

CW- und Puls-ENDOR-Spektroskopie
an den reduzierten [2Fe-2S]-Zentren der Aldehyd
Oxidoreduktase – ein Enzym aus der Klasse der
Molybdopterinhydroxylasen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von
Thomas Dell

Saarbrücken
2008

Zusammenfassung

Die Aldehyd Oxidoreduktase (AOR) gehört zu den Molybdän enthaltenden Enzymen und ist ein Mitglied der Molybdopterinhydroxylasen. Die Funktion der AOR, die in den unterschiedlichsten Organismen zu finden ist, besteht in der oxidativen Hydroxylierung von Aldehyden zu Carbonsäuren. Im Verlauf dieser Reaktionen entstehen enzymatische Intermediate, bei denen verschiedene Oxidationsstufen des Molybdän-Zentrums auftreten. Um die Elektronen an einen physiologischen Akzeptor weiterzuleiten, enthält das Enzym zwei weitere Metallkomplexe, die zu der Gruppe der Eisen-Schwefel-Verbindungen gehören und bei der AOR in Form von [2Fe-2S]-Zentren auftreten. Die beiden FeS-Cluster der AOR besitzen trotz identischer Struktur verschiedene ESR-Eigenschaften und unterschiedliche Redoxpotentiale. Frühere spektroskopische Experimente zeigten daneben eine selektive Reduktion bestimmter Fe-Ionen innerhalb der FeS-Cluster. Ungeklärt blieb, um welche Fe-Ionen es sich handelt.

In dieser Arbeit wurden CW- und Puls-ENDOR-Techniken eingesetzt, um die Ursachen für die stark unterschiedlichen paramagnetischen Eigenschaften der beiden reduzierten [2Fe-2S]-Cluster der AOR von *Desulfovibrio gigas* zu charakterisieren. Die spektroskopischen Daten, die mit Hilfe der orientierungsselektiven CW- und Puls-ENDOR-Spektroskopie gewonnen wurden, konnten im Zusammenhang mit Röntgenstrukturdaten durch Spektren-Simulationen analysiert werden. Durch die Simulationen konnten die fundamentalen elektronischen und magnetischen Parameter Spindichte-Verteilungen, g-Tensor-Orientierungen und Hyperfeinwechselwirkungen der beiden ESR-aktiven Redoxzentren bestimmt werden. Durch die Analyse der Spindichte-Verteilung konnte identifiziert werden, welche Fe-Ionen selektiv reduziert werden. Weiterhin wurden die g-Tensor-Orientierungen beider FeS-Cluster sowie der Einfluß der koordinierenden Cystein-Liganden auf die g-Orientierung gezeigt. Mit Hilfe der gefundenen g-Tensor-Lagen der FeS-Cluster läßt sich nun auch die magnetische Wechselwirkung zwischen beiden Metallkomplexe, die bei der ESR-Spektroskopie an der AOR beobachtet wird, erklären. Letztlich wurde mit Hilfe der gefundenen paramagnetischen Eigenschaften und einer umfangreichen Strukturanalyse der Einfluß der um die beiden FeS-Zentren liegenden Aminosäuren auf das Verhalten der reduzierten Redoxzentren deutlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Protonen der Cystein-Liganden der FeS-Cluster sowie benachbarte permanente Dipole in großem Ausmaß die Eigenschaften der reduzierten [2Fe-2S]-Zentren bestimmen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Spektroskopische Grundlagen	3
2.1 Grundlagen der CW-ESR-Spektroskopie	3
2.1.1 Elektron-Zeeman-Effekt	3
2.1.2 Der Spin-Hamilton-Operator	6
2.1.3 Relaxationsprozesse und Linienbreite	11
2.1.4 ESR an orientierten und nicht-orientierten Systemen	13
2.2 Grundlagen der CW-ENDOR-Spektroskopie	17
2.2.1 Der ENDOR-Effekt	17
2.2.2 ENDOR an nicht-orientierten Systemen	22
2.3 Grundlagen der Puls-ENDOR-Spektroskopie	24
3. Enzymatische Grundlagen	29
3.1 Eisen-Schwefel-Proteine	29
3.1.1 Übersicht	29
3.1.2 Klassifikation von Eisen-Schwefelproteinen	31
3.1.3 Elektronische Struktur der [2Fe-2S]-Zentren	33
3.1.3.1 Oxidierte [2Fe-2S]-Komplexe	33
3.1.3.2 Reduzierte [2Fe-2S]-Komplexe	34
3.1.4 ESR- und ENDOR-Spektroskopie von 2Fe-2S-Komplexe	35
3.2 Molybdänkofaktorenzyme	37
3.2.1 Übersicht	37
3.2.2 Klassifikation von Molybdänkofaktorenzyme	37
3.2.3 Struktur und Aufbau der Molybdopterinhydroxylasen	39
3.2.4 ESR- und ENDOR-Spektroskopie von Molybdopterinhydroxylasen	41
3.3 Aldehyd Oxidoreduktase	45
3.3.1 Übersicht	45
3.3.2 Struktur und Reaktionsmechanismus der Aldehyd Oxidoreduktase	45
3.3.3 ESR-Spektroskopische Untersuchungen der Aldehyd Oxidoreduktase	50
4. Ziel der Arbeit	56

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation	61
5.1 Präparation der Aldehyd Oxidoreduktase.....	61
5.2 Spektrometerbeschreibung und Spektrenaufnahme.....	62
5.2.1 Aufbau eines CW-ESR- und ENDOR-Spektrometers.....	62
5.2.2 CW-ESR-Spektrenaufnahme und Geräteparameter.....	65
5.2.3 CW-ENDOR-Spektrenaufnahme und Geräteparameter	66
5.2.4 Aufbau eines Puls-ENDOR-Spektrometers	67
5.2.5 Puls- ENDOR-Spektrenaufnahme und Geräteparameter.....	68
5.2.6 Bearbeitung der ESR- und ENDOR-Spektren	68
5.3 Simulation der ESR- und ENDOR-Spektren.....	72
5.3.1 Theoretische Beschreibung der Simulation eines ENDOR-Pulverspektrums	72
5.3.2 Simulationsprogramme	74
5.3.2.1 Simulation mit Phytia	75
5.3.2.2 Simulation mit Sacopane	79
6. Ergebnisse	82
6.1. Spektrenbeschreibung.....	82
6.1.1 Hochmodulierte CW-ENDOR-Spektren in H ₂ O-Puffer	82
6.1.2 Hochmodulierte CW-ENDOR-Spektren in D ₂ O-Puffer	89
6.1.3 Niedrigmodulierte CW-ENDOR-Spektren in H ₂ O-Puffer.....	92
6.1.4 Puls-ENDOR-Spektren	95
6.1.5 Feld-Frequenz-Plot der AOR	100
6.2 ENDOR-Simulation.....	103
6.2.1 Simulation FeSII	103
6.2.2 Simulation FeSI.....	114
6.2.3 Gesamtsimulation FeSI und FeSII	120
6.2.4 Untersuchung von Linienbreiteneffekten.....	131
6.2.5 Automatikalkulation der Simulationsparameter	136
6.2.6 Automatikalkulation von g- und A-strain	141
7. Diskussion	143
7.1 Strukturelle Interpretation.....	143
7.1.1 Vergleich der Simulationsparameter und Struktur FeSII mit <i>A. platensis</i> Fdx	143
7.1.2 Vergleich der Simulationsparameter und Struktur FeSI und FeSII	145
7.2 Diskussion der Simulationsparameter	146
7.2.1 Valenzzuordnung und Spindichte	146
7.2.2 g-Tensor-Orientierung.....	149
7.2.3 Isotrope Hyperfeinkopplungen.....	150
8. Zusammenfassung und Ausblick	153

9. Literaturverzeichnis	157
10. Abbildungsverzeichnis	164

Formelzeichen

S	Vektor Eigendrehimpuls (Spin) eines Elektrons
L	Vektor Bahndrehimpuls eines Elektrons
I	Vektor Eigendrehimpuls (Spin) eines Kerns
\hat{S}	Operator Kernspin
μ_e	Vektor magnetisches Moment des Elektrons
μ_N	Vektor magnetisches Moment des Kern
h	Planck-Quantum
g_e	Landé g-Faktor
g_N	Kern-g-Faktor
T	Temperatur
B	Magnetfeld-Vektor
B_{eff}	effektives Magnetfeld
ν	Frequenz
ν_N	freie Kernfrequenz
g	g-TENSOR
g_{max}	maximaler g-Eigenwert
g_{int}	interner g-Eigenwert
g_{min}	minimaler g-Eigenwert
g_{eff}	effektiver g-Wert
A	Hyperfeinstruktur-Tensor
a_{iso}	isotrope Hyperfein-Kopplung
\hat{H}_{SP}	Spin-Hamilton-Operator
\hat{H}_{ZE}	Elektron-Zeeman-Operator
\hat{H}_{HFS}	Hyperfeinstruktur-Operator
\hat{H}_{KZ}	Kern-Zeeman-Operator
\hat{H}_{KQ}	Kern-Quadropol-Operator
\hat{H}_{Dip}	Operator Dipol-Dipol-Wechselwirkung
\hat{H}_{FK}	Operator Fermi-Kontaktwechselwirkung
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
T_2	Gesamt-Relaxationszeit
T_{1E}	Elektronenspin-Gitter-Relaxationszeit
T_{1N}	Kernspin-Gitter-Relaxationszeit
$T_{X1,2}$	Kreuzrelaxationszeit
M_S	Magnetische Quantenzahl eines Elektrons
M_I	Magnetische Quantenzahl eines Kerns
\hat{H}_{HDvV}	Heisenberg-Dirac-van Vleck-Operator
J	magnetische Austauschkonstante
H_{FeSI}	Spin-Operator FeS-ClusterI
H_{FeSII}	Spin-Operator FeS-ClusterII
$H_{\text{I,II}}$	Operator Dipol-Dipol-Wechselwirkung FeSI und FeSII
$J_{\text{I,II}}$	elektronischer Wechselwirkungstensor
$D_{\text{I,II}}$	anisotroper Dipol-Dipol-Tensor

Abkürzungen

ESR	Elektronenspinresonanz
ENDOR	Elektron-Kern-Doppelresonanz
NMR	Kernspinresonanz
CW	continuous wave
RF	Radiofrequenz
AOR	Aldehyd Oxidoreduktase
ISP	iron sulphur protein
Fdx	Ferredoxin
Adx	Adrenodoxin
Moco	Molybdopterin-Kofaktor
XO	Xanthin Oxidase
XDH	Xanthin Dehydrogenase
XOR	Xanthin Oxidoreduktase
COR	Chinolin Oxidoreduktase
IOR	Isochinolin Oxidoreduktase
OR	Oxidoreduktase
DH	Dehydrogenase
AA	amino acid

1. Einleitung

Molybdänenzyme sind an einer Vielzahl elementarer biologischer Prozesse beteiligt. Vertreter dieser Enzym-Gruppe sind von Archaeobakterien und Prokaryonten bis zu höheren pflanzlichen und tierischen Organismen aufzufinden. Sie zeigen unterschiedliche katalytische Reaktionen und sind z.B. am Stickstoffkreislauf und am Schwefelmetabolismus sowie an der Kohlendioxidreduktion und der Kohlenmonoxidoxidation beteiligt. Innerhalb der Molybdänenzyme unterscheidet man zwischen mehreren Untergruppen, wobei die Aldehyd Oxidoreduktase (AOR) zu den Molybdopterincofaktorenzymen gehört und ein Mitglied der Molybdopterinhydroxylasen darstellt. Das Enzym wurde erstmals aus der schwefelreduzierenden *Desulfovibrio gigas* isoliert und ist in den letzten Jahren bei verschiedenen Prokaryonten, Vertebraten sowie dem Menschen gefunden worden. Die Funktion der AOR besteht in der oxidativen Hydroxylierung von Aldehyden zu Carbonsäuren. In der Vertebraten-Leber spielt sie beim Abbau toxischer Substanzen eine Rolle, während sie bei Prokaryonten an der Energiegewinnung durch den oxidativen Abbau organischer Substrate beteiligt ist. Im Verlauf dieser Reaktionen entstehen enzymatische Intermediate, bei denen verschiedene Oxidationsstufen des Molybdän-Zentrums auftreten. Um die Elektronen an einen bisher unbekanntem physiologischen Akzeptor weiterzuleiten, enthält das Enzym zwei weitere Metallkomplexe, die zu der Gruppe der Eisen-Schwefel-Verbindungen gehören. Letztere bilden unterschiedliche Formen von FeS-Zentren aus, von denen die beiden 2Fe-2S-Zentren der AOR im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen. Somit kann die AOR einerseits als Molybdänhaltiges Enzym beschrieben werden, andererseits gehört sie zu der umfangreichen Klasse der Eisen-Schwefel-Proteine.

ESR (Elektronenspinresonanz)- und ENDOR (Elektron-Nuklear-Doppelresonanz)-Techniken sind physikalische Meßmethoden, die detaillierte Erkenntnisse bei der Untersuchung von Metalloproteinen und ihren Reaktionszentren liefern. Durch die Änderung des Oxidationszustands nehmen die beteiligten Kofaktoren einen resultierenden Elektronenspin $S \neq 0$ an, der dann als paramagnetischer Zustand selektiv von der elektromagnetischen Resonanzspektroskopie erfaßt werden kann. CW- (continuous wave) ESR-Experimente sind bei Molybdopterinhydroxylasen in den letzten Jahrzehnten vielfach eingesetzt worden, um die Metallzentren zu identifizieren und enzymatische Intermediate zu analysieren. Weiterhin erfasst die ESR-Spektroskopie Wechselwirkungen der Spinzentren mit benachbarten Kernen, die eine von Null verschiedene Kernspinquantenzahl aufweisen (Hyperfineinstruktur). Bei FeS-

1. Einleitung

Proteinen können diese vielzähligen und kleinen Wechselwirkungen von der CW-ESR jedoch meist nicht ausreichend aufgelöst werden, so dass hochauflösende Methoden wie Puls-ESR- und ENDOR-Techniken herangezogen werden müssen. Damit können diese kleinen Wechselwirkungen beobachtet und mit Strukturdaten verglichen werden. Für die meisten Untersuchungen stehen jedoch keine kristallinen Proben, sondern gefrorene, wässrige Lösungen (Pulverproben) zur Verfügung. Für solche ungeordneten Systeme müssen die Daten, die mit Hilfe der orientierungsselektiven CW- und Puls-ENDOR gewonnen werden, im Zusammenhang mit Strukturdaten durch Spektren-Simulationen analysiert werden. Daraus ergeben sich dann die fundamentalen magnetischen Parameter der ESR-aktiven Redoxzentren. In dieser Arbeit sollen CW- und Puls-ENDOR-Techniken bei der Untersuchung der AOR eingesetzt werden. Durch die Anwendung verschiedener spektroskopischer und analytischer Verfahren steht die Bestimmung der elektronischen Eigenschaften der beiden 2Fe-2S-Zentren dieser Molybdopterinhydroxylase im Interesse dieser Arbeit.

2. Spektroskopische Grundlagen

Die Anwendung der ESR- und ENDOR-Spektroskopie in der Biologie ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung von Molekülen, die einen resultierenden Elektronenspin aufweisen. Diese Eigenschaft kann bei Metalloproteinen z.B. während eines Reaktionszyklus oder bei Elektronen-Transfer-Prozessen auftreten. Die folgenden Betrachtungen behandeln zunächst theoretische Grundlagen der ESR- und ENDOR-Spektroskopie, die für das Verständnis bei der Untersuchungen von Übergangsmetallkomplexen relevant sind. Allgemeine elektronische Eigenschaften sowie spezielle ESR- und ENDOR-Merkmale von [2Fe-2S]-Zentren, Molybdopterinhydroxylasen sowie der AOR werden in Kap. 3 näher beschrieben. Experimentelle Vorgehensweise und die Simulationstechnik sind dann Bestandteil von Kap. 5.

2.1 Grundlagen der ESR-Spektroskopie

Das Messprinzip der ESR-Spektroskopie beruht auf der selektiven Absorption elektromagnetischer Wellen durch die Induktion von Übergängen ungepaarter Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld. Dabei ist die Art der Energie-Absorption eine kennzeichnende Größe der elektronischen Struktur eines Spinsystems. Da diese mit der Geometrie des paramagnetischen Zentrums verbunden ist, werden dadurch auch Strukturinformationen eines Metallkomplexes und seiner Umgebung aufgedeckt. Die folgende Darstellungen orientieren sich zunächst an allgemeinen Lehrbücher [90, 122, 138], Monographien [81, 123] und früheren Doktorarbeiten [29, 82, 121]. Bei der Darstellung komplexer Sachverhalte werden hauptsächlich Modellsysteme verwendet, die innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt wurden [86].

2.1.1 Der Elektron-Zeeman - Effekt

Der Elektron-Zeeman-Effekt beschreibt das Verhalten von ungepaarten Elektronen in einem äußeren Magnetfeld. Neben Masse und Ladung besitzen Elektronen einen Bahndrehimpuls \mathbf{L} sowie einen Eigendrehimpuls (Spin), der durch den Vektor \mathbf{S} beschrieben wird. Zunächst soll

2. Spektroskopische Grundlagen

ein einzelnes, bahnloses Elektron betrachtet werden. Mit dem Elektronenspin \mathbf{S} ist analog zur Kreisbewegung einer elektrischen Ladung ein magnetisches Moment $\boldsymbol{\mu}_e$ verbunden:

$$\boldsymbol{\mu}_e = -g_e \beta_e \hat{\mathbf{S}} \quad (2.1)$$

Mit β_e wird das Bohrsche Magneton des Elektrons bezeichnet. Der g -Wert ist eine dimensionslose Proportionalitäts-Konstante und hat für ein freies Elektron den Wert $g_e = 2.0023$.

Betrachtet man ein Elektron mit dem Spin $S = 1/2$ in einem homogenen statischen Magnetfeld mit $\mathbf{B}_0 = [0; 0; B_0]$, richtet sich der magnetische Dipol, also der Spinvektor, parallel oder antiparallel zur Magnetfeldrichtung unter einem bestimmten, von der Quantenmechanik vorgegeben Winkel δ aus. Für die Projektion des Elektronenspins S auf die \mathbf{B}_0 -Achse sind dabei nur die Magnetquantenzahlen m_s erlaubt. Sie ergeben sich aus der Spin-Quantenzahl nach:

$$m_s = S, S-1, S-2 \dots -S \quad (2.2)$$

Es existieren demnach $2S+1$ Einstellungsmöglichkeiten des Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld. Die z -Komponente des Spinvektors \mathbf{S} kann in Richtung der Vorzugsachse \mathbf{B}_0 nur ganz- oder halbzahlige Werte annehmen. Für ein freies Elektron ergeben sich für m_s zwei Werte ($m_s = +1/2$ und $m_s = -1/2$).

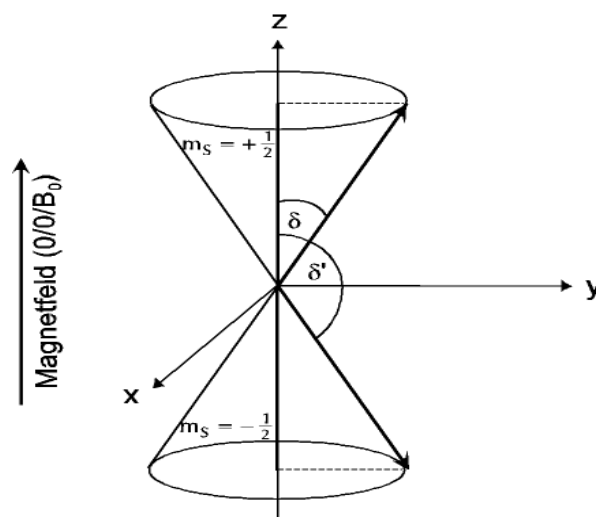


Abb. 2.1: Die beiden möglichen Einstellungen des Spinmoments eines freien Elektrons in einem Magnetfeld B_0 (nach Kirmse/Stach, [90]).

