküle typische Verhalten wird dahingehend gedeutet, dass oberhalb der Grenztemperatur neue quasidiffusive Bewegungsmoden angeregt werden können, die als Übergänge zwischen verschiedenen Konformationssubzuständen interpretiert werden (Parak und Formanek 1971; Parak et al. 1981; Parak und Reinisch 1986; Parak 2003). Diese werden als proteinspezifische Dynamik bezeichnet. Der Beitrag der proteinspezifischen

Bewegungsmoden zum mittleren Auslenkungsquadrat heißt $\langle x^2 \rangle_t$. Das eindimensionale Potentialbild für Proteine geht von einer harmonischen Einhüllenden aus (vgl. Abb. 5.8). Beim Auslenken von im Proteinverband gebundenen Atomen aus der Ruhelage wirken rücktreibende Hooksche Kräfte. Die tiefen Potentialmulden repräsentieren die Konformationssubzustände (Frauenfelder et al. 1979). Bei tiefen Temperaturen sind die einzelnen Proteinmoleküle in den jeweiligen Konformationssubzuständen eingefroren. In diesen lokalen Energieminima führen sie harmonische Schwingungen aus, die den linearen Anstieg von $\langle x^2 \rangle$ im Tieftemperaturbereich zur Folge haben. Erst oberhalb einer Grenztemperatur T_C können die Proteine entropiegetrieben aus den tiefen Potentialmulden ins "Kontinuum" gehoben werden, wo sie sich auf der Suche nach einem neuen stabilen Minimum strukturell umorientieren. Diese quasidiffusiven Bewegungen im Übergangszustand t liefern den Beitrag $\langle x^2 \rangle_t$ zum mittleren Auslenkungsquadrat.

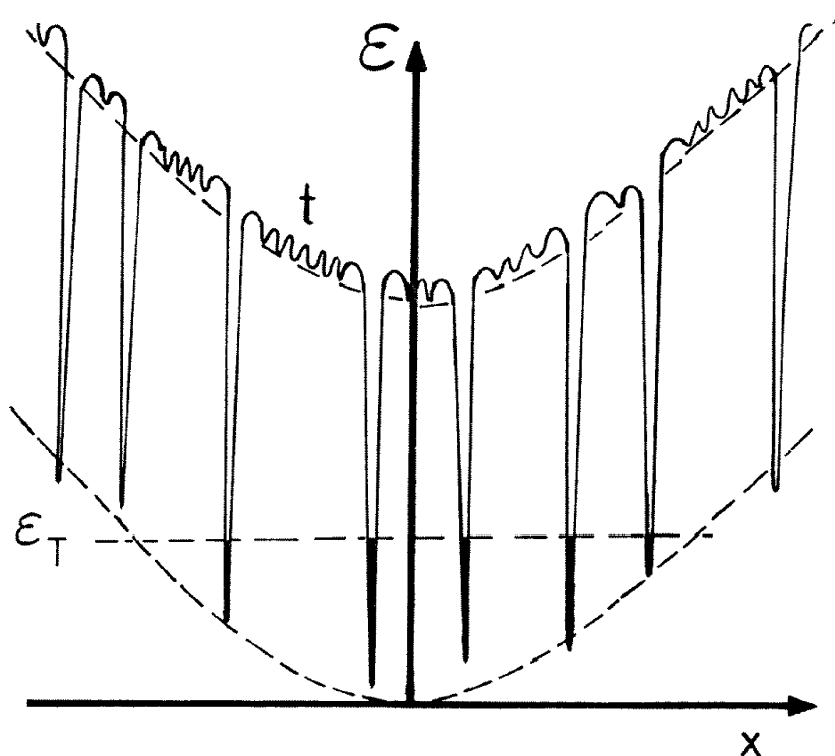


Abb. 5.8 Modell für das Potential ε eines Proteinmoleküls in Abhängigkeit einer Proteinkoordinate x zum Verständnis der proteinspezifischen Dynamik (Parak et al. 1982).

Die Steigung der Ausgleichsgeraden des Tieftemperaturbereiches aus der Mößbauer-Spektroskopie sind für natives und teilweise entfaltetes HiPIP gleich (vgl. Abb. 5.7). Ebenso ist dies für die $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale der Fall. Dies gilt auch für die Fe-S-Schale. EXAFS bestätigt die Annahme, dass sich der von harmonischen Gitterschwingungen geprägte

Temperaturbereich zwischen HiPIPs in verschiedenartigen Zuständen nicht unterscheidet. So konnte dies auch noch für reduziertes und oxidiertes HiPIP mittels Mößbauer-Spektroskopie gezeigt werden (Dilg 2001). Dieses Verhalten stellt aber keine allgemeingültige Regel für alle Proteine dar. Beim Cytochrome c und der Superoxiddismutase dagegen sind die Unterschiede der Geradensteigungen für die beiden Eisen-Oxidationsniveaus erheblich (Frolov et al. 1997; Scherk 1998).

Aus Abb. 5.7 ist deutlich zu erkennen, dass die Steigung der Ausgleichsgeraden der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale aus EXAFS nur einen Bruchteil der Steigung der Ausgleichsgeraden der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus der Mößbauer-Spektroskopie beträgt. Betrachtet man die $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale, ist EXAFS sensitiv auf variierende Abstände der nächsten Nachbarn und somit empfindlich auf Schwingungsmoden innerhalb des Clusters. Dies zeigt, dass Bewegungen des gesamten Clusters gegen das Proteinrückgrat dominant sind. Untermuert wird dies durch eine Normalmodenanalyse (Melchers et al. 1996) und durch temperaturabhängige EXAFS-Messungen an der Fe-Kante von Myoglobin (Scherk et al. 2001). Die $\langle x^2 \rangle_v$ -Werte können hier durch die an das Eisen ankoppelnden Normalmoden erklärt werden. Hauptbeitrag zum mittleren Auslenkungsquadrat liefern Eigenschwingungen, bei denen sich alle Atome der Hämeebene gemeinsam gegen das Proteinrückgrat bewegen. Der Hauptbeitrag zu solchen Schwingungen liefern die langwelligen akustischen Phononen (Achterhold et al. 2002). Mit EXAFS können keine akustischen Phononen detektiert werden. EXAFS ist sensitiv auf optische Phononen, die am Eisen-Schwefel-Cluster ankoppeln.

Durch Extrapolation der Ausgleichsgeraden der $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus EXAFS auf 0 K kann der statische Anteil bestimmt werden. Dieser ist ein Maß für die mögliche Anzahl der Konformationssubzustände des Eisen-Schwefel-Clusters. Durch Abzug von den gemessenen Absolutwerten können so die $\langle x^2 \rangle_v$ -Werte, auf die EXAFS sensitiv ist, bestimmt werden. Die $\langle x^2 \rangle_v$ -Werte aus der Mößbauer-Spektroskopie sind deutlich größer als die aus XAS gewonnenen Werte. XAS ist lediglich für variierende Abstände der nächsten Eisennachbarn empfindlich, während die Mößbauer-Spektroskopie alle dynamischen Auslenkungen des Eisens registriert, also auch Bewegungen größerer Molekülsegmente, die den Eisen-Cluster enthalten. Zu beobachten ist allerdings bei EXAFS nur ein linearer Anstieg der $\langle x^2 \rangle$ -Werte bis zur Zimmertemperatur. Während bei den Mößbauer- $\langle x^2 \rangle$ -Werten oberhalb T_C ein starker nichtlinearer Anstieg zu registrieren ist. Die proteinspezifische Dynamik beruht daher nicht auf Schwingungen des Eisens gegen seinen unmittelbaren Nachbarn, sondern auf Bewegungen ganzer Molekülsegmente. EXAFS kann nicht nur in das Bild der

proteinspezifischen Dynamik eingebettet werden, sondern es leistet einen eigenständigen Beitrag zum besseren Verständnis derselben.

5.4.3 Beschreibung der Faltung des HiPIP aus *C. vinosum*

NMR-Arbeiten zeigen eine weitgehend aufgelöste Sekundärstruktur des entfalteten Proteins (Bertini et al. 1997). Die vierfache Cysteinligandierung des nach wie vor intakten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Kubanes bleibt NMR zufolge bei der teilweisen Entfaltung jedoch erhalten. Letzteres deckt sich mit den EXAFS-Ergebnissen von Tab. 5.2. Besonders die "pre-edge" Fläche bestätigt die pseudo tetraedrische Eisensymmetrie. Die EXAFS-Ergebnisse zeigen eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Clusterstruktur im nativen und im entfalteten Protein (Abb. 5.3a-d). In Details sind jedoch Unterschiede im EXAFS-Spektrum zu erkennen, man vergleiche etwa den Bereich der Wellenzahlen um $k = 8 \text{ \AA}^{-1}$. Die Eisen-Schwefel-Bindungen sind trotz der Entfaltung unversehrt, wenngleich sich die Bindungsabstände moderat verändern. Die Cysteinschwefel entfernen sich um fast 0.1 \AA von ihren Eisen-Bindungspartnern. Innerhalb des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters hingegen verändern sich die Eisen-Schwefel-Distanzen kaum. Dass die Elektronenkonfiguration im Metallzentrum durch die Entfaltung unverändert fortbesteht, wird durch die identischen Mößbauer-Parameter angezeigt (vgl. Anhang B). Während also die Entfaltung des Proteinrückgrats bereits fortgeschritten ist, hält das Metallzentrum in seiner Umgebung einen erheblichen Ordnungsgrad aufrecht.

Anhand der temperaturabhängigen EXAFS-Messungen konnte gezeigt werden, dass der Cluster auch bei physiologischen Bedingungen trotz der fortgeschrittenen Denaturierung großer Proteinbereiche noch an die Aminosäurenkette gebunden ist und die Struktur des Clusters geringfügig im Vergleich zum Cluster im nativen Protein modifiziert ist. EXAFS Messungen am Hämeisen in nativem und entfaltetem Cytochrom c bei einer Temperatur lieferten vergleichbare Ergebnisse (Zhang und Stern 1995). Es wurden nur geringe Änderungen in der direkten Umgebung des Metallzentrums im Vergleich zum nativen Cytochrom c beobachtet.

Damit wird an zwei unterschiedlichen Typen von prosthetischen Gruppen gezeigt, dass prosthetische Gruppen einen Stabilitätspunkt innerhalb eines Proteins bilden. Es liegt damit nahe, prosthetischen Gruppen eine entscheidende Rolle im Faltungsprozesses eines Proteins zuzusprechen.

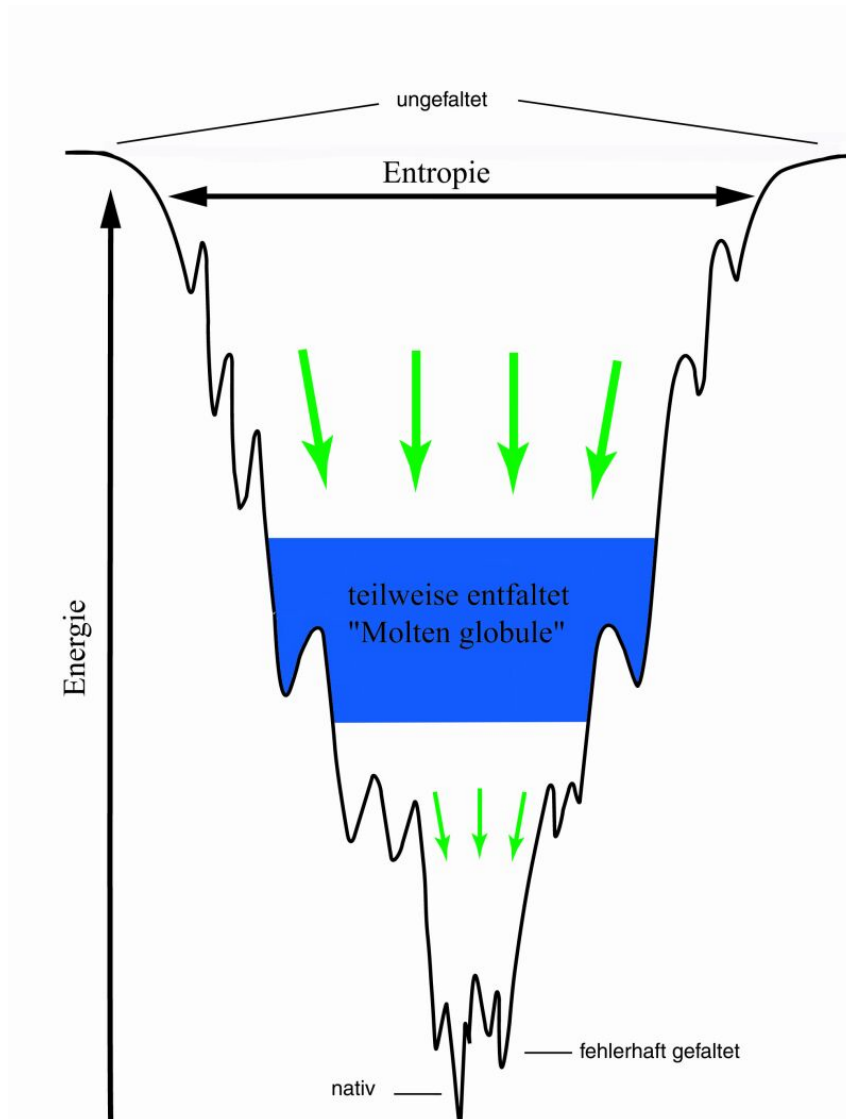


Abb. 5.9 Faltung von HiPIPs

Wenn die prosthetische Gruppe eine geordnete Struktur in seiner Umgebung unterstützt, während die Aminosäurekette keine Sekundärstruktur ausbildet, so ist im Umkehrschluss zu folgern, dass der Eisen-Schwefel-Cluster physiologisch als Keimstelle für Proteinfaltung fungiert. Seine Bindung mit dem ansonsten strukturell undefinierten Proteinrückgrat bildet ein Zentrum der Stabilität. Die Formierung der Eisen-Cystein-Bindungen könnte als Keimbildungsphase bezeichnet werden. Dadurch wird auch der für das Protein zugängliche Konformationsraum eingengt. Hat sich die Bindung des Metallzentrums an seine Liganden ausgebildet, kann der Rest des Proteins den Konformationsraum abtasten. Dabei kann es durch Ausbildung oder durch Trennung von Wasserstoffbrücken in ein tieferes Energieminimum fallen. In Abb. 5.9 ist modellhaft der Faltungsprozess eines HiPIPs dargestellt. Dabei muss in jedem Energieminimum die Potentiallandschaft durch die

Konformationssubzustände erweitert werden (vgl. Abb. 5.8) (Parak und Frauenfelder 1993). Das als "Molten globule" bezeichnete (Creighton 1996) lokale Potentialminimum stellt einen HiPIP-Zustand dar, in dem der Cluster über die Cysteine an das Protein gebunden ist, aber noch keine Sekundärstruktur ausgebildet hat (Wolynes et al. 1995; Schultz 2000). Durch die Einschränkung des Konformationsraumes wird das Protein darin unterstützt, in kürzerer Zeit die native Endkonformation zu erreichen. Die katalytische Wirkung von Metallzentren auf die Proteinfaltung wird auch durch das Phänomen des "cofactor-assisted folding" angezeigt. Dieses beschreibt die Tatsache, dass bei der Zugabe des Co-Faktors zu einer Lösung von Apo-Protein spontane Faltung erfolgt (Grandori et al. 2000). Der unterschiedliche statische $\langle x^2 \rangle$ -Wert der Fe-Fe-Schale für natives und teilweise entfaltetes HiPIP spiegelt sich in Abb. 5.9 auch wider. Dieser ist höher für das teilweise entfaltete HiPIP und bedeutet eine größere Entropieverteilung als für das native HiPIP.

6 Kupferbindung in der N-terminalen Domäne des Prion-Proteins

6.1 Prion-Proteine

Prionen sind der Grund für neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. die Bovine spongiform encephalopathy (BSE) bei Rindern, die Traberkrankheit der Schafe und Ziegen (Scrapie) oder die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen. Die infektiöse Form der Prionen entwickelt sich aus den zellulären Prion-Proteinen (PrP^{C}) durch eine Aggregation der "Scrapie Form" (PrP^{Sc}). Das PrP^{Sc} ist charakterisiert durch eine radikale Umwandlung der Sekundär- und Tertiär-Struktur des PrP^{C} . Das PrP^{Sc} enthält einen hohen Anteil an β -Faltblättern, löst sich nicht oder nur schlecht und ist resistent gegen Proteolyse (Pan et al. 1993). Dagegen ist PrP^{C} ein lösliches Protein. Die Struktur des rekombinanten menschlichen PrP wurde mittels NMR-Untersuchungen (Nuclear Magnetic Resonance) im Bereich der Aminosäuren 23 bis 230 bestimmt (Zahn et al. 2000) (vgl. Abb. 6.1).

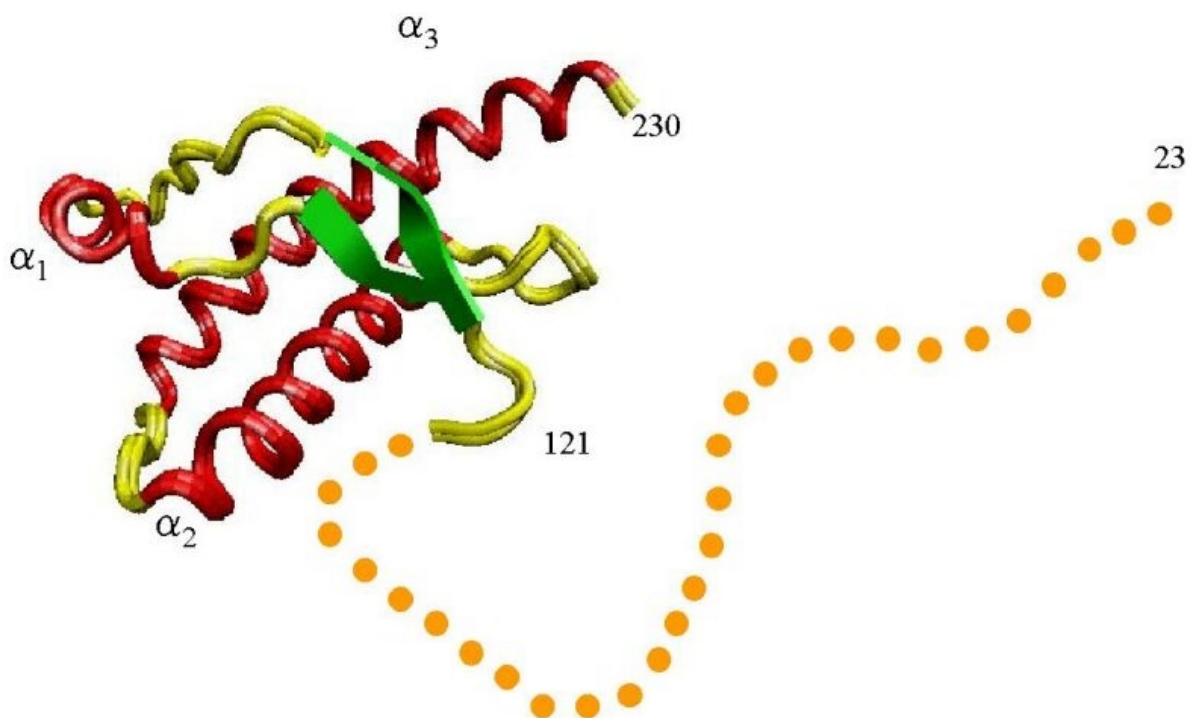


Abb. 6.1 Dreidimensionale Struktur des menschlichen Prion-Proteins PrP(23-230) bestimmt mittels NMR. Die Helizes sind rot, das antiparallele β -Faltblatt grün, Bereiche ohne Sekundärstrukturelemente in der C-terminalen Domäne gelb und die flexible ungeordnete N-terminale Domäne der Aminosäuren 23-121 orange gepunktet gezeichnet (Protein Data Bank Eintrag 1QLX).

Die Architektur des menschlichen PrP^C weist zwei Domänen auf, die aus den zusammenhängenden Polypeptidsegmenten 23-125 und 126-230 bestehen und sehr unterschiedliche Strukturen aufweisen. Die C-terminale Domäne 126-230 enthält drei α -Helices und ein antiparalleles β -Faltblatt (vgl. Abb. 6.1 und Abb. 6.2). Die α -Helices 2 und 3 sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und bilden mit dem β -Faltblatt einen stabilen hydrophoben Kern.

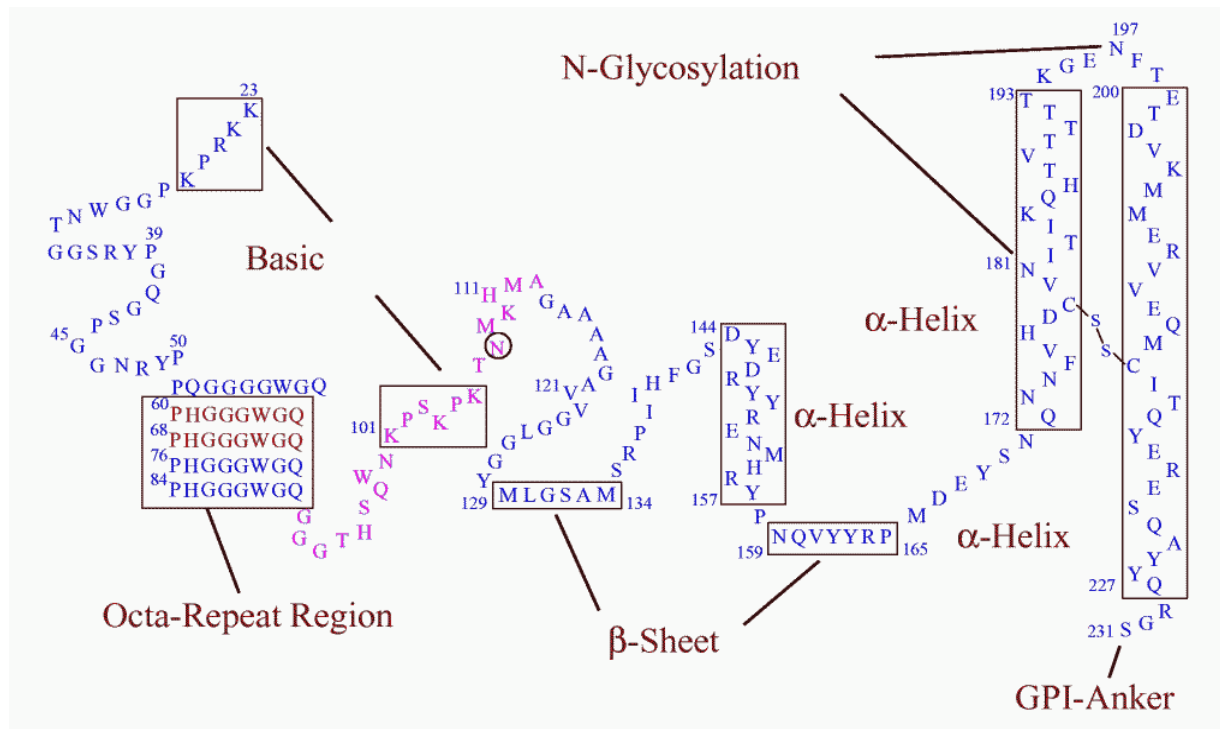


Abb. 6.2 Sequenz des menschlichen Prion-Proteins.

Die N-terminale Region des menschlichen Prion-Proteins enthält vier Kopien der Sequenz PHGGGWGQ, die sog. Octa-Repeat Region (vgl. Abb. 6.2), die bei Primaten hoch konserviert ist (Schätzl et al. 1995). In Abwesenheit von Kupfer bildet die N-terminale Hälfte einen flexiblen Bereich.

Für die Funktion des PrP^C als kupferbindendes Protein an der Synapse gibt es Anhaltspunkte (Miura et al. 1995; Brown et al. 1997). Untersuchungen an synthetisierten Octa-Repeat Fragmenten ergab, dass vier Cu²⁺-Ionen kooperativ mit identischer Bindungsgeometrie an diese Region binden (Viles et al. 1999; Garnett und Viles 2003). Dabei liegt die halbmaximale kooperative Cu²⁺-Bindung des PrP(23-98)-Fragments bei 5.9 μ M (Kramer et al. 2001). Ein hypothetisches Modell zur Funktion der Kupferbindung geht davon aus, dass das Prion-Protein über einen GPI-Anker (Glycosyl-Phosphatidylinositol) (vgl. Abb. 6.2) an der

präsynaptischen Membran verankert ist, wo es mit seinem N-terminalen Anteil freies, bei der synaptischen Vesikelverschmelzung in den synaptischen Spalt gelangendes Kupfer bindet (Hartter und Barnea 1988; Kardos et al. 1989). Durch eine endozytotische Aufnahme des Prion-Proteins gelangt PrP^C wieder in die Präsynapse (Pauly und Harris 1998). Hier erfolgt die Abspaltung des an das Prion-Protein gebundenen Kupfers möglicherweise durch eine Veränderung des pH-Wertes (Viles et al. 1999).

Die dreidimensionale Struktur der N-terminalen Region des Prion-Proteins bei Anwesenheit von Kupfer ist bisher unbekannt. Erste strukturelle Untersuchungen an einem HGGGW-Segment, an dem ein Cu²⁺ gebunden ist, wurden mittels der Röntgenstrukturanalyse durchgeführt (Burns et al. 2002). Die Auflösung betrug 0.7 Å. Als Liganden in planarer Anordnung traten dabei der Stickstoff N_δ des Histidins, die zwei Stickstoffe im Rückgrat der Glycine nach dem Histidin und der Sauerstoff des mittleren Glycins auf. Als axialer Ligand wurde ein Wasser beobachtet (vgl. Abb. 6.3).

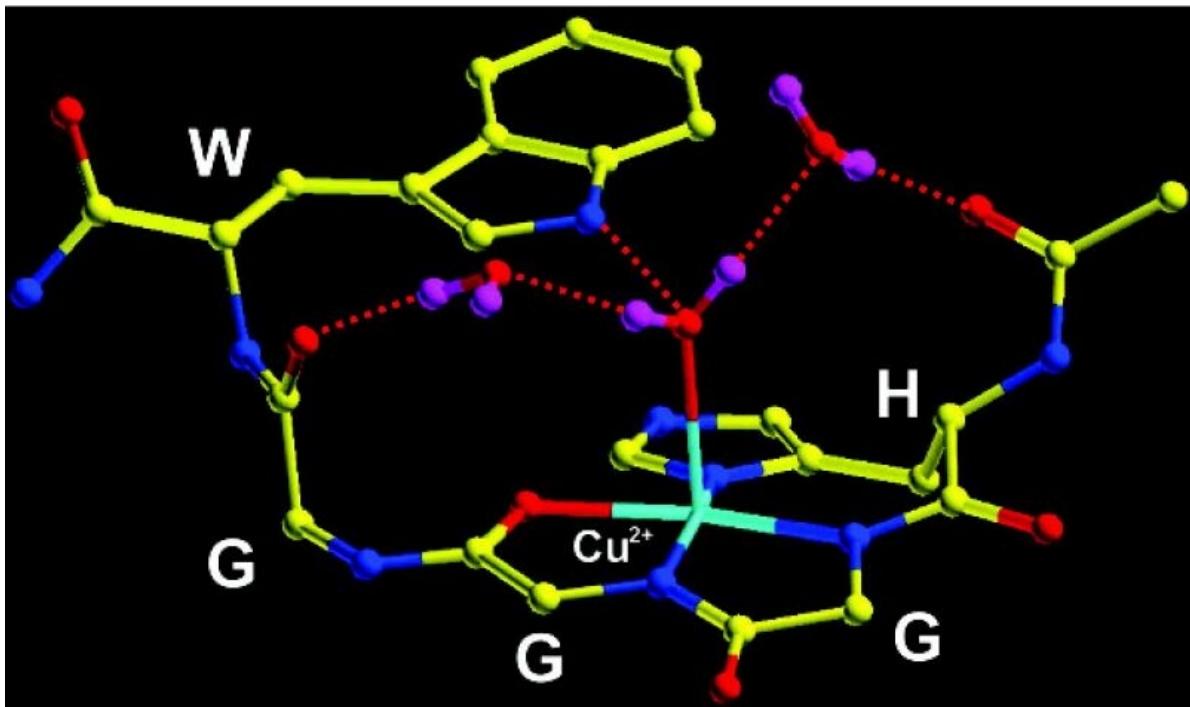


Abb. 6.3 Röntgenstrukturanalyse des HGGGW-Segments in Verbindung mit einem Kupferatom (Burns et al. 2002). Kohlenstoffatome (gelb), Stickstoffatome (blau), Sauerstoffatome (rot), Wasserstoffatome (lila).

EXAFS soll im Rahmen dieser Arbeit zur strukturellen Untersuchung der Kupferumgebung in der Octa-Repeat Region herangezogen werden. Zum einem soll dies an einem PHGGGWGQ-Segment und zum anderen am menschlichen PrP(23-231) mit kompletter Octa-Repeat Region erfolgen.

6.2 Probenpräparation

6.2.1 Modell-Komplexe für die Octa-Repeat Region des menschlichen Prion-Proteins.

Alle Proben wurden mit Hilfe der Festphasensynthese auf Harzen und Abspaltung der Schutzgruppen hergestellt (Songster und Barany 1997). Die Peptide wurden N-Terminal acetyliert und C-Terminal amidiert, um geladene Endgruppen zu vermeiden. Damit wurde auch eine bessere Imitation der Sequenz im intakten Protein erreicht. Die Proben wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie, Bioorganische Chemie, in Martinsried synthetisiert. Eine Auflistung der mit XAS gemessenen Proben ist in Tab. 6.1 dargestellt. Im Anhang D sind von all diesen Proben k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren mit ihren Fourier-Transformierten zu sehen. Um die Ergebnisse aus XAS besser mit EPR (Electron Paramagnetic Resonance), ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) und ESEEM (Elektron Spin Echo Envelope Modulation) vergleichen zu können, wurden die Proben immer aus demselben Ansatz präpariert. Die in Kapitel 6 zitierten EPR-, ENDOR- und ESEEM-Ergebnisse sind Teil der Dissertation von Matthias Mentler. Alle Methoden benötigen in etwa die gleiche Mindestkonzentration an Kupfer, um eine Messung mit guter Statistik zu ermöglichen. Es wurde das Isotop ^{63}Cu zugegeben, da für EPR, ENDOR und ESEEM sich durch ein Isotopengemisch aus den natürlich vorkommenden ^{63}Cu und ^{65}Cu eine Linienverbreiterung ergeben würde. Das ^{63}Cu wurde verwendet, da es in der Natur häufiger als ^{65}Cu vorkommt. Für die XAS-Untersuchungen spielt es keine Rolle, welche Isotope verwendet werden.

Probe 1	OCTA in 100mM KCl, 20% Glycerol, 25mM NEM, pH 7.0, 1.17 mM Cu
Probe 2	OCTA in H ₂ O, pH 7.0, 2.4 mM Cu
Probe 3	OCTA in 200mM SDS-Micellen, pH 7.0, 1.17 mM Cu
Probe 4	OCTA in H ₂ O, 100mM KCl, pH 7.15, 1.0 mM Cu
Probe 5	OCTA in 140mM DPC-Micellen, 100mM KCl, pH 7.03, 1.0 mM Cu
Probe 6	TETRAOCTA in 75mM DPC-Micellen, 100mM KCl, pH 7.52, $c_{\text{Peptid}}=0.75\text{mM}$, Kupfer ist ausgefallen
Probe 7	TETRAOCTA in 30mM DPC-Micellen, 100mM KCl, pH 7.73, $c_{\text{Peptid}}=0.3\text{ mM}$, 1.25 mM Cu

Tab. 6.1 Auflistung der mit XAS gemessenen synthetisierten Proben. OCTA: Octa-Repeat Ac-PHGGGWGQ-NH₂, TETRAOCTA: Ac-(PHGGGWGQ)₄-NH₂ NEM: N-ethylmorpholin, DPC: Dodecylphosphocholin-d₃₈ Micellen, SDS: Sodiumdodecylphosphat Micellen

Für die XAS-Experimente wurden 1 mm dicke PVC-Plättchen mit herausgefrästen Fenstern verwendet, auf die mit Zweikomponentenkleber (Uhu plus schnellfest) eine Mylar-Folie aufgeklebt wurde. Es wurden 75 µl der jeweiligen Probe über eine 100 µl-Spritze durch eingebohrte Löcher luftblasenfrei eingefüllt. Anschließend wurden die Öffnungen mit Zweikomponentenkleber abgedichtet und die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren.

6.2.2 Reinigung und Herstellung von rekombinanten menschlichen PrP(23-231)-Proben

Die menschlichen Prion-Protein Proben wurden am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilian-Universität in München hergestellt.

BL21DE3 RIL *E. coli*-Zellen transformiert mit dem Plasmid pET17b-HsPrP23-231WT Klon81 wurden in 4 x 500 ml Rich Medium (20 g/l Trypton, 10 g/l Yeast Extract, 10 g/l NaCl, 50 mM K₂HPO₄, 10 mM MgCl₂, 1 % Glucose, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer Zelldichte entsprechend einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 kultiviert.

Die Prion-Protein Expression wurde induziert durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid). Die Kultur wurde 2 h bei 37°C fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min pelletiert. Die Bakterienpellets von 300 ml Kultur wurden in je 6 ml 50mM Tris pH8, 1mM MgCl₂ resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

Aufgetaute Bakterienpellets wurden mit 1,4 mg/ml Lysozym, 0,5 % Triton X-100, 60 U/ml Benzonase und 0,3 mg/ml RNase I für 30 min bei 37°C lysiert. In "inclusion bodies" abgelagertes rekombinantes PrP wurde durch Zentrifugation bei 17000 rpm für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde sukzessive dreimal mit je $\frac{3}{4}$ des Lysatvolumens an Puffer 20mM Tris-HCl pH 8,0, 23%(w/v) sucrose, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1mM EDTA (Ethylendiamintetraacetyl), 1mM Benzamidin durch Resuspendieren gewaschen und das rekombinante PrP jeweils durch Zentrifugation (s.o.) erneut pelletiert. Das letzte Pellet wird in $\frac{1}{4}$ Lysatvolumen 8 M Harnstoff, 10 mM MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) pH 7,0, 1 mM EDTA, 50 mM DTT (Dichlordiphenyltrichlorethan) solubilisiert und durch Zentrifugation bei 35000 rpm für 30 min von unlöslichem Material abgetrennt.

Das Harnstoff solubilisierte, denaturierte PrP wurde auf zwei in Reihe geschaltete und mit Puffer A (8M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7,0) equilibrierte Ionenaustauschersäulen bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Das auf der Säule gebundene PrP wurde dann durch

einen 60 ml linearen Salzgradienten mit 30 - 80 % Puffer B (= Puffer A + 500 mM NaCl) bei 1 ml/min eluiert und in 2 ml Fraktionen aufgefangen.

Die PrP enthaltenden Fraktionen des Eluates wurden durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt und durch Gelfiltration umgepuffert in 8 M Harnstoff, 50 mM Tris pH 8,5 und mit diesem Puffer auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml verdünnt. Zugabe von 2 μ M CuSO₄ wurde zur katalytischen Oxidation der Disulfidbrücke im PrP benutzt und die Reaktion 3 h bei Raumtemperatur ablaufen gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM EDTA und pH-Einstellung auf 5 - 6 mit 2 M HCl gestoppt.

Die PrP Lösung wurde erneut durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt und durch Gelfiltration umgepuffert in 8 M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7,0, 500 mM NaCl. 0,5 ml einer Nickel-Chelat Sepharose Matrix wurden 3 h bei Raumtemperatur mit der PrP Lösung durch über Kopf drehen in einem geschlossenen 15 ml Gefäß gemischt, danach in eine kleine BioRad-Säule gefüllt und der Durchlauf auflaufen lassen. Die Säulen-Matrix wurde mit 2 x 5 ml 8 M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7,0, 500 mM NaCl gewaschen. Das PrP wurde von der Säule durch 6 x 5 ml 7,2 M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7,0, 50 mM Imidazol, 150 mM NaCl eluiert. Die Eluate wurden durch Ultrafiltration auf weniger als 3 ml eingengt.

Je 500 μ l des konzentrierten Nickel-Säulen Eluats wurden unter ständigem Rühren tropfenweise langsam in 50 ml 10 mM MES (Morpholinoethansulfonsäure) pH 6.0 verdünnt. Die Lösung wurde 4 - 12 h bei 4°C weiter gerührt und durch Zentrifugation bei 17 000 rpm für 30 min von ausgefallenem Protein abgetrennt. Der Überstand wurde dann durch Ultrafiltration auf weniger als 3 ml eingengt und durch erneute Zentrifugation bei 16 000 g für 30 min und 4°C von ausgefallenem Protein abgetrennt. Der Überstand wurde zweimal für 2 h und schließlich einmal über Nacht gegen den gewünschten Puffer (vgl. Tab. 6.2) dialysiert. Das Dialysat wurde in CD-spektroskopischen Messungen auf korrekte Faltung des PrP und in eindimensionalen NMR-Messungen auf Abwesenheit von niedermolekularen Kontaminationen überprüft.

Zu 3 ml der dialysierten PrP Lösung wurde soviel festes ⁶³CuCl₂ gegeben, dass das Verhältnis von Cu zu PrP Konzentration annähernd 5:1 betrug. Die Lösung wurde 1 h auf Eis inkubiert und bei 16 000 g 30 min zentrifugiert, um ausgefallenes Kupfer zu entfernen.

Oberhalb einer Proteinkonzentration von 60 μ M beginnen die Prion-Proteine Aggregate zu bilden. EXAFS benötigt aber Kupfer-Konzentrationen im millimolaren Bereich (vgl. Kap. 3.1). Daher wurde das kupferbeladene PrP durch Zugabe von Ammoniumsulfat bzw. PEG

(Polyethylenglycol) ausgefällt. Die Präzipitation wurde über Nacht auf Eis fortgesetzt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 16 000 g für 30 min pelletiert und mit viermal 30 µl destilliertem Wasser resuspendingiert. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 150 µl PrP Suspension.

Mit Hilfe der ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectroscopy) wurde die Kupferkonzentration der Lösung vor und nach der Präzipitation gemessen. Damit konnte die mittlere Kupferkonzentration pro Prion-Protein bestimmt werden.

Probe A	menschliches PrP(23-231) in 2mM MES, pH 6.0, c(Cu) gemittelt 1.7 pro PrP, Präzipitiert mit 90% Ammoniumsulfat
Probe B	menschliches PrP(23-231) in 2mM MOPS, pH 7.0, c(Cu) gemittelt 2.7 pro PrP, Präzipitiert mit 90% Ammoniumsulfat
Probe C	menschliches PrP(23-231) in 2 mM NEM, pH 6.0, c(Cu) gemittelt 0.75 pro PrP, Präzipitiert mit 50 % PEG
Probe D	menschliches PrP(23-231) in 2 mM NEM, pH 6.0, c(Cu) gemittelt 1.3 pro PrP, in Lösung

Tab. 6.2 Die mit XAS gemessenen menschlichen PrP-Proben; MES: Morpholinoethansulfonsäure; MOPS: Morpholinopropansulfonsäure; NEM: N-ethylmorpholin; PEG: Polyethylenglycol

Eine Auflistung der mit XAS gemessenen Proben ist in Tab. 6.2 dargestellt. Im Anhang E sind von all diesen Proben k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren mit ihren Fourier-Transformierten gezeigt. Um die Ergebnisse aus XAS besser mit EPR, ENDOR und ESEEM vergleichen zu können, wurden die Proben immer aus demselben Reinigungszyklus für die jeweiligen Messungen präpariert.

Für die XAS-Experimente wurden 1mm dicke PVC-Plättchen mit herausgefrästen Fenstern verwendet, auf die mit Zweikomponentenkleber (Uhu plus schnellfest) auf einer Seite eine Mylar-Folie aufgeklebt wurde. Darauf wurden knappe 150 µl der PrP-Suspension mit einer Pipette aufgebracht. Die andere Seite wurde dann mit selbstklebender Mylar-Folie luftdicht abgeschlossen. Mit der selbstklebenden Mylar-Folie nach oben wurde der Probenhalter auf der Probenstange des Kryostaten montiert. Die Probenstange mit dem Probenhalter wurde dann für einige Stunden fixiert, damit sich das Präzipitat im Probenhalter auf die nach unten zeigende Seite absetzen kann. Danach wurde der Probenhalter waagrecht in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Probenstange wurde dann so eingebaut, dass der Röntgenstrahl als erstes auf das Präzipitat trifft. Damit wurde erreicht, dass die von der Probe reemittierte Fluoreszenz-Strahlung nicht das Probenvolumen auf dem Weg zum Detektor durchlaufen muss. Damit wird das Signal- / Rauschverhältnis stark verbessert.

6.3 Ergebnisse und Auswertung

6.3.1 Untersuchungen an synthetisierten Octa-Repeat Segmenten

Alle Messungen wurden bei $T = 35$ K durchgeführt. Ein Vergleich der Messungen von Probe 1, Probe 4, Probe 5 und Probe 7 ist in Abb. 6.4 zu sehen. Die Daten weisen bis zu $k = 11 \text{ \AA}^{-1}$ eine gute Statistik auf. Bei größeren k -Werten überlagerte sich der Einfluss der Zink-Kante, die etwa 600 eV über der Cu-Kante liegt. Probe 1, Probe 4 und Probe 5 enthalten alle eine Octa-Repeat Sequenz PHGGGWGQ und unterscheiden sich nur in der Zusammensetzung des verwendeten Lösungsmittels (vgl. Tab. 6.1). Probe 7 besteht aus vier Octa-Repeats im gleichen Lösungsmittel wie Probe 5. Alle Proben zeigen den gleichen Verlauf des Spektrums. Auch der etwas kleinere Peak bei etwa $k = 6 \text{ \AA}^{-1}$ ist bei allen vier Spektren deutlich ausgeprägt.