2. Spektroskopische Grundlagen

Die Energie des ungepaarten Elektrons spaltet unter dem Einfluss des Magnetfeldes in zwei Niveaus auf:

$$E = E_0 \pm \frac{1}{2} g_e \cdot \beta_e \cdot \mathbf{B}_0 \quad (2.3)$$

Wird das Elektron nun einer elektromagnetischen Strahlung ausgesetzt, können Übergänge zwischen den beiden Energieniveaus angeregt werden. Für einen ESR-Übergang besteht die Auswahlregeln $\Delta M_s = \pm 1$. Je nach Energiezustand des Elektrons wird bei einer Spinänderung entweder Energie absorbiert oder Energie vom selben Betrag emittiert. Die elektromagnetische Strahlung stellt diese Energie bereit, deren Größe

$$\Delta E = h\nu \quad (2.4)$$

durch die Strahlungsfrequenz ν bestimmt ist (mit h = Planck-Konstante). Für eine Änderung des Spinzustandes erhält man dann die Resonanzbedingung mit:

$$h\nu = g_e \beta_e \mathbf{B}_0 \quad (2.5)$$

Gleichung 2.5 stellt das Grundprinzip der ESR dar. Sie beschreibt das Verhältnis von Strahlungsfrequenz und magnetischer Feldstärke, bei der eine Aufnahme oder Abgabe von elektromagnetischer Energie möglich ist. Bei der ESR wird dabei aus technischen Gründen die Mikrowelle mit einer festen Frequenz eingestrahlt und das Magnetfeld kontinuierlich verändert (vgl. Kap. 5.2).

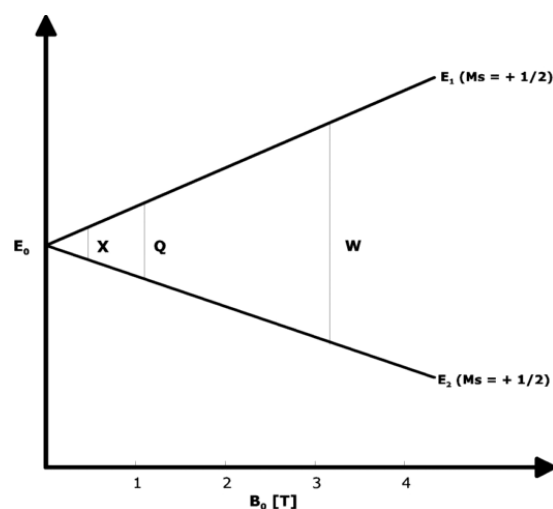


Abb. 2.2: Energieniveauschema für ein System mit $S = 1/2$ im Feld B_0 und den drei Frequenzbänder X-Band (9.7GHz), Q-Band (35GHz) und W-Band (95GHz), die im Arbeitskreis zur Verfügung stehen.

2. Spektroskopische Grundlagen

Bei einem einzelnen Elektron lässt sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit sowohl Absorption als auch Emission induzieren. Betrachtet man eine Vielzahl von Elektronen, ist das Besetzungsverhältnis der beiden Niveaus entscheidend. Im thermischen Gleichgewicht ist das Verhältnis der Besetzung des oberen (n_+) und des unteren (n_-) Energieniveaus durch die Boltzmann-Verteilung

$$\frac{n_{(+)}}{n_{(-)}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} = e^{\frac{h\nu}{kT}} \approx \frac{1}{(1-\varepsilon)}$$

(2.6)

gegeben, wobei k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur bezeichnet (Besetzungszahldifferenz $\varepsilon = h\nu/(kT)$). Zwischen den beiden Energieniveaus besteht demnach ein Besetzungsunterschied ($n_+ < n_-$), der niedrigere Energiezustand zeigt eine höhere Besetzungsanzahl. Bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz $\nu = g_e\beta_e\mathbf{B}_0/h$ erfolgt dadurch insgesamt eine Nettoabsorption, die detektiert werden kann. Voraussetzung für die Energieabsorption bei der ESR ist, dass das angeregte System die aufgenommene Energie wieder abgibt und in den Grundzustand zurückkehrt, da sonst ein Besetzungsverhältnis von 1 eintritt (Sättigung). In diesem Fall lässt sich kein ESR-Übergang beobachten. Der Prozess, der für die Wiedereinstellung der ursprünglichen Boltzmann-Verteilung sorgt, wird als Relaxation bezeichnet (vgl. Kap. 2.1.3).

2.1.2 Der Spin- Hamilton- Operator

Bisher wurde das Verhalten bahnlöser Elektronen betrachtet, deren ESR-Spektren nur aus einem Resonanzübergang besteht. Bei Übergangsmetallkomplexen, bei denen sich das ungepaarte Elektron in einem p-, d- oder f-Orbital befindet, hat nun der Bahndrehimpuls \mathbf{L} Einfluss auf die elektronische Eigenschaften des paramagnetischen Systems. Mit dem Bahndrehimpuls \mathbf{L} ist analog zum Spin \mathbf{S} ein magnetisches Moment verbunden. Die zwischen diesen beiden magnetischen Momenten auftretende Wechselwirkung wird als Spin-Bahn-Kopplung bezeichnet. Das zusätzliche magnetische Moment kann zu einer Verstärkung oder Abschwächung des äußeren Magnetfeldes und zu einer Veränderung der Energiedifferenz ΔE führen. Die Resonanzlinie ist in diesem Fall durch größere oder kleinere g -Werte als g_e bestimmt. Daneben können weitere magnetische und elektrische Wechselwirkungen auftreten. Liegen Atomkerne in der Umgebung des Spinzentrums vor, wirken diese im Fall eines resultierenden Kernspins ebenfalls auf das paramagnetische Zentrum ein. Die Energie eines

2. Spektroskopische Grundlagen

Spinsystems mit $S = 1/2$ in einem Molekül wird dann unter Einbeziehung aller magnetischen Wechselwirkungen mit dem Spin-Hamilton-Operator zusammengefasst:

$$\hat{H}_{\text{SP}} = \hat{H}_{\text{ZE}} + \hat{H}_{\text{HFS}} + \hat{H}_{\text{KZ}} + \hat{H}_{\text{KQ}} \quad (2.7)$$

mit

- \hat{H}_{ZE} : Zeeman-Wechselwirkung der Elektronen mit dem äußeren Magnetfeld
- \hat{H}_{HFS} : Hyperfein-Wechselwirkung zwischen Elektronen und Kernen
- \hat{H}_{KZ} : Zeeman-Wechselwirkung der Kerne mit dem äußeren Magnetfeld
- \hat{H}_{KQ} : Kern-Quadrupol-Wechselwirkung zwischen dem Quadrupolmoment des Kerns und dem elektrischen Feldgradient

Der Elektron-Zeeman-Term \hat{H}_{ZE} beschreibt die Wechselwirkung des Elektrons mit dem äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 . Daneben können spezifische magnetische Felder \mathbf{B}_i auftreten, die z.B. von dem Ligandenfeld eines Metallkomplexes verursacht werden. Diese inneren Magnetfelder beeinflussen die Symmetrie der Elektronenverteilung (Spindichte) über die Spin-Bahn-Kopplung. Der Elektronenspin quantisiert nun nicht mehr um \mathbf{B}_0 , sondern entlang einer neuen Achse \mathbf{B}_{eff} :

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_i \quad (2.8)$$

Die Projektion des Elektronenspins auf die neue Quantisierungsachse \mathbf{B}_{eff} wird durch den g-Tensor beschrieben, der Elektron-Zeeman-Term in Operatorform lautet dann:

$$\hat{H}_{\text{ZE}} = \beta_e \mathbf{g} \mathbf{B} \hat{S} \quad (2.9)$$

Der g-Tensor ist durch eine Hauptachsentransformation diagonalisierbar und hat die drei Eigenwerte g_{max} , g_{int} und g_{min} (mit $g_{\text{min}} < g_{\text{int}} < g_{\text{max}}$). Die Lage der g-Eigenwerte im ESR-Spektrum wird dabei von der Symmetrie des Spinsystems bestimmt. Bei kubischer Symmetrie liegt ein isotroper g-Faktor vor, d. h. die Lage der Resonanzlinie ist unabhängig von der Orientierung des paramagnetischen Zentrums zum Feldvektor \mathbf{B} . Alle drei Eigenwerte des Tensors sind identisch ($g_{\text{max}} = g_{\text{int}} = g_{\text{min}}$). Bei axialer Symmetrie sind 2 Eigenwerte gleichwertig, man kann einen g_{\perp} -Wert (z.B. g_{max} , g_{int}) von einem g_{\parallel} -Wert (z.B. g_{min})

2. Spektroskopische Grundlagen

unterscheiden. Bei rhombischer Symmetrie sind alle drei Eigenwert des g -Tensors verschieden ($g_{\max} \neq g_{\text{int}} \neq g_{\min}$).

Bei FeS-Metallkomplexen befinden sich die ungepaarten Elektronen in einem d-Orbital der Metall-Ionen, man erhält bei einem ESR-Experiment meist axiale oder rhombische ESR-Spektren. Bei der Ermittlung der anisotropen g -Hauptwerte unterscheidet man dabei zwischen orientierten und nichtorientierten Systemen. Die Vorgehensweise wird in Kap. 1.4 näher beschrieben.

Der Hyperfeinstrukturterm \hat{H}_{HFS} beschreibt die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem Magnetfeld benachbarter Atomkernen, die einen Kernspin $I \neq 0$ aufweisen. In diesem Fall liegt ein magnetisches Moment für den Kern vor:

$$\boldsymbol{\mu}_N = g_N \beta_N \mathbf{B} \hat{\mathbf{I}} \quad (2.10)$$

mit Kern- g -Faktor g_N , Kern-Magneton β_N und dem Kernspinoperator $\hat{\mathbf{I}}$. Die beiden magnetischen Momente von Kern und Elektron erfahren eine gegenseitige Beeinflussung. Eine einfache ESR-Linie spaltet unter der Beteiligung dieser Wechselwirkung dann in $2I+1$ Linien auf. Diese Linien bezeichnet man als Hyperfeinstruktur-Linien, der dazugehörige Hyperfeinstrukturterm ist in zwei Anteile unterteilt:

$$\hat{H}_{\text{HFS}} = \hat{H}_{\text{Dip}} + \hat{H}_{\text{FK}} \quad (2.11)$$

Die anisotrope Hyperfeinaufspaltung \hat{H}_{Dip} kann analog der Energieberechnung zweier magnetischer Dipole mit dem Abstand r betrachtet werden. \hat{H}_{Dip} lässt durch den symmetrischen Dipoltensor \mathbf{A}_{Dip} , dessen Spur Null ist ($A_{xx}+A_{yy}+A_{zz} = 0$) darstellen:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{\text{Dip}} &= \mathbf{A}_{\text{Dip}} \hat{\mathbf{S}} \hat{\mathbf{I}} \\ &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{g_e g_N \beta_e \beta_N}{hr^3} \hat{\mathbf{S}} \hat{\mathbf{I}} \end{aligned} \quad (2.12)$$

Die Aufspaltungswerte der Hyperfeinstrukturlinien enthalten im Fall einer rein dipolaren Wechselwirkung, d.h. ohne Beteiligung einer chemischen Bindung zwischen Kern und Spinzentrum, Informationen über die Distanz zwischen beiden.

2. Spektroskopische Grundlagen

Der isotrope Anteil $\hat{\mathbf{H}}_{\text{FK}}$ beschreibt die Fermi-Kontaktwechselwirkung zwischen dem ungepaarten Elektron und Kernen, die über eine chemische Bindung mit dem Spinsystem verbunden sind.

$$\begin{aligned}\hat{\mathbf{H}}_{\text{FK}} &= a_{\text{iso}} \hat{\mathbf{S}}\hat{\mathbf{I}} \\ &= \frac{8 \cdot \pi}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\Psi(K)|^2 \hat{\mathbf{S}}\hat{\mathbf{I}}\end{aligned}\quad (2.13)$$

mit $|\Psi(K)|$ als Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons in einem s-Orbital. Die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} ist proportional zur Elektronenspindichte am Kernort und enthält Aussagen, inwieweit das Elektron hinsichtlich eines Kerns delokalisiert ist.

Beide Hyperfeinoperatoren lassen sich zusammenfassen zu:

$$\hat{\mathbf{H}}_{\text{HFS}} = \hat{\mathbf{S}} (a_{\text{iso}} \cdot \mathbf{1} + \mathbf{A}_{\text{Dip}}) \hat{\mathbf{I}} = \hat{\mathbf{S}} \mathbf{A} \hat{\mathbf{I}} \quad (2.14)$$

mit $\mathbf{1}$ als Einheitsmatrix. Die Symmetrie des A-Tensors wird auf ähnlich Weise wie die des g-Tensors beschrieben, man unterscheidet zwischen kubischer, axialer und rhombischer Symmetrie.

In Proteinproben zeigen Kerne mit Kernspin $I = 1/2$, wie z.B. ^{15}N - oder ^1H -Kerne, Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften. Bei nativen Proteinproben ist z.B. die Bestimmung der A-Tensoren für ^1H -Protonen in der Umgebung der Spinzentren ein Ziel. Diese Protonen können einerseits über den Raum mit dem ungepaarten Spin in Wechselwirkung treten, der Tensor enthält dann nur einen dipolaren Anteil \mathbf{A}_{Dip} . Sind die ^1H -Kerne über Ligandenbindungen mit dem Spinzentrum verbunden, enthalten sie auch isotrope Hyperfeinanteile a_{iso} . Aus der Bestimmung von \mathbf{A} für Protonen können dann Informationen über die Elektronenvalenzen und die Struktur eines Metall-Komplexes gewonnen werden. Bei Metallkernen wie z.B. ^{56}Fe und ^{94}Mo ($I = 0$) tritt diese Wechselwirkung nicht auf, kann aber durch Isotopensubstitution mit ^{57}Fe oder ^{95}Mo ($I = 1/2$ bzw. $I = 5/2$) experimentell eingeführt werden.

Der Kern-Zeeman-Term $\hat{\mathbf{H}}_{\text{KZ}}$ beschreibt die Wechselwirkung des Kernspins mit dem äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 :

$$\hat{\mathbf{H}}_{\text{KZ}} = -g_N \beta_N \mathbf{B}_0 \hat{\mathbf{I}} \quad (2.15)$$

Der Energiebetrag dieser Wechselwirkung ist wegen des Verhältnis β_n/β_e für ^1H -Kerne klein im Vergleich zur Elektron-Zeeman-Wechselwirkung ($g_e\beta_n/g_N\beta_e = 1/658$). In der ESR-Spektroskopie ist sein Einfluss gering und kann als isotrope Konstante betrachtet werden. Da bei der ENDOR-Spektroskopie Kernspin-Übergänge induziert werden, wird der Einfluss dieser Wechselwirkung bei der ENDOR-Technik aufgezeigt (vgl. Kap. 2.2.1).

Der Kern-Quadropol-Term tritt bei Kernen mit Kernspin $I \geq 1$ in Erscheinung. Der Term beschreibt dabei die Wechselwirkung des elektrischen Quadrupolmoments mit dem elektrischen Feldgradienten eq am Kernort durch den Operator:

$$\hat{H}_Q = \hat{I} Q \hat{I} \quad (2.16)$$

In Frequenzeinheiten erhält man den Kernquadrupol-Operator mit:

$$\hat{H}_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)h} (3 \hat{I}_z^2 - \hat{I}^2 + \eta (\hat{I}_x^2 - \hat{I}_y^2)) \quad (2.17)$$

Die Größe Q beschreibt das skalare Quadrupolmoment des Kerns. Der Term enthält daneben die Kernquadrupol-Kopplungskonstante κ sowie den Asymmetrieparameter η mit:

$$\kappa = \frac{e^2 q Q}{4h} \quad (2.18)$$

$$\eta = \frac{Q_{xx} - Q_{yy}}{Q_{zz}} \quad (2.19)$$

Die Parameter κ und η sind experimentell zugängliche Größen und liefern Informationen über die Ladungsverteilung und die Bindungsverhältnisse des betrachtenden Kerns. In der ESR werden meist nur geringe Veränderung in der Lage der Resonanzlinien durch diese Wechselwirkung erzeugt, bei ENDOR-Spektren werden dagegen deutliche Verschiebungen beobachtet (vgl. Kap. 2.2.1).

Für einen Elektronenspin $S = 1/2$, der an N Kernspins I_i gekoppelt ist wird der gesamte Spin-Hamilton-Operator zusammenfassend beschrieben mit:

$$\begin{aligned}\hat{H}_{\text{SP}} &= \hat{H}_{\text{ZE}} + \hat{H}_{\text{HFS}} + \hat{H}_{\text{KZ}} + \hat{H}_{\text{Q}} \\ &= \frac{\beta_e}{h} B_0 g S - \frac{\beta_n}{h} \sum_{i=1}^N g_N i I_i B_0 + \sum_{i=1}^N S A_i I_i + \sum_{i=1}^N I_i Q_i I_i\end{aligned}\quad (2.20)$$

Im Falle einfacher Systeme kann der Gesamtspin-Operator weiter reduziert werden. Diese Methode bietet sich z.B. bei der Simulation von ESR- Spektren an (vgl. Kap. 5.3.1).

2.1.3 Relaxationsprozesse und Linienform

Eine ESR-Resonanzlinie ist neben der Lage des g-Wertes zusätzlich durch Breite und Form charakterisiert. Verbreiterungsprozesse können nicht durch den Spin-Hamiltonian beschrieben werden, die Lösung des Operators ergibt zunächst ein Linienspektrum. Bei einem ESR-Experiment wird jedoch eine Absorptionskurve bzw. deren 1. Ableitung detektiert. Diese Resonanzlinie kann nicht unendlich schmal sein, da dies aufgrund der Heisenbergschen Unschärferelation:

$$\Delta E \cdot \Delta t \approx h \quad (2.21)$$

eine unendlich große Aufenthaltsdauer der Elektronenspins in den höheren Energiezuständen n_+ bedeuten würde. Wie in Kap. 2.1.1 erwähnt, müssen Relaxationsprozesse das thermische Gleichgewicht wieder einstellen, um ein ESR-Signal zu erhalten. Dies erfolgt über die Wechselwirkung des Spinsystems mit seiner Umgebung, dem Gitter. Dabei muss das Gitter die bei einem Spinwechsel benötigte oder von ihm abgegebene Energie bereitstellen oder aufnehmen können. Dieser Prozeß wird als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 , die als longitudinale Relaxationszeit bezeichnet wird, gibt die Zeit an, in der die Störung der Besetzungszahldifferenz n^+/n^- gegenüber der Boltzmann- Verteilung (Gl. 2.6) auf $1/e = 37\%$ abgesunken ist. Die Breite einer ESR- Linie wird somit durch T_1 beeinflusst. Zusätzlich trägt die Spin-Spin-Relaxation mit der transversale Relaxationszeit T_2 zur Linienverbreiterung bei. Über eine magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen können paramagnetische Nachbarmoleküle ihren Spinzustand austauschen. Der Spinaustausch beeinflusst dabei die Lebensdauer eines Spinzustandes. Aus beiden Relaxationsprozessen ergibt sich dann eine resultierende effektive Relaxationszeit T_2 nach:

2. Spektroskopische Grundlagen

$$\frac{\Delta\omega}{2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2} \equiv \frac{1}{T_2} \quad (2.22)$$

mit $\omega = 2\pi\nu$. Die Verbreiterung einer ESR-Absorptionslinien berechnet sich nach einer Lorentzkurve mit:

$$g(\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2 \cdot (\omega - \omega_0)^2} \quad (2.23)$$

Der relative Intensitätsbeitrag $g(\omega)$ hat bei ν_0 (Resonanzfrequenz) ein Maximum (Abb. 2.3, links). Unter dem Einfluss der Relaxationzeiten ergibt sich eine homogene Linienverbreiterung. Diese kann bei Proteinproben aufgrund kurzer Relaxationszeiten ausgeprägt auftreten und erfordert bei der ESR-Spektroskopie dann Tieftemperaturmessungen.

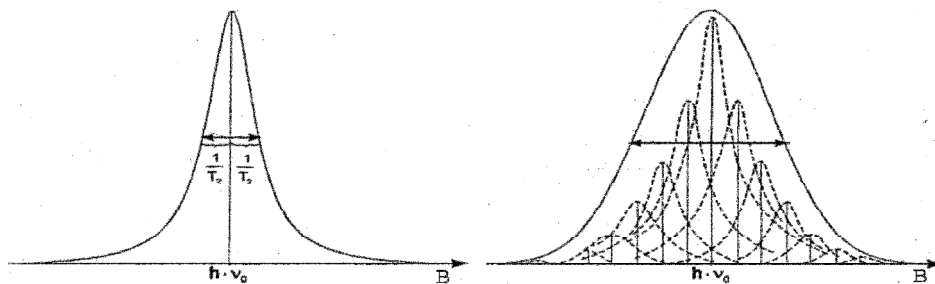


Abb. 2.3: Form einer homogen verbreiterten Absorptionslinie (Lorentzkurve, links) und inhomogenen Linienverbreiterung als Superposition homogener Linien (Gaußkurve, rechts) [nach 90].