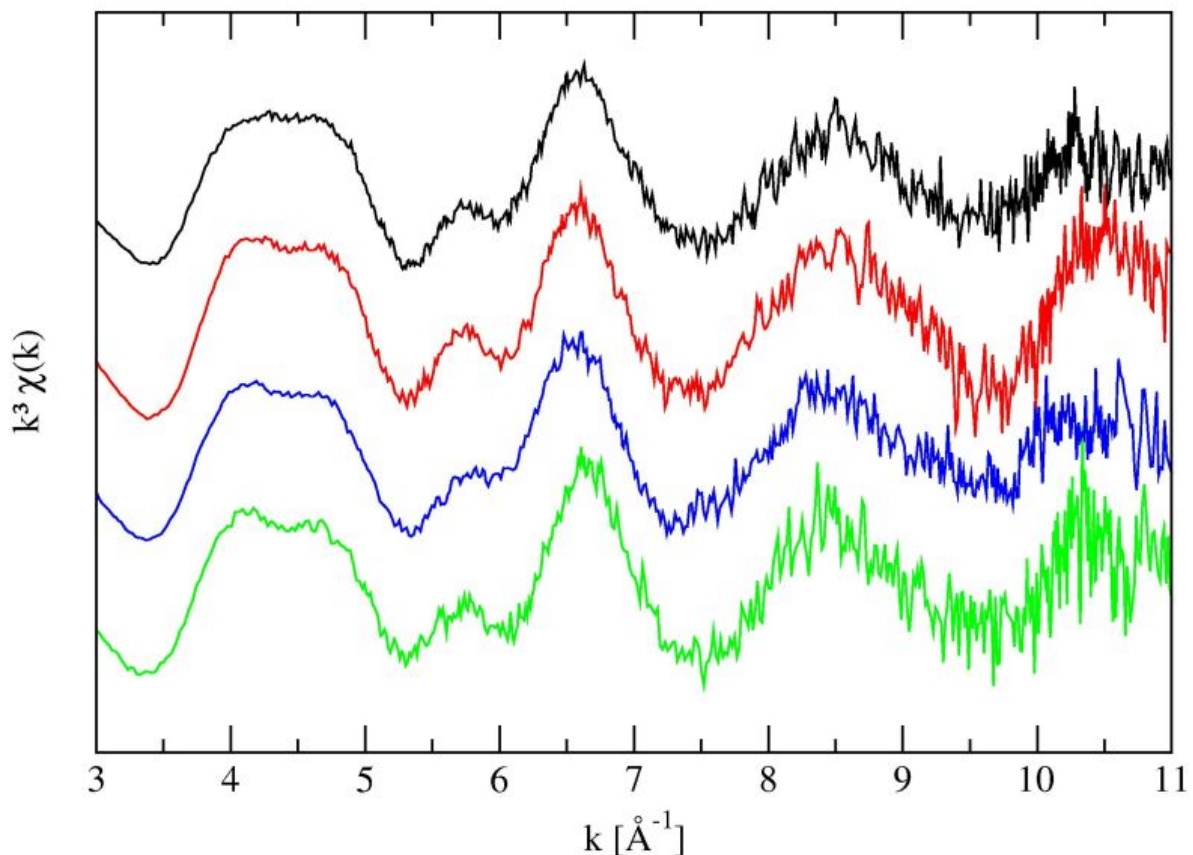


Abb. 6.4 Vergleich der gemessenen k^3 -gewichteten EXAFS-Spektren nach der Datenreduktion von Probe 1 (schwarz), Probe 4 (rot), Probe 5 (blau) und Probe 7 (grün). Die Transformation der Spektren in den k -Raum erfolgte nach Bestimmung der Kantenlage E_0 (vgl. Gleichung (2.27))

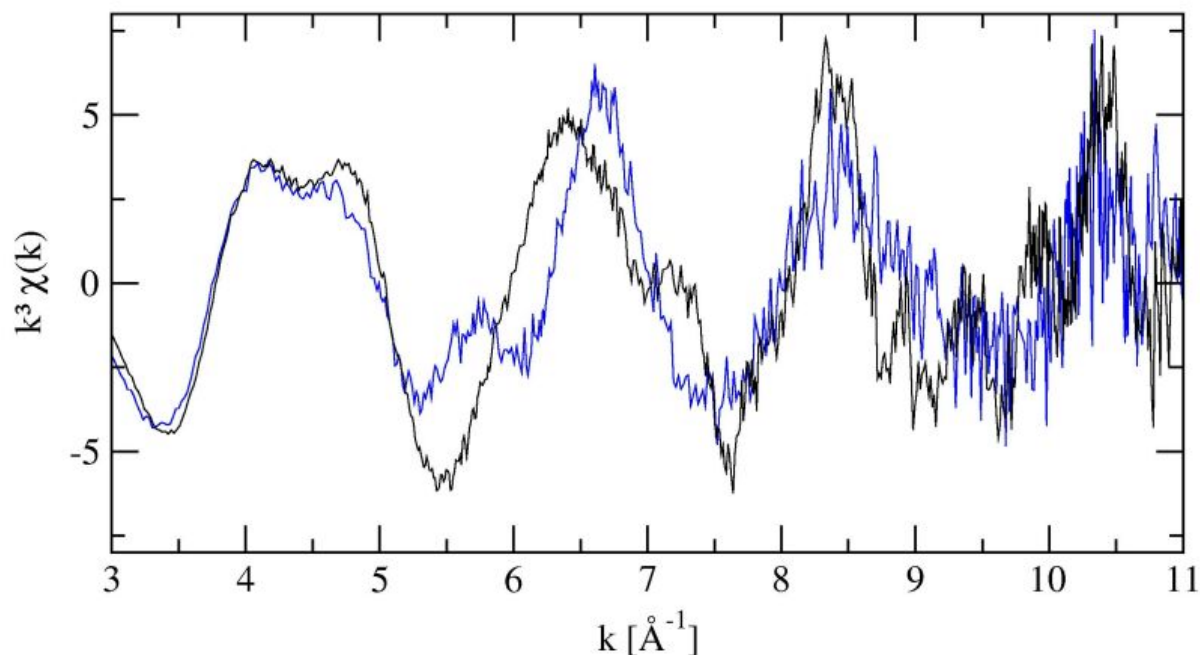


Abb. 6.5 Vergleich der gemessenen k^3 -gewichteten EXAFS-Spektren nach der Datenreduktion von einem Octa-Repeat in verschiedenen Micellen-Typen von Probe 3 (schwarz) und Probe 5 (blau). Die Transformation der Spektren in den k -Raum erfolgte nach Bestimmung der Kantenlage E_0 (vgl. Gleichung (2.27)).

Der Vergleich von Probe 3 und Probe 5 ist in Abb. 6.5 dargestellt. In Probe 3 wurde ein Kupferatom in Verbindung mit einem Octa-Repeat in SDS-Micellen untersucht. In Probe 5 wurden die SDS-Micellen durch DPC-Micellen ersetzt. Besonders die unterschiedlichen Peaks zwischen $k = 5 \text{ \AA}^{-1}$ und $k = 8 \text{ \AA}^{-1}$ zeigen einen signifikanten Unterschied der Kupferumgebung an.

An allen Proben wurden EPR-Messungen durchgeführt. Von Probe 1 wurden zusätzlich auch ENDOR- und ESEEM-Messungen durchgeführt. Aus diesen Untersuchungen konnte ein "Minimal Modell" erstellt werden. Das Bindungsmotiv, das aus EPR gewonnen wurde, geht von drei Stickstoffen und einem Sauerstoff als Bindungspartner aus, welche sich in einer planaren Anordnung mit dem Kupfer befinden. Mittels ENDOR Messungen an Probe 1 in deuteriertem Wasser konnte bestimmt werden, dass das Kupfer einen axialen Wasserliganden besitzt. Die ESEEM-Messungen konnten dahingehend interpretiert werden, dass nur ein Imidazolring aus einem Histidin an das Kupfer ligandiert ist. Der Imidazolring des Histidins besitzt zwei Stickstoffe, die an das Kupfer binden können. In diesem "Minimal Modell" bindet der $N\delta$ Stickstoff des Imidazolrings vom Histidin an das Kupfer. Dieser Stickstoff ist dergleiche, der auch in der Röntgenstruktur des HGGW-Segments bindet (vgl. Abb. 6.3). Diese Ergebnisse wurden dementsprechend für EXAFS interpretiert und mit dem

Softwarepaket EXCURVE98 angepasst (Binsted et al. 1992). Es wurde für die 3 Stickstoffe und 2 Sauerstoffe jeweils eine Schale gebildet. An die Stelle eines Stickstoffes wurde ein Imidazolring gesetzt. Als Anpassungsparameter dienten die Kantenverschiebungsenergie E_F , die Abstände der ligandierenden Atome und ein gemeinsamer A-Faktor für alle Atome. Innerhalb des Imidazolringes wurde Vielfachstreuung zugelassen.

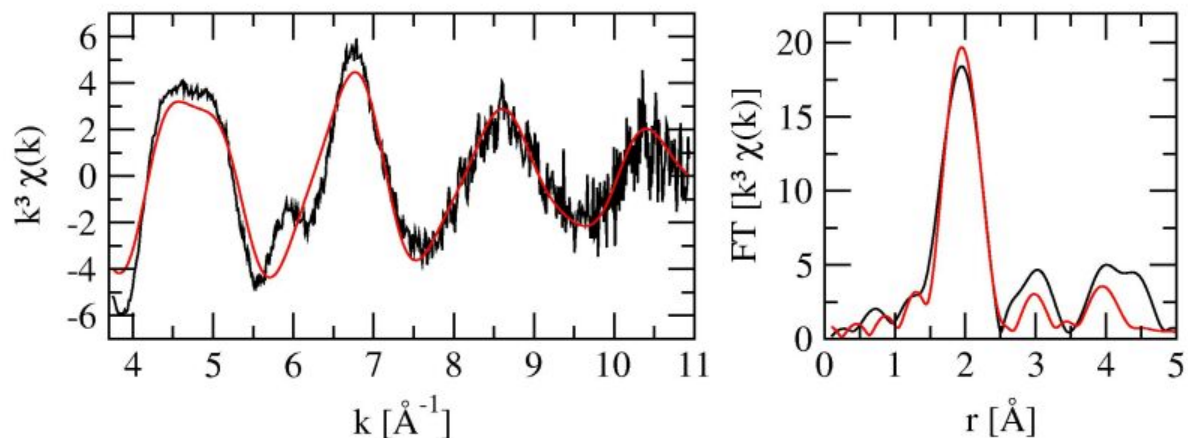


Abb. 6.6 Anpassung des k^3 -gewichteten EXAFS-Spektrums (rot) und seine Fourier-Transformierte von Probe 1 mit einem "Minimal Modell" erhalten aus EPR, ENDOR und ESEEM Messungen.

	r [Å]	A-Faktor [Å ²]
Cu-N δ 1	1.91 ± 0.02	0.007 ± 0.001
Cu-N ₁	1.94 ± 0.02	0.007 ± 0.001
Cu-N ₂	1.96 ± 0.02	0.007 ± 0.001
Cu-O _{pl}	1.96 ± 0.02	0.007 ± 0.001
Cu-O _{ax}	2.36 ± 0.02	0.007 ± 0.001
Cu-N ϵ 2	3.99 ± 0.02	0.007 ± 0.001
\angle Cu-N δ 1-N ϵ 2	$159^\circ \pm 5^\circ$	
\angle Cu-N δ 1-Imidazoleebene	$0^\circ \pm 5^\circ$	
E_F [eV]	-4.5	
R [%]	38.4	

Tab. 6.3 A-Faktoren, Abstände r , Winkel \angle Cu-N δ 1-N ϵ 2 und \angle Cu-N δ 1-Imidazolebene, Kantenverschiebungsenergie E_F und R-Faktor der Anpassung des EXAFS-Spektrums von Probe 1 mit einem "Minimal Modell" erhalten aus EPR, ENDOR und ESEEM. N δ 1: Am Kupfer bindender Stickstoff im Imidazolring; N₁ und N₂: Stickstoffe in der Cu-Liganden-Ebene; N ϵ 2: Stickstoff im Imidazolring; O_{pl}: Sauerstoff in der Cu-Liganden-Ebene; O_{ax}: axial gebundener Sauerstoff.

Der planare Imidazolring wurde als Einheit angepasst. Die Anpassungsparameter für den Imidazolring waren der Abstand von N δ und die beiden Winkel, welche die Lage der Ebene des Imidazolringes relativ zum Kupfer festlegen. Es wurde somit der Winkel zwischen der Verbindungslinie Cu-N δ 1 und N ϵ 2 und der Winkel der Ebene des Imidazolringes zur Verbindungslinie zwischen Cu-N δ 1 (\angle Cu-N δ 1-Imidazolebene) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.3 und Abb. 6.6 zu sehen. Hervorzuheben ist, dass mit dem "Minimal Modell" keine zufrieden stellende Anpassung des EXAFS-Spektrums erreicht wurde. Besonders der Peak bei $k = 6 \text{ \AA}^{-1}$ kann nicht wiedergespiegelt werden.

6.3.2 Untersuchungen an rekombinanten menschlichen PrP(23-231)

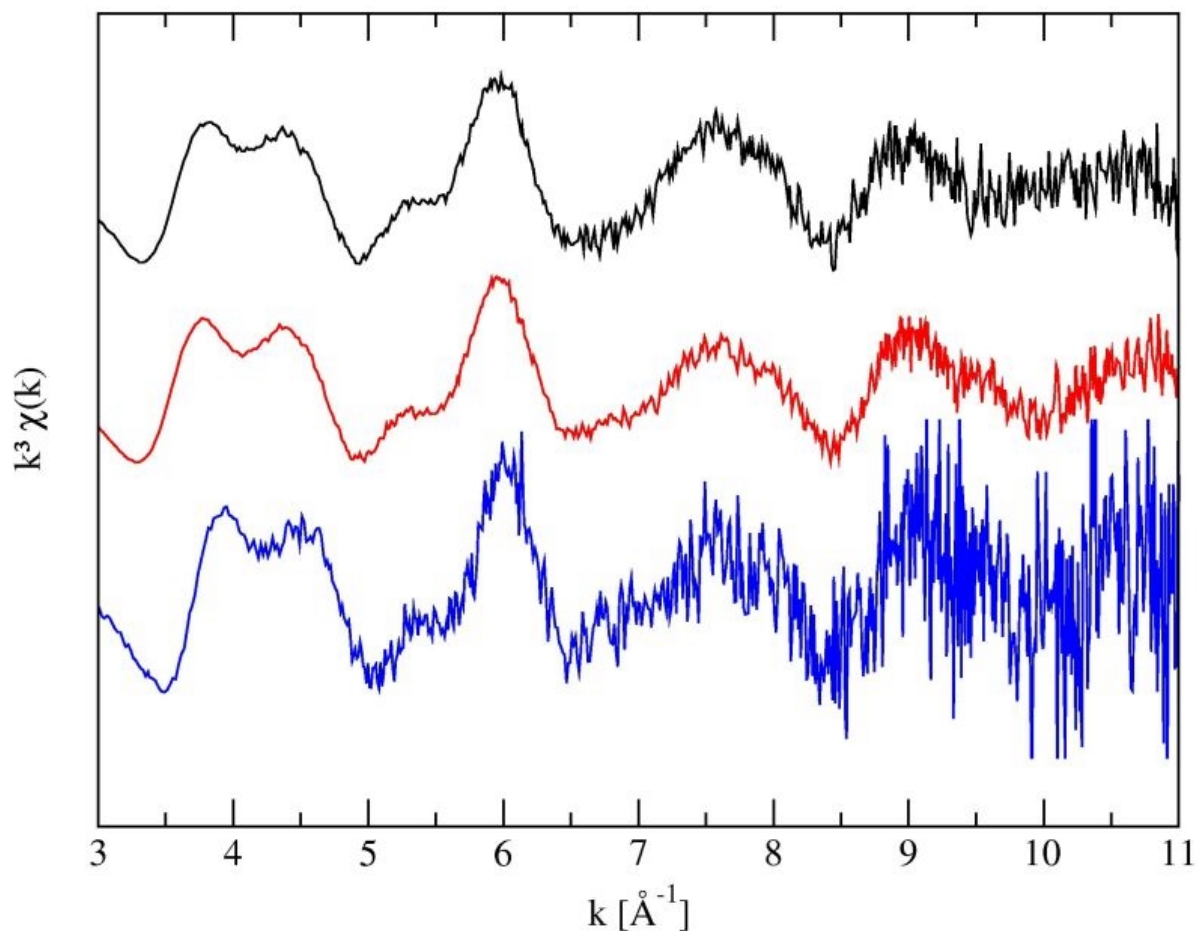


Abb. 6.7 Vergleich der gemessenen k^3 -gewichteten Spektren nach der Datenreduktion von Probe A (schwarz), Probe B (rot) und Probe D (blau). Die Transformation der Spektren in den k -Raum erfolgte nach Bestimmung der Kantenlage E_0 (vgl. Gleichung (2.27)).

Ein Vergleich von Probe A, Probe B und Probe D ist in Abb. 6.7 dargestellt. Bei Probe A und Probe B handelt es sich um Präzipitate, in Probe D um eine Probe in Lösung. Alle Proben enthalten das rekombinante PrP(23-231). Probe A und Probe D sind bei einem pH-Wert von 6.0 und Probe B bei einem pH-Wert von 7.0 gemessen worden. Das Spektrum von Probe D weist eine schlechtere Statistik auf als die Spektren von Probe A und B. Trotzdem ist klar ersichtlich, dass der Verlauf aller Spektren und deren Intensitäten sehr ähnlich ist. Besonders der Bereich von $k = 3 \text{ \AA}^{-1}$ und $k = 7 \text{ \AA}^{-1}$ zeigt eine sehr gute Übereinstimmung.

Der Versuch einer Anpassung eines Modells erfolgte an Probe B, weil dieses Spektrum bis etwa $k = 14 \text{ \AA}^{-1}$ die beste Statistik aufwies. Als Modell diente der Vorschlag von Viles et al. (1999). Dieses Modell basiert auf Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie, Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich, EPR, CD-Spektroskopie

und durch Aufzeichnung von Bindungskurven. In Abb. 6.8 ist dieser Modellvorschlag skizziert.

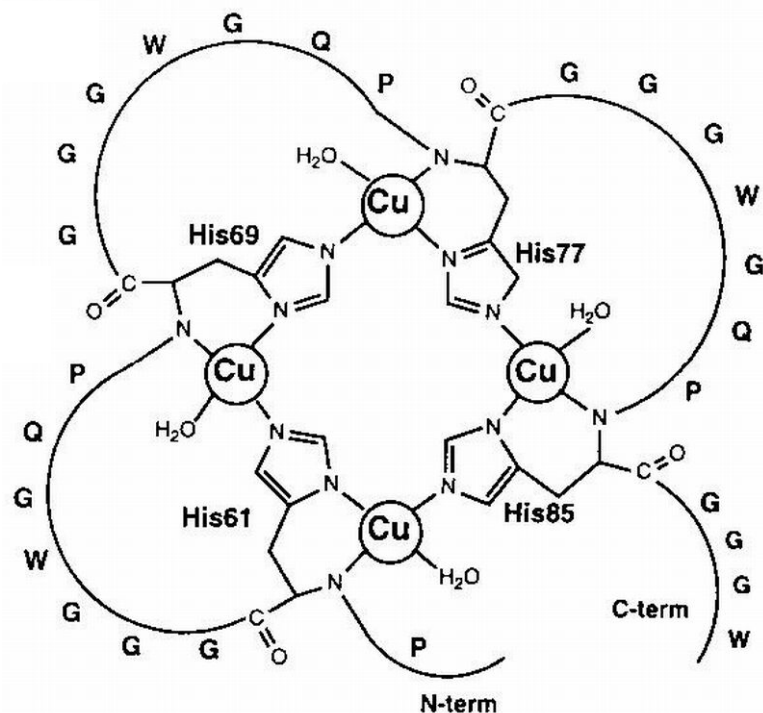


Abb. 6.8 Vorschlag eines Modells des Kupferbindungsplatzes in der Octa-Repeat Region des menschlichen Prion-Proteins (Viles et al. 1999).

Im Modell ist die Umgebung der einzelnen Kupferatome ähnlich. Da EXAFS auf alles Kupfer in der Probe sensitiv ist und zwischen einzelnen Kupferatomen nicht unterschieden werden kann, wurden die vier Kupferatome in der EXAFS-Auswertung, motiviert durch das Modell von Viles et al. (1999), zu einem Komplex mit einem Kupferatom und identischer Umgebung zusammengefasst. Für die Anpassung des EXAFS-Spektrums wurden zwei Histidine eingelesen. Als Liganden fungierten einmal der N δ 1-Stickstoff und zum anderen der N ϵ 2-Stickstoff. Bei den Histidin, bei welchem der N ϵ 2-Stickstoff bindet, wurde bei der Anpassung nur der Imidazolring berücksichtigt (Imidazolring 1). Beim anderen Histidin bindet sowohl der Rückgrat-Stickstoff als auch der N δ 1-Stickstoff an das Kupfer. Um die Abstände der beiden Stickstoffatome zum Kupfer anpassen zu können, wurde die Aminosäure in zwei Bereiche aufgeteilt, innerhalb derer Vielfachstreuung zugelassen wurde. Der eine Bereich ist der Imidazolring (Imidazolring 2). Im anderen Bereich befinden sich die restlichen Atome O, C, C α , C β und N (Bereich 1). Zusätzlich wurde im Bereich 1 die Rückgratkette am Stickstoffatom mit einem C α -Atom fortgesetzt. Abstand N-C α und \angle Cu-N-C α entsprechen dabei Standardwerten. In EXCURV98 werden standardisierte Aminosäuren eingelesen. Eine

Anpassung bei gleichzeitiger Modifikation der Aminosäure ist nicht implementiert. Dies wäre bei der Anpassung der Bindungsabständen von zwei Atomen einer Aminosäure vonnöten. Gerechtfertigt wird dieses Verfahren dadurch, dass bei dieser Einteilung der Bereiche die wichtigsten Vielfachstreuwege berücksichtigt werden.

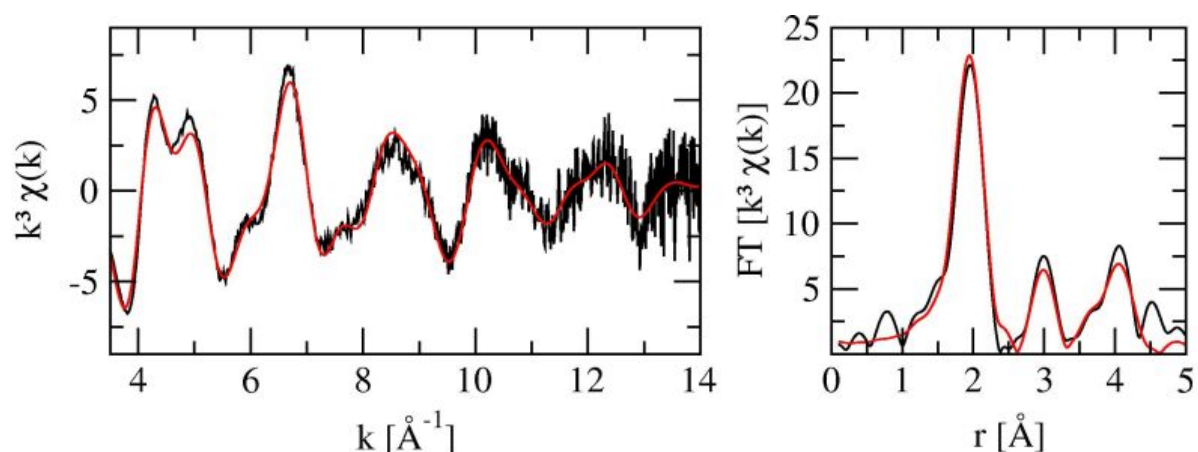


Abb. 6.9 Anpassung des k^3 -gewichteten EXAFS-Spektrums (rot) und seine Fourier-Transformierte von Probe B mit einem Modell aus Viles et al. (1999) (vgl. Abb. 6.8).

	r [Å]	A-Faktor [Å ²]
Cu-Nε2 (Imidazolring 1)	2.00 ± 0.02	0.009 ± 0.001
Cu-Nδ1 (Imidazolring 2)	2.01 ± 0.02	0.009 ± 0.001
Cu-N (Bereich 1)	1.97 ± 0.02	0.009 ± 0.001
Cu-O _{pl}	1.91 ± 0.02	0.009 ± 0.001
Cu-O _{ax}	2.26 ± 0.02	0.009 ± 0.001
∠ Cu-Nε2-Nδ1 (Imidazolring 1)	$166^\circ \pm 5^\circ$	
∠ Cu-Nδ1-Nε2 (Imidazolring 2)	$164^\circ \pm 5^\circ$	
E_F [eV]	-4.5	
R [%]	36.25	

Tab. 6.4 A-Faktor, Abstände r , Winkel Cu-Nε2-Nδ1 (Imidazolring 1) und Cu-Nδ1-Nε2 (Imidazolring 2), Kantenverschiebungsenergie E_F und R-Faktor der Anpassung des EXAFS-Spektrums von Probe B mit einem Modell aus Viles et al. (1999) O_{pl}: Sauerstoff in der Cu-Liganden-Ebene; O_{ax}: axial gebundener Sauerstoff.

Der Wasserligand in der Kupfer-Liganden-Ebene wird in EXAFS mit einem Sauerstoffliganden wiedergegeben. Über axiale Liganden trifft das Modell keine Aussagen. Als Anpassungsparameter dienen die Abstände der nächsten Liganden, die Lage der

Imidazolringe relativ zum Kupfer und ein A-Faktor für alle Atome. Das Modell musste dahingehend erweitert werden, dass ein zusätzlicher axialer Sauerstoffligand eingeführt wurde, um eine zufrieden stellende Anpassung zu erhalten. Das Ergebnis ist in Abb. 6.9 dargestellt. Die erhaltenen Parameter sind in Tab. 6.4 zu sehen. Der Verlauf des Spektrums wird sehr gut wiedergegeben. Auch die Vielfachstreubeiträge, welche sich in der Fourier-Transformierten bei Werten größer als 3 \AA widerspiegeln, sind durch die Anpassung der Imidazolringe sehr gut wiedergegeben worden.

6.4 Diskussion

6.4.1 Charakterisierung des Kupferbindungsplatzes in den Octa-Repeat Segmenten

Die Stabilität und Konformation der Kupferbindung innerhalb der Octa-Repeat Region wird kontrovers diskutiert. Es werden die verschiedensten Modelle für die Umgebung des Kupferatoms vorgeschlagen (Aronoff-Spencer et al. 2000; Burns et al. 2002). Auch der Einfluss des verwendeten Puffers auf die Konformation ist nicht geklärt.

Wie in in Abb. 6.4 gezeigt, wurde die Kupferbindung in drei verschiedenen Puffern untersucht. Probe 1 befindet sich in einem Puffer aus einem Gemisch aus Glycerol und NEM. Glycerol dient dabei als Frostschutzmittel. Probe 4 wurde in Wasser und 100 mM KCl gemessen. Probe 5 enthält einen Puffer aus DPC-Micellen. Die DPC-Micellen bilden Lipidvesikel und sollen eine Membran imitieren. Ihre Größe ist pH-Wert abhängig. Bei einem pH-Wert von 7.0 besteht eine Micelle aus etwa 60 - 100 DPC-Molekülen. DPC-Moleküle sind zwitterionisch und somit neutral.

Die EXAFS-Spektren dieser drei Proben weisen keinen wesentlichen Unterschied auf. Dies bedeutet aber nicht, dass die Umgebung der Kupferatome in allen Proben die Gleiche sein muss. Da XAS auf alles Kupfer in der Probe sensitiv ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Spektrum ein Resultat verschiedener Kupferkomplexe ist. Mittels EPR konnte bei Probe 1 und Probe 5 nur eine Spezies beobachtet werden. EPR-Ergebnisse weisen für Probe 1 und Probe 4 auf ein Bindungsmotiv aus 3N1O hin. Dagegen ist bei Probe 4 eine deutliche Veränderung des EPR-Spektrums zu beobachten. Dies führt man auf die Bildung von zwei Spezies zurück. In allen Proben wurde kein freies Kupfer beobachtet. Wenn EXAFS-Spektren den gleichen Verlauf zeigen, bedeutet das, dass die stärksten Streubeiträge sich von Probe zu Probe nicht unterscheiden. Dies sind die Einfachstreuung an den nächsten Liganden und die Beiträge der Vielfachstreuung. Aus den EPR-Ergebnissen lässt sich folgern, dass Probe 1 in NEM und Probe 5 in DPC-Micellen vergleichbare Strukturen mit gleichen Liganden bilden. Als mögliche Liganden für den Kupferkomplex kommen entweder Stickstoff- oder Sauerstoffatome in Frage. Dies erklärt auch die Ähnlichkeit der EXAFS-Spektren. Tauscht ein Stickstoff-Ligand gegen einen Sauerstoffliganden oder umgekehrt aus und verändert sich dadurch die Vielfachstreuung des Systems nicht gravierend, ist im EXAFS-Spektrum kein Unterschied zu erkennen, da Stickstoff und Sauerstoff sehr ähnliche

Streuphasen besitzen. Legt man als Beispiel das Bindungsmotiv der Röntgenstrukturanalyse des HGGGW-Segments zu Grunde, könnte man ein ähnliches EXAFS-Spektrum von diesem Komplex dadurch erhalten, dass ein Stickstoff-Ligand aus einem Glycin durch einen Sauerstoff ersetzt wird. Dieser Sauerstoff könnte aus einem Wasser oder einer anderen Carboxyl-Gruppe stammen. Ein einfaches Glycin liefert auch keinen wesentlichen Anteil zur Vielfachstreuung. Mit Sicherheit bindet aber der Imidazolring des Histidins in allen drei Proben. Denn ein Austausch des Histidins gegen einen anderen Liganden würde eine ausgeprägte Änderung des Spektrums durch den Verlust seiner starken Vielfachstreubeiträge hervorrufen. Dass ein Histidin bindet, wurde mit ESEEM an Probe 1 bestimmt. Mit EXAFS kann belegt werden, dass mindestens ein Histidin am Kupfer bindet. Die Intensität der Vielfachstreubeiträge in der Fourier-Transformierten von Probe 1 zwischen 3 und 5 Å kann schon mit dem Beitrag eines Imidazolrings angepasst werden.

Das Prion-Protein bindet über den C-Terminalen GPI-Anker an der Zellmembran. Es ist anzunehmen, dass das Protein mit den Lipid-Bilayern interagiert. Dabei könnte die Konformation der unstrukturierten N-terminalen Hälfte des Proteins und somit auch der Verlauf der Kupferbindung moduliert werden. Zur Bestimmung eines geeigneten Lipid Imitats wurden zwei verschiedene Typen von Micellen verwendet und davon jeweils ein EXAFS-Spektrum bestimmt. Zum einen sind dies die zuvor beschriebenen DPC-Micellen (Probe 5). Zum anderen sind dies SDS-Micellen. SDS-Micellen sind die am häufigsten verwendeten Nachbildungen für Zellmembranen zur Untersuchung von Konformationsstudien von Peptiden in der Umgebung von Lipiden. SDS-Micellen bestehen aus 60 - 100 SDS-Molekülen, deren Kopfgruppe negativ geladen ist. Die Spektren beider Proben zeigen erhebliche Unterschiede (vgl. Abb. 6.5). Diese Unterschiede können nur mit deutlichen strukturellen Änderungen erklärt werden. Von Probe 1 in NEM ist bekannt, dass es einen einzigen stabilen Komplex bildet. Der Vergleich von Probe 5 in DPC-Micellen mit Probe 1 in NEM liefert keinen Unterschied in den Spektren. Will man den Cu-Oktapeptid Komplex in natürlicher Umgebung untersuchen, so sollte man die DPC-Micellen verwenden, da ebenfalls ein einziger stabiler Komplex gebildet wird. Inwieweit der Cu-Oktapeptid Komplex mit den Lipiden wechselwirkt, ist mit EXAFS nicht zu bestimmen, solange die Cu-Umgebung davon nicht beeinflusst wird.

Bei Probe 7 handelt es sich um die komplette Octa-Repeat Region in einer Lösung aus DPC-Micellen. Das EXAFS-Spektrum von Probe 7 ist wieder vergleichbar mit den anderen Spektren. Die Statistik ist aber nicht zufrieden stellend. Mit EPR-Untersuchungen an Probe 7

konnten aber wieder zwei Spezies beobachtet werden. Bei Untersuchungen an Tetraoktapeptiden mit 1, 2 und 3 molar-äquivalentem Kupfer in einem Puffer aus 25mM NEM wurde nur eine Spezies beobachtet (Viles et al. 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass auch bei den Tetraoktapeptiden mit Kupfer in einer Lösung aus DPC-Micellen eine Spezies beobachtet werden sollte. Die DPC-Micellen eignen sich somit nicht zur Untersuchung der Tetraoktapeptide in einer Membran imitierenden Umgebung.

Mit Probe 1 wurde versucht, die Kupferbindung an ein Oktapeptid genauer zu beschreiben. Anhand der EPR-, ENDOR- und ESEEM-Untersuchungen konnte ein "Minimal Modell" erstellt werden. Aus diesem "Minimal Modell" konnte mittels EXAFS die Lage des Imidazolrings und die Abstände der nächsten Liganden bestimmt werden. Der N δ 1-Stickstoff des Imidazolrings hat einen Abstand von 1.91 Å vom Kupferatom, und das Kupferatom liegt in einer Ebene mit dem Imidazolring. Der Winkel Cu-N δ 1-Ne2 beträgt $159^\circ \pm 5^\circ$. Mittels ENDOR-Untersuchungen können auch Abstandsinformationen über die Protonenlagen bestimmt werden. Zusätzlich kann noch der Winkel zwischen der Normalen der Kupfer-Liganden-Ebene und dem Proton bestimmt werden. Ein Winkel von 0° entspricht einem Proton senkrecht zur Kupfer-Liganden-Ebene. Der Bereich, in dem ENDOR sensitiv ist, liegt zwischen 2 und 5 Å. Bei ENDOR wird die Dipolwechselwirkung des Protons mit dem Kupfer detektiert. Protonenpositionen können jedoch nicht in ein Modell für EXAFS übersetzt werden, da EXAFS nicht sensitiv auf Protonen ist.

Dass die Ergebnisse der Anpassung des "Minimal Modells" mit den Ergebnissen der ENDOR-Untersuchungen kompatibel sind, kann an einem Beispiel plausibilisiert werden. Mit ENDOR konnten eines oder mehrere Protonen in einem Abstand von 3.1 Å beobachtet werden. Mindestens eines davon sollte sich in der Kupferliganden-Ebene befinden. Aus der mit EXAFS bestimmten Lage des Imidazolrings relativ zum Kupfer können mit dem Programm X-PLOR (Brünger 1992) die Protonenpositionen des Imidazolrings aus Standardgeometrien berechnet werden. Die berechnete Position des H ϵ 1 des Histidins stimmt mit den Vorhersagen aus ENDOR überein. Bei einem größeren Winkel Cu-N δ 1-Ne2 wird der Abstand des Protons H ϵ 1 größer und rutscht in den Abstandsbereich von 3.2 Å – 3.7 Å. In diesem Bereich wurden mit ENDOR keine Protonen detektiert. Dies beweist, dass mittels EXAFS die Lage des Imidazols relativ zum Kupfer bestimmt werden konnte und kompatibel mit den ENDOR-Ergebnissen ist.

Aus den EPR-Untersuchungen kann von einem Bindungsmotiv 3N1O in axialer Symmetrie ausgegangen werden. Es existiert keine Information über die genaue Art der Liganden. Mit EXAFS konnte die radiale Verteilung der nächsten Liganden bestimmt werden. Eine Stickstoffposition ist vom N δ 1-Stickstoff des Imidazolringes besetzt. Die Abstände lagen für die anderen drei Atome bei etwa 1.95 Å. Bei den Anpassungen war die Tendenz zu erkennen, dass ein Abstand der Stickstoffe oder des Sauerstoffs im Bereich von 2.35 Å zu finden sein sollte. Diese Vermutung wird durch mindestens drei Modellkomplexe gestützt, die das gleiche Bindungsmotiv 3N2O besitzen. Bei diesem Bindungsmotiv liegt ein Sauerstoffatom axial zur Kupfer-Liganden-Ebene in einem Bereich, wie es EXAFS aufzeigt (vgl. Tab. 6.5). Diese Modellkomplexe weisen ebenfalls eine planare Anordnung von 3N1O auf.

Referenz	Cu-N1 _{pl} [Å]	Cu-N2 _{pl} [Å]	Cu-N3 _{pl} [Å]	Cu-O _{pl} [Å]	Cu-O _{ax} [Å]	alle \angle (Ligand-Cu-Ligand) etwa 90°
(Priolo et al. 1983)	1.913	2.025	1.997	1.886	2.378	Axialer Ligand H ₂ O,
(Félix et al. 1994)	2.005	1.991	1.999	2.030	2.249	Axialer Ligand H ₂ O
(Miklos et al. 2001)	2.086	1.984	2.011	1.956	2.471	Beide O-Liganden H ₂ O

Tab. 6.5 Modellkomplexe und die Abstände der nächsten Cu-Liganden in Angström bei einem Bindungsmotiv 3N2O (aus der Cambridge Structure Database). O_{pl}: Sauerstoff in der Kupfer-Liganden-Ebene; O_{ax}: axialer Sauerstoff.

In der Röntgenstrukturanalyse des HGGGW-Segments wird der axiale Ligand als Wasser interpretiert. Zur Klärung der Art des axialen Liganden wurden wieder ENDOR-Untersuchungen durchgeführt. Bei Verwendung von deuteriertem Wasser tauschen alle austauschbaren Protonen gegen Deuteronen aus. Welche Protonen bei Aminosäuren gegen Deuteronen austauschen können, ist in Anhang A dargestellt. Ebenso tauscht auch jedes ligandierende Wasser gegen deuteriertes Wasser aus. Deuteronen sind in ENDOR-Spektren nicht sichtbar. Es wurde beobachtet, dass eine Protonenresonanz verschwindet die mindestens einem Proton in einem Abstand von 3.1 Å zugeordnet wird und axial zur Kupfer-Liganden-Ebene liegt. Der Abstand von 2.35 Å für ein Sauerstoffatom und Protonenabstände von 3.1 Å können mit einem Wassermolekül exakt wiedergegeben werden.

In diesem "Minimal Modell" sind alle Einfachstreubeiträge der nächsten Liganden berücksichtigt worden. Durch den Imidazolring ist auch ein Hauptbestandteil der Vielfachstreubeiträge berücksichtigt. Trotzdem konnte das Spektrum nicht restlos zufrieden stellend wiedergegeben werden. Es müssen noch zusätzliche Vielfachstreubeiträge in Betracht

gezogen werden. Sind die Liganden aber nicht bekannt, kann EXAFS alleine keine Aussagen darüber treffen.

Ein neuer Ansatz zum Erreichen einer Strukturlösung, wird hier in Kombination von EXAFS mit EPR, ENDOR und X-PLOR versucht. Mit der bekannten Sequenz des Octa-Repeats können aufbauend auf den spektroskopischen Untersuchungen Modelle mit Standard-Abständen und Standard-Winkeln entwickelt werden. Bei einem planaren 3N1O Bindungsmotiv und der Sequenz Ac-PHGGGWGQ-NH₂ ergeben sich daraus 189 mögliche Konformationen für die Kupferbindung, wobei der Imidazolring mit seinem N δ 1-Stickstoff an das Kupfer bindet. Jedes dieser Modelle besitzt eine Vielzahl von Freiheitsgraden. Für jede Aminosäure sind dies die Winkel Φ und Ψ des Rückgrats und die Rotationswinkel der Einfachbindungen in den Aminosäureresten. Durch Rotation um die Einfachbindungen, Φ und Ψ wird mit X-PLOR durch eine Energieminimierung versucht, eine mögliche Struktur zu finden. Die EXAFS-Ergebnisse dienen bei der Energieminimierung als Randbedingungen. Aus den daraus erhaltenen Modellen können auch Protonenpositionen bestimmt werden. Diese Positionen müssen mit den Protonenpositionen kompatibel sein, welche aus ENDOR bestimmt wurden. Von diesen Strukturen kann nun das EXAFS-Spektrum simuliert werden. Dazu werden alle Atome mit einem Abstand kleiner als 5 Å berücksichtigt. Weiter entfernte Atome liefern keinen nennenswerten Beitrag zum EXAFS-Spektrum. Vielfachstreuung zwischen allen Atomen ist zugelassen. Als mögliche Parameter zur Verbesserung der Übereinstimmung des simulierten Spektrums zum gemessenen Spektrum können die A-Faktoren und die Kantenverschiebungsenergie E_F dienen. Ferner ist auch die leichte Variation der Abstände ausgewählter Bereiche von Atomen in den Größenordnungen von 0.02 Å zulässig. In einem Bereich befinden sich zum Beispiele alle Atome des Imidazolringes. Die Bereiche werden so gewählt, dass die auftretenden Vielfachstreubeiträge berücksichtigt werden.

Abb. 6.10 zeigt ein simuliertes EXAFS-Spektrum nach einer Energieminimierung. In diesem Beispiel binden der N δ 1-Stickstoff des Histidins, der Amidstickstoff vom His2, der Amidstickstoff vom Gly4 und der Sauerstoff vom Gly7. Die Aminosäuren sind nach ihrer Reihenfolge in der Sequenz PHGGGWGQ nummeriert. Es wurden die A-Faktoren und die Kantenverschiebungsenergie angepasst. Durch Variation der Abstände um ± 0.02 Å konnte die Übereinstimmung mit dem gemessenen Spektrum verbessert werden. In Tab. 6.6 sind die wichtigsten Parameter dieses Modells zu sehen. Der Verlauf ist bis auf den Bereich bei etwa k

$= 6 \text{ \AA}^{-1}$ sehr gut wiedergegeben. Dieser Bereich wird aber besser wiedergegeben als beim "Minimal Modell" (vgl. Abb. 6.6). Die Abstände der nächsten Liganden liegen alle im Bereich des "Minimal Modells". Besonders die Lage des Imidazolringes relativ zum Kupfer stimmt mit dem "Minimal Modell" gut überein. Der R-Faktor sinkt von 38 % auf 28 %. Durch dieses Verfahren ist die Güte der Anpassung erheblich verbessert worden. In diesem Beispiel ist die Ligandierung des Kupfers aber nicht planar, sondern stark tetraedisch verzerrt. Dies widerspricht den EPR-Ergebnissen. So muss dieses Modell trotz Verbesserung der Anpassung des EXAFS-Spektrums verworfen werden.

Um entscheiden zu können, welches die Konformation der Kupferbindung innerhalb des Oktapeptides ist, muss das zuvor geschilderte Iterationsverfahren auf alle möglichen Konformationen angewandt werden. Zusätzlich müssen die erhaltenen Strukturen auf Standardgeometrien und ihre Kompatibilität mit allen zugänglichen Ergebnissen überprüft werden. Erst wenn alle Ergebnisse in einem konsistenten Bild zusammengefasst werden können, ermöglicht dies eine klare Aussage über die Konformation des Kupferbindungsplatzes innerhalb des Oktapeptides zu treffen. EXAFS kann hierzu die nötigen Randbedingungen für die Energieminimierung liefern. In einem letzten Schritt kann mit Hilfe der Simulation des EXAFS-Spektrums überprüft werden, ob die Struktur plausibel ist.

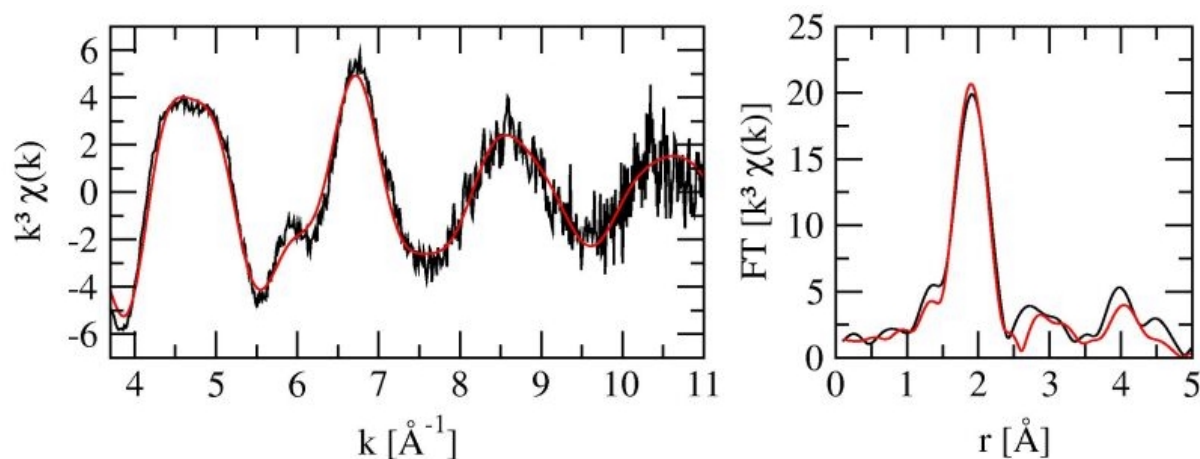


Abb. 6.10 Simulation des k^3 -gewichteten EXAFS-Spektrums (rot) und seine Fourier-Transformierte von Probe 1 mit einem Modell erhalten aus einer Energieminimierung und nachfolgender Anpassung der Abstände im Rahmen der Fehlergrenzen, der A-Faktoren und der Kantenverschiebungsenergie E_F .

	r [Å]	A-Faktor [Å ²]
Cu-Nδ1	1.95 ± 0.02	0.006 ± 0.001
Cu-His2N	1.94 ± 0.02	0.006 ± 0.001
Cu-Gly4N	2.00 ± 0.02	0.006 ± 0.001
Cu-Gly7O	1.89 ± 0.02	0.006 ± 0.001
Cu-O _{ax}	2.45 ± 0.02	0.010 ± 0.001
Cu-Nε2	4.04 ± 0.02	0.014 ± 0.001
∠ Cu-Nδ1-Nε2	154° ± 5°	
∠ Cu-Nδ1-Imidazoleebene	0° ± 5°	
E _F [eV]	-5.38	
R [%]	28.29	

Tab. 6.6 A-Faktoren, Abstände r, Winkel ∠ Cu-Nδ1-Nε2 und ∠ Cu-Nδ1-Imidazolebene, Kantenverschiebungsenergie E_F und R-Faktor der Simulation des EXAFS-Spektrums von Probe 1 nach der Energiminimierung mit X-PLOR und anschließender Anpassung der A-Faktoren, Kantenverschiebungsenergie und Variation der Abstände gesamter Bereiche im Bereich ± 0.02 Å. Nδ1: Am Kupfer bindender Stickstoff im Imidazolring; N₁ und N₂: Stickstoffe in der Cu-Liganden-Ebene; Nε2: Stickstoff im Imidazolring; O_{ax}: axial gebundener Sauerstoff.