Zusätzlich können diese homogenen Effekte durch experimentelle Bedingungen wie Magnetfeldinhomogenität sowie Störungen des elektrischen Kristallfeldes oder durch nicht aufgelöste Hyperfeinwechselwirkungen überdeckt werden. In diesem Fall spricht man von inhomogener Linienverbreiterung. Die Absorption ergibt sich dann aus der Superposition homogener Linien, die einer Häufigkeitsverteilung sog. Spinpakete über alle vorkommenden Resonanzfrequenzen entsprechen (Abb. 2.3, rechts). Die Absorptionslinie besitzt dann die Form einer Gaußkurve:

$$g(\omega) = \frac{1}{b_0 \sqrt{\pi}} e^{-\frac{(\omega - \omega_0)^2}{b_0^2}} \quad (2.24)$$

Die Konstante b_0 gibt die Häufigkeitsverteilung der Spinpakete in Frequenzeinheiten an.

Bei der Untersuchung von Protein-Proben spielen zusätzlich g- und A-strain- Effekte eine besondere Rolle bei der inhomogenen Linienverbreiterung. Diese werden durch die strukturelle Flexibilität der Enzymproben verursacht, die in der Umgebung des paramagnetischen Zentrum vorliegt und die sich spektroskopisch in einer statistischen Verteilung der g-Hauptwerte und der Orientierung des g-Tensors zeigt (vgl. Kap. 6.2.4). Unter dem Einfluß der genannten homogenen und inhomogenen Linienverbreiterungsprozessen kann ein ESR-Spektrum von einem Metallkomplex, bei dem Hyperfeinwechselwirkungen vorliegen, eine unzureichende Auflösung aufzeigen. Die Eigenwerte des g-Tensors können bei der ESR-Spektroskopie jedoch experimentell bestimmt werden. Die Vorgehensweise ist Bestandteil des nächsten Kapitels.

2.1.4 ESR an orientierten und nicht-orientierten Systemen

Die Ermittlung der anisotropen g-Werte soll ausgehend von einem einkristallinen System betrachtet werden, bei dem alle Moleküle die gleiche Orientierung bezüglich des Magnetfeldes aufweisen und dessen Spin- Hamilton-Operator auf einen Elektron-Zeeman-Term \hat{H}_{ZE} mit $S = 1/2$ und $I = 0$ reduziert ist. Abhängig von der Position des Kristalls bezüglich des äußeren Magnetfeldes erhält man bei einer ESR-Aufnahme unterschiedliche Lagen der Resonanzlinie. Die g-Anisotropie läßt sich geometrisch anhand eines Ellipsoiden verdeutlichen, bei dem der g-Tensor die feste Bezugsgröße gegenüber dem Magnetfeld darstellt (Abb. 2. 4). Für den isotropen Fall sind die drei Halbachsen des Ellipsoids gleich lang, bei axialer Symmetrie sind zwei Halbachsen identisch und repräsentieren den g_{\perp} -Wert (g_{max} , g_{int} , bzw. g_{int} , g_{min}) und den g_{\parallel} -Wert (g_{min} , bzw. g_{max}). Bei rhombischer Symmetrie ist das System anhand dreier unterschiedlicher Achsen definiert. Die Orientierung des äußeren Magnetfeld wird durch den Vektor \mathbf{B} wiedergegeben, mit Θ als Winkel zwischen \mathbf{B} und der g_{max} -Achse und Φ der Winkel zwischen \mathbf{B} und g_{int} .

Bei rhombischer Symmetrie erhält man den effektiven g-Wert in Abhängigkeit der Magnetfeldorientierung zu:

$$g(\Theta, \Phi) = \sqrt{g_{min}^2 \sin^2 \Theta \cos^2 \Phi + g_{int}^2 \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi + g_{max}^2 \cos^2 \Theta} \quad (2.25)$$

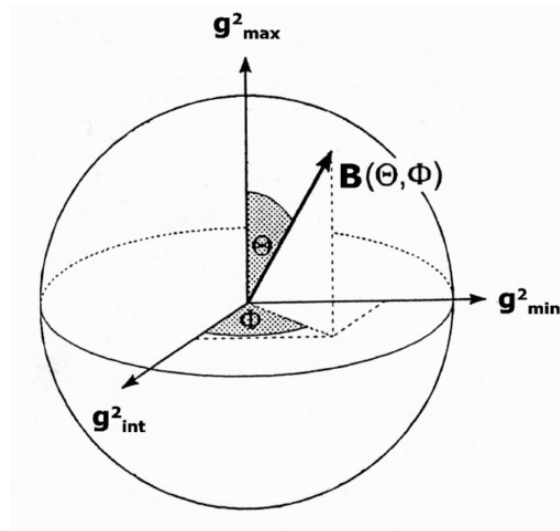


Abb. 2.4: Darstellung der Magnetfeldrichtung anhand einer Arbeitspunktkugel (g-Ellipsoid).

Bei axialer Symmetrie vereinfacht sich Gl. 2.25 zu:

$$g(\Theta) = \sqrt{g_{\perp}^2 \sin^2 \Theta + g_{\parallel}^2 \cos^2 \Theta} \quad (2.26)$$

Durch Drehung des Einkristalls wird die Lage des g-Tensors relativ zum äußeren Magnetfeld verändert. Für jede Kristall-Orientierung ist eine Magnetfeldstärke \mathbf{B}_0 vorhanden mit der Resonanzbedingung:

$$h\nu = g(\Theta, \Phi) \beta_e \mathbf{B}_0 \quad (2.27)$$

Gleichung (2.26) lässt sich umformen zu:

$$g(\Theta, \Phi) = \sqrt{\mathbf{n}^T \mathbf{g} \mathbf{g}^T \mathbf{n}} \quad (2.28)$$

mit

$$\mathbf{n}^T = (\sin \Theta \cos \Phi, \sin \Theta \sin \Phi, \cos \Theta) \quad (2.29)$$

wobei \mathbf{n} als Einheitsvektor des B-Felds im Hauptachsensystem von \mathbf{g} bezeichnet wird. Aus der Lage der Resonanzlinie auf der Magnetfeldskala lässt sich durch systematische Veränderung der Kristallposition der dazugehörige effektive g_{eff} -Wert als Funktion von \mathbf{n}^T bestimmen. Auf diese Weise können Eigenwerte und Orientierung von \mathbf{g} ermittelt werden.

2. Spektroskopische Grundlagen

Die bisherige Betrachtung gilt für kristalline Systeme mit gleicher Molekülorientierung. Im Gegensatz dazu liegt bei polykristallinen Proben wie z.B. bei gefrorenen Lösungen eine statistische Orientierungsverteilung der Moleküle vor. Nimmt man nun wie beim einkristallinen System den g -Tensor wieder als festes Bezugssystem an, ergibt sich dadurch eine statistische Verteilung des Magnetfelds \mathbf{B} für diejenigen Moleküle, für die die Resonanzbedingung erfüllt ist. ESR-Experimente einer Pulverprobe lassen sich dann in einem geometrischen Model veranschaulichen [86]. Betrachtet werden soll wieder ein rhombisches Modellsystem mit $S = 1/2$ und $I = 0$. Das Magnetfeld bzw. die entsprechenden g -Werte werden durch die Oberfläche einer Kugel dargestellt. Befindet sich das Magnetfeld bei niedrigen Feld-Werten zunächst außerhalb des Resonanzbereichs, umgibt die g -Kugel das g -Tensor-Ellipsoid ohne Kontaktpunkte, d.h. man erhält kein ESR-Signal. Bei Berührung der Kugel und des g -Tensors bei g_{\max} ist erstmals die Resonanzbedingung erfüllt. Bei diesem g -Wert sind diejenigen Moleküle in Resonanz, deren g_{\max} parallel zum externen Magnetfeld liegt.

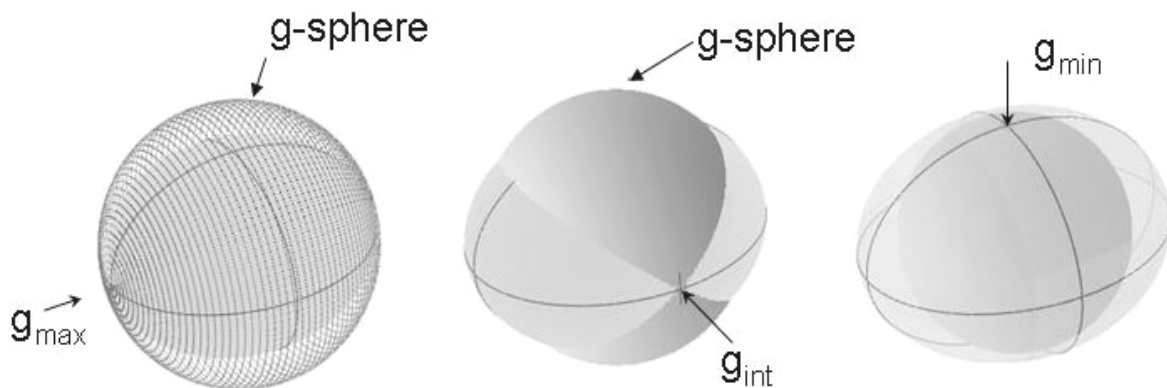


Abb. 2.5: Darstellung der Projektion aller Linien konstanten g -Werts eines Systems mit rhombischem g -Tensor (nach [86]). Die Schnittpunkte der g -Kugel mit dem Tensor-Ellipsoid repräsentieren Orientierungen, für die die Resonanzbedingung erfüllt ist.

Bei konstanter Verkleinerung der g -Kugel (steigendes Magnetfeld) befinden sich nun ab g_{\max} eine bestimmte Untermenge von Molekülorientierungen in Resonanz. Diese Orientierungen werden durch g -iso Linien repräsentiert, die aus der Schnittlinie von g -Kugel und g -Tensor resultieren. Durchläuft das Feld den intermediären g_{int} Wert, erreicht die g -iso Linie ihre größte Länge. An diesem Punkt tragen die meisten Moleküle zum ESR-Spektrum bei und

2. Spektroskopische Grundlagen

führen zur maximalen Signalintensität. Bei g_{\min} befinden sich wiederum wenige Moleküle in Resonanz, die g -Kugel berührt das Tensor-Ellipsoid von innen an einem einzigen Punkt. Bei höheren Werten verlieren dann die beiden geometrischen Figuren wieder den Kontakt, bei diesen Magnetfeldwerten erhält man kein ESR-Signal.

Abhängig von der Magnetfeldstärke befindet sich also immer eine bestimmte Anzahl von Molekülen in Resonanz, für die Gl. 2.27 gilt. Die einzelnen Resonanzlinien addieren sich dann zu dem Gesamtspektrum. Die ESR-Aufnahmen an ungeordneten Systemen zeigen charakteristische axiale oder rhombische Pulverspektren, die sich über einen bestimmten Magnetfeldbereich ausdehnen (Abb. 2.6). Die Tensorhauptwerte können in diesem Fall direkt experimentell bestimmt werden, die Orientierung der Tensorhauptachsen bzgl. des Spinzentrums ist aus dem ESR- Pulverspektrum dagegen nicht zugänglich.

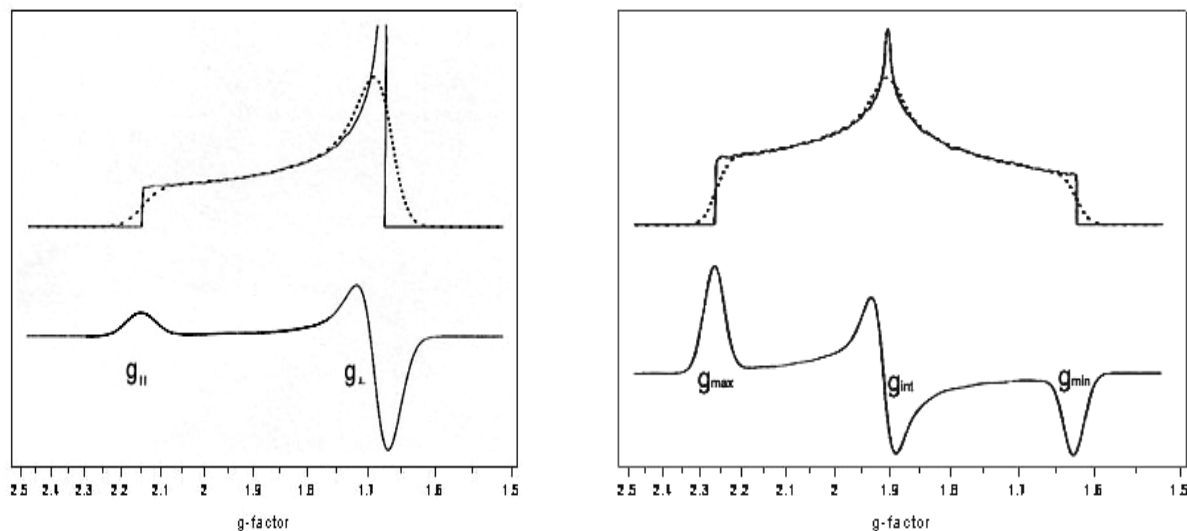


Abb. 2.6: Pulverspektrum mit axialem g -Tensor (links) und rhombischem g -Tensor (rechts) eines Systems $S = 1/2$, $I = 0$.

2.2 Grundlagen der ENDOR-Spektroskopie

Im vorherigen Kapitel wurden Spinsysteme betrachtet, bei denen die Hyperfeinaufspaltung keine Bedeutung hat. Bei Metalloproteinen liegen die paramagnetischen Zentren jedoch in einer Proteinmatrix eingefügt vor. Unter dem Einfluss der Umgebung können Wechselwirkungen mit verschiedenen Kernen auftreten. ESR-Spektren sind meist nicht ausreichend aufgelöst, um diese Wechselwirkung darzustellen. Die ENDOR ist eine

2. Spektroskopische Grundlagen

Doppelresonanztechnik, die dann zur Detektion von solchen nicht aufgelösten Hyperfeinwechselwirkungen zwischen dem ungepaarten Elektron und Atomkernen mit Kernspin $I > 0$ herangezogen werden kann. Bei der ENDOR-Spektroskopie wird zusätzlich zu einer Mikrowelle eine variable Radiofrequenz (RF) im MHz-Bereich eingestrahlt. Mit diesem RF-Feld werden Übergänge zwischen den Kernspinniveaus induziert. Die Intensitätsänderung des ESR-Signals, die als Funktion der Radiofrequenz aufgezeichnet wird, stellt dann das ENDOR-Signal dar. Mit dieser Technik kann, abhängig von der untersuchten Probe, das Auflösungsvermögen der ESR verbessert werden.

2.2.1 Der ENDOR- Effekt

Die theoretischen Grundlagen der ENDOR- Spektroskopie können analog zur ESR- Spektroskopie anhand des Spin- Hamilton-Operators betrachtet werden. Dieser kann bei einfachen Systemen auf den Elektron-Zeeman-Term, den Kern-Zeeman-Term und den Hyperfeinstruktur-Term reduziert werden. Bei diesen paramagnetischem Systemen mit $S = 1/2$ und $I = 1/2$ ergibt sich unter der Bedingung, das g- und A-Tensor isotrop und die Spins entlang der Magnetfeldrichtung quantisiert sind, die Energieniveaus zu:

$$E(M_s, M_i) = g_e \beta_e \mathbf{B} M_s + A M_s M_i - g_n \beta_n \mathbf{B} M_i \quad (2.30)$$

Unter der Berücksichtigung der NMR-Auswahlregel $\Delta M_s = 0$, $\Delta M_i = \pm 1$ erhält man 4 Energieniveaus mit je zwei ESR- und zwei ENDOR-Übergängen (Abb. 2.7).

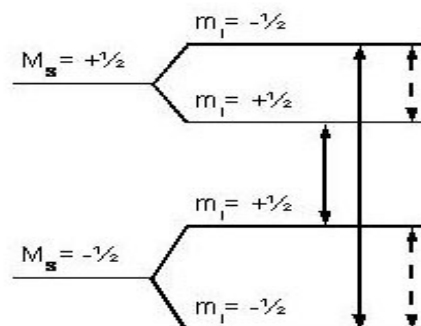


Abb. 2.7: Energieniveauschema von ENDOR-Übergängen für ein Spinsystem $S = 1/2$, $I = 1/2$ und isotropen g-Faktor. Die ESR-Übergänge sind mit durchgezogenen und die ENDOR-Übergänge mit gestrichelten Pfeilen gekennzeichnet.

2. Spektroskopische Grundlagen

In Frequenzformulierung erhält man die Elektron-Proton-Wechselwirkung mit:

$$\frac{E}{h}(M_s, M_I) = \nu_E \cdot m_s + \frac{A}{h} \cdot m_s \cdot m_I - \nu_N \cdot m_I \quad (2.31)$$

Mit ν_e als Elektron-Zeemanfrequenz (Gl. 2.5) und $\nu_N = (-g_N \beta_N \mathbf{B}_0)/h$ als Kern-Zeemanfrequenz. Bei einer Hyperfeinkopplungstensor axialer Symmetrie, z.B. bei ^1H -Kernen ($H_{EZ} \gg H_{HFS}$) erhält man die Kern-Übergangsfrequenzen für ein Proton nach:

$$\nu_P^\pm = \left| \nu_N \pm \frac{A}{2} \right| \quad (2.32)$$

Die niedrigere Frequenz ν_P^- wird als Differenzfrequenz bezeichnet, die höhere ν_P^+ als Summenfrequenz. Die ENDOR-Niveaus werden abhängig vom Vorzeichen von A und der relativen Größe von ν_N zu A angeordnet. Die Resonanzlinien sind entweder um $A/2$ mit Abstand $2\nu_N$ oder um ν_N mit Abstand A angeordnet (Abb. 2.8).

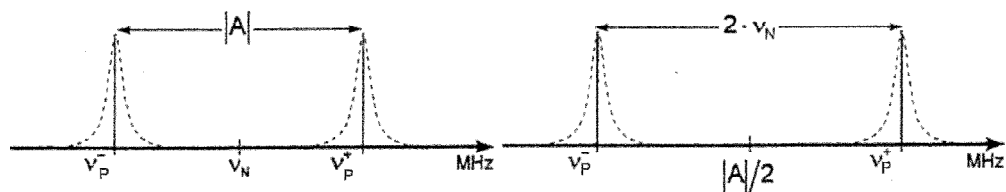


Abb.2.8: Anordnung der ENDOR-Linien eines $S = 1/2, I = 1/2$ -Systems; links: $\nu_N < A/2$, rechts $\nu_N > A/2$.

Bei starker Anisotropie des g -Tensors wird der Hyperfein-Tensor asymmetrisch und die Resonanzlinien liegen dann ebenfalls asymmetrisch um die freie Kernfrequenz ν_N .

Bei ENDOR-Spektren von Spinsystemen $S = 1/2, I \geq 1$ muss zusätzlich der Kernquadrupol-Term berücksichtigt werden. Bei einem anisotropen Spinsystem mit $A > 0$ und unter der Annahme, dass g -, A - und Q -Tensoren kollinear sind und \mathbf{B}_0 entlang einer Hauptachse orientiert ist, erhält man den Hamilton-Operator in Frequenzeinheiten mit:

$$\frac{E}{h}(M_s, M_I) = \nu_E \cdot m_s + \frac{A}{h} \cdot m_s \cdot m_I + \frac{Q}{h} \left(m_I - \frac{1}{3} I(i+1) \right) - \nu_N \cdot m_I \quad (2.33)$$

2. Spektroskopische Grundlagen

Das Energieniveau-Schema spaltet nun unter dem Einfluß der Kern-Quadrupol-Wechselwirkung in 4 ENDOR-Übergängen auf.