6.4.2 Der N-terminale Kupferbindungsplatz in menschlichen Prion-Proteinen

Um die für EXAFS nötigen Kupferkonzentrationen zu erreichen, wurde bei Probe A und Probe B an Präzipitaten gemessen. Probe D war eine reine Kontrollprobe. Die Statistik des Spektrums von Probe D war nicht zufrieden stellend. Sie reicht aber aus, um den Verlauf des Spektrums von Probe D mit dem Verlauf der Spektren der präzipitierten Probe vergleichen zu können. In Probe D wurde das kupferbeladene PrP in einem NEM-Puffer ohne Präzipitation gemessen. Sowohl das Ammoniumsulfat aus der Präzipitation als auch die Puffer von Probe A und Probe B könnten über ihre Schwefelgruppen mit dem Kupfer wechselwirken. Das Spektrum von Probe D stimmt mit den Spektren von Probe A und Probe D überein (vgl. Abb. 6.7). Probe D enthält keine zusätzlichen Schwefelgruppen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Präzipitation mit Ammoniumsulfat keinen Einfluss auf die Kupferbindung hat und die Puffer MOPS und MES geeignete Puffer zur Untersuchung des Kupferbindungsplatzes in der N-terminalen Domäne des Prion-Proteins sind. Desweiteren konnte somit gezeigt werden, dass XAS-Messungen an Präzipitaten durchaus zum Erfolg führen können. Von besonderem Interesse ist dies im Falle von zu geringen Metallkonzentrationen. Durch Messung an Präzipitaten können diese Proben für XAS-Untersuchungen zugänglich gemacht werden.

Zusätzlich muss noch geprüft werden, ob das Kupfer nur innerhalb der Octa-Repeat Region bindet. Ein Vergleich der gemessenen EXAFS-Spektren von Probe A, Probe B und Probe D mit dem EXAFS-Spektrum, das durch XAS-Messungen an PrP(91-231) erhalten wurde, zeigt deutliche Unterschiede (Hasnain et al. 2001). Ein Kupferatom bindet hier im Bereich zwischen HIS96 und HIS111. Das Met109 ligandiert das Kupfer mit seinem Schwefelatom. An Probe A und Probe B wurden auch EPR-Untersuchungen durchgeführt. Ein direkter Schwefelligand kann aus den erhaltenen EPR-Spektren ausgeschlossen werden. Auch freies Kupfer wurde nicht beobachtet. Aus all diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass in Probe A und Probe B das Kupfer ausschließlich an die Octa-Repeat Region bindet.

Probe A wurde bei einem pH-Wert von 6.0 untersucht und Probe B bei einem pH-Wert von 7.0. Bei diesen Proben konnte mittels der ICP-MS die mittlere Kupferkonzentration pro Prion-Protein bestimmt werden. Bei Probe A sind das im Mittel 1.7 Kupferatome pro Prion-Protein. In Probe B sind es dagegen im Mittel 2.7 Kupferatome pro Prion-Protein. Die unterschiedliche Beladung kann dadurch erklärt werden, dass mit höheren pH-Werten die Wahrscheinlichkeit der Deprotonierung der Histidine zunimmt. Sind die Imidazolringe der

Histidine deprotoniert, können Sie an das Kupfer binden. Die gemessenen EXAFS-Spektren sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Da in Probe B ein Kupferatom im Mittel mehr gebunden ist als in Probe A und die EXAFS-Spektren identisch sind, lässt dies den Schluss zu, dass die Umgebung der einzelnen Kupferatome die gleiche ist. Durch den Vergleich mit den EXAFS-Messungen an einfachen Oktapeptiden (vgl. Abb. 6.4) ist eindeutig zu erkennen, dass sich der Kupferbindungsplatz in der N-terminalen Domäne des gesamten Prion-Proteins entscheidend von einem einfachen Oktapeptid unterscheidet.

Die EPR-Spektren von Probe A und Probe B konnten mit nur einer Spezies erklärt werden. Die Ergebnisse weisen auf eine planare Anordnung mit einem Bindungsmotiv aus 3N1O hin. Über den axialen Liganden konnte keine Aussage getroffen werden. Die EXAFS-Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass die Umgebung der bindenden Kupferatome identisch ist. Die Fourier-Transformierte des EXAFS-Spektrum von Probe B im Bereich größer als 3 Å zeigt einen erheblichen Anteil von Vielfachstreuung (Abb. 6.9). Dieser kann durch die Ligandierung von zwei Histidinen an das Kupfer erklärt werden. In Probe B sind in der Octa-Repeat Region mindestens drei Kupferatome gebunden, und es befinden sich dort vier Histidine. Wenn bei drei Kupferatomen jedes Kupfer zwei Imidazole bindet, müssen bei nur vier Imidazolringen in der Octa-Repeat Region die Kupferatome über die Imidazolringe miteinander verknüpft sein. Möglich wird dies dadurch, dass das Imidazol sowohl am N δ 1-Stickstoff als auch am N ϵ 2-Stickstoff Kupferatome binden kann. Weiter kann man folgern, dass bei zwei Bindungsplätzen pro Imidazolring und zwei Imidazolringen pro Kupfer höchstens vier Kupferatome pro Octa-Repeat Region binden können.

In einer Cu₂Zn₂ Superoxiddismutase fungiert ebenfalls ein Imidazolring als Brückenligand (Parge et al. 1992). Es wurde ein Kupfer-Kupfer-Abstand von 6.3 Å beobachtet. Auch hier ist ein solcher Abstand zu erwarten, da ein typischer Cu-Stickstoff Abstand im Bereich von 2.0 Å und der Durchmesser eines Imidazols ebenfalls bei etwa bei 2.0 Å liegt. Ein Cu-Cu-Abstand von über 6 Å ist mit EXAFS nicht detektierbar und wurde deshalb nicht berücksichtigt.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse passen in das von Viles et al. (1999) vorgeschlagene Modell für den Kupferbindungsplatz in der N-terminalen Domäne des menschlichen Prion-Proteins (vgl. Abb. 6.8). Das Bindungsmotiv 3N1O ist in diesem Modell erkennbar, zwei Imidazolringe binden pro Kupferatom, und die Kupferatome sind über die Imidazolringe verbrückt. Der dritte Stickstoffligand des Kupfers ist in diesem Modell der Rückgratstickstoff

eines Histidins. Der Sauerstoffligand in der Ebene ist aus einem Wassermolekül gebildet. Für diese beiden Kupferliganden gibt es Beispiele in der Literatur (Sigel und Martin 1982; Perkins et al. 1984; Kaim und Schwederski 1991; Miklos et al. 2001).

Aufgrund der von Viles et al. (1999) angenommenen kooperativen Bindung von Kupferatomen an die Octa-Repeat Region geht dieses Modell von vier Kupferatomen aus (Garnett und Viles 2003). Da EXAFS keinen Cu-Cu-Abstand dieser Größenordnung bestimmen kann und auf alle Kupferatome in der Probe sensitiv ist, werden alle vier Kupferatome zu einem Kupferatom mit gleicher Umgebung zusammengefasst. Ob es nun drei oder vier Kupferatome pro Octa-Repeat Region sind, ist somit für die Anpassung nicht von Belang. Gerechtfertigt wird dieses Vorgehen dadurch, dass das EPR-Spektrum von Probe B nur eine Spezies anzeigt. Es ist also anzunehmen, dass die drei bzw. vier Kupferatome die gleiche Umgebung besitzen.

Eine Anpassung dieses Modells an das gemessene Spektrum liefert die Daten in Tab. 6.3. Das daraus resultierende EXAFS-Spektrum ist in Abb. 6.9 dargestellt. Das Modell wurde dahingehend erweitert, dass an jedem Kupferatom axial ein Sauerstoffatom bindet. Ein Hinweis auf den axialen Liganden liefert die nicht korrekte Anpassung des Peaks in der Fourier-Transformierten bei etwa 2 Å ohne einen Atomabstand größer als 2.2 Å. Auch bei den einfachen Octa-Repeats wurde ein axialer Wasserligand beobachtet. Von Miklos et al. (1999) wurde auch ein 3N2O Kupferkomplex untersucht, dessen zwei Sauerstoffliganden von zwei Wassermolekülen stammen. Der erhaltene Abstand des axialen Sauerstoffs von 2.261 Å stimmt gut mit den Literaturdaten in Tab. 6.5 überein. Eine weitere experimentelle Bestätigung des Vorhandenseins beider Wasserliganden könnte mit ENDOR-Messungen an Probe B mit deuteriertem Wasser erreicht werden.

Anhand der Güte der Anpassung kann darauf geschlossen werden, dass die meisten Einfach- und Vielfachstreubeiträge berücksichtigt wurden. Der Abstand und die Lage der beiden Imidazolringe wird unabhängig voneinander angepasst. Die Kupferatome liegen bei beiden Imidazolen in der Imidazolringebene. Da die Kupferatome über die Imidazole verbrückt sind, ergibt sich daraus eine sehr planare Anordnung der Kupferatome mit ihren ligandierenden Imidazolringen zueinander. Die erfolgreiche Anpassung mit nur einem A-Faktor für alle Schalen weist ebenfalls auf eine sehr kompakte und in sich homogene Struktur hin. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den gleichen Abständen beider Imidazole zum Kupfer und den gleichen Winkeln ($\angle \text{Cu-N}\delta 1\text{-N}\epsilon 2$) wider.

Die hier erhaltenen Ergebnisse können in das Modell der kooperativen Bindung der Kupferatome innerhalb der N-terminalen Domäne des menschlichen Prion-Proteins integriert werden. Insbesondere der Beleg der Verbrückung der Kupferatome über die Imidazolringe und die sehr kompakte Anordnung legt das kooperative Bindungsverhalten nahe. Es ist bekannt, dass bei Bindung eines Metallatoms an den N δ 1-Stickstoff des Imidazols der pK_a-Wert des N ϵ 2-Stickstoffes gesenkt wird. Dies ermöglicht es, ein weiteres Metallatom an den N ϵ 2-Stickstoff zu binden (Sundberg und Martin 1974). Ist erst einmal ein Kupfer an zwei Imidazolringe gebunden, müssen die nächsten beiden Kupfer nur noch einen Imidazolring einfangen. Sind dann drei Kupferatome gebunden, ist die Struktur für das vierte Kupferatom vororientiert.

7 Ausblick

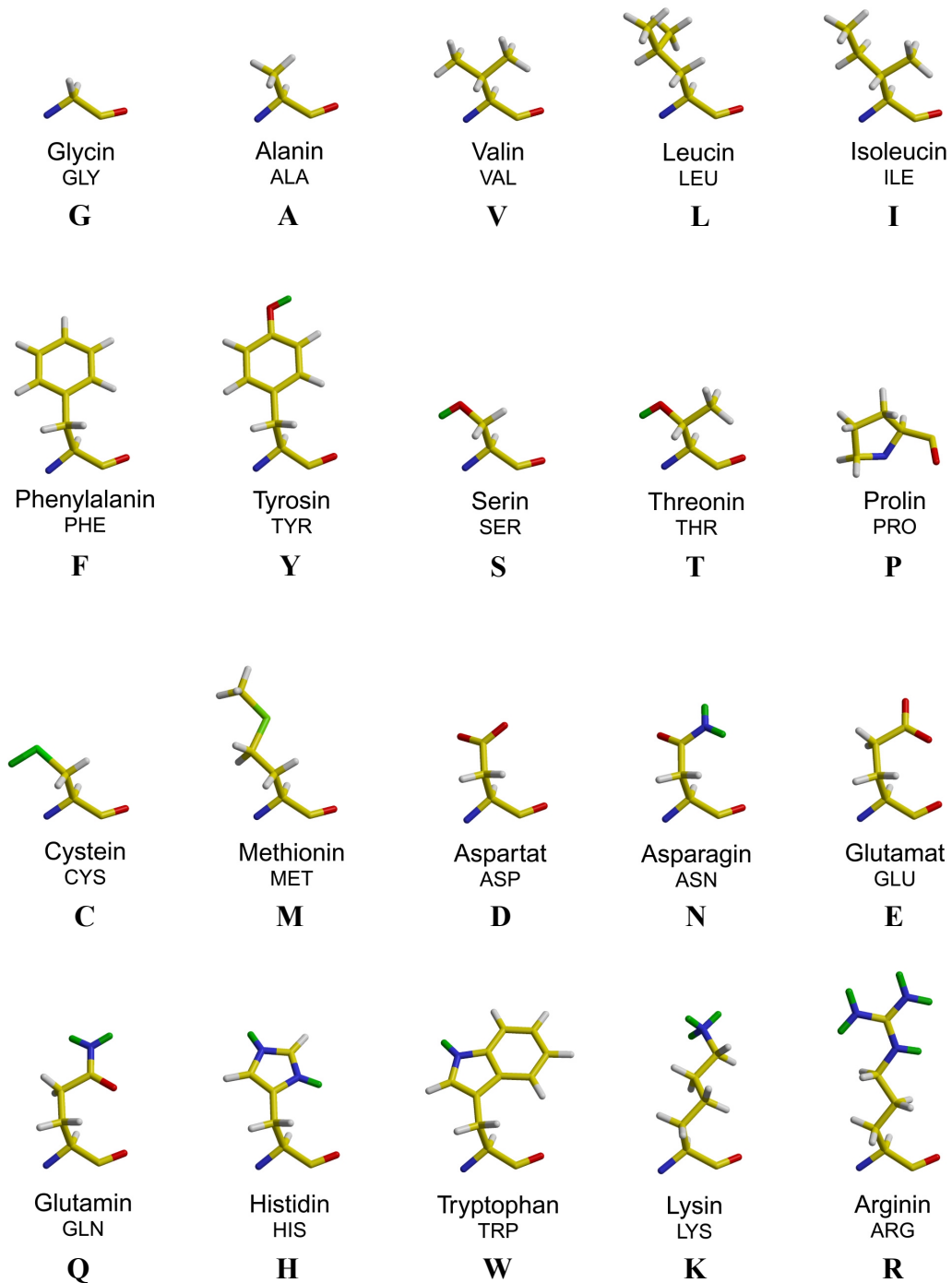
Anhand des modifizierten PSII wurde gezeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe der Bildung eines Differenz-EXAFS-Spektrums das EXAFS-Spektrum des zu untersuchenden Clusters zu extrahieren. Die erfolgreiche Interpretation des Differenz-EXAFS-Spektrums gestaltete sich schwierig. Es müssen sehr detaillierte Informationen über den zu untersuchenden Cluster vorhanden sein, um eine aussagekräftige Anpassung zu erhalten und somit die Stärken von EXAFS ausnützen zu können. Im Detail ist immer zu prüfen, ob genügend Zusatzinformationen für die erfolgreiche und eindeutige Interpretation der Differenz-EXAFS-Spektren vorhanden sind.

Mit der Studie der Temperaturabhängigkeit der XAS Debye-Waller Faktoren wurde durch einen Vergleich mit den mittleren quadratischen Auslenkungen aus der Mößbauer-Spektroskopie die Bedeutung und die Notwendigkeit für solche Untersuchungen gezeigt. Es wurde gezeigt, dass XAS neue Informationen zur Analyse der Proteindynamik beitragen kann. Man erhält am selben System Informationen sowohl über die Struktur als auch über die Dynamik. Es können auch strukturelle und dynamische Informationen über die Proteinfaltung erlangt werden. Die Messung der temperaturabhängigen XAS Spektren beansprucht sehr viel Messzeit. Deswegen und aufgrund der erhöhten Strahlenschäden bei höheren Temperaturen ist die Weiterführung dieser Untersuchungen auf sehr stabile und hochkonzentrierte Proben angewiesen. Es ist notwendig, eine ausreichende Statistik auch bei k -Werten größer als 14 \AA^{-1} zu erreichen. Mögliche Systeme zur Untersuchung wären das teilweise entfaltete Cytochrom C für die Proteinfaltung (Zhang und Stern 1995) und Proteine, die wie der Eisen-Schwefel-Cluster in HiPIPs, einen Metall-Metall-Abstand besitzen. Interessant wäre auch ein Metall-Metall-Abstand von unterschiedlichen Metallatomen. So könnte man EXAFS-Untersuchungen an verschiedenen Metallatomen gleichzeitig durchführen und somit von zwei Seiten aus die Struktur und insbesondere die Dynamik des jeweiligen anderen Metallatoms untersuchen.

Die Untersuchungen an den Oktapeptid-Proben der Sequenz PHGGGWGQ zeigen auf dem Gebiet der Strukturbestimmung neue Möglichkeiten auf. Mittels EXAFS können die Abstände von allen nicht-Wasserstoffatomen innerhalb von 5 \AA um das Absorberatom bestimmt werden. Die Abstände der ersten Liganden sind mit hoher Genauigkeit bestimmbar. Ebenso bei ligandierenden Aminosäuren, welche Vielfachstreubeiträge liefern, kann deren

Position relativ zum Absorberatom sehr genau bestimmt werden. Eine komplementäre Methode stellt ENDOR dar. ENDOR kann Protonenabstände vom Kupfer und ihre radiale Verteilung bezüglich zur Normalen der Kupferligandenebene bis zu einem Abstand von 5 Å bestimmen. Es wurde gezeigt, dass die Verknüpfung von beiden Methoden in der Lage sein sollte, unter Verwendung von Energieverfeinerungsprogrammen wie X-PLOR nicht nur dreidimensionale Informationen über das untersuchte System zu erhalten, sondern auch bei nicht bekannter Konformation eine Strukturlösung der Kupferumgebung zu erreichen. Dieses Verfahren könnte eine Ergänzung zur NMR mit paramagnetischen Zentren sein. Aufgrund der paramagnetischen Metallzentren kann mit Hilfe der NMR die Struktur nur ab etwa 5 Å um das Metallzentrum herum bestimmt werden. So könnte in Zukunft aus der Kombination aller Methoden der Einfluß der Kupferbindung auf das gesamte Prion-Protein strukturell untersucht werden.