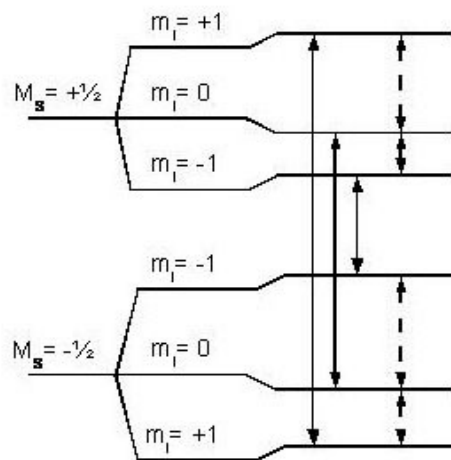


Abb. 2.9: Energieniveauschema von ENDOR-Übergängen für ein Spinsystem $S = 1/2$, $I = 1$ und isotropen g -Faktor. Die ESR-Übergänge sind mit durchgezogenen und die ENDOR-Übergänge mit gestrichelten Pfeilen gekennzeichnet.

Die Übergangsfrequenzen 1. Ordnung sind dann gegeben durch:

$$\nu_{\text{ENDOR}}^{\pm} = \left| \frac{A_i}{2} \pm \nu_N \pm \frac{3}{2} Q_i \right| \quad (2.34)$$

Der Index i stellt die Tensor-Hauptachsen dar. Das entsprechende ENDOR-Spektrum ergibt 4 Resonanzlinien (Abb. 2.10).

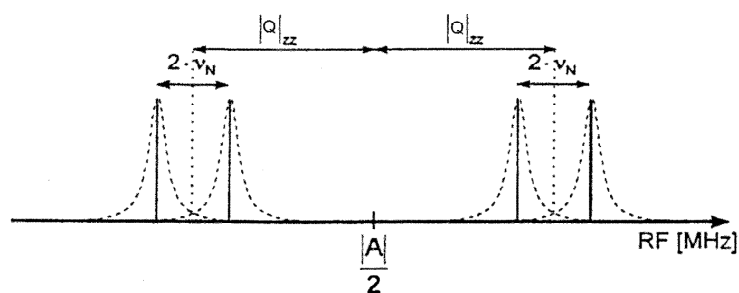


Abb. 2.10: Anordnung der ENDOR-Linien eines $S = 1/2$, $I = 1$ -Systems.

2. Spektroskopische Grundlagen

Um die Übergänge der m_i -Subniveaus zu beobachten, wird zunächst durch Einstrahlen eines starken Mikrowellenfeldes die Besetzungszahldifferenz ε der beteiligten Niveaus verringert. Als Folge dieser partiellen Sättigung nimmt die Intensität des ESR-Signals ab. Durch Einstrahlung eines Radiofrequenzfeldes, dessen Energie $h\nu_{RF}$ im Bereich der Hyperfeinwechselwirkung liegt, werden nun Kernspinübergänge induziert und damit das ESR-Signal über neu geschaffene Relaxationswege entsättigt. Der Wiederanstieg der Intensität des ESR-Signals wird dann als ENDOR-Signal aufgezeichnet. Großen Einfluss auf die Signal-Stärke und Linienbreite haben auch hier wieder die Zeiten der beteiligten Relaxationsprozesse (vgl. Kap. 2.1.3). Neben der beschriebenen Elektronenspin-Gitter-Relaxationszeit T_{1E} treten nun zusätzlich die Kernspin-Gitter-Relaxationszeit T_{1N} sowie die Kreuzrelaxationen T_{X1} und T_{X2} auf. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 2.11 veranschaulicht.

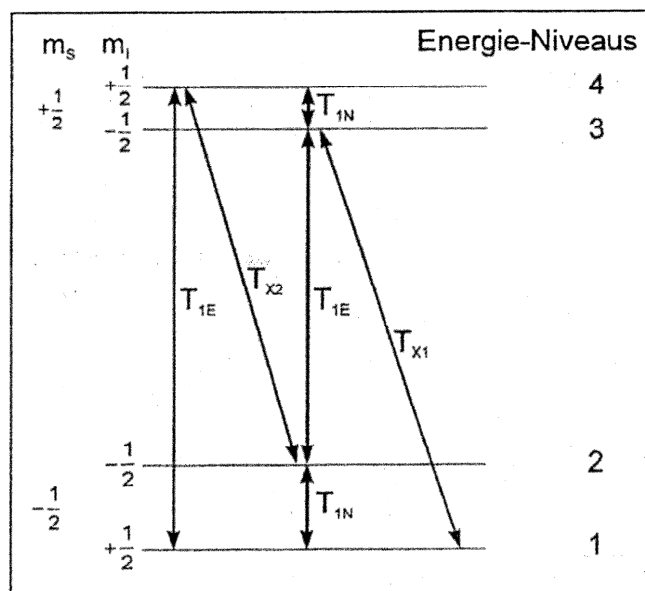


Abb. 2. 11: Relaxationswege eines $S = 1/2$, $I = 1/2$ Spinsystems.

Durch Einstrahlung geeigneter RF-Frequenzen ν_N^+ bzw. ν_N^- wird die Kernspin-Gitter-Relaxation T_{1N} durch Induktion der entsprechenden Kernspinübergänge umgangen. Die Spinpopulationen können somit von Niveau 4 auf Niveau 3 (bzw. von 1 auf 2) übergehen und von dort über die Kreuzrelaxationen T_{X1} bzw. T_{X2} zum Niveau 1 bzw. 2 gelangen. Über T_{X1} ändert sich sowohl Elektronen- wie auch Kernspin und ermöglichen einen Übergang, für den die Auswahlregel $\Delta(m_s + m_i = 0)$ vorliegt. Die zweite mögliche Kreuzrelaxation erfüllt die Bedingung $\Delta(m_s + m_i = 2)$. Beide Kreuzrelaxationen verknüpfen dabei Niveaus, die

verbotene Übergänge darstellen. Dadurch wird die effektive Relaxationszeit verändert und führt zu der Gesamtrelaxationszeit T' mit:

$$\frac{1}{T'} = \frac{1}{T_{1E}} + \left(\frac{1}{T_{X1}} + \frac{1}{T_{1N}} \right) \quad (2.35)$$

Tritt nur Elektronenspin-Gitter-Relaxation auf und ist somit $T_{1E}/T' = 1$, ist kein ENDOR-Signal detektierbar. Für viele paramagnetische Festkörperzentren gilt $T_{1E} < T_{X1} \ll T_{1N}$, wodurch ENDOR-Intensitäten in der Größenordnung von ca. 1-10% der ESR-Intensitäten erreicht werden. Bei Metalloproteinen beobachtet man dabei sehr kurze Relaxationszeiten ($T_{1E} = 10^{-6}$ s), die jedoch bei tiefen Temperaturen stark verlängert werden können.

2.2.2 ENDOR an nicht-orientierten Systemen

Die Detektion eines ENDOR-Effekts bezieht sich wie beschrieben auf einen bestimmten ESR-Übergang. Bei der ENDOR-Spektroskopie an einer Pulverprobe liefert nun abhängig von der Feld-Position im ESR-Spektrum eine bestimmte Untermenge der Molekül-orientierungen Beiträge zum ENDOR-Spektrum. Wie in Kap. 2.1.4 erläutert, kann der g -Tensor geometrisch als Ellipsoid mit den Hauptachsen g_{\max} , g_{\min} und g_{int} veranschaulicht werden. Die durch die Kugelkoordinaten θ und Φ charakterisierte Orientierungsselektion wird nun bei der Beschreibung eines ENDOR-Pulverspektrums auf den Hyperfeintensor A projiziert, wobei der g -Tensor das Bezugssystem für den A -Tensor darstellt (Abb. 2.13). Die Entstehung komplexer ENDOR-Spektren lässt sich nun wieder anhand eines geometrischen Modells veranschaulichen [86].

Betrachtet man die Aufnahme eines ENDOR-Spektrums exakt am Arbeitspunkt g_{\max} , liegt zunächst keine g -iso-Linie vor, sondern ein Punkt, d.h. es besteht ein quasicristalliner Zustand. Das resultierende ENDOR Spektrum besteht wie in Kap. 2.2.1 beschrieben aus einem Dublett (Abb. 2.8). Dieselbe Aussage lässt sich für den Arbeitspunkt g_{\min} treffen, an beiden extremalen Tensor-Hauptwerten erhält man Spektren vom Einkristall-Typ [117]. An den intermediären Arbeitspunkten liegen dagegen komplexere Spektren vor. Abb. 2.12 zeigt 3 Feldwerte in einem ESR-Pulver-Spektrum (links) und die resultierenden ENDOR-Spektren an

2. Spektroskopische Grundlagen

den entsprechenden Arbeitspunkten 1-3 (rechts). Bei Position 1 im ESR-Pulverspektrum zwischen g_{\max} und g_{int} repräsentiert die g_{iso} -Linien (Θ, Φ)-Kombinationen, für die die Resonanzbedingung erfüllt ist. Diese (Θ, Φ)-Paare werden nun auf das A-Tensor-System transformiert (Abb. 2.13). Die ENDOR-Resonanzlinien stammen dabei von Bereichen der g_{iso} -Linie, bei denen die Änderung der Hyperfeinwerte gegenüber Änderung der (Θ, Φ)-Winkel am geringsten ausfällt. Dies trifft bei den Wendepunkten der Kurve auf (Pfeile). An diesen Bereichen kommt es zu einer Akkumulation der Resonanzintensitäten (Abb. 2.13, 1). Am intermediären Arbeitspunkt g_{int} ist der Abstand der Wendepunkte am höchsten und ergibt die größte Separation der Resonanzlinien. (Abb. 2.13, 2). An Position 3 des ESR-Spektrums im Bereich zwischen g_{int} und g_{\min} verringern sich die Aufspaltungsgrößen wieder (Abb. 2.13, 3) und erreichen bei g_{\min} wieder den beschriebenen Einkristall-Typ mit 2 Resonanzlinien. Bei der ENDOR-Spektroskopie an Pulverproben erhält man also abhängig von Magnetfeldwert und der Protonenposition mehrere Resonanzlinien für ein Proton. Bei der Untersuchung von Protein-Pulverproben nimmt man deshalb zunächst an mehreren Magnetfeldwerten (= Arbeitspunkte) ENDOR-Spektren auf. Man erhält dann Spektren wie in Abb. 2.12, rechts, in denen sich die Signalmaxima über mehrere Arbeitspunkte hinweg ändern.

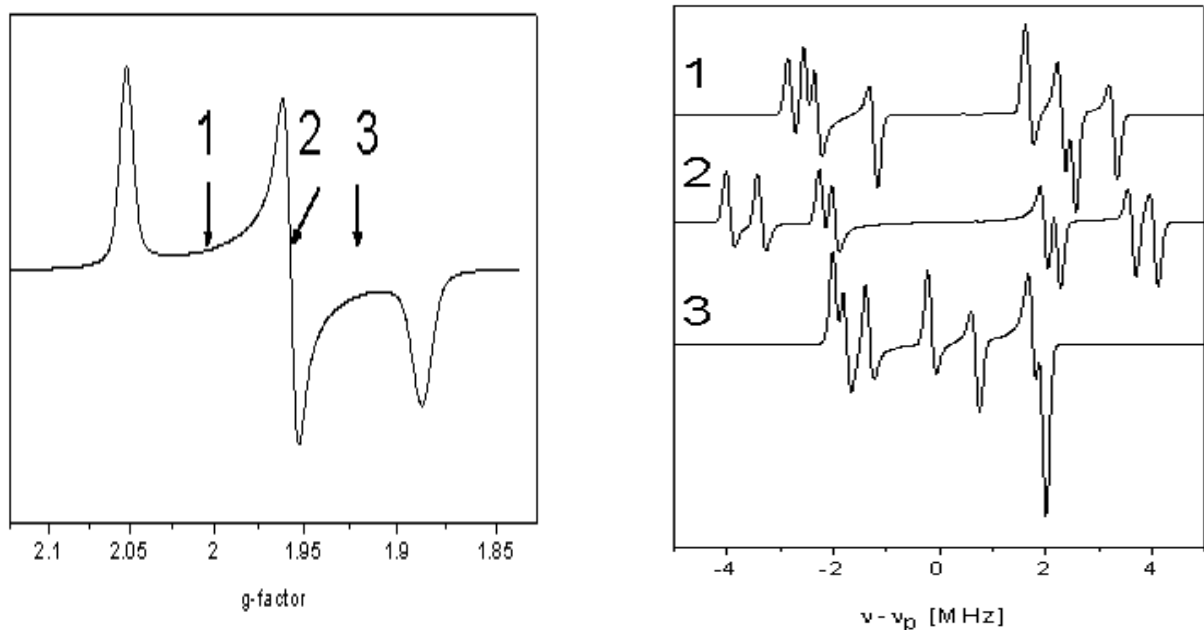


Abb. 2.12: ESR-Pulverspektrum (links) mit drei ausgewählten Arbeitspunkten und simulierte ENDOR-Spektren (links) für die jeweiligen Positionen im ESR-Spektrum [86].

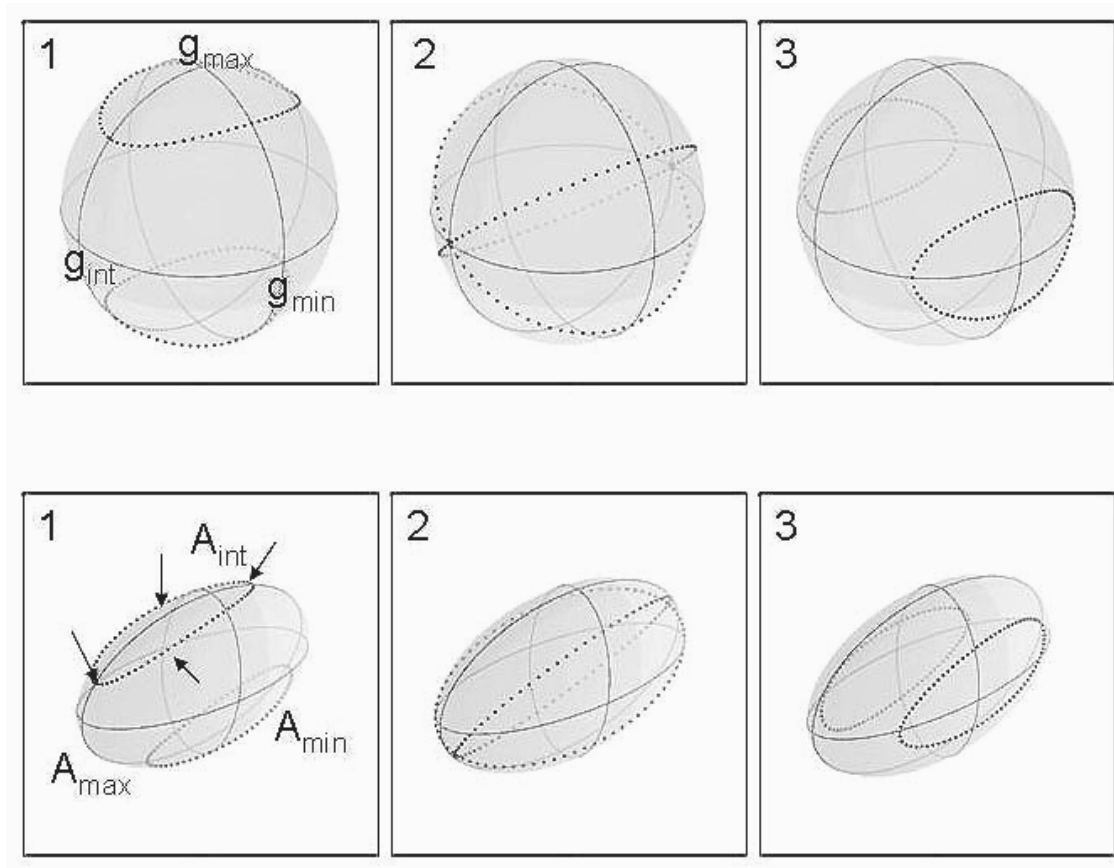


Abb. 2.13: giso-Linien der drei im Text beschriebenen Arbeitspunkte 1-3 (oben) und die Projektion der jeweiligen g-iso-Linien auf den A-Tensor (unten). Die Pfeile markieren die Wendepunkte der g-iso-Kurven [86].

Bei einem Spinzentrum, das sich innerhalb eines Proteins befindet, liegen meist Hyperfeinwechselwirkungen mehrerer umgebender Kerne vor. Als charakteristisches Merkmal beobachtet man meist spektrale Überlagerungen nahe der freien Kernfrequenz ν_N (ca. 14.5 MHz für ^1H -Protonen). Signale von Protonen mit Distanzen $> 4.0 \text{ \AA}$ nehmen in diesem Frequenzbereich teil. Protonen mit kurzen Distanzen von ca. 2.5 \AA - 4.0 \AA können dagegen Außenlinien mit hohen Hyperfein-Aufspaltungswerten ergeben. Auch Außenlinien können von Überlagerungen verschiedener Protonen-Wechselwirkungen verursacht werden, im Idealfall stammen sie jedoch von einzelnen H-Kernen. Durch Aufnahmen an verschiedenen Feldpositionen mit ausreichend kleinen Abständen können nun die Hyperfeintensoren ermittelt werden, indem man die Linienverläufe untersucht. Die Bestimmung der A-Parameter wird dabei mit Hilfe einer ENDOR-Simulation durchgeführt. Die theoretischen Grundlagen soll bei der Beschreibung der Simulationstechnik vorgestellt werden (vgl. Kap. 5.3).

2.3 Grundlagen der Puls-Endor-Spektroskopie

Bisher wurden spektroskopische Techniken betrachtet, bei denen Mikrowelle und Radiowellen kontinuierlich eingestrahlt wurden. Da ESR- und ENDOR-Resonanzlinien teilweise starken Verbreiterungseffekten unterliegen und geringe Intensitäten zeigen, können gepulste Messtechniken für die Darstellung aller Wechselwirkungen notwendig sein. Dabei wird die Einschaltdauer der eingestrahlten elektromagnetischen Wellen verändert. Mit dieser Methode kann der Einfluss bestimmter Wechselwirkungen auf das ESR-bzw. ENDOR-Signal verringert werden. Dadurch steigt die Auflösung für andere Wechselwirkungen und man erhält spektroskopische Details, die mit CW-Methoden unzugänglich sind. Bei der Puls-ENDOR-Spektroskopie unterscheidet man zwischen Präparations-, Polarisationstransfer- und Detektionsphase. Zunächst soll ein einfaches Puls-ESR-Experiment betrachtet werden, das bei der Puls-ENDOR-Messungen in der Detektionsphase eingesetzt wird. Diese relativ einfache Verfahren zur Durchführung einer gepulsten ESR-Messung beruht auf der Verwendung einer Zwei-Puls-Echo-Sequenz nach Hahn [60] (Abb.2.14).

Befindet sich ein Spinsystem unter dem Einfluß eines äußeren Magnetfeldes, ist nach der Boltzmannverteilung (Gl. 2.6) der energetisch tiefer liegende Spinzustand stärker besetzt, so dass eine makroskopische Magnetisierung M_z parallel zu \mathbf{B}_0 resultiert. Durch einen MW-Puls erfolgt eine Drehung der Magnetisierung M_z um den Winkel:

$$\beta = \gamma_e B_1 t_p = \omega_1 t_p \quad (2.36)$$

(mit γ_e = gyromagnetisches Verhältnis des Elektronenspins, B_1 (ω_1) die Magnetfeldstärke und t_p die Dauer des MW- Pulses).

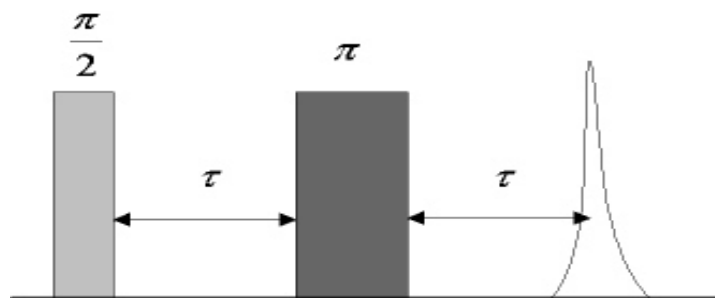


Abb. 2.14: Zwei-Puls-Echo-Sequenz zur Erzeugung von Elektronenspinechos.

2. Spektroskopische Grundlagen

Ein einzelner Puls mit dem Winkel $\beta = 90^\circ$ ($\pi/2$ - Puls) führt die ursprüngliche longitudinale Magnetisierung M_z in die transversale $-y$ -Magnetisierung über (Abb.2.15, a, b). Innerhalb der Zeit τ dephasieren die Spinpakete anschließend in der transversalen xy -Ebene (Abb.2.15, c). Dadurch wird ein Verlust der Phasenkohärenz und die Abnahme der transversalen Magnetisierung verursacht. Der Zerfall der transversalen Magnetisierung wird als freier Induktionszerfall (engl. free induction decay, FID) bezeichnet. Dieses abklingende Signal zerfällt mit der Phasengedächtniszeit T_m und ist definiert als die Zeit, nach der die Intensität auf e^{-1} des Anfangswertes gesunken ist. Im Fall eines exponentiellen Abnahme der Echointensität entspricht sie der transversalen Relaxationszeit T'_2 . Der nun folgende π -Puls verursacht die Umkehr der Dephasierung, indem die Magnetisierungsvektoren um 180° um die x -Achse gedreht werden (Abb.2.15, d). Durch diesen Refokussierungspuls sind nach einem weiteren Zeitintervall τ alle Vektoren entlang der $+y$ -Achse ausgerichtet (Abb.2.15, e).

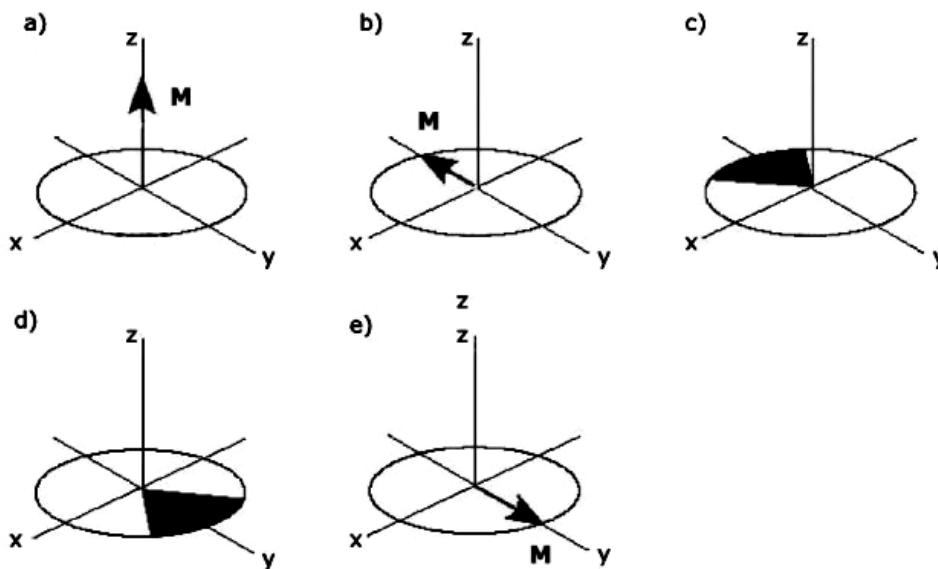


Abb.2.15: Schematische Darstellung des Magnetisierungsvektors in einem rotierenden Koordinatensystem bei einem Zwei-Puls-Echo-Experiment. Die Anregung erfolgt durch MW-Pulse $\pi/2$ und π entlang der x -Achse. a) Vor der MW-Anregung zeigt der Magnetisierungsvektor eines Spinsystems in die z -Richtung. b) Durch die Einstrahlung eines $\pi/2$ -Pulses aus der $-x$ -Richtung wird der Magnetisierungsvektor in die $-y$ -Richtung überführt. Durch diesen Puls wird eine Elektronenkohärenz erzeugt, die einer festen Phasenbeziehung zwischen den Elektronenspins in beiden m_s - Zuständen entspricht. c) Anschließend dephasiert der Magnetisierungsvektor während der Zeit τ , da die einzelnen Elektronenspins unterschiedliche Präzessionsfrequenzen aufweisen. Dies führt zum Verlust der Elektronenkohärenz. d) Ein π -MW-Puls dreht die dephasierten Spins zum Zeitpunkt τ um 180° um die x -Achse. e) Nach der Zeit τ nach dem π -MW-Puls wird die Phasenbeziehung der Elektronenspins wieder kohärent. Es bildet sich ein Echo-Signal.

2. Spektroskopische Grundlagen

Die kurzzeitig sich aufbauende und wieder zerfallende transversale y -Magnetisierung wird als Elektronenspin-Echo (ESE) bezeichnet. Die Spin-Echo-Amplitude ist eine Funktion des Pulsabstandes τ , die mit der charakteristischen Relaxationszeit T_2 zerfällt. Bei der FS-ESE wird bei einer Zwei-Puls-Echo-Sequenz die Echo-Intensität als Funktion des Magnetfelds \mathbf{B}_0 gemessen. Auf diese Weise wird ein Elektronen-Spin-Echo detektiertes ESR-Spektrum in Absorption erhalten.

Bei der ESR ist oftmals der FID und damit das Elektronenspinecho wenig strukturiert. In diesem Fall kann die ESEEM- oder die Puls-ENDOR-Spektroskopie herangezogen werden, um die Elektronen-Kern-Wechselwirkungen aufzulösen. Der Vorteil der Puls-ENDOR-Spektroskopie gegenüber CW-Techniken besteht darin, durch geeignete Pulssequenzen das Relaxationsverhalten des untersuchten Systems zu beeinflussen. Neben vielen speziellen Puls-ENDOR-Techniken existieren zwei Standardmethoden, die von Mims [104] bzw. Davies [38] eingeführt und nach ihnen benannt wurden. Im Folgenden soll die für diese Arbeit angewendete Davies-Sequenz der Puls- ENDOR-Spektroskopie dargestellt werden (Abb. 2.16).

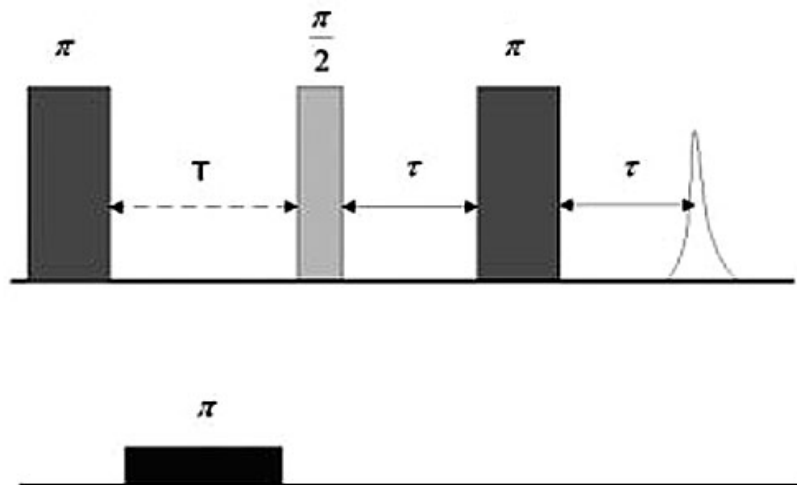


Abb. 2.16: Davies-ENDOR-Sequenz mit den drei Unterteilungen Präparation (MW- π -Puls), Polarisationstransfer (RF- π -Puls) und Detektion (Hahn-Sequenz).

In Abb. 2.17 ist ein System mit zwei Elektronen und zwei Kernspinübergängen, also $S = \frac{1}{2}$ und $I = \frac{1}{2}$ dargestellt, das die Besetzung der Energieniveaus während eines Davies-ENDOR-Experimentes beschreibt. Im thermischen Gleichgewicht befindet sich das Spinsystem im

2. Spektroskopische Grundlagen

Zustand einer Spin-Polarisation (Abb. 2.17, a). Die Davies-Sequenz beginnt mit einer Polarisationsinversion eines einzelnen ESR-Übergangs durch einen π -MW-Puls. Dieser Puls invertiert die Elektronenspin-Population, also die Besetzung eines Niveaus zwischen 1 und 3. Innerhalb der Relaxationszeit dieses Übergangs kann durch einen selektiven π -Rf-Puls die Polarisation eines Kernspinübergangs in einem der beiden M_s -Zustände invertiert werden. Bei einem resonanten RF-Puls werden die Zustände 1 und 2 invertiert. Dies führt zum Verschwinden der Populationsdifferenz des ursprünglich angeregten ESR-Übergangs ($3 \leftrightarrow 1$) und somit zum Abklingen der Echointensität. Bei einem nichtresonanten RF-Puls bleibt eine Populationsdifferenz erhalten. Der Kernspinübergang kann dann über die Hahn-Pulssequenz detektiert werden. Die durch den RF-Puls verschobene Polarisation gibt dabei einen oszillierenden Beitrag zum Echo. Bei diesem Puls-Verfahren wird die Änderung des Echo-Signals bei einer festen Position des Magnetfeldes \mathbf{B}_0 in Abhängigkeit der Radiofrequenz gemessen.

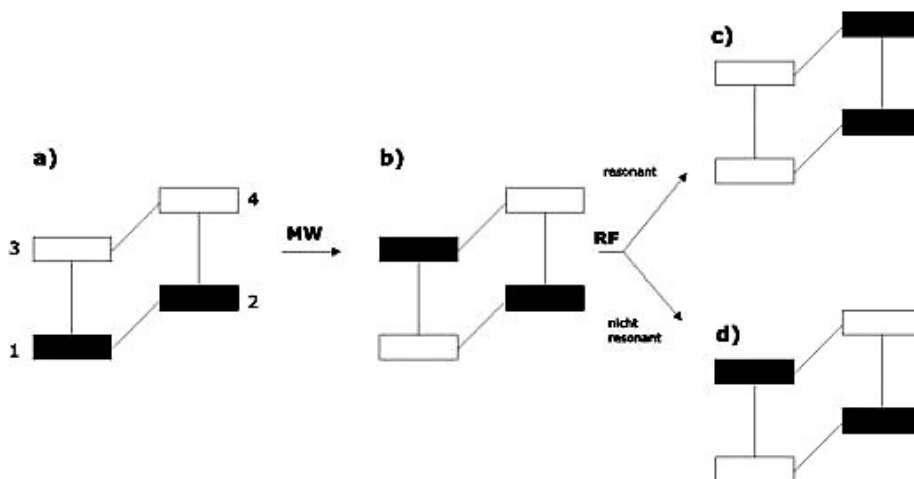


Abb. 2.17: Besetzung der Energieniveaus bei einem Davies-ENDOR-Experiment eines Spinsystems $S = 1/2$, $I = 1/2$. Schwarze (hohe Besetzung) und weiße (niedrige Besetzung) Kästchen symbolisieren die Populationsunterschiede. a) Population der Spinzustände im thermischen Gleichgewicht. b) Inversion der Besetzung der Zustände nach dem selektiven π -MW-Puls für den ESR-Übergang $3 \leftrightarrow 1$ (Kernspin-Polarisation). c) Populationsänderung nach einem resonanten π -RF-Puls für den Übergang 3 nach 4. Dabei wird die Kernspinpolarisation invertiert und bewirkt eine Veränderung der Polarisation des ESR-Beobachter-Übergangs. Das Echosignal verschwindet auf diesem Übergang. d) Besetzungszustand nach einem nicht-resonanten π -RF-Puls auf diesen Kernspinübergang. In diesem Fall wird ein (invertiertes) Echo erhalten.

2. Spektroskopische Grundlagen

Die Davies-Sequenz gilt als geeignete Methode, um breite Hyperfeinlinien mit großen Aufspaltungswerten zu detektieren, während die Mims-Puls-Sequenz zum Nachweis kleiner Hyperfeinkopplungen eingesetzt wird. Da bei Metalloproteinen oftmals charakteristische Außenlinien entscheidenden Anteil bei der Analyse der Spektren haben, wurde bei der vorliegenden spektroskopischen Untersuchung der Schwerpunkt der Pulsspektroskopie auf die Davies-Sequenz gelegt. Pulsdauer, Pulsabstände und Spektrometerbeschreibung werden in Kap. 5.2.4 und 5.2.5 aufgeführt.

3. Enzymatische Grundlagen

3.1 Eisen-Schwefel- Proteine

Eisen-Schwefel-Proteine (ISP, iron sulphur proteins) sind an einer Vielzahl biologischer Redoxprozesse beteiligt. Die Bildung der Eisen-Schwefel-Komplexe kann *in vitro* erfolgen [8], bei Archae bis zu tierischen und pflanzlichen Eukaryoten sind jedoch komplexe Enzymsysteme vorhanden, um FeS-Zentren zu bilden [49, 124]. Die Biogenese der verschiedenen FeS-Cluster erfordert dabei die Anwesenheit von Sulfid, Eisen und geeignete Liganden. Diese können bei der Assemblierung sowohl von Proteinen als auch von anorganischen Thiolverbindungen gestellt werden [9]. In den folgenden Kapitel werden zunächst die wichtigsten Merkmale von Eisen-Schwefel-Proteinen zusammengefasst. Anschließend erfolgt eine allgemeine Beschreibung von Molybdänproteinen sowie eine detaillierte Betrachtung der AOR.

3.1.1 Übersicht

Schwefel liegt in FeS-Zentren immer als S^{2-} , Eisen als Fe^{2+} oder Fe^{3+} vor. In Anzahl und Anordnung können beiden Atomarten unterschiedlich auftreten. Der einfachste der FeS-Cluster ist ein tetraedrisch von vier Sulfhydrylgruppen der Aminosäure Cystein koordiniertes Eisen-Atom und in den sog. Rubredoxinen vorhanden (Abb. 3.1a). Vielfach treten planare [2Fe-2S]-Zentren auf, bei denen zwei Eisen-Atome über zwei anorganische Schwefelatome verbunden werden (Abb. 3.1b). Neben einer Ligandierung, bei der die Eisenatome jeweils von zwei Cystein-Schwefelatomen koordiniert werden (Ferrodoxine, Fdx), gibt es auch den Typ der sog. Rieske-Proteine (Rieske-ISP), bei denen ein Eisenatom von zwei Cystein-Schwefelatomen koordiniert wird und ein Eisenatom kovalent an zwei Stickstoffatome zweier benachbarter Histidine gebunden ist. Weiterhin ist unter den Eisen-Schwefel-Zentren der [4Fe-4S]-Typus weit verbreitet (Abb. 3.1 d). Bei diesen unterscheidet man je nach elektrochemischen Redoxpotentialen zwischen LoPIPs (Low-Potential-Iron-Sulfur-Proteins mit $[2Fe^{3+}, 2Fe^{2+}]^{2+}$ bzw. $[1Fe^{3+}, 3Fe^{2+}]^{+}$ in der reduzierten Form) und HiPIPs (High-Potential-Iron-Sulfur-Proteins mit $[3Fe^{3+}, 1Fe^{2+}]^{3+}$ bzw. $[2Fe^{3+}, 2Fe^{2+}]^{2+}$ in der reduzierten Form). Daneben findet man auch [3Fe-3S]-Cluster und [3Fe-4S]-Cluster, bei denen eine Eisenecke des Kubans unbesetzt ist (Abb. 3.1 c) sowie weitere FeS-Zentren, die meist aus Kombinationen dieser Grundtypen bestehen [vgl. 8, 9].

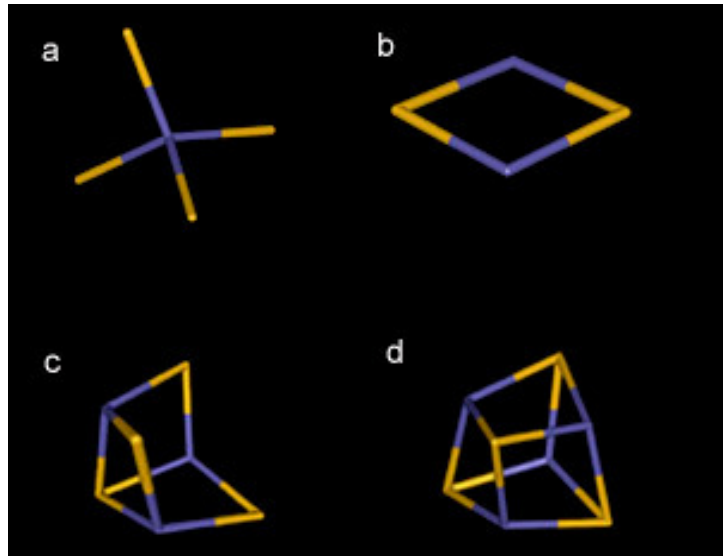


Abb. 3.1: Verschiedene Formen der FeS-Zentren; a) Rubredoxin, FeS_4 ; b) $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, c) $[3\text{Fe}-4\text{S}]$, d) $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ (Fe-Atome violett, S-Atome gelb).

Die Funktion der FeS-Cluster besteht aufgrund der Redox Eigenschaften des Eisens und des Schwefels überwiegend in Elektronentransfer-Prozessen. Die Redoxpotentiale der Protein-gebundenen Zentren können dabei einen großen Bereich umfassen und liegen zwischen -650 mV bei $[7\text{Fe}8\text{S}]$ -Zentren bis + 450 mV bei $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -Zentren der HiPIPs [4, 69]. Auch innerhalb des gleichen FeS-Typus treten deutliche Unterschiede in den elektrochemischen Eigenschaften auf. Die durch Redox titrationen ermittelbaren Werte zeigen bei $2\text{Fe}-2\text{S}$ -Molekülen eine große Spannbreite [137]. Zunächst kann diese Fluktuation durch die Ligandierung des FeS-Zentrums verursacht werden. Bei Rieske-ISP beträgt das Redoxpotential ca. +300mV [133], bei Ferredoxinen dagegen -450mV bis -200mV [4]. Ebenso können Wasserstoffbrücken zwischen Amidgruppen des Aminosäurerüsts und den Cystein-Schwefelatomen des Clusters bei der Modulierung des Redoxpotentials eine Rolle spielen [14]. Untersuchungen bei verschiedenen Fdx zeigen einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der N-H \cdots S-Wasserstoffbrücken in der Umgebung der Fe-Zentren bezüglich der Redoxpotentiale und deuten auf eine Änderung von 75-80 mV pro einzelner N-H \cdots S-Bindung [2, 97]. Weiterhin haben elektrostatische Effekte, hervorgerufen durch Dipole oder geladene Seitengruppen des Aminosäurerüsts, entscheidenden Anteil an der Größe der Redoxpotentiale [14, 94]. Eine T54A-Mutation bei Adrenodoxin (Adx) ergibt z.B. eine Veränderung von 70mV [139]. Dieses Phänomen lässt sich auch bei anderen FeS-Zentren beobachten. Eine ausführliche Studie anhand von Punkt-Mutationen in der Umgebung von $4\text{Fe}4\text{S}$ - Zentren konnte bei Änderungen der lokalen Ladung starke Veränderungen in den Redox Eigenschaften aufzeigen [33].

3.1.2 Klassifikation von Eisen- Schwefel- Proteinen

In Form und Funktion können Eisen-Schwefelproteine auf unterschiedliche Weise auftreten. Sie liegen in ungebundener Form oder als Untereinheiten großer, z.T. membran-gebundener Proteinkomplexe vor. In der mitochondrialen Atmungskette sind FeS-Zentren des Cytochrom bc₁-Komplexes, der Succinat-Dehydrogenase und der NADH-Dehydrogenase, mit insgesamt drei [4Fe4S] und fünf bis sechs [2Fe2S]-Zentren der größte bekannte Eisen-Schwefel-Protein-Komplex [13]. Bei der photosynthetischen Elektronentransportkette ist das Photosystem I und II mit drei gebundenen [4Fe4S]-Zentren (F_X, F_A, F_B) an der Elektronenübertragung beteiligt [48]. Der Elektronentransfer von PS I zur Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase wird anschließend durch ein mobiles [2Fe2S]-Fdx durchgeführt. Ein weiterer zentraler Stoffwechselprozess mit Beteiligung von FeS-Zentren ist die Stickstofffixierung. Das Molybdän-Eisen-Protein der Nitrogenase enthält untypische FeS-Cluster, wie einem [8Fe-7S]-Zentrum sowie ein [Mo-7Fe-9S]-Zentrum [36].