Anhang A



Die 20 α -L-Aminosäuren. Unter der Bezeichnung der Aminosäure ist die jeweilige Abkürzung im Dreibuchstaben-Code und Einbuchstaben-Code angegeben. Kohlenstoffatome (gelb), Stickstoffatome (blau), Sauerstoffatome (rot), Schwefelatome (hellgrün), Wasserstoffatome (grau) und austauschbare Wasserstoffe (dunkelgrün)

Anhang B

reduziertes natives HiPIP <i>C. vinosum</i> Mößbauer-Spektroskopie								
T [K]	R _{cor} [%]	t _a	δ [mm s ⁻¹]	ΔE _Q [mm s ⁻¹]	ξ ₁ [mm s ⁻¹]	ξ ₂ [mm s ⁻¹]	<x ² > [10 ⁻² Å ²]	<x _t ² > [10 ⁻² Å ²]
81	91.890	2.76965	0.426	1.085	0.20	-	0.750	-
105	92.184	2.54293	0.418	1.066	0.20	-	0.910	-
123	91.941	2.31884	0.409	1.044	0.20	-	1.083	-
142	92.174	2.09539	0.402	1.020	0.20	-	1.274	-
163	92.100	1.93901	0.390	0.988	0.20	-	1.419	-
183	91.705	1.75320	0.379	0.958	0.19	-	1.608	-
193	91.551	1.64379	0.376	0.946	0.20	-	1.729	-
199	92.360	1.59250	0.372	0.933	0.20	-	1.789	-
204	91.910	1.49127	0.370	0.926	0.20	1.50	1.912	0.103
209	91.912	1.43038	0.369	0.920	0.20	4.48	1.991	0.136
214	91.760	1.36662	0.366	0.909	0.19	3.29	2.076	0.180
219	91.974	1.26297	0.359	0.896	0.20	2.73	2.220	0.272
224	91.837	1.17380	0.359	0.890	0.19	2.10	2.362	0.372
229	92.104	1.05513	0.354	0.885	0.19	2.08	2.562	0.531
234	92.022	0.95668	0.353	0.875	0.20	2.28	2.746	0.666
245	91.973	0.64903	0.346	0.866	0.19	2.07	3.474	1.305
255	92.011	0.19921	0.343	0.831	0.36	3.79	5.692	3.432
Ausgleichsgerade [81 K; 199 K]: <x ² > = (0.887 ± 0.022)10 ⁻⁴ Å ² K ⁻¹ T ± 3.3 10 ⁻⁴ Å ²								
⁵⁷ Fe-Flächendichte: n _{Fe} = 1.61 10 ¹⁸ cm ⁻²								

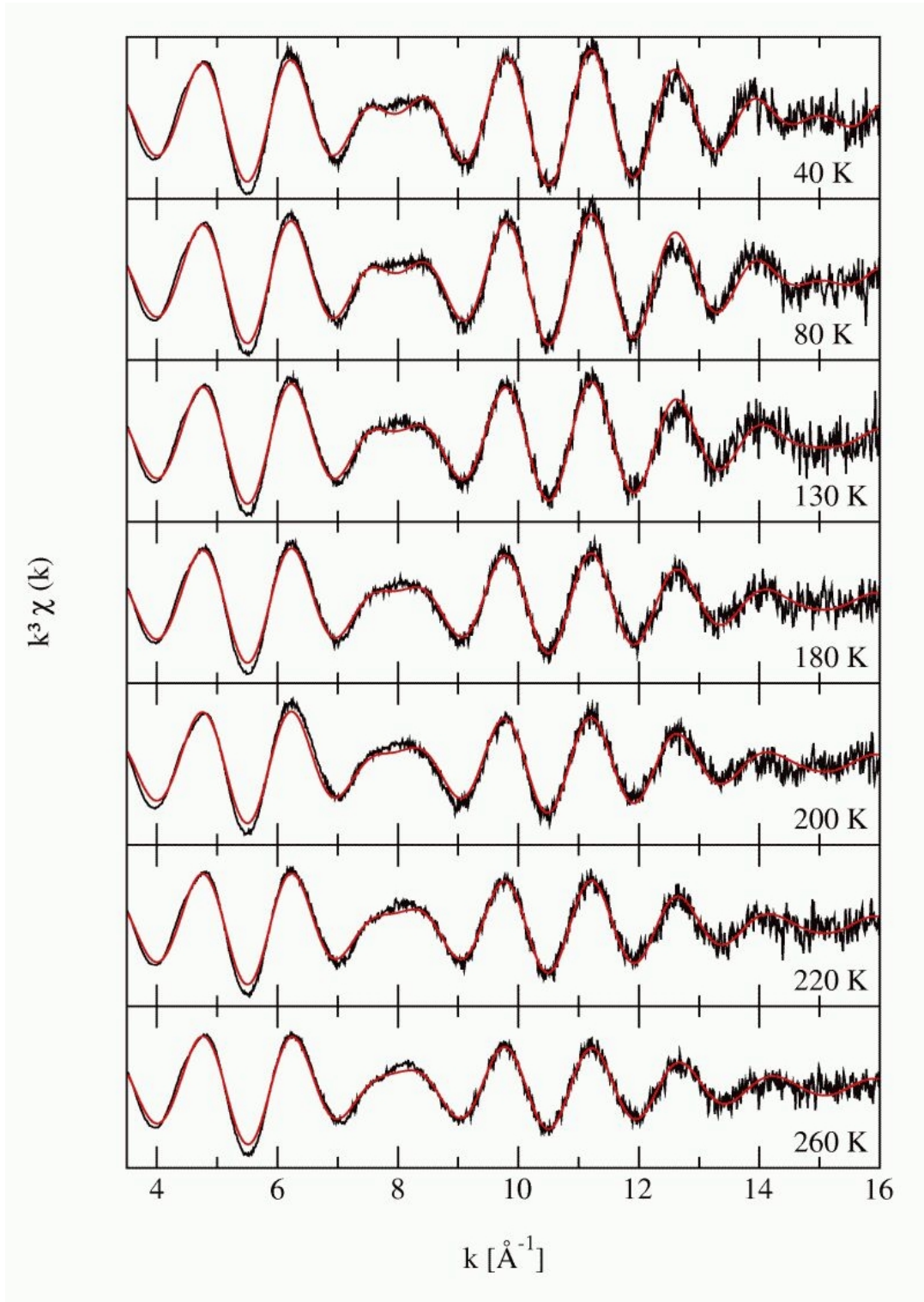
reduziertes teilweise entfaltetes HiPIP <i>C. vinosum</i> Mößbauer-Spektroskopie								
T [K]	R _{cor} [%]	t _a	δ [mm s ⁻¹]	ΔE _Q [mm s ⁻¹]	ξ ₁ [mm s ⁻¹]	ξ ₂ [mm s ⁻¹]	<x ² > [10 ⁻² Å ²]	<x _t ² > [10 ⁻² Å ²]
80	89.019	2.23010	0.437	1.063	0.30	-	0.720	-
101	89.373	2.05289	0.432	1.042	0.30	-	0.876	-
120	89.641	1.86820	0.425	1.026	0.30	-	1.053	-
140	89.358	1.71251	0.417	0.998	0.31	-	1.216	-
159	89.570	1.57525	0.405	0.979	0.29	-	1.372	-
171	89.787	1.49202	0.401	0.959	0.29	-	1.475	-
181	89.853	1.40886	0.398	0.949	0.30	-	1.583	-
186	89.573	1.36203	0.392	0.941	0.29	-	1.646	-
191	89.724	1.32697	0.392	0.932	0.29	-	1.695	-
197	89.753	1.21884	0.385	0.930	0.29	2.76	1.855	0.134
202	90.064	1.19207	0.386	0.924	0.28	1.27	1.896	0.133
206	89.959	1.12757	0.381	0.913	0.28	1.45	2.001	0.196
212	89.824	1.08891	0.380	0.898	0.29	2.27	2.066	0.211

217	89.846	1.05158	0.373	0.887	0.30	2.28	2.132	0.230
223	90.334	0.98374	0.371	0.883	0.30	3.13	2.257	0.304
228	89.852	0.93470	0.368	0.881	0.32	3.73	2.353	0.354
234	89.779	0.83318	0.363	0.885	0.30	2.31	2.569	0.524
239	89.761	0.72064	0.362	0.878	0.32	2.48	2.841	0.749
242	89.708	0.49706	0.358	0.865	0.30	2.16	3.539	1.424
244	90.096	0.23939	0.355	0.841	0.41	3.75	4.911	2.773
246	90.192	0.07848	0.386	0.749	0.40	4.25	7.005	4.853
Ausgleichsgerade [80 K; 191 K]: $\langle x^2 \rangle = (0.875 \pm 0.015) 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$								
^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 1.28 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2}$								

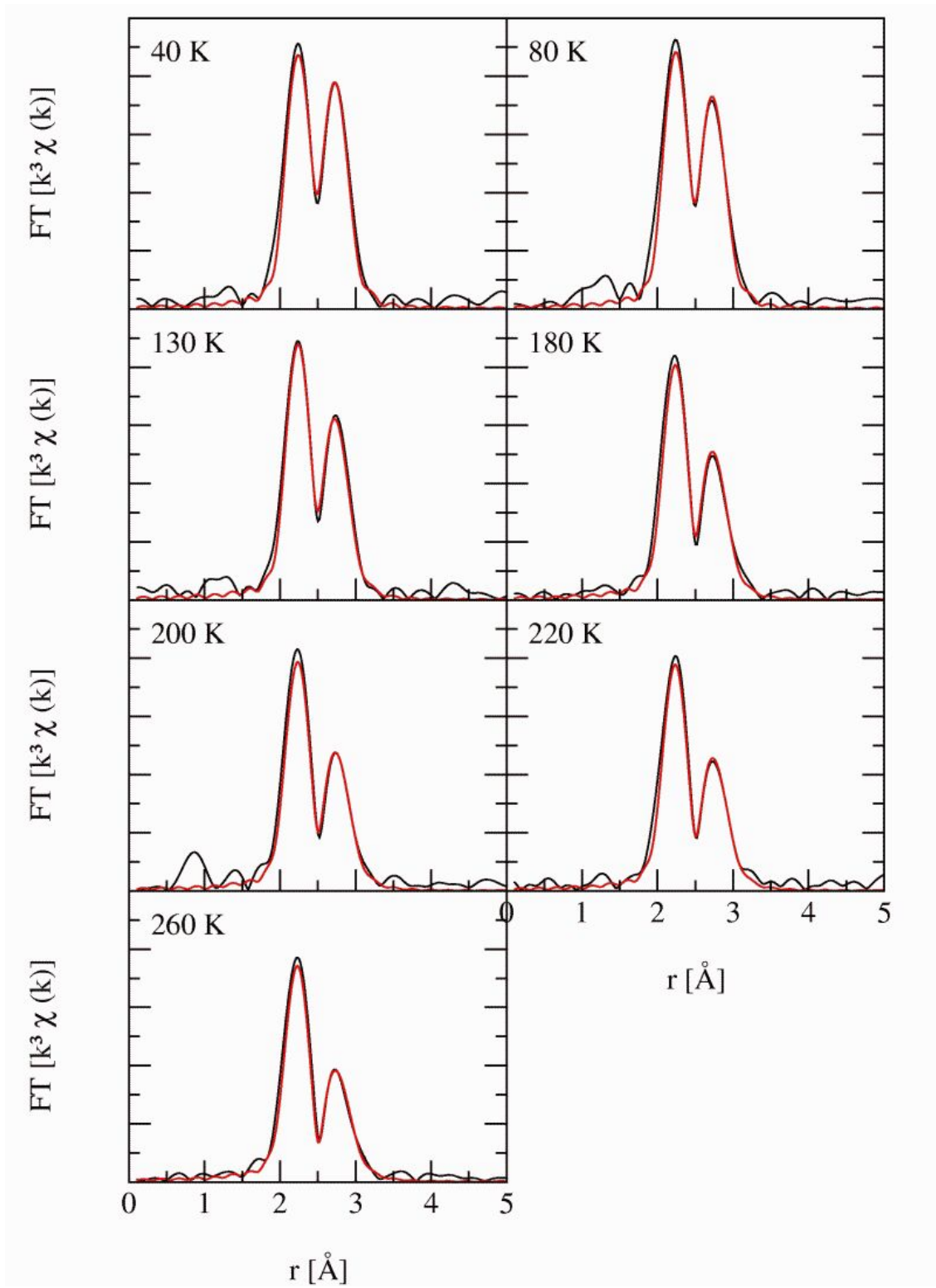
reduziertes HiPIP <i>C. vinosum</i> C77S Mößbauer-Spektroskopie								
T [K]	R _{cor} [%]	t _{a1} +t _{a2} =4/3 t _{a1}	δ _{1/2} [mm s ⁻¹]	ΔE _{Q1/2} [mm s ⁻¹]	ξ _{1/2} [mm s ⁻¹]	ξ _{3/4} [mm s ⁻¹]	⟨x ² ⟩ [10 ⁻² Å ²]	⟨x _t ² ⟩ [10 ⁻² Å ²]
80	95.031	1.93418	0.388/0.626	1.116/1.004	0.18/0.05	-	0.664	-
100	94.749	1.79838	0.383/0.615	1.086/0.979	0.19/0.05	-	0.801	-
120	94.560	1.65632	0.374/0.606	1.047/0.944	0.19/0.03	-	0.955	-
140	94.707	1.53060	0.366/0.597	1.015/0.910	0.18/0.01	-	1.103	-
160	94.834	1.40665	0.357/0.581	0.976/0.871	0.19/0.03	-	1.262	-
180	94.897	1.26431	0.351/0.563	0.939/0.834	0.19/0.09	-	1.462	-
190	94.929	1.21196	0.345/0.552	0.915/0.809	0.19/0.07	-	1.541	-
200	94.885	1.14449	0.344/0.533	0.892/0.779	0.20/0.11	2.94/2.80	1.649	0.043
205	95.000	1.11182	0.344/0.522	0.878/0.764	0.21/0.09	3.10/1.90	1.703	0.058
210	95.188	1.04576	0.341/0.522	0.864/0.764	0.19/0.07	2.83/2.47	1.818	0.132
215	95.206	1.03770	0.338/0.510	0.859/0.747	0.20/0.07	3.51/2.14	1.833	0.107
220	95.197	0.99156	0.338/0.503	0.847/0.732	0.21/0.08	1.80/4.30	1.887	0.120
225	95.207	0.95195	0.334/0.499	0.838/0.732	0.20/0.05	2.33/2.02	1.995	0.188
230	95.176	0.87308	0.334/0.494	0.835/0.719	0.20/0.05	1.45/3.44	2.157	0.311
235	95.192	0.83567	0.332/0.482	0.829/0.697	0.22/0.08	2.52/2.01	2.224	0.353
240	95.120	0.76344	0.333/0.483	0.821/0.708	0.22/0.08	2.65/4.13	2.409	0.482
250	95.205	0.49532	0.320/0.491	0.818/0.713	0.21/0.08	1.70/4.91	3.222	1.214
260	95.109	0.15857	0.317/0.474	0.815/0.680	0.44/0.34	4.57/5.00	5.360	3.273
Ausgleichsgerade [80 K; 190 K]: $\langle x_v^2 \rangle = (0.803 \pm 0.021) 10^{-4} \text{ \AA}^2 \text{ K}^{-1} \text{ T} \pm 2.9 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^2$								
^{57}Fe -Flächendichte: $n_{\text{Fe}} = 1.08 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2}$								

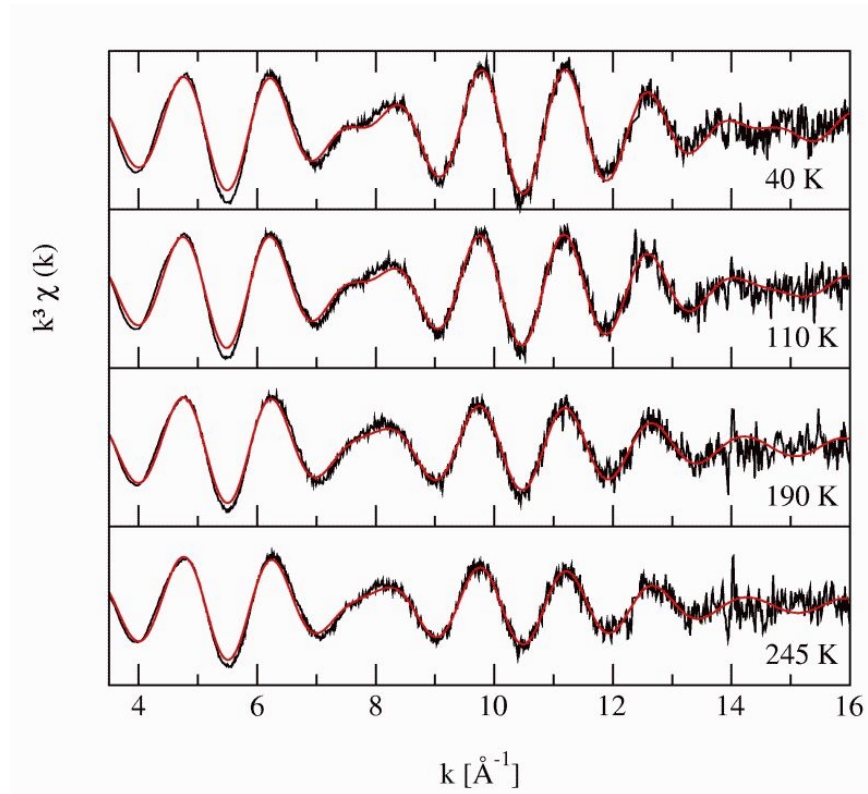
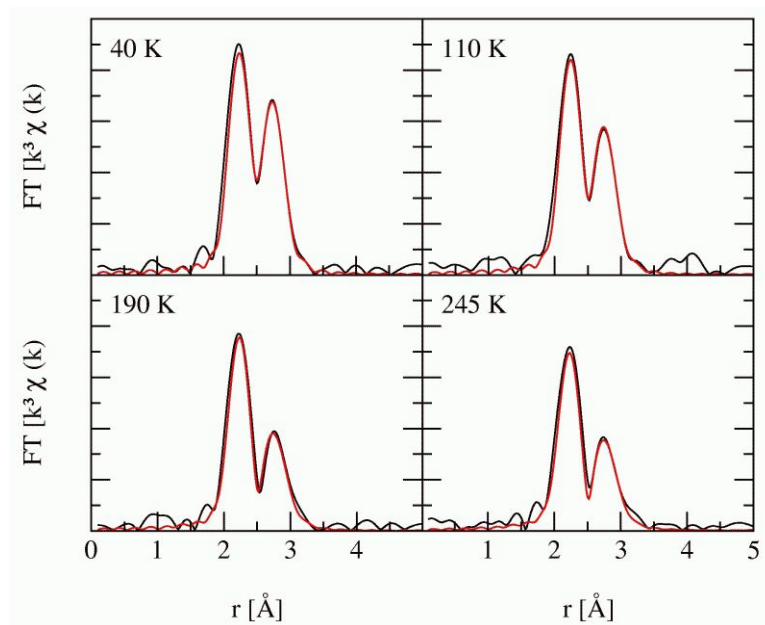
Anhang C

Anpassung der EXAFS-Spektren von reduziertem nativem HiPIP *C. vinosum*



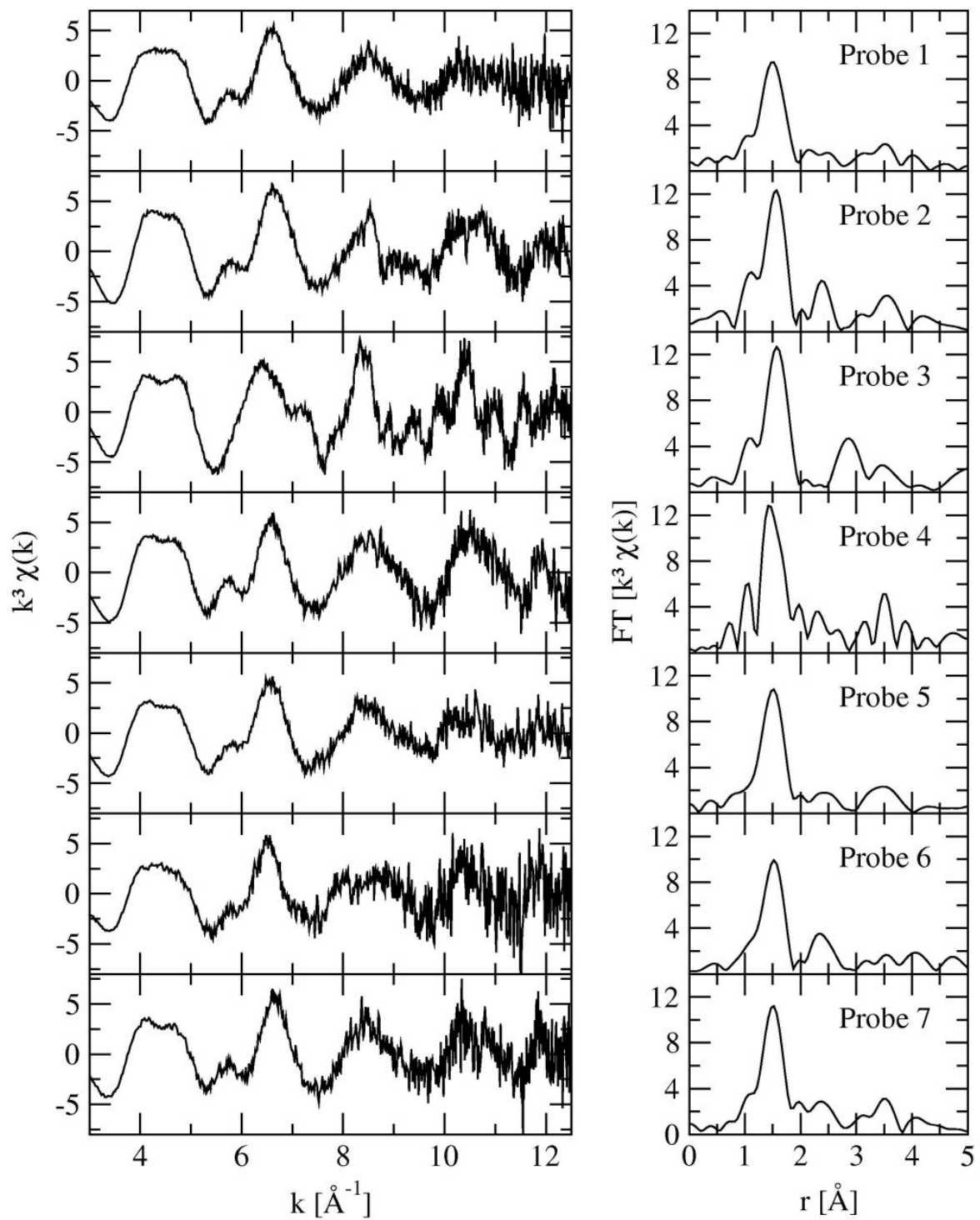
Fourier-Transformation der EXAFS-Spektren von reduziertem nativem HiPIP *C. vinosum*



Anpassung der EXAFS-Spektren von reduziertem teilweise entfaltetem HiPIP *C. vinosum*Fourier-Transformation der EXAFS-Spektren von reduziertem teilweise entfaltetem HiPIP *C. vinosum*