Eine einheitliche Klassifizierung der Eisen-Schwefel-Proteine gestaltet sich wegen der Vielseitigkeit bezüglich der Struktur ihrer Zentren und ihrer Beteiligung an unterschiedlichen Stoffwechselprozessen als schwierig. Man kann sie einerseits als reine Elektronen-Transfer-Proteine von Enzymen mit katalytischer Funktion unterscheiden und andererseits danach differenzieren, ob sie nur Eisen-Schwefel-Zentren oder auch zusätzliche prosthetische Gruppen aufweisen. Weiterhin können membrangebundene Systeme von freien Enzymen abgegrenzt werden. Folgende Unterteilung nach Struktur und Funktion gibt einen Überblick über die Diversität dieser Proteingruppe [27]:

1. FeS-Proteine ohne Kofaktor: Dazu gehören meist kleine, interenzymatische Elektronen-Transfer-Proteine, von denen viele pflanzliche und bakterielle Ferredoxine, Adrenodoxin und Putidaredoxin aus Prokaryonten und menschlichem Gewebe sowie die pflanzlichen Rieske-ISP und die HiPPIPs bekannte Beispiele darstellen. Sie können neben [2Fe-2S] und [4Fe-4S]-Zentren auch höhermolekulare Cluster-Typen enthalten.

2. FeS-Proteine mit Kofaktor: Unter diesen Kofaktoren können organische Verbindungen wie Flavin und Chinon oder organometallische Verbindungen mit Mo, W, Ni oder Nicht-Häm-Fe-Gruppen vorkommen. Biochemisch gut untersuchte Proteine sind z. B die Monooxygenasen, die Dioxygenasen, Nickel-Hydrogenasen, sowie Wolfram- und

Molybdänhaltige FeS-Proteine. Letztere stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit und werden in Kap. 3.2 näher beschrieben.

3. Membrangebundene Eisenschwefel-Proteine: Diese Gruppe zeigt eine große Übereinstimmung in ihrem strukturellen Aufbau. Sie bestehen mindestens aus einer Untereinheit, die verantwortlich für die Bindung an die Membran ist und einer Untereinheit, an der die Substratumsetzung stattfindet. Oftmals besitzen sie ergänzend eine Untereinheit für eine Chinon-Bindung. Die FeS-Cluster sind dann zwischen den beiden letztgenannten Untereinheiten positioniert und verantwortlich für den intraenzymatischen Elektronentransport. Beispiele für membrangebundene Systeme wurden bereits bei der Photosynthese und der mitochondrialen Atmungskette erwähnt. Weitere bekannte Vertreter sind u.a. Format-Dehydrogenase, Nitrat-Dehydrogenase, DMSO- Reduktase und Fumarat-Reduktase, die zu den Molybdopterinhydroxylasen gehören und in Kap. 3.3.2 näher beschrieben werden.

4. FeS-Zentren mit katalytischer Funktion: Einige FeS-Enzyme dienen nicht dem Elektronenfluss, ihre FeS-Zentren fungieren als biochemische Katalysatoren, deren Reaktionsmechanismus zur Hydrierung, Dehydrierung oder Isomerisierung von Doppelbindungen führt. Dazu gehören z. B Proteine der Atmungskette wie die Aconitase, die während des Glucose-Abbaus Citrat zu Isocitrat umsetzt. Im aktiven Zustand besitzt dieses Enzym ein [3Fe-4S]-Zentrum, das bei der Katalyse in ein [4Fe-4S]-Zentrum überführt wird [10]. E.coli besitzt ein weiteres FeS-Protein mit einer katalytischen Funktion, die Biotin-Synthase. Mit Hilfe eines [4Fe4S]-Cluster katalysiert dieses Enzym die Insertion des Schwefels in ein Desthiobiotin-Molekül. Ein zweites [2Fe2S]-Zentrum der Biotin-Synthase wird bei dieser Reaktion zerstört, ein Schwefel-Atom aus diesem Zentrum wird dabei möglicherweise in Biotin eingebaut [102,134].

Neben der Beteiligung von FeS-Proteinen an Elektronenübertragungen und Katalysen können FeS-Proteine auch regulatorische Funktionen in einer Zelle übernehmen Ein eukaryontisches zelluläres FeS-Protein, das IRP (Iron Regulatory Protein) des SoxR/SoxS-Systems, dient als Sensor gegenüber O^2- Radikalen [63], die Fumarat-Nitrat-Reduktase aus E.coli kann als Sauerstoffsensoren erwähnt werden [89].

3.1.3 Elektronische Struktur von [2Fe-2S]- Zentren

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung der beiden [2Fe-2S]-Cluster der AOR. Beide Zentren gehören zum Fdx-Typ, die Metallionen sind durch vier Cysteine koordiniert. Bei einer großen Anzahl von [2Fe-2S]-Zentren konnte anhand verschiedener spektroskopischer Methoden die elektronischen bzw. geometrischen Strukturen beschrieben werden [53, 11, 48]. Dabei zeigen sich unterschiedliche Eigenschaften für die jeweiligen Oxidationsstufen. Im oxidierten Zustand $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ enthalten sie zwei Fe^{3+} -Atome, während im reduzierten $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{1+}$ -Zustand eines der beiden Atome zu Fe^{2+} reduziert worden ist. Dabei können geringe strukturelle Unterschiede zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand bei vielen Zentren beobachtet werden [140].

3.1.3.1 Oxidierte [2Fe- 2S]- Komplexe

Im oxidierten [2Fe-2S]- Cluster liegen zwei Fe^{3+} -Ionen mit $3d^5$ -Elektronenkonfiguration vor, zwischen denen eine über die Sulfidbrücken vermittelte magnetische Wechselwirkung besteht. Die tetraedrische Schwefelkoordination führt nach dem Ligandenfeld-Modell zu einer sog. high-spin- d^5 - Konfiguration der Eisenorbitale [114]. Die magnetische Wechselwirkung zwischen den Spin-Operatoren \hat{S}_1 und \hat{S}_2 wird durch den sog. Heisenberg-Dirac-van Vleck ($\mathcal{H}_{\text{HDvV}}$)- Operator beschrieben:

$$\hat{H}_{\text{HDvV}} = J \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_2 \quad (3.1)$$

Mit J wird die magnetische Austauschkopplungskonstante bezeichnet, diese Konstante beschreibt die Wechselwirkung von einfach besetzten d-Orbitalen des Eisenatoms mit doppelt besetzten Schwefel-Orbitalen. Ihre Größe ist abhängig von der Fe-S-Distanz sowie dem Fe-S-Fe-Bindungswinkel [61, 110]. Durch Anwendung des \hat{H}_{DvV} -Operators (3.1) auf die Schrödinger-Gleichung erhält man die Energieeigenwerte:

$$E_i = J S'_i (S'_i + 1) \quad (3.2)$$

S' kann Werte zwischen $|S_1 + S_2|$ und $|S_1 - S_2|$ annehmen. Die Art der Liganden beeinflusst dabei, ob bei einem [2Fe- 2S]-Zentrum sog. ferromagnetische (für $|S_1 + S_2|$) oder antiferromagnetische (für $|S_1 - S_2|$) Wechselwirkung vorliegt [1, 37]. Die fünf ungepaarten Elektronen der Eisen-d-Orbitale richten sich bei antiferromagnetischen Kopplung nach dem Prinzip der Spin-Maximierung mit entgegengesetztem Spin zueinander aus (Hundsche Regel).

Bei [2Fe2S] Zentren liegt i.d.R. diese Konfiguration vor, aufgrund von $S_1 = S_2 = 5/2$ erhält man für $S' = |S_1 - S_2| = 0$. Der oxidierte Zustand eines [2Fe-2S]-Zentrums ist der ESR-Spektroskopie somit nicht zugänglich, die elektronische Struktur wird z. B mit Hilfe von NMR- und Mößbauer-Techniken beschrieben [111, 131].

3.1.3.2 Reduzierte [2Fe- 2S]- Komplexe

Im Fall einer Reduktion eines [2Fe- 2S]²⁺-Zentrums erhält man ein [2Fe2S]⁺-Zentrum, in dem ein Eisenatom dreiwertig ($S_1 = 5/2$) und ein Eisenatom zweiwertig ($S_2 = 2$) ist. Durch Anwendung des \hat{H}_{HDV} -Operators liegt bei antiferromagnetischer Kopplung der Grundzustand mit $S' = |S_1 - S_2| = 1/2$ vor, wodurch sich ein ESR-Signal beobachten lässt. Nach dem Spinkopplungsmodell werden dabei die g-Werte von 2Fe-2S-Zentren auf eine Linearkombination der einzelnen g-Faktoren der Fe-Ionen zurückgeführt [51]. Für den symmetrischen Fe(III)-Kern werden sie als isotrop angesehen, während für das Fe(II)-Ion eine unsymmetrische tetraedrale Koordination zu einem anisotropen lokalen g-Tensor führt:

$$g = K(\text{Fe}_1)g_1 + K(\text{Fe}_2)g_2 \quad (3.3)$$

wobei die Größen $K(\text{Fe}_i)$ die Projektionen der Spins S_i der Eisenatome auf den Gesamtspin S' des Clusters und damit die Spindichte am Eisen Fe_i wiedergeben [130]:

$$\begin{aligned} K(\text{Fe}_{1(2)}) &= \frac{\langle S_{1(2)} \cdot S' \rangle}{S'^2} \\ &= \frac{S'(S'+1) + S_{1(2)}(S_{1(2)}+1) - S_{2(1)}(S_{2(1)}+1)}{2S'(S'+1)} \end{aligned} \quad (3.4)$$

Bei einem System $S' = 1/2$, $S_1 = 5/2$ und $S_2 = 2$ ergeben sich für $K(\text{Fe}_1) = 7/3$ und für $K(\text{Fe}_2) = -4/3$, d.h. bei antiferromagnetischer Kopplung wird die Spindichte am oxidierten Atom positiv und am reduziertem Atom negativ. Die Bestimmung der Spindichteverteilung bei einem [2Fe-2S]-Zentrum liefert somit Aussagen hinsichtlich der Valenzzuordnung bei diesen mehrzentrigen Spinsystemen. Bei [2Fe-2S]-Zentren liegen dabei überwiegend lokalisierte Valenzen vor. Die Valenzlokalisierung konnte anhand von Mößbauerspektren bereits frühzeitig bei Fdx nachgewiesen werden [42, 114]. Würde das sechste, durch die Reduktion addierte Elektron über beide Eisenatome delokalisieren (sog. Mixed-Valence-Pair), könnten entartete $\text{Fe}^{2+}\text{-Fe}^{3+} // \text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}$ -Zustände miteinander kombiniert werden. Solch eine

Delokalisation tritt im Fall $S' = |S_1 + S_2| = 9/2$ auf. Bei antiferromagnetischer Kopplung $S' = 1/2$ tritt das Problem auf, dass dann ein Orbital mit zwei parallelen Spins besetzt werden müsste. Aus diesem Grund ist der Effekt der Delokalisation der Ladung bei antiferromagnetisch gekoppelten Fe^{2+} - Fe^{3+} -Systemen selten vorhanden.

3.1.4 ESR-und ENDOR-Spektroskopie von 2Fe-2S-Komplexen

Von einer Vielzahl von reduzierten 2Fe2S-Zentren sind ESR- und ENDOR-Daten vorhanden [27, 43]. Die ESR-Spektren dieser Cluster-Klasse zeigen teilweise Variationen hinsichtlich der Tensor-Symmetrie und der g-Eigenwerte innerhalb einer Symmetriegruppe. Bei den Fdx unterscheidet man zwischen zwei Typen, einerseits den Pflanzen-Fdx-Typ und andererseits den Vertebraten-Fdx-Typ. Pflanzliche Fdx sind charakterisiert durch rhombische g-Tensorsymmetrie mit g-Eigenwerten von ca. 2.05, 1.96 und 1.89 und g_{av} Werten kleiner 2.0 ($g_{av} = [g_{max} + g_{int} + g_{min}]/3$). Bei Vertebraten-Fdx wie z.B. Adrenodoxin und Putidaredoxin besitzt der g-Tensor dagegen annähernd axiale Symmetrie [vgl. 65]. Die ESR-Daten an den meist als ungeordneten Systemen vorliegende Proben reichen jedoch nicht aus, um die g-Tensor-Orientierung bezüglich der molekularen Struktur zu determinieren. Dies erfolgte bislang ausschließlich an einem Einkristall von einem Rieske-ISP (mitochondrialer bc1-Komplex, Rind). Mittels einer ESR-Studie an der kristallinen Probe konnte neben den g-Eigenwerten die g-Tensorlage bestimmt werden [18].

Die ENDOR-Spektroskopie kann hinsichtlich g-Orientierung, Spindichte und Hyperfeinwechselwirkung detaillierte Informationen liefern. Zum einen konnte anhand ENDOR-Messungen mit ^{57}Fe substituierten FeS-Komplexen Einblicke in die elektronischen Merkmale der 2Fe-2S-Cluster gewonnen werden. Die theoretischen Werte der Spin-Projektionskoeffizienten (Gl. 3.4) wurden durch Mößbauer und ENDOR-spektroskopische Daten des ^{57}Fe -Hyperfein-Tensors experimentell bestätigt [42, 47]. Die Experimente ergaben einen negativen, leicht anisotropen Fe(III)-Hyperfeintensor mit A_{av} -Werten von ca. -46 MHz und einen positiven, stark anisotropen Fe(II)-Hyperfeintensor, mit Werten zwischen +10 und +35 MHz. Systematische ^1H -ENDOR-Daten von 2Fe-2S-Zentren sind erst in den letzten Jahren bestimmt worden. Zunächst bietet sich der Vergleich zwischen einem Fdx aus *A. platensis* (apFdx, Pflanzen-Typ) [31], Adrenodoxin (hsAdx, Vertebraten-Typ) [87] und einem Rieske-ISP (Vertebraten) [87] hinsichtlich der g-Orientierung an. Die Lage des g-Tensor

3. Enzymatische Grundlagen

orientiert sich bei den durch Cysteine koordinierten Zentren des asFdx und hsAdx an der tetraedrischen Koordinationsgeometrie (Abb. 3.2, links, Mitte). Die Hauptachsen g_{\max} und g_{int} sind in Richtung der Cysteinliganden orientiert, g_{\min} liegt um ca. 45° aus der Clusterebene verkippt. Bei dem Rieske-ISP liegt der g-Tensor hingegen mit seiner g_{\max} -Orientierung in der Cluster-Ebene, g_{\min} zeigt entlang des Fe-Fe-Verbindungsvektors. Abb. 3.2 zeigt die Ligandierung und die Lage des g-Tensors der drei unterschiedlichen 2Fe-2S-Cluster.

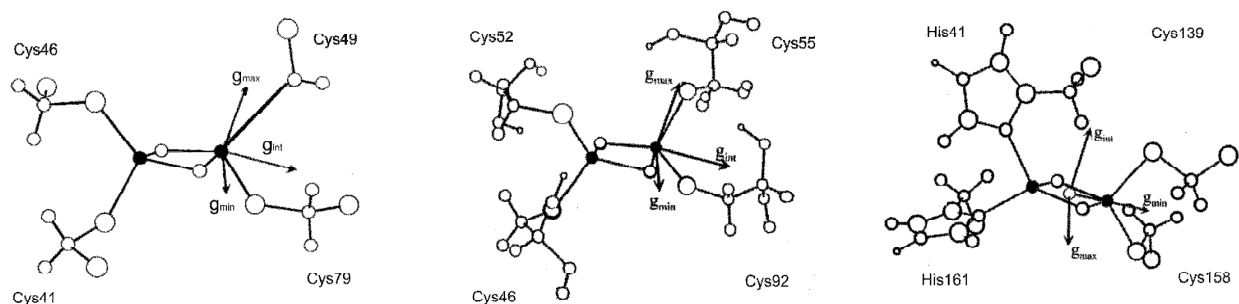


Abb.3.2:g-Tensor-Orientierung verschiedener 2Fe2S-Komplexe: apFdx (links), hsAdx (Mitte) und btRieske-ISP (rechts) [nach 31, 87].

Durch die ^1H -ENDOR-Experimente konnten weiterhin die Spindichten bestimmt werden. Für diese fanden sich Werte im Bereich von ca. 1.6 (Fe2)/-0.6(Fe1) (hsAdx) bis 1.9 (Fe2)/-0.85 (Fe1) (asFdx). Bei den durch 4 Cysteine koordinierten 2Fe2S-Clustern ist somit Fe1 das reduzierte Fe-Zentrum, wobei für das asFdx dieser Befund bereits durch NMR-Experimente aufgezeigt werden konnte [41]. Im Fall des Rieske-ISP wurde dagegen die Reduktion des Fe2 bestätigt [54] und zeigt eine Spindichte-Verteilung von 1.6 (Fe1) und -0.55 (Fe2) auf. Daneben wurde bei der ENDOR-Analyse der 3 aufgeführten FeS-Zentren isotrope Kopplungen der Cystein- β -Protonen am Fe mit positiver Spindichte im Bereich zwischen ca. 1.6 MHz und 4.2 MHz aufgefunden. Das apFdx diente wegen der großen Ähnlichkeit zur dgAOR zu Beginn der vorliegenden Arbeit als Referenz-System, da an diesem erstmals systematische ^1H -ENDOR-Studien unternommen wurde. Ein ausführlicher Vergleich zu den Ergebnissen der AOR soll bei der Diskussion der Simulationsparameter gegeben werden (Kap. 7.1).

3.2 Molybdopterincofaktorenzyme

3.2.1 Übersicht

Molybdänhaltige Enzyme spielen bei einer großen Anzahl elementarer biologischer Prozesse eine bedeutende Rolle. Unter der Bezeichnung Molybdopterincofaktorenzyme fasst man Proteine zusammen, die Sauerstofftransfer-Redoxreaktionen katalysieren und neben einem Molybdopterincofaktor zusätzlich FeS-Cluster sowie weitere Zentren wie FAD- oder Häm-Gruppen besitzen. Durch eine große Variabilität bei der Kombination der prosthetischen Gruppen sowie des Aufbaus des Molybdänzentrums sind sie in der Lage, eine Vielzahl organischer Substrate zu oxidieren bzw. zu reduzieren.

3.2.2 Klassifikation von Molybdopterincofaktorenzymen

Die Klasse der Molybdopterincofaktorenzyme können auf der Basis ihrer Aminosäuresequenz, der spektroskopische Eigenschaften, der Struktur des Reaktionszentrums und der von ihnen katalysierten Reaktionen unterteilt werden. Anhand der steigenden Anzahl der Strukturdaten setzte sich eine Klassifikation nach der Struktur-Homologie ihrer Reaktionszentren in drei Gruppen durch (Abb. 3.3). Eine Darstellung dieses Themengebietes liefern verschiedene Übersichtsartikel und Monographien [66, 91, 113, 120].

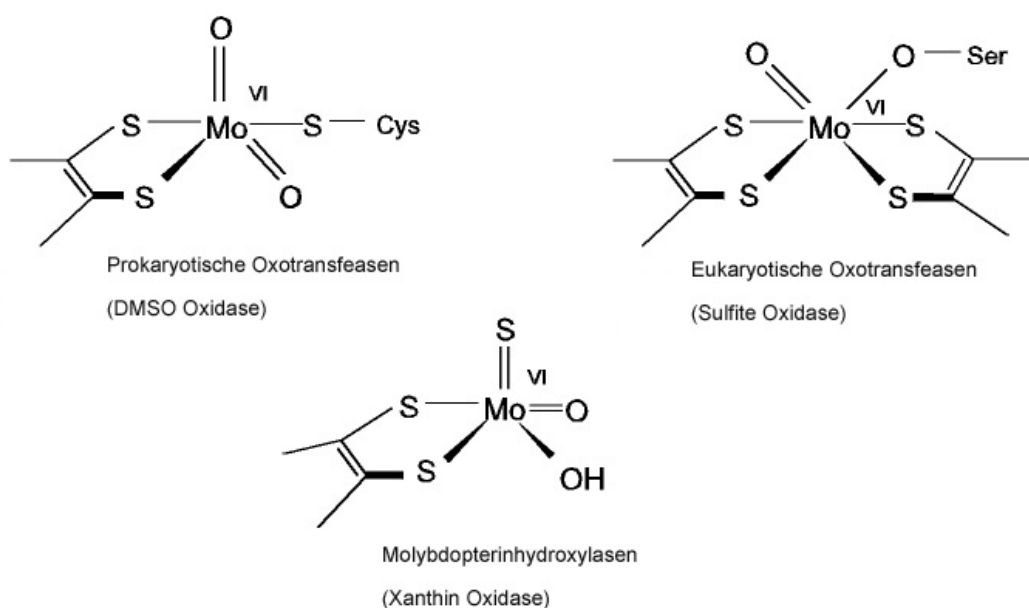


Abb. 3.3.: Struktur der Reaktionszentren der drei Molybdopterin-Gruppen.

1. DMSO-Gruppe.

Diese Molybdopterin- Proteine umfassen prokaryotischen Oxotransferasen mit der größten strukturellen Vielfalt innerhalb der Molybdänkofaktorenzyme. Mitglieder der DMSO-Reduktase-Familie enthalten als bekannteste Vertreter die Nitrat reduzierende DMSO-Reduktase, die Format-Dehydrogenase und die Sulfoxid-Reduktase. Diese Enzyme besitzen eine Molybdopterin-Guanosin-Dinukleotid-Form des Molybdopterin-Kofaktors. Die Koordination des Molybdän-Zentrums erfolgt neben zwei Oxo- und zwei Thiolat-Gruppen von einem Cystein des umgebenden Polypeptides. Die Anzahl und Organisation zusätzlicher prosthetischer Gruppen variiert stark innerhalb dieser Familie, sie enthalten neben [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- oder [4Fe-4s]- Cluster des weiteren b-Häm- und Flavin-Faktoren. Eine Unterteilung nach ihren Reaktionsmechanismen gestaltet sich als schwierig, da sie eine Vielzahl katalytischer Funktionen aufweisen. Im Allgemeinen führen sie Sauerstofftransfer-Reaktionen von oder zu einem Substratmolekül durch.

2. Sulfit Oxidase Gruppe

Auch diese Gruppe enthält ausschließlich Oxotransferasen. Bis dato sind wenige eukaryotische Vertreter dieser Gruppe beschrieben worden, bekannte Beispiele stellen neben der Sulfit Oxidase die assimilatorische Nitrat Reduktase in Algen und höheren Pflanzen dar. Die Sulfit Oxidase ist im mitochondrialen Zwischenmembranraum lokalisiert und katalysiert dort die Oxidation von Sulfit zu Sulfat mit Hilfe von Cytochrom c als physiologischem Oxidationsmittel. Diese Reaktion terminiert den oxidativen Abbau der Schwefel enthaltenden Aminosäuren Cystein und Methionin. Das Molybdän wird von 5 Liganden koordiniert: 3 Schwefelliganden, ein Wasser/Hydroxo-Ligand und eine Oxo-Gruppe. Zwei der Schwefelliganden stammen von Dithiolenen, das dritte Schwefelatom dagegen von einem Cystein. Vertreter der Sulfit Oxidase Familie katalysieren Reaktionen nach dem Schema:



Der Elektronentransfer erfolgt über ein Häm-Zentrum zu einem Cytochrom c-Komplex.

3. Molybdopterinhydroxylasen

Zu dieser Gruppe zählt man Proteine, die eine breite Anzahl von Aldehyden und aromatischen Heterozyklen oxidativ, d.h. unter Bruch einer CH-Bindung hydroxylieren. Sie wird nach ihrem zuerst entdeckten Vertreter auch als Xanthin-Oxidase-Familie bezeichnet. Im

Gegensatz zu anderen molybdänhaltigen Flavo- oder Pterinhydroxylasen verwenden diese Enzyme nicht O_2 , sondern Wasser als Sauerstoffdonor. Die allgemeine Form des Reaktionsschemas dieser Enzyme lautet:



Der Mo-Kofaktor (Moco) kann in unterschiedlicher Weise organisiert sein, zu einem in der Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Form (MCD), in der Mononukleotidform des Pterinkofaktors (MPT) oder seltener in der Molybdopterin-Guanin-Dinukleotidform (MGD). Einige näher beschriebene Vertreter dieser umfangreichen Protein-Gruppe sind die Xanthin-Oxidasen (XO, Purin-Metabolismus), Xanthin-Dehydrogenasen (XDH, Purin/Xanthin-Metabolismus) Xanthin-Oxidoreduktasen (XOR, Hydroxierung von Purinen, Pyrimidinen Pterinen und Aldehyden), Kohlenmonoxiddehydrogenasen (CODH, Oxidation von CO zu CO_2), Chinolin- Oxidoreduktasen (COR, Oxidativer Chinolinmetabolismus) und Isochinolin Oxidoreduktasen (IOR, Oxidation von Chinolin u. a. Substraten). Eine übersichtliche Darstellung der Vertreter dieser Enzym-Familie findet man in [125]. Da die hier untersuchte AOR zu der Familie der Molybdopterinhydroxylasen gehört, soll im folgenden das Mo-Reaktionszentrum näher betrachtet werden.

3.2.3 Struktur und Reaktionsschema von Molybdopterinhydroxylasen

Neben dem Molybdänzentrum und zwei $[2Fe-2S]$ -Cluster enthalten Molybdopterinhydroxylasen meist eine FAD-Gruppe. Röntgenstrukturdaten aus der Gruppe der Molybdopterinhydroxylasen waren erstmals von *D. gigas* AOR (dgAOR) erhältlich [118]. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind in den letzten Jahren kristallographisch analysiert worden. Dazu gehört die *D. desulfuricans* AOR (ddAOR) [115], CODH von *O. carboxidovorans* (ocCODH) [39] und *H. pseudoflava* (hpCODH) [59], weiterhin XO/XDH von *B. taurus* (btXO/XDH) ([44] und XDH von *R. capsulatus* (rcXDH) [132] sowie Quinolin 2-Oxidoreductase von *Pseudomonas putida* 86 (ppQOR) [17]. Nach ihrem physiologischem Elektronenakzeptor unterscheidet man zwischen FAD-enthaltenden (z.B. ocCODH, hpCODH btXO/XDH) und FAD-freien Molybdopterinhydroxylasen (dgAOR, dsAOR, IOR).

Die Struktur der als Dimere vorliegenden FAD-enthaltenden Mo-Enzyme kann nach funktionellen Untereinheiten aufgeteilt werden. Jedes Monomer enthält eine Untereinheit, die

das FAD-Molekül bindet. Die beiden anderen Untereinheiten enthalten den Moco sowie die beiden FeS-Zentren und werden weiter in 4 Domänen unterschieden (s. AOR, Kap. 3.3.2). In Abb. 3.4 ist das Molybdän-Zentrum der btXO gezeigt. Spektroskopische Analysen und die Kristallstrukturen von Molybdopterinhydroxylasen zeigen, dass neben zwei Dithiolenen, die von einem Pterinmolekül stammen, 3 weitere Liganden an das Mo gebunden sind. Die aktive Form der Molybdopterinhydroxylasen liegen in der Sulfo-Form vor, d.h. das Mo ist pentakoordiniert mit zwei dithiolen-Schwefel, einer Oxo-Gruppe ($\text{Mo}=\text{O}$), einer OH_x -Gruppe und einer Sulfido-Gruppe ($\text{Mo}=\text{S}$). In der inaktiven Desulfo-Form wird letztere durch eine Oxo-Gruppe ersetzt.

Das Pterin-Pyran-Dithiolen-System erfüllt verschiedene Funktionen. Eine Aufgabe ist die Verankerung des Kofaktors in die Protein-Matrix, die ausschließlich über Wasserstoffbrücken erfolgt (s. AOR, Kap. 3.3.2). Weiterhin vermittelt das Pteringerüst den Elektronenfluss zu und aus dem Mo-Zentrum. Isolierte Pterin-Systeme sind Redox-aktiv und können bis zu 8 Elektronen aufnehmen, um das vollständig reduzierte Tetrahydro-Stadium anzunehmen [64]. Den beiden Dithiolenen des Ringsystems wird weiterhin eine Modulation des Redox-Potential des Mo-Zentrums zugeschrieben [vgl. 66]. Die Dithiolen-Substruktur erfährt dabei eine Konformationsänderung, sie hat im oxidierten Zustand teilweise S-S-Bindungscharakter (ca. 3.0\AA) während in den reduzierten Kristallen diesen Abstand vergrößert ist ($3,5\text{\AA}$) [73, 118].

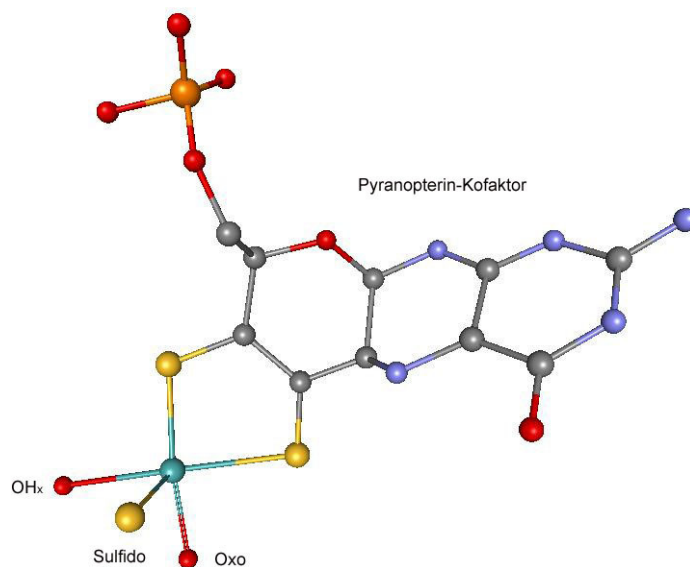


Abb. 3.4: Struktur des Molybdopterin-Kofaktors [nach 1HLR.pdb].

Beim Durchlauf eines Reaktionszyklus wechselt das Mo-Zentrum zwischen den Oxidationsstufen Mo(VI)-Mo(V)-Mo(IV). Am Molybdänzentrum wird das Substrat katalytisch umgesetzt, während am Akzeptor die Gegenreaktion (Reduktion molekularen Sauerstoffs) abläuft. Die Substratumsetzung erfolgt in einem 2-Schritte-1-Elektron-Transfer. Zwei Eisen-Schwefel-Cluster schließen den Elektronenfluss zwischen den beiden Redoxpartnern. Jeder der beiden FeS-Cluster wechselt bei der Reduktion von Fe(III)-Fe(III) zu Fe(III)-Fe(II). Eine detailliertere strukturelle Beschreibung des Reaktionszentrums einer Molybdopterinhydroxylase soll am Beispiel der dgAOR gezeigt werden (Kap. 3.3.2). In diesem Kapitel erfolgt zu dem eine ausführliche Beschreibung der Geometrie der beiden FeS-Cluster sowie der Struktur ihrer Umgebung. Im folgenden soll ein Überblick über bis dato erfolgte ESR- und ENDOR-Spektroskopie an verschiedenen Molybdopterinhydroxylasen gegeben werden.

3.2.4 ESR- und ENDOR- Spektroskopie an Molybdopterinhydroxylasen

Während der Substratumsetzung treten bei den Molybdopterinhydroxylasen unterschiedliche Enzymzustände auf, die sich bei spektroskopischen Untersuchungen überlagern können. Die ESR-/ENDOR-Spektroskopie ist in der Lage, von allen Reaktionszuständen den paramagnetischen Zustand, also Mo(V), FeS⁺ und FADH zu detektieren. Deshalb wurde diese Spektroskopie vielfältig zur Untersuchung von Mitgliedern der Molybdopterinhydroxylasen herangezogen [vgl. 66, 67, 99, 30]. Die XO gehört dabei zur meistuntersuchten Spezies dieser Gruppe. In Abb. 3.5 werden verschiedene ESR-Signale dieses Enzyms dargestellt, die in verwandter Form auch bei den anderen Vertretern dieser Familie auftreten. Zunächst ist das ESR-Signal des FAD aufgezeigt (a). Es durchläuft während des Enzymzyklus den Semichinonzustand und ergibt im ESR-Spektrum ein isotropes Signal bei $g = 2.0035$. Die Molybdän-Signale „very rapid“ und „rapid“ (b, c) sind ebenfalls im Verlauf des Enzymzyklus zu beobachten und wurden nach ihrem zeitlichen Auftreten bzw. nach der Dauer der Signale bezeichnet. Um die Struktur des „very rapid“-Signals aufzudecken, wurden zahlreiche ESR-Experimente mit isotopensubstituierten Reaktionspartnern durchgeführt [98]. Das „very rapid“-Signal zeigt starke Wechselwirkung mit einem Sauerstoffatom und ist assoziiert mit der Produktbindung an das Mo-Zentrum [126]. Austausch-Experimente mit ¹⁷O ergeben dabei starke Hinweise, dass die Mo-OH-Gruppe als Sauerstoff-Donor fungiert [56]. Eine eindeutige Aufklärung des Reaktionsmechanismus im Detail wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert [34, 66, 71].

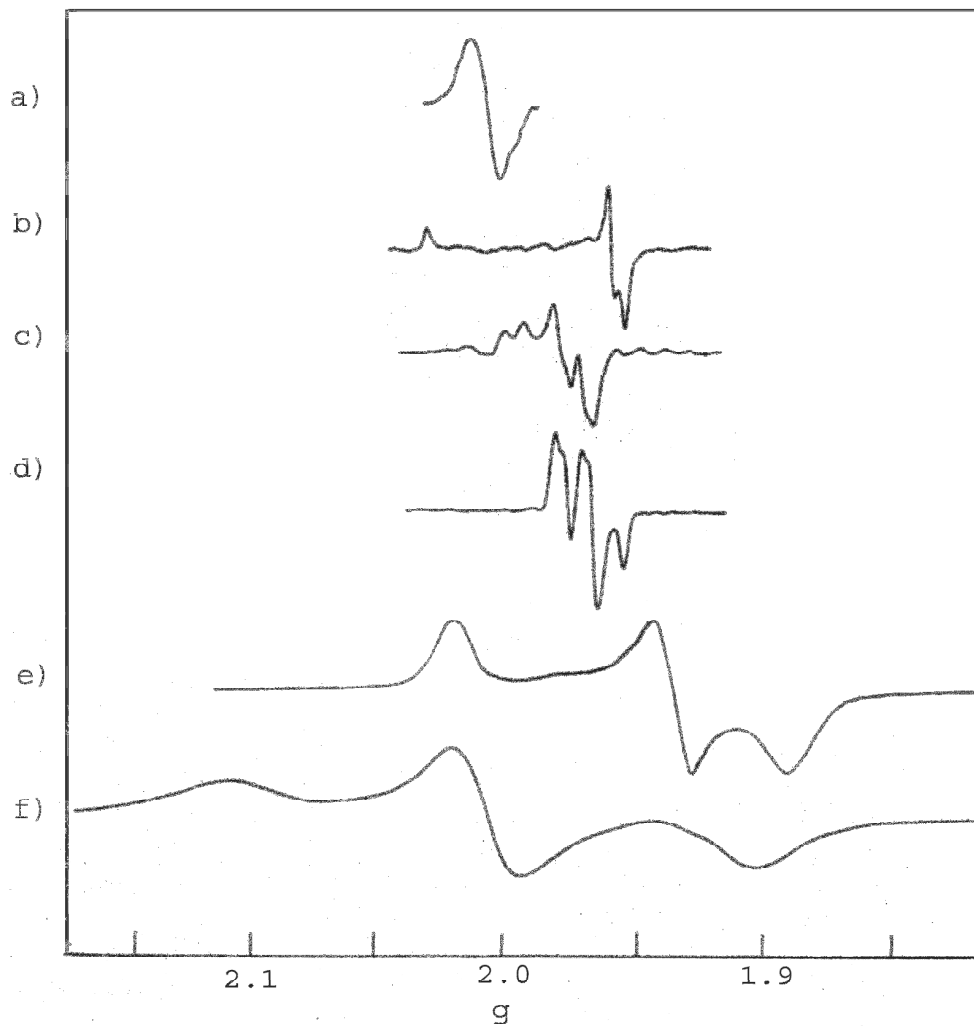


Abb.3.5: ESR-Signale der XO; a) FAD, b) „very-rapid“-Signal, c) „rapid“-Signal, d) „slow“-Signal, e) FeSI, f)FeSII [nach 20]

Bei dem „rapid“-Signal der XO handelt es sich um einen Komplex aus nicht-oxidiertem Substrat und reduziertem Enzym, das Signal tritt nur bei Umsatz mit überschüssiger Substratmenge bzw. bei der Reduktion mit Dithionit auf [57]. Erkennbar wird bei dem Signal eine Protonenaufspaltung mit $A_{av} = 13.3\text{G}$, die von einem austauschbaren Proton stammt und anzeigt, dass im „rapid“-Komplex eine S-H-Gruppe vorliegt [22]. Beim Vergleich verschiedener Molybdopterinhydroxylasen finden sich dabei Typ 1-, Typ 2- oder eine Mischung aus beiden „rapid“-Signalen [23, 101]. Das Typ 2-rapid-Signal wird durch zwei stark gekoppelte, austauschbare Protonen verursacht, Typ 1-rapid-Signale zeigen ein stark und ein schwach gekoppeltes Proton. Bei der „slow“-Form des paramagnetischen Mo-Zustandes (d) liegt ein ESR-Signal vor, das z.B. durch eine Reduktion mit Dithionit hervorgeht (s. Kap. 3.3.4).

3. Enzymatische Grundlagen

Die FeS-Zentren ergeben im reduzierten Zustand zwei rhombische Signale (Abb. 3.5, e, f). Das ESR-Signal I mit der geringeren Anisotropie erscheint unterhalb von Temperaturen von ca. 90K bis ca. 70K. Ein ESR-Signal mit einer höheren Anisotropie tritt bei tieferen Temperaturen (ab ca. 60-40K) in Erscheinung und wird mit Signal 2 bezeichnet. Tab. 3.1 zeigt exemplarisch einige g-Werte der FeS-Zentren von Mitglieder der XO-Gruppe auf. Man erkennt z.T. große Unterschiede der Werte innerhalb einer Signalgruppe, der Unterschied zwischen den Signalgruppen kann dagegen teilweise gering ausgeprägt sein. Größtenteils gehören die Signale I zu dem $g_{av} = 1.96$ -Typ, wie er bei pflanzlichen [2Fe-2S]-Cluster häufig beobachtet wird. Ausnahme bilden die dmXDH und XO (Hasenleber), die deutliche Abweichung zu diesem Typ aufzeigen. Bei Signal II ist der Unterschied der g-Werte innerhalb dieser Gruppe noch ausgeprägter. Während z.B. die g-Werte von dgAOR und ppQOR im Bereich der $g_{av} = 1.96$ -Klasse liegen, zeigen andere Molybdopterinhydroxylasen deutlich höhere Werte. In Abb. 3.6 sind einige charakteristische Tieftemperatur-ESR-Spektren reduzierter Molybdopterin-hydroxylasen aufgezeigt. Dabei wird die Überlagerung der beiden paramagnetischen FeS-Zentren und des Mo(V) kenntlich. Lage und Breite der g-Werte sowie die Zuordnung der Signale zu den verursachenden FeS-Zentren soll bei der dgAOR explizit vorgestellt werden (Kap. 3.3.4).