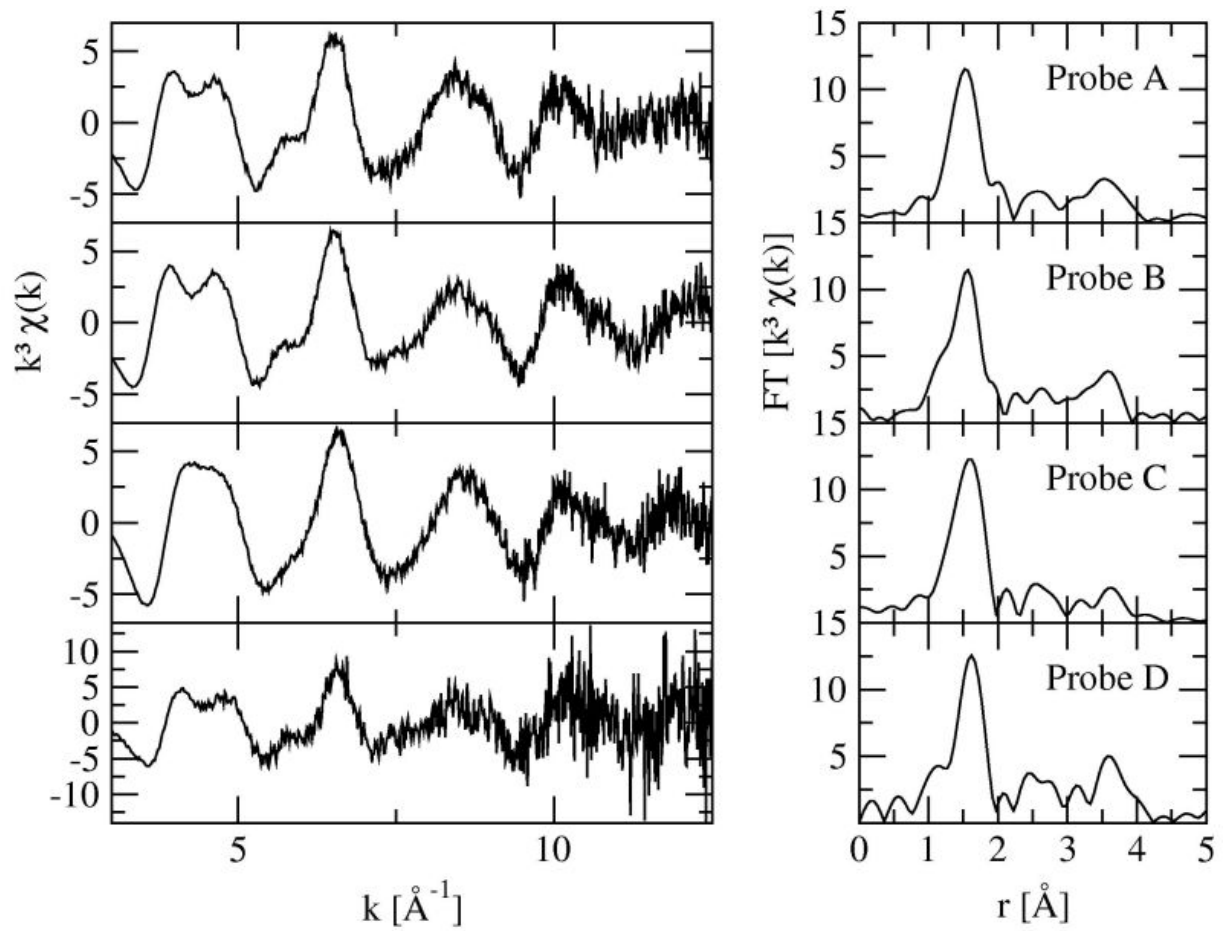
Anhang D

k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren und ihre Fourier-Transformierten der synthetisierten Peptide von Kap. 6.2.1 nach der Datenreduktion. Die Transformation der Spektren in den k -Raum erfolgte nach Bestimmung der Kantenlage E_0 (vgl. Gleichung (2.27))



Anhang E

k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren und ihre Fourier-Transformierten des rekombinanten menschlichen PrP(23-231) von Kap. 6.2.2 nach der Datenreduktion. Die Transformation der Spektren in den k -Raum erfolgte nach Bestimmung der Kantenlage E_0 (vgl. Gleichung (2.27))



Literaturverzeichnis

- Achterhold K, Keppler C, Ostermann A, Bürck van U, Sturhahn W, Alp EE, Parak FG (2002) "Vibrational dynamics of myoglobin determined by the phonon-assisted Mössbauer effect." *Phys. Rev. E* 65: 051916
- Ahlbrink R, Semin BK, Mulkidjanian AY, Junge W (2001) "Photosystem II of peas: effects of added divalent cations of Mn, Fe, Mg, and Ca on two kinetic components of P_{680}^+ reduction in Mn-depleted core particles." *Biochemica et Biophysica Acta* 1506: 117-126
- Ankudinov AL, Ravel B, Rehr JJ, Conradson SD (1998) "Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure." *Phys. Rev. B* 58: 7565-7576
- Arnon DI (1949) "Copper Enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*." *Plant Physiol.* 24: 1-15
- Aro EA, Virgin I, Andersson B (1993) "Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover." *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-114
- Aronoff-Spencer E, Burns CS, Avdievich NI, Gerfen GJ, Peisach J, Antholine WE, Ball HL, Cohen FE, Prusiner SB (2000) "Identification of the Cu^{2+} Binding Site in the N-Terminal Domain of the Prion Protein by EPR and CD Spectroscopy." *Biochemistry* 39: 13760-13771
- Ashley CA, Doniach S (1975) "Theory of extended x-ray absorption edge fine structure (EXAFS) in crystalline solids." *Phys. Rev. B* 11: 1279-1288
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD (1999) "Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology." John Wiley & Sons, Inc.
- Babini E, Bertini I, Borsari M, Capozzi F, Dikiy A, Eltis LD, Luchinat C (1996) "A serine \rightarrow cysteine ligand mutation in the high potential iron-sulphur protein from *Chromatium vinosum* provides insight into the electronic structure of the [4Fe-4S] cluster." *J. Am. Chem. Soc.* 118: 75-80
- Banci L, Bertini I, Dikiy A, Kastrau DHW, Luchinat C, Sompornpisut C (1995) "The three-dimensional solution structure of the reduced high-potential iron-sulfur protein from *Chromatium vinosum* through NMR." *Biochemistry* 34: 206-219
- Barber J, Nield J, Morris EP, Zheleva D, Hankamer B (1997) "The structure, function and dynamics of photosystem II." *Physiol. Plant* 100: 817-827
- Barry RA, Kent SBH, McKinley MP, Meyer RK, DeArmond SJ, Hood LE, Prusiner SB (1986) "Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes." *J. Infect. Dis.* 153: 848-854
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) "Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene." *Cell* 46: 417-428
- Beni G, Platzmann PM (1976) "Temperature and polarization dependence of extended x-ray absorption fine structure spectra." *Phys. Rev. B* 14: 1514-1518
- Bentrop D, Bertini I, Capozzi F, Dikey A, Eltis L, Luchinat C (1996) "Three-dimensional structure of the reduced Cys77Ser mutant of the *Chromatium vinosum* high-potential iron-sulphur protein through nuclear magnetic resonance: comparison with solution structure of the wild-type protein." *Biochemistry* 35: 5928-5936
- Bentrop D, Bertini I, Luchinat C, Niikura Y, Piccioli M, Presenti C, Rosato A (1999) "Structural and dynamical properties of a partially unfolded Fe_4S_4 : role of the cofactor in protein folding." *Biochemistry* 38: 4669-4680
- Berthold DA, Babcock GT, Yocum CF (1981) "A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes." *FEBS Letters* 134: 231-234

- Bertini I, Ciurli S, Luchinat C (1995a) "The electronic structure of FeS centers in proteins and models. A contribution to the understanding of their electron transfer properties." *Struct. Bonding* 83: 1-53
- Bertini I, Dikoy A, Kastrau DHW, Luchinat C, Sompornpisut C (1995b) "Three-dimensional solution structure of the oxidized high-potential iron-sulfur protein from *Chromatium vinosum* through NMR. Comparative analysis with the solution structure of the reduced species." *Biochemistry* 34: 9851-9861
- Bertini I, Cowan JA, Luchinat C, Natarajan K, Piccioli M (1997) "Nuclear Magnetic Resonance; Heteronuclear NMR Spectroscopy; *Chromatium Vinosum*; Sulfur Protein; 2-Dimensional NMR; Paramagnetic Metalloproteins; Structural Characterization; Secondary Structure; Backbone Dynamics; Electron Transfer." *Biochemistry* 36: 9332-9339
- Binsted N, Strange RW, Hasnain SS (1992) "Constrained and restrained refinement in EXAFS data analysis with curved-wave theory." *Biochemistry* 31: 12117-12125
- Bricker TM (1990) "The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in Photosystem II." *Photosynth. Res.* 24: 1-13
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H (1997) "The Cellular Prion Protein Binds Copper In Vivo." *Nature* 390: 684-687
- Brünger AT (1992) "X-PLOR, Version 3.1" The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, 260 Whitney Avenue, P.O. Box 6666, New Haven, CT 06511
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." *Cell* 73: 1339-1347
- Burns CS, Aronoff-Spencer E, Dunham CM, Lario P, Avdievich NI, Antholine WE, Olmstead MM, Vrielink A, Gerfen GJ, Peisach J, Scott WG, Millhauser GL (2002) "Molecular Features of the Copper Binding Site in the Octarepeat Domain of the Prion Protein." *Biochemistry* 41: 3991-4001
- Caciuffo R, Melone S, Rustichelli F (1987) "Monochromators for x-ray synchrotron radiation." *Physics Reports* 152: 1-71
- Cammack R, Sykes AG (1992) "Iron sulfur proteins" *Advances in inorganic chemistry* 38, Academic Press San Diego
- Capellari S, Parchi P, Wolff BD, Campbell J, Atkinson R, Posey DM, Peterson RB, Gambetti P (2002) "Creutzfeldt-Jakob disease associated with a deletion of two repeats in the prion protein gene." *Neurology* 59: 1628-1630
- Capozzi F, Ciurli S, Luchinat C (1998) "Coordination sphere versus protein environment as determinants of electronic and functional properties of iron-sulphur proteins" *Struct. Bonding* 90: 127-160
- Carlson TA, Nestor CW, Tucker TC, Malik FB (1968) "Calculation of electron shake-off for elements from Z=2 to 92 with the use of self-consistent-field wave functions." *Phys. Rev.* 169: 27-36
- Carter CW, Kraut J, Freer ST, Alden RA, Sieker LC, Adman ET, Jensen LH (1972) "A Comparison of [Fe₄S₄]-Clusters in High Potential Iron Protein and in Ferredoxin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3526-3529
- Carter CW, Kraut J, Freer ST, Xuong NH, Alden RA, Bartsch RG (1974) "Two-Angstrom crystal structure of oxidized *Chromatium* high potential iron protein." *J. Biol. Chem.* 249: 4212-4225
- Case DA, Karplus M (1979) "Dynamics of ligand binding to heme proteins." *J. Mol. Biol.* 132: 343-368

- Cinco RM, Roblee JH, Rompel A, Fernandez C, Yachandra VK, Sauer K, Klein MP (1998) "Strontium EXAFS reveals the proximity of calcium to the manganese cluster of oxygen-evolving photosystem II." *J. Phys. Chem. B* 102: 8248-8256
- Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB (1994) "Structural clues to prion replication." *Science* 264: 530-531
- Cohen FE, Prusiner SB (1998) "Pathologic conformations of prion proteins." *Annu. Rev. Biochem.* 67: 793-819
- Creighton TE (1996) "Protein folding" In: Meyers RA (ed) "Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine" Weinheim
- Crozier ED, Rehr JJ, Ingalls R (1988) " In: Koningsberger DC und Prins R (eds) "X-ray Absorption" New York, Chichester, Brisbane
- Daly KA, Penner-Hahn JE (1998) "Extracting Dynamic Information from EXAFS: Simultaneous Analysis of Multiple Temperature-Dependent Data." *J. Synchrotron Rad.* 5: 1383-1389
- Debus RJ, Nguyen AP, Conway AB, Chu HA (1991) "Identification of Manganese or Calcium ligands in photosystem II by site-directed mutagenesis." *Biophys. J.* 59: 143
- Debus RJ (1992) "The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution." *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 269-352
- DeRose VJ, Mukerji I, Latimer MJ, Yachandra VK, Sauer K, Klein MP (1994) "Comparison of the manganese oxygen-evolving complex in photosystem II of spinach and *Synechococcus* sp. with multinuclear manganese model compounds by x-ray absorption spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.* 116: 5239-5249
- Dickson DPE, Johnson CE, Cammack R, Evans MCW, Hall DO, Rao KK (1974) "Mössbauer effect in the high-potential iron-sulphur protein from *Chromatium vinosum*." *Biochem. J.* 139: 105-108
- Dilg AWE (2001) "Struktur und Dynamik natürlicher, mutierter und entfalteter eisen-Schwefel-Proteine (HiPIPs) untersucht mit fünf spektroskopischen Methoden." Dissertation Technische Universität München
- Dilg AWE, Grantner K, Iakovleva O, Parak FG, Babini E, Bertini I, Capozzi F, Luchinat C, Meyer-Klaucke W (2002) "Dynamics of wild-type HiPIPs: a Cys77Ser mutant and a partially unfolded HiPIP." *J Biol Inorg Chem* 7: 691-703
- Dittmer J (1999) "Linear-Dichroismus-Röntgenabsorptionsspektroskopie zum katalytischen Zyklus des wasserspaltenden Mangankomplexes der Photosynthese in Theorie und Experiment." Dissertation Christian-Albrechts-Universität Kiel
- Fee JA, Findling KL, Yoshida T, Hille R, Tarr GE, Hearshen DO, Dunham WR, Day EP, Kent TAY, Muenck E (1984) "Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus*." *J. Biol. Chem.* 259: 124-133
- Félix V, Delgado R, Amorim MTS, Chaves S, Galvão AM, Duarte MT, Carrondo MAAF, Moura I, Fraústo da Silva JJR (1994) "ESR Studies and X-ray "Crystal Structures of Copper (II) Complexes of some 12, 13 and 14-membered Oxatriaza Macrocycles" *J. Chem. Soc. Dalton:* 3099
- Fonda L (1992) "Multiple-scattering theory of x-ray absorption: a review." *J. Phys.: Condens. Matter* 4: 8269-8302
- Frauenfelder H, Petsko GA, Tsernoglou D (1979) "Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics." *Nature* 280: 558-563
- Fricke H (1920) "The K-characteristic absorption frequencies for the chemical elements magnesium to chromium." *Phys. Rev.* 16: 202-215
- Frolov EN, Gvosdev R, Goldanskii VI, Parak FG (1997) "Differences in the dynamics of oxidized and reduced cytochrome *c* measured by Mössbauer spectroscopy." *J Biol Inorg Chem* 2: 710-713

- Garbers A (1997) "Untersuchung der natuerlichen Eisenszentren des Photosystems II aus *Spinacia oleracea* mit Hilfe der Moessbauerspektroskopie." Doktorarbeit. Dissertation Technische Universität München
- Garnett AP, Viles JH (2003) "Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism." *J. Biol. Chem.* 278: 6795-6802
- Garry DJ, Ordway GA, Lorenz JN, Radford NB, Chin ER, Grange RW, Bassel-Duby R, Williams S (1998) "Mice without myoglobin." *Nature* 395: 905-908
- Gasiorowicz S (1987) "Quantenphysik" Oldenbourg Verlag, München
- Gaßmann A (2000) "Proteinspezifische Dynamik und Relaxation in Myoglobin." Dissertation Technische Universität München
- George GN, Prince RC, Stockley KE, Adams MWW (1989) "X-ray-absorption-spectroscopic evidence for a novel iron cluster in hydrogenase II from *Chlostridium pasteurianum*." *Biochem. J.* 259: 597-600
- Ghanotakis DF, Babcock GT (1983) "Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II." *FEBS Letters* 153: 231-234
- Goldanskii V, Herber R (1968) "Chemical Applications of the Mößbauer Spectroscopy." Academic Press, New York
- Gonser U (1975) "Mößbauer Spectroscopy" Springer Verlag, Berlin
- Gonser U (1981) "Mößbauer Spectroscopy II" Springer Verlag, Berlin
- Grandori R, Schwarzingler S, Müller N (2000) "Cloning, overexpression and characterization of micro-myoglobin, a minimal heme-binding fragment." *Eur. J. Biochem.* 267: 1168-1172
- Gurman SJ, Binsted N, Ross I (1984) "A rapid, exact curved-wave theory for EXAFS calculations." *J. Phys. C* 17: 143-151
- Gurman SJ, Binsted N, Ross I (1986) "A rapid, exact curved-wave theory for EXAFS calculations: II. The multiple-scattering contributions." *J. Phys. C* 19: 1845-1861
- Gurman SJ (1988) "The small atom approximation in EXAFS and surface EXAFS." *J. Phys. C* 21: 3699-3717
- Hartter DE, Barnea A (1988) "Evidence for release of copper in the brain: depolarisation-induced release of newly taken-up ⁶⁷Cu." *Synapse* 2: 412-415
- Hasnain SS, Murphy LM, Strange RW, Grossmann JG, Clarke AR, Jackson GS, Collinge J (2001) "XAFS Study of the High-affinity Copper-binding Site of Human PrP^{D91-231} and its Low-resolution Structure in Solution." *J. Mol. Biol.* 311: 467-473
- Hedin L, Lundquist S (1969) "Effects of electron-electron and electron-phonon interaction on the one-electron states of a solid." *Solid states physics* 23: 1-5
- Hsu BD, Lee JY, Pan RL (1987) "The high-affinity binding site for manganese on the oxidizing side of photosystem II." *Biochim. Biophys. Acta* 890: 89-96
- Iuzzolino L, Dittmer J, Dörner W, Meyer-Klaucke W, Dau H (1998) "X-ray absorption spectroscopy on layered photosystem II membrane particles suggests manganese-centered oxidation of the oxygen-evolving complex for the S₀-S₁, S₁-S₂ and S₂-S₃ transitions of water oxidation cycle." *Biochemistry* 37: 17112-17119
- Jaklevic J, Kirby JA, Klein MP, Robertson AS, Brown GS, Eisenberger P (1977) "Fluorescence detection of exafs: Sensitivity enhancement for dilute species and thin films." *Solid State Commun.* 23: 679-682
- Jensen LH (1987) "The Iron-Sulfur Proteins: An Overview" In: Matsubara H, Katsube Y und Wada K (eds) "Iron-Sulfur Protein Research" Tokio

- Kaim W, Schwederski B (1991) "Bioorganische Chemie" Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart
- Kardos J, Kovacs I, Hajos F, Kalman M, Simonyi M (1989) "Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability." *Neuroscience Letters* 103: 139-141
- Kau L, Spira-Solomon DJ, Penner-Hahn JE, Hodgson KO, Solomon EI (1987) "X-ray Absorption Edge Determination of the Oxidation State and Coordination Number of Copper: Application to the Type 3 Site in *Rhus vernicifera* Laccase and Its Reaction with Oxygen." *J. Am. Chem. Soc.* 109: 6433-6442
- Kok B, Forbush B, McGloin M (1970) "Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution - I. A linear four step mechanism" *Photochem. Photobiol.* 11: 457-475
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretschmar HA (2001) "Prion protein binds copper within the physiological concentration range." *J. Biol. Chem.* 273: 33107-33110
- Kronig RdeL (1931) "Zur Theorie der Feinstruktur in den Röntgenabsorptionsspektren." *Z. Phys.* 70: 317-323
- Kronig RdeL (1932) "Zur Theorie der Feinstruktur in den Röntgenabsorptionsspektren." *Z. Phys.* 75: 468-475
- Krugh BW, Miles D (1995) "Energy transfer for low temperature fluorescence in PS II mutant thylakoids." *Photosyn. Res.* 44: 117-125
- Laplanche JL, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Dussaucy M, Chatelain J, Launay JM (1995) "Two novel insertions in the prion protein gene in patients with late-onset dementia." *Human Molecular Genetics* 4: 1109-1111
- Lee PA, Pendry JB (1975) "Theory of extended x-ray absorption fine structure." *Phys. Rev. B* 11: 2795-2811
- Lee PA, Beni G (1977) "New method for the calculation of atomic phase shifts: Application to extended x-ray absorption fine structure (EXAFS) in molecules and crystals." *Phys. Rev. B* 15: 2862-2883
- MacLachlan DJ, Hallahan BJ, Ruffle SV, Nugent JHA, Evans MCW, Strange RW, Hasnain SS (1992) "An e.x.a.f.s. study of the manganese O₂-evolving complex in purified photosystem II membrane fractions." *Biochem. J.* 285: 569-576
- Mansy SS, Xiong Y, Hemann C, Hille R, Sundaralingam J, Cowan A (2002) "Crystal Structure and Stability Studies of C77S HiPIP: A Serine Ligated [Fe₄-S₄] Cluster." *Biochemistry* 41: 1195-1201
- Maradudin AA, Montroll EW, Weiss GH, Ipatova IP (1971) "Theory of lattice dynamics in the harmonic approximation." In: Ehrenreich H, Seitz F und Turnbull D (eds) "Solid State Physics Sup." New York und London
- Martin ME, Byers BR, Olson MOJ, Salin ML, Arceneaux AL (1986) "A *Streptococcus mutans* SOD that is active with either manganese or iron as a cofactor." *J. Biol. Chem.* 261: 9361-9367
- McDermott AE, Yachandra VK, Guiles RD, Britt RD, Dexheimer SL, Sauer K, Klein MP (1988) "Low-potential iron-sulfur centers in photosystem I: an X-ray absorption spectroscopic study." *Biochemistry* 27: 4013-4020
- Melchers B, Knapp EW, Parak FG, Cordone L, Cupane A, Leone M (1996) "Structural fluctuations of myoglobin from normal-modes, Mössbauer, Raman, and absorption spectroscopy." *Biophys. J.* 70: 2092-2099
- Meyer J, Gaillard J, Lutz M (1995) "Characterization of a Mutated Rubredoxin with a Cysteine Ligand of the Iron Replaced by Serine." *Biochem Biophys Res Comm* 212: 827-833

- Meyer W (1996) "Untersuchung von Enzymen und biomimetischen Komplexen mit Röntgenabsorptionsspektroskopie und kernresonanter Streuung von Synchrotronstrahlung." Dissertation Universität Hamburg
- Meyer-Klaucke W (2002) "persönliche Mitteilung", Hamburg
- Miklos D, Segl'a P, Palicová M, Kopcová M, Melník M, Valko M, Glowiak T, Korabik M, Mrozinski J (2001) "Synthesis, spectral and magnetic properties, and crystal structures of copper(II)-methylthionicotinate adducts with chelating ligands." *Polyhedron* 20: 1867-1874
- Miura T, Hori-i A, Takeuchi H (1995) "Metal-dependent α -helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein." *FEBS Letters* 396: 248-252
- Miyao M, Murata N (1984) "Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolving system and its replacement by chloride ions." *FEBS Letters* 170: 350-354
- Mustre J, Rehr JJ, Zabinsky SI, Albers RC (1991) "Ab initio curved-wave x-ray-absorption fine structure." *Phys. Rev. B* 44: 4146-4156
- Nolting HF, Hermes C (1992) "Documentation for the EMBL EXAFS data analysis and evaluation program package.", Release 1.0, EMBL Hamburg
- Nolting W (1994) "Quantenmechanik - Teil 2: Methoden und Anwendungen." Zimmermann-Neufang Bd. 5, 2. Aufl., Ulmen
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C (1985) "A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP(27-30) Protein." *Cell* 40: 735-746
- Ono T, Inoue Y (1984) "Ca²⁺-dependent restoration of O₂-evolving activity in CaCl₂-washed PSII particles depleted of 33, 24 and 16 kDa proteins." *FEBS Letters* 168: 281-286
- Ono T, Noguchi T, Inoue Y, Kusunoki M, Matsushita T, Oyanagi H (1992) "X-ray detection of the period-four cycling of the manganese cluster in photosynthetic water oxidizing enzyme." *Science* 258: 1335-1337
- Pakrasi HB, Vermaas WFJ (1992) "Protein engineering of photosystem II" In: Barber J (ed) "The photosystems: Structure, function and molecular biology" Elsevier
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB (1993) "Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966
- Parak FG, 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 FG, Knapp EW, Kucheida D (1981) "Protein dynamics" *J. Mol. Biol.* 145: 825-833
- Parak FG, Knapp EW, Kucheida D (1982) "Protein dynamics. Mössbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals." *J. Mol. Biol.* 161: 177-194
- Parak FG, Reinisch L (1986) "Mössbauer Effect in the Study of Structure Dynamics" In: Hirs CHW und Timasheff SN (eds) "Structural dynamics and Mobility of Proteins" Vol. 131: 568-607
- Parak FG, Hartmann H, Nienhaus GUI (1987) "The Mössbauer effect as a probe in protein dynamics." In: Austin RBE, Chance B, De Vault D, Dutton PL, Frauenfelder H und Goldanskii VI (eds) "Proc. in Life Sciences: Protein Structure - Molecular and Electronic Reactivity." Springer Verlag New York
- Parak FG, Frauenfelder H (1993) "Protein dynamics." *Physica A* 201: 332-345
- Parak FG (2003) "Physical aspects of protein dynamics." *Rep. Prog. Phys.* 66: 103-129
- Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA (1992) "Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu, Zn superoxide dismutase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6109-6113

- Pauly PC, Harris DA (1998) "Copper stimulates endocytosis of the prion protein." *J. Biol. Chem.* 273: 33107-33110
- Perkins CM, Roes NJ, Weinstein B, Stenkamp RE, Jensen LH, Pickart L (1984) "The structure of a copper complex of the growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine at 1.1 Å resolution." *Inorg. Chim. Acta* 82: 93-99
- Perutz MF, Mathews FS (1966) "An X-ray study of azide methaemoglobin." *J. Mol. Biol.* 21: 199-202
- Pettifer RF, Hermes C (1985) "Absolute energy calibration of X-ray radiation from synchrotron sources." *J. Appl. Cryst.* 18: 404-412
- Poiarkova AV, Rehr JJ (1999) "Multiple-scattering x-ray-absorption fine structure Debye-Waller factor calculations." *Phys. Rev. B* 59: 948-957
- Poulson M, Samson G, Whitmarsh J (1995) "Evidence that cytochrome b₅₅₉ protects photosystem II against photoinhibition." *Biochemistry* 34: 10932-10938
- Priolo FC, Rotondo E, Rizzardi G, Bruno G, Bombieri G (1983) "N-{2-[(2-Aminoethyl)amino]ethyl}salicylideneaminato O,N,N',N''}aquacopper(II) hexafluorophosphate, [Cu(C₁₁H₁₆N₃O)(H₂O)]PF₆." *Acta Cryst. C* 39: 550-552
- Prusiner SB (1982) "Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie." *Science* 216: 136-144
- Prusiner SB (1991) "Molecular Biology of Prion Diseases." *Science* 252: 1515-1522
- Przywiecki C, Meyer TE, Cusanovich MA (1985) "Circular dichroism and redox properties of high redox potential ferredoxins." *Biochemistry* 24: 2542-2549
- Rehr JJ, Albers RC (2000) "Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure." *Reviews of Modern Physics* 72: 621-654
- Reiner M (2000) "Untersuchungen zum wasserspaltenden Komplex des Photosystems II von *Spinacia oleracea* -Mössbauerspektroskopie und ein Strukturvorschlag." Dissertation Technische Universität München
- Roelofs TA, Liang W, Latimer MJ, Cinco RM, Rompel A, Andrews JC, Sauer K, Yachandra VK, Klein MP (1996) "Oxidation states of the manganese cluster during the flash-induced S-state cycle of the photosynthetic oxygen-evolving complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3335-3340
- Sambrook J, MacCallum P, Russell D (2000) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Sandmann H (1993) "Mössbauerspektroskopie am wasserspaltenden Komplex des Photosystem II von Spinat." Diplomarbeit Johannes-Gutenberg Universität Mainz
- Sayers DE, Stern EA, Lytle FW (1971) "New technique for investigating noncrystalline structures: Fourier analysis of the EXAFS." *Phys. Rev. Lett.* 27: 1204-1207
- Schätzl H, DaCosta M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995) "Prion protein gene variation among primates." *J. Mol. Biol.* 245: 362-374
- Scherk CG, Schmidt M, Nolting HF, Meier B, Parak FG (1996) "EXAFS investigation of the active site of iron superoxide dismutase of *Escherichia coli* and *Propionibacterium shermanii*." *Eur. Biophys. J.* 24: 243-250
- Scherk CG (1998) "Untersuchung der Struktur und Dynamik einer Superoxid Dismutase." Dissertation Technische Universität München
- Scherk CG, Ostermann A, Achterhold K, Iakovleva O, Nazikkol C, Krebs B, Knapp EW, Meyer-Klaucke W, Parak FG (2001) "The X-ray absorption spectroscopy Debye-Waller factors of an iron compound and of met-myoglobin as a function of temperature." *Eur. Biophys. J.* 30: 393-403

- Schiller H, Dittmer J, Iuzzolino L, Doerner W, Meyer-Klaucke W, Sole VA, Nolting H-F, Dau H (1998) "Structure and orientation of the oxygen-evolving manganese complex of green algae and higher plants investigated by x-ray absorption linear dichroism spectroscopy on oriented photosystem H membrane particles." *Biochemistry* 37: 7340-7350
- Schultz CP (2000) "Illuminating folding intermediates." *Nature Structural Biology* 7: 7-10
- Schwabl F (1998) "Quantenmechanik" Springer Verlag 5, Berlin Heidelberg New York
- Scott RA, Wang S, Eidsness MK, Kriauciunas A, Frolik CA, Chen VJ (1992) "X-ray absorption spectroscopic studies of the high-spin iron(II) active site of isopenicillin N synthase: evidence for iron-sulfur interaction in the enzyme-substrate complex." *Biochemistry* 31: 4596-4601
- Semin BK, Ivanov II, Rubin AB, Parak FG (1995) "High-specific binding of Fe(II) at the Mn-binding site in Mn-depleted PSII membranes from spinach." *FEBS Letters* 375: 223-226
- Semin BK, Davletschina L, Ivanov II, Reiner M, Parak FG (1998) "Formation of dinuclear Fe(III) centre by interaction of Fe(II) with the Mn-binding site of Mn-depleted PSII membranes." In: Garab G (ed) "Photosynthesis: Mechanisms and effects" Kluwer Academic Publishers
- Sevillano E, Meuth H, Rehr JJ (1979) "Extended x-ray absorption fine structure Debye-Waller factors. I. Monoatomic crystals." *Phys. Rev. B* 20: 4908-4911
- Shmidt (1961) "Contribution to the theory of the temperature dependence of the fine structure of x-ray absorption spectra." *Bull. Acad. Sci. USSR, Phys. Ser.* 25: 988-993
- Shmidt (1963) "Contribution to the theory of the temperature dependence of the fine structure of x-ray absorption spectra. II. Case of high temperatures." *Bull. Acad. Sci. USSR, Phys. Ser.* 27: 392-397
- Sigel H, Martin RB (1982) "Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and related Ligands." *Chem. Rev.* 82: 385-426
- Skworc KH, Windl O, Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Bergk J, Nägele A, Vieregge P, Zerr I, Poser S, Kretzschmar HA (1999) "Familial Creutzfeldt-Jakob Disease with a Novel 120-bp Insertion in the Prion Protein Gene." *Annals of Neurology* 46: 693-700
- Songster MF, Barany G (1997) "Handles for Solid-Phase Peptide Synthesis." *Methods Enzymol.* 289: 126-174
- Stephans PJ, Morgan TV, Devlin F, Penner-Hahn JE, Hodgson KO, Scott RA, Stout CD, Burgess BK (1985) "[Fe₄-S₄]-cluster-depleted *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I: a new 3Fe iron-sulfur protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5661-5665
- Stern EA (1974) "Theory of extended x-ray absorption fine structure." *Phys. Rev. B* 10: 3027-3037
- Stern EA, Sayers DE, Lytle FW (1975) "Extended x-ray-absorption fine-structure technique. III. Determination of physical parameters." *Phys. Rev. B* 11: 4836-4846
- Stern EA, Bunker B, Heald SM (1980) "Many-body effects on extended X-ray absorption fine structure amplitudes." *Phys. Rev. B* 21: 5521-5539
- Stern EA (1988) "Theory of EXAFS." In: Koningsberger DC und Prins R (eds) "X-Ray Absorption" New York, Chichester, Brisbane
- Stöckel J, Safar J, Wallace A, Cohen FE, Prusiner SB (1998) "Prion Protein Selectively Binds Copper(II) Ions." *Biochemistry* 37: 7185-7193
- Strange RW, Blackburn NJ, Knowles PF, Hasnain SS (1987) "X-ray absorption spectroscopy of metal-histidine coordination in metalloproteins. Exact simulation of the EXAFS of Tetrakis(imidazole)copper(II) Nitrate and other Copper-imidazole complexes by use of a multiple-scattering treatment." *J. Am. Chem. Soc.* 109: 7157-7162
- Sundberg RJ, Martin RB (1974) "Interactions of Histidine and Other Imidazole Derivatives with Transition Metal Ions in Chemical and Biological Systems." *Chem. Rev.* 74: 471-517

- Tamura N, Chenu G (1987) "Photoactivation of the water-oxidizing complex in photosystem II membranes depleted of Mn and extrinsic proteins. I. Biochemical and kinetic characterization." *Biochim. Biophys. Acta* 890: 179-194
- Teo BK, Lee PA (1979) "Ab initio calculations of amplitudes and phase functions for EXAFS." *J. Am. Chem. Soc.* 101: 2815-2832
- Teo BK (1986) "EXAFS: Basic Principles and Data Analysis." Springer Verlag, Berlin
- Tierney DL, Fee JA, Ludwig ML, Penner-Hahn JE (1995) "X-ray Absorption Spectroscopy of the Iron Site in *Escherichia coli* Fe(III) Superoxide Dismutase." *Biochemistry* 34: 1661-1668
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ (1999) "Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2042-2047
- von Barth U, Hedin L (1972) "A local exchange-correlation potential for the spin polarized case: I." *J. phys. C* 5: 1629-1642
- Wegener A (1965) "Der Mößbauereffekt und seine Anwendungne in Physik und Chemie." Hochschultaschenbücher Verlag, Berlin
- Westre TE, Kennepohl P, DeWitt JG, Hedmann B, Hodgson KO, Solomon EI (1997) "A Multiplet Analysis of Fe K-Edge 1s → 3d Pre-Edge Features of Iron Complexes." *J. Am. Chem. Soc.* 119: 6297-6314
- Wolynes PG, Onuchic JN, Thirumalai D (1995) "Models of protein folding." *Science* 268: 959-61
- Xiao Z, Lavery MJ, Ayhan M, Scrofani SDB, Wilce MCJ, Guss JM, Tregloan PA, George GN, Wedd AG (1998) "The Rubredoxin from *Clostridium pasteurianum*: Mutation of the Iron Cysteinyll Ligands to Serine. Crystal and Molecular Structures of Oxidized and Dithionite-Treated Forms of the Cys42Ser Mutant." *J. Am. Chem. Soc.* 120: 4135-4150
- Yachandra VK, Guiles RD, A.E. M, Britt RD, Dexheimer SL, Sauer K, Klein MP (1986) "The state of manganese in the photosynthetic apparatus. 4. Structure of the manganese complex in photosystem II studied using EXAFS spectroscopy. The S1 state of the O2-evolving photosystem II complex from spinach." *Biochim. Biophys. Acta* 850: 324-332
- Yachandra VK, DeRose VJ, Latimer MJ, Mukerji I, Sauer K, Klein MP (1993) "Where plants make oxygen: A structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster." *Science* 260: 675-679
- Yachandra VK, Sauer K, Klein MP (1996) "Manganese cluster in photosynthesis: where plants oxidize water to dioxygen." *Chem. Rev.* 96: 2927-2950
- Yocum CF (1991) "Calcium activation of photosynthetic water oxidation." *Biochim. Biophys. Acta* 1059: 1-15
- Yocum CF (1992) "The calcium and chloride requirements for photosynthetic water oxidation." In: Pecoraro VI (ed) "Manganese redox enzymes" VCH
- Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, Schroetter von C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K (2000) "NMR solution structure of the human prion protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 145-150
- Zhang Y, Stern EA (1995) "XAFS study of CO-binding to denatured cytochrome c." *Physica B* 208/9: 727-728
- Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauß N, Saenger W, Orth P (2001) "Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution." *Nature* 409: 739-743

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten HiPIPs.....	6
Tab. 4.1 Wert für die "pre-edge" Fläche des XAS-Spektrums von Probe 1, 2, 3 und 4 des PSII..	47
Tab. 4.2 Parameter der Anpassung des Differenz-EXAFS-Spektrums.....	49
Tab. 4.3 Parameter für die Anpassung an das Fe-EXAFS-Spektrum in Sucrose.....	50
Tab. 5.1 Bindungsabstände (in Å) für verschiedene [Fe ₄ S ₄]-Cluster in HiPIPs von <i>C. vinosum</i> ...	55
Tab. 5.2 Parameter für die Anpassung der EXAFS-Spektren diverser HiPIP <i>C. vinosum</i>	63
Tab. 5.3 Parameter der temperaturabhängigen Messungen des nativen HiPIPs <i>C. vinosum</i>	66
Tab. 5.4 Parameter der temperaturabhängigen Messungen des teilweise entfalteten HiPIPs.....	66
Tab. 6.1 Auflistung der mit XAS gemessenen synthetisierten Octapeptid Proben.....	80
Tab. 6.2 Die mit XAS gemessenen menschlichen PrP-Proben	83
Tab. 6.3 Parameter der Anpassung des EXAFS-Spektrums mit einem "Minimal Modell"	86
Tab. 6.4 Parameter der Anpassung des EXAFS-Spektrums von Probe B	90
Tab. 6.5 Modellkomplexe und die Abstände der nächsten Cu-Liganden	95
Tab. 6.6 Parameter der Simulation des EXAFS-Spektrums eines Octapeptids	98

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 2.1 Struktur von Röntgenabsorptionsspektren	9
Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Interferenz	12
Abb. 2.3 Graphische Darstellung der Mehrfachstreuentwicklung.....	19
Abb. 2.4 Vielfachstreubeiträge $\chi(s)$ bei nahezu kollinearer Anordnung.....	24
Abb. 2.5 Darstellung des Imidazolringes der Aminosäure Histidin.....	24
Abb. 2.6 Aus vorgegebener Geometrie berechnetes theoretisches EXAFS-Spektrum.....	25
Abb. 2.7 Theoretisches EXAFS-Spektrum und seine Fourier-Transformierte	25
Abb. 2.8 Extraktion des "pre-edge" Bereiches.....	27
Abb. 2.9 Einfluß der Hyperfeinwechselwirkungen auf den Grundzustand.....	30

Abb. 3.1 Schema des Messplatzes an der EMBL EXAFS beam line D2	34
Abb. 3.2 Monochromator an der EMBL EXAFS beam line D2	35
Abb. 3.3 Einblick in den EMBL EXAFS Messplatz	37
Abb. 3.4 Kalibrationssystem am EMBL EXAFS Messplatz D2.....	38
Abb. 4.1 Struktur des Photosystems II	41
Abb. 4.2 Das Berkeley-Modell für den Mn-Cluster.....	42
Abb. 4.3 k^3 -gewichtete EXAFS-Spektren nach der Datenreduktion vom PSII	48
Abb. 4.4 k^3 -gewichtetes Fe-Differenz-EXAFS-Spektrum	49
Abb. 4.5 k^3 -gewichtetes Fe-EXAFS-Spektrum von Fe^{2+} in Sucrose	50
Abb. 5.1 Schematische Darstellung der prosthetischen Gruppen in Eisen-Schwefel-Proteinen....	54
Abb. 5.2 Schematische Darstellung des $[Fe_4S_4]$ -Clusters aus HiPIPs.....	56
Abb. 5.3 Fe-EXAFS-Spektren diverser reduzierter HiPIPs	62
Abb. 5.4 EXAFS von nativem und teilweise entfaltetem HiPIP bei diversen Temperaturen.....	64
Abb. 5.5 Fourier-Transformierte der EXAFS-Spektren von Abb. 5.4 bei diversen Temperaturen	65
Abb. 5.6 Verlauf der $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe-Schale und der Fe-S-Schale.....	67
Abb. 5.7 $\langle x^2 \rangle$ -Werte der Fe-Fe Schale aus EXAFS und Mößbauer-Spektroskopie	71
Abb. 5.8 Modell für das Potential ϵ eines Proteinmoleküls	72
Abb. 5.9 Faltung von HiPIPs.....	75
Abb. 6.1 Dreidimensionale Struktur des menschlichen Prion-Proteins PrP(23-230)	77
Abb. 6.2 Sequenz des menschlichen Prion-Proteins.	78
Abb. 6.3 Röntgenstrukturanalyse des HGGGW-Segments.....	79
Abb. 6.4 Vergleich diverser EXAFS-Spektren mit einem Octapeptid.....	84
Abb. 6.5 Vergleich der EXAFS-Spektren von einem Octapeptid in verschiedenen Micellen.....	85
Abb. 6.6 Anpassung eines "Minimal Modells" erhalten aus EPR, ENDOR und ESEEM.....	86
Abb. 6.7 Vergleich diverser EXAFS-Spektren von PrP(23-231).....	88
Abb. 6.8 Vorschlag eines Modells des Kupferbindungsplatzes in der Octa-Repeat-Region.....	89
Abb. 6.9 Anpassung eines Modells an das EXAFS-Spektrums von Probe B	90
Abb. 6.10 Simuliertes EXAFS-Spektrum mit einem Modell nach einer Energieminimierung	97

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Fritz G. Parak für seine stete und konstruktive Betreuung dieser Arbeit. Sein aktives Engagement, sein ausdauerndes Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft waren für mich unersetzlich.

Bei Dr. Wolfram Meyer-Klaucke möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und apparative Unterstützung bei den Messzeiten in Hamburg bedanken. Seine stetige Bereitschaft auftretende Probleme kurzfristig zu lösen, erleichterten Vieles. Dr. Manuel Gnida danke ich nicht nur für die Überlassung der Bilder vom Messplatz in Hamburg. Er war mir nicht nur während den Messzeiten in Hamburg ein höchst angenehmer Kollege und Freund. Für die Bemühungen innerhalb des deutschen EXAFS-Verbundes bedanke ich mich bei Dr. Thomas Meyer herzlich.

Für die stetige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Octa-Repeat Proben bin ich Dr. Stella Fiori, Dr. Christian Renner und Dr. Dominga Deluca mehr als nur zu Dank verpflichtet. Gleiches gilt nicht minder für Dr. Uwe Bertsch für die rekombinanten menschlichen PrP Proben. Innerhalb des bayrischen Forschungsverbundes FORPRION sei Andreas Weiss für seine Bemühungen und seine Diskussionsbereitschaft herzlich gedankt. Für die Präparation der PSII Proben möchte ich mich bei Dr. Boris Semin ebenfalls herzlich bedanken.

Ohne meine gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe um Prof. Parak wäre die Forschung nur halb so schön gewesen. Das Arbeitsklima war geprägt von Hilfsbereitschaft und Kooperation. Bei Dr. Klaus Achterhold möchte ich mich besonders dafür bedanken, dass er jederzeit ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme praktischer und theoretischer Art hatte. Dr. Andi Dilg danke ich nicht nur für die Unterstützung während der HiPIP-Messzeit in Hamburg und für das Überlassen der HiPIP-Proben als Kollege und als Freund auf das herzlichste. Matthias Mentler war als EPR-, ENDOR- und ESEEM-Spezialist aus unserem gemeinsamen Prionen-Projekt nicht wegzudenken. Seine Unterstützung nicht nur während der Prionen-Messzeit in Hamburg war für mich überaus wertvoll. Besonderen Dank verdient auch Dr. Michael Reiner als Mößbauer-Spezialist am PSII und als höchst unterhaltsamer Zimmerkollege. Meinen zahlreichen Zimmerkollegen und dem aufheiterndem Lachen von Dr. Alexandra Huenges gebührt ebenfalls besonderer Dank.

Meinen Eltern Sieglinde und Alois Grantner danke ich für Ihre uneingeschränkte und jederzeit gewährte Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich einem Menschen mehr danken, als ich in Worte fassen kann. Meiner Frau Isabell! Ihre Toleranz und Ihre Liebe waren für mich Inspiration und Motivation zugleich.

Lebenslauf

Name: Grantner
Vorname: Klaus
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Alois Grantner und Sieglinde Grantner, geb. Geiger
Familienstand: verheiratet mit Isabella Grantner, geb. Falkus, keine Kinder

Bildungsweg:

1979 – 1983 Max-Kolmsperger-Grundschule in München
1983 - 1985 Schulforumunabhängige Orientierungsstufe München
1985 – 1992 Städtisches-Werner-von-Siemens-Gymnasium in München, Abitur
1992-1998 Studium der Technischen Physik an der TU München, Diplom
Seit Januar 1999 Beginn der Promotion am Lehrstuhl E17 für molekulare Biophysik am Physik-Department der TU München bei Prof. F. G. Parak