Tab. 3.1: g-Werte [2F-2S]-Cluster von Enzymen der XO-Familie (g_{max} , g_{int} , g_{min})

Moco-Enzym	Signal I	Signal II
XO (Kuhmilch) [65]	2.022,1.932,1.894,	2.11,1.991,1.902
XDH (Truthanleber) [6]	2.017,1.932,1.906	1.08,1.00,1.92
AOR (Hasenleber) [7]	2.018,1.930,1.918	2.106,2.003,1.915
AOR (<i>D. alskensis</i>) [3]	2.021,1.934,1.916	2.066,1.970,1.900
AOR (<i>D. aminophilus</i>) [128]	2.024,1.938, 1.913	2.060, 1.968,1.882
XDH (<i>D.melanogaster</i>) [77]	2.022,1.933,1.902	2.118,2.005,1.896
CODH (<i>H. pseudoflava</i>) [58]	2.023, 1.947,1.905	2.160,1.974,1.873
QOR (<i>P.putida</i>) [28]	2.035,1.95,1.898	2.072,1.97,1.866
IOR (<i>P.diminuta</i>) [28]	2.01,1.945,1.919	2.084, 1.974,1.90
Aldehyd DH (<i>C.testosteroni</i>) [100]	2.023,1.941,1.904	2.092,1.980,1.895

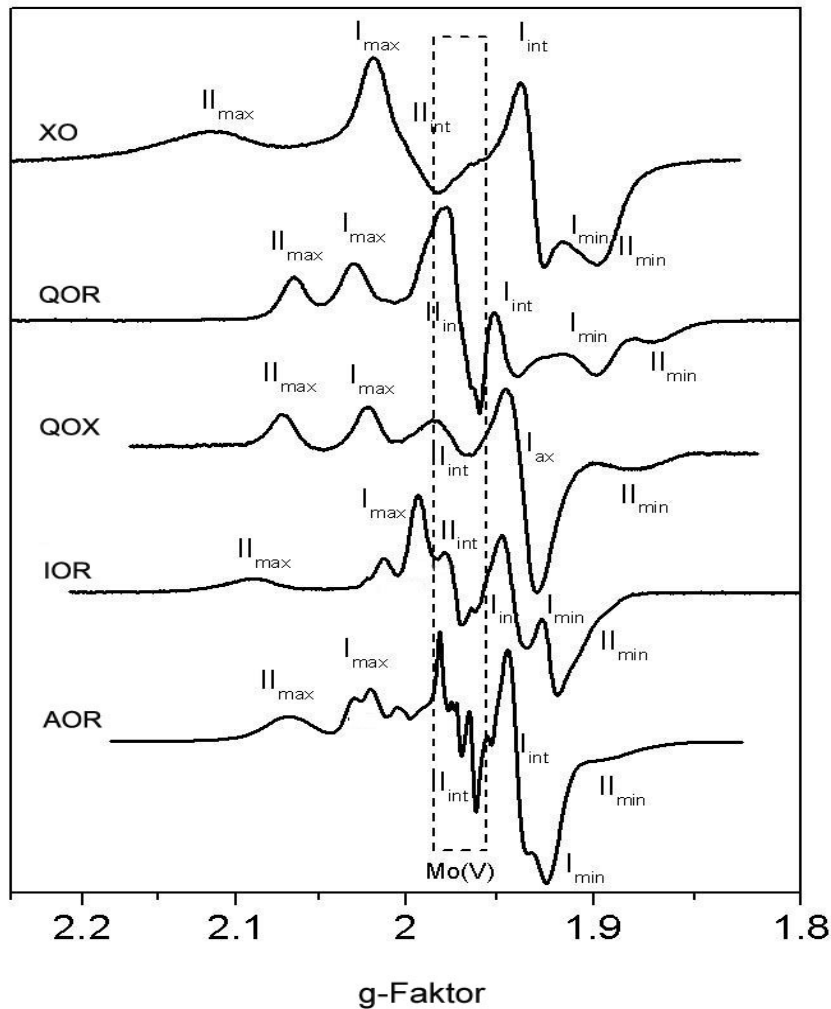


Abb.3.6: ESR-Spektren von Tieftemperatur-Messungen bei verschiedenen Molybdopterinhydroxylasen [nach 86].

Ebenso wie ESR-Daten stehen auch ENDOR-Spektren von Molybdopterinhydroxylasen zur Verfügung, die z.B. an der XO zur Strukturanalyse des Mo-Zentrums durchgeführt wurden. Um die Struktur des „very-rapid“-Signals aufzudecken, konnten verschiedene ENDOR-Experimente mit ^{18}C -isotopensubstituierten Substraten Einblick in die Geometrie der Koordinationssphäre des Mo liefern [70, 72]. Protonen-ENDOR-Untersuchungen an Enzymen aus der Gruppe der Molybdopterinhydroxylasen wurden bisher nur wenige durchgeführt. Dies erfolgte erstmals bei der Xanthin Oxidase, die Interpretation dieser ^1H -ENDOR-Experimente konnte aufgrund fehlender Strukturdaten jedoch nicht abgeschlossen werden [125]. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden weiterhin Messreihen von IOR sowie an den beiden [2Fe-2S] Zentren der Chinaldin-OR [45] durchgeführt, die jedoch mangels fehlender Strukturdaten ebenfalls nur bedingt auswertbar sind.

3.3 Aldehyd Oxidoreduktase

3.3.1 Übersicht

1976 erfolgte erstmals eine Isolierung und Charakterisierung einer AOR (*D. gigas*) und konnte als Molybdän und Eisen-Schwefel enthaltendes Enzym identifiziert werden [108]. Verschiedene spektroskopische und biochemische Methoden bestimmten anschließend Redoxeigenschaften und ESR-Charakteristika der dgAOR [24, 109, 135]. Mössbauer-Daten zeigten eine selektive Reduktion der Fe-Ionen der FeS-Cluster auf [5]. Mittels molekularbiologischer Methoden konnte weiterhin die Gen-Sequenz der AOR bestimmt werden [129]. Ein wesentlicher Beitrag zur Entschlüsselung der Struktur ergab dann die Röntgenkristallographie der AOR bei 2,25Å Auflösung [118]. Aufgrund der Strukturdaten sowie kinetischer Studien konnte im Vergleich mit den Ergebnissen der ESR der Reaktionsmechanismus der AOR beschrieben werden [74, 119]. Zuordnung der FeS-Zentren zu den FeS-Signalen I und II konnte anhand experimenteller ESR-Daten und einer theoretischen Beschreibung der magnetischen Wechselwirkungen gekennzeichnet werden [26]. Eine röntgenkristallographische Untersuchung bei 1,28 Å brachte dann detaillierten Einblick in die Struktur der AOR [116]. Diese Strukturdaten sind Ausgangspunkt für die folgende Betrachtung des Enzyms sowie der durchgeführten ENDOR-Untersuchungen. Eine im Verlauf dieser Arbeit veröffentlichte theoretische Beschreibung der Valenzzuordnung der Fe-Zentren [105] anhand der ESR-Eigenschaften wird bei der Diskussion der ENDOR-Ergebnisse in Kap. 7.2 beschrieben.

3.3.2 Struktur und Reaktionsmechanismus der Aldehyd Oxidoreduktase

Die dgAOR ist ein Homodimer mit 907 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa pro Untereinheit. Dabei handelt es sich um ein Protein globulärer Form mit einem Durchmesser von ca. 75Å. Neben dem Molybdopterincofaktor besitzt die AOR zwei [2Fe-2S]-Cluster, 3Cl⁻ und 2 Mg²⁺-Ionen sowie 2 Isopropanol-Moleküle. Das Protein nimmt eine Anordnung in 4 Domänen ein; in Abb. 3.8 wird eine röntgenkristallographische Darstellung der AOR gezeigt. Domäne 1 enthält den distalen FeS-Cluster, sie wird unter helikaler Faltung von den Aminosäuren (AA) 1-76 aufgebaut und zeigt teilweise große Strukturhomologie zu pflanzlichen Fdx. In der Domäne 2 (AA84-157) befindet sich der proximale FeS-Cluster. Die Domäne 3 und 4 (Mo1, AA196-AA581; Mo2, AA582-AA907) enthalten den MCD-Cofaktor,

3. Enzymatische Grundlagen

diese beiden Domänen bilden einen ca. 15Å tiefen, hydrophoben Kanal, über den das Substrat zum Molybdänzentrum gelangt.

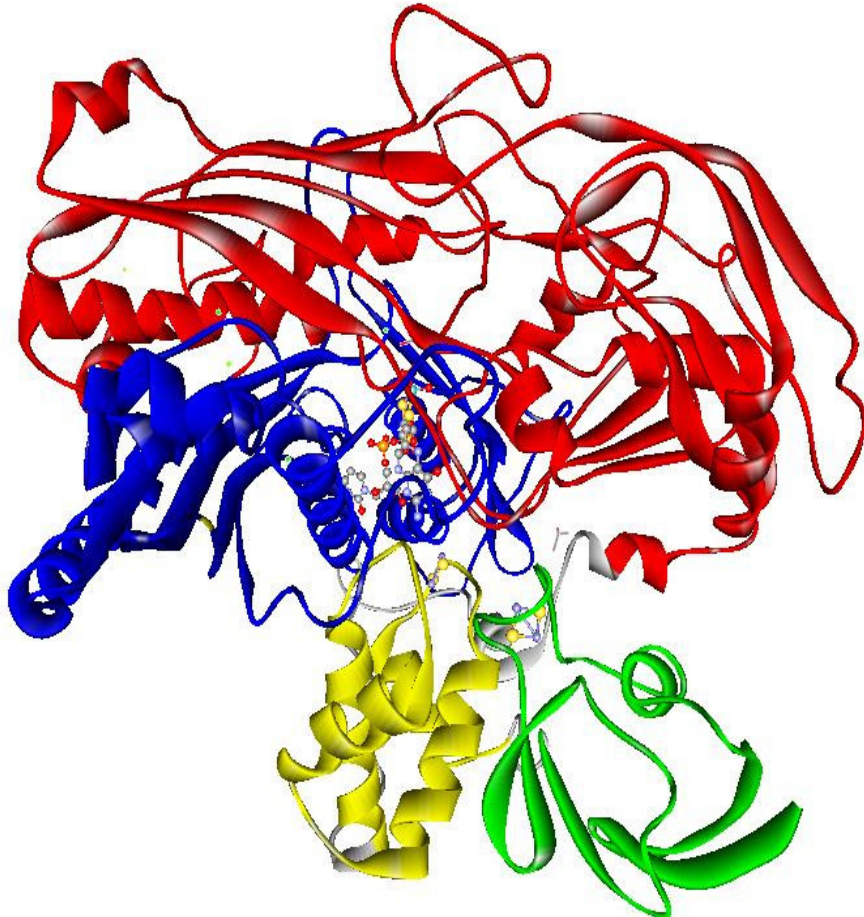


Abb.3.7.: Domäne 1 (grün) enthält den distalen FeS-Cluster, Domäne 2 (gelb) den proximalen Cluster. Domäne 3 (rot) und Domäne 4 (blau) bilden einen hydrophoben Tunnel aus, in den der Mo-Kofaktor hinein ragt [nach 1HLR.pdf].

Das Molybdänzentrum wird über einen Pyranring an einen Pterinring gebunden und von einer 1,2-Dithiolengruppe ligandiert (Abb. 3.4). Der gesamte MCD-Komplex ist ausschließlich über Wasserstoffbrücken mit umgebenden Aminosäuren des Proteins verbunden (Abb. 3.8). In Analogie zur XO liegt die aktive Form der AOR in der Sulfo-Form vor, d.h. das Mo ist pentakoordiniert mit zwei Dithiolen-Schwefel, einer Oxo-Gruppe (Mo=O), einer OH₂-Gruppe und einer Sulfido-Gruppe (Mo=S). Die Koordinationssphäre des Mo(VI) weist eine verzerrte pyramidale Geometrie auf, das Zentralatom liegt etwa 0,5Å aus der quadratischen Ebene

3. Enzymatische Grundlagen

heraus in Richtung der apicalen Position. Ein Glutamatrest (Glu689) liegt nahe des Mo-Zentrums sowie dessen Wasserliganden und zeigt eine funktionelle Beteiligung bei der Substratumsetzung (s. Reaktionsmechanismus, Abb. 3.9). Die Mo=S-Gruppe hat die Imidazolgruppe von His653 als nächsten Nachbarn (ca.3,2Å Abstand), die Mo=O-Gruppe befindet sich auf der vom Solventkanal abgewandten Seite in der Nähe von Arg 553 (ca.3.3Å).

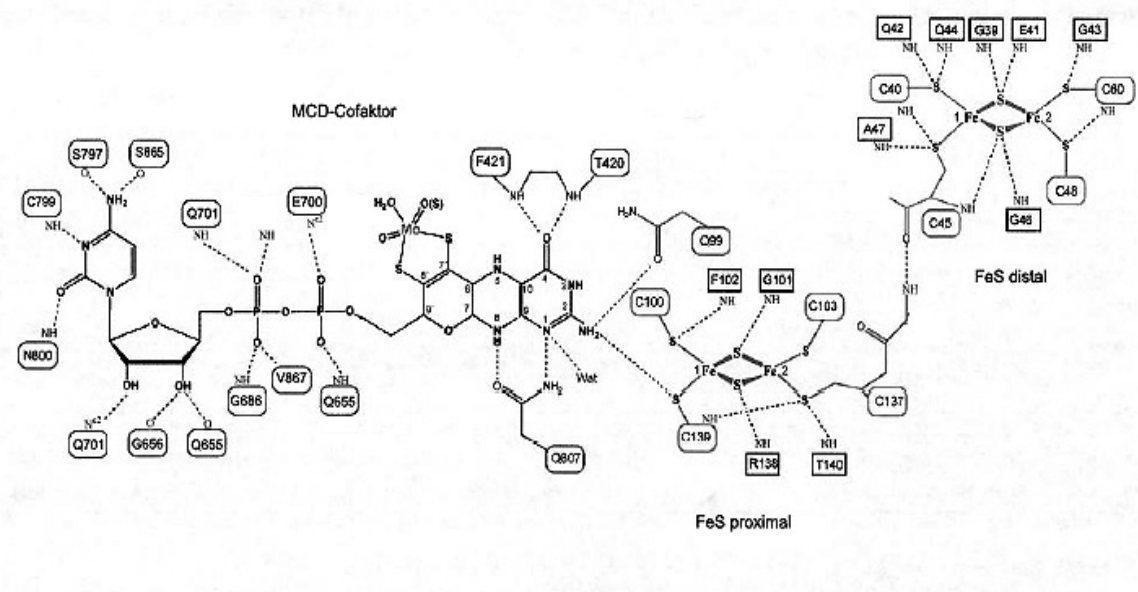


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der 3 Reaktionszentren der AOR. Der Molybdopterincofaktor wird ausschließlich über Wasserstoffbrücken an die beiden Domänen des Proteins gebunden [nach 118].

Die AOR oxidiert Aldehyde zu Carbonsäuren. Dabei wird zunächst ein Michaelis-Komplex aus dem Aldehyd-Substrat und Mo(VI) gebildet. Bei der Bildung eines Enzym-Produkt-Komplexes nimmt das Molybdänzentrum zwei Elektronen vom Substrat auf und wird zu Mo(IV) reduziert. Nach der Produktfreisetzung entsteht ein Intermediat des Mo mit Glu689, wodurch sich wieder ein Wassermolekül an das Molybdän anlagern kann. Der Reaktionszyklus ist somit geschlossen und kann erneut eingeleitet werden (Abb. 3.9).

3. Enzymatische Grundlagen

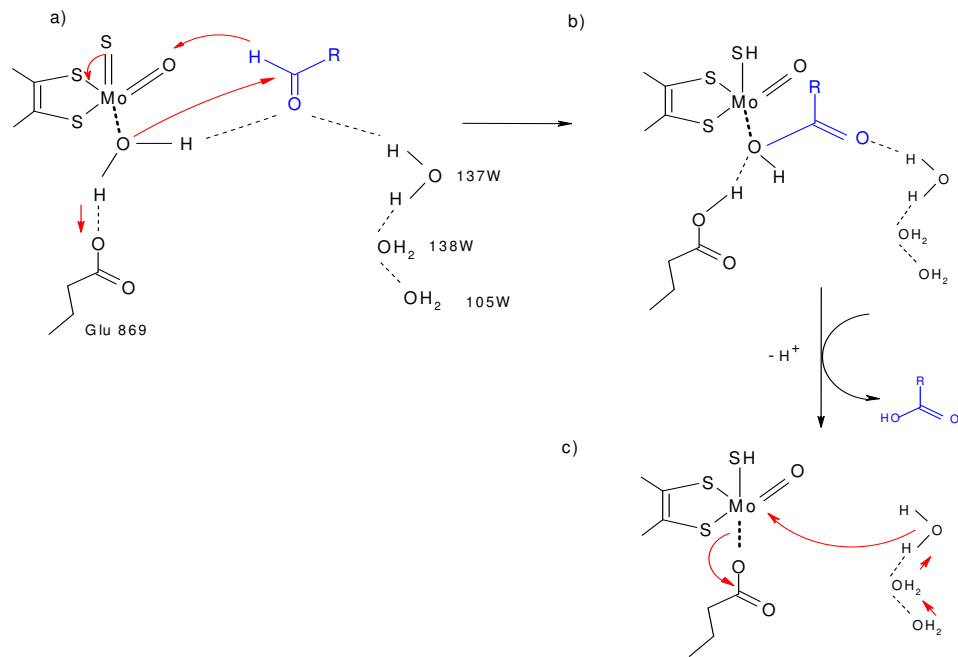


Abb. 3.9: Reaktionsmechanismus der AOR: a) Das an Mo koordinierte Wassermolekül wird über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem benachbarten Glu689 aktiviert, ein O-Atom wird zu dem Carbonyl-C-Atom transferiert. Die nukleophile Reaktion wird durch Wasserstoffbrücken des Carbonylsauerstoffs mit W137 und dem Mo-Wasserliganden, die eine Polarisation der Carbonyldoppelbindung bewirken, erleichtert. b) Das nach dem Hydrid-Transfer auf die Sulfido-Gruppe entstandene Karbonsäure-Produkt verdrängt das am Mo koordinierte Wasser-Molekül. c) Freisetzung des Produkts vom reduzierten Mo-Zentrum, ein im Kanal befindliches Wassermolekül besetzt anschließend wieder die unbesetzte Koordinationsstelle des Molybdän [nach 119].

Anschließend verteilen sich die beiden auf Mo übertragenen Elektronen auf die FeS-Zentren, die so vom oxidierten Zustand $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ zu $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ reduziert werden. Wie Mößbauer-Daten zeigen, wird bei dem Elektronentransfer je Cluster ein Fe-Ion reduziert [5]. Die Redoxpotentiale werden für FeSI (proximales Zentrum) mit -280 mV und für FeSII (distales Zentrum) mit -285 mV bei pH7,6 angegeben [109]. Aktuellere Messungen ergeben für Signal I - 365 mV und Signal II - 330 mV bei pH 7.5 [35]. FeSI befindet sich ca. 15\AA unterhalb der Proteinoberfläche und ist über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem γ -Schwefel von Cys139 und der C2-Aminogruppe des Pteringerüsts mit dem Molybdopterinokofaktor verbunden. Eine Wasserstoffbrückenverbindung des FeSI-Zentrums mit der Pteringruppe deutet an, dass letzterer der Vermittlung des intraenzymatischen Elektronentransfers zu FeSI dient, eine direkte Involvierung des Pterinrings in den Katalysemechanismus konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. FeSII befindet sich unmittelbar unter der Proteinoberfläche und besitzt über Cys60 Solventkontakt. Die beiden Eisen-Schwefel-Zentren haben einen Abstand von ca.

3. Enzymatische Grundlagen

12Å (Fe1-Fe1 = 13.1Å) und sind über insgesamt sieben kovalente Aminosäurebindungen sowie einer Wasserstoffbrücke miteinander verknüpft. In Abb. 3.10 werden die FeS-Cluster mit den Cysteinliganden in ihrer relativen Lage zueinander dargestellt. Der Abstand der Fe-Atome zu den Sulfiden beträgt jeweils 2.2Å, die Abstände von Fe1 zu Fe2 2.7Å. Die Ebenen der [2Fe-2S]-Cluster bilden eine in etwa eine orthogonale Anordnung zu den Ebenen der beteiligten Cystein-S^γ-Atome. Bei der AOR liegen zwei unterschiedliche Cystein-Motive vor, die die Koordination von FeS-Cluster ermöglichen: ein C-X₄-C-X₂-C-X_n-C-Motiv, identisch mit denen von pflanzlichen Fdx und ein C-X₂-C-X_n-C-X-C-Motif, das unter Eisen-Schwefel-Proteinen untypisch ist. Cluster I wird durch den letzteren Typ koordiniert, während Cluster II durch das Pflanzentyp-Motif in das Aminosäuregerüst eingebunden ist. Strukturelle Unterschiede finden sich auch teilweise bei den Distanzen und Torsionswinkel der Cysteine und der β-Protonen dieser Liganden sowie bei der Verteilung polarer Gruppen in der Umgebung der Zentren (Kap. 7.2.1). FeSI ist an sieben N-H···S- sowie einer N-H···O-Wasserstoffbrücken beteiligt. Bei FeSII ist ein ähnliches N-H···S-Wasserstoffbrücken-Muster wie bei anderen Fdx aufzufinden [31], das distale Zentrum der AOR ist von neun N-H···S und einer N-H···O umgeben. Die unsymmetrische Anordnung der N-H...S_y-Bindungen verursacht dabei möglicherweise die geringen Unterschiede der Fe-S^γ- Bindungslängen (2.27-2.37Å).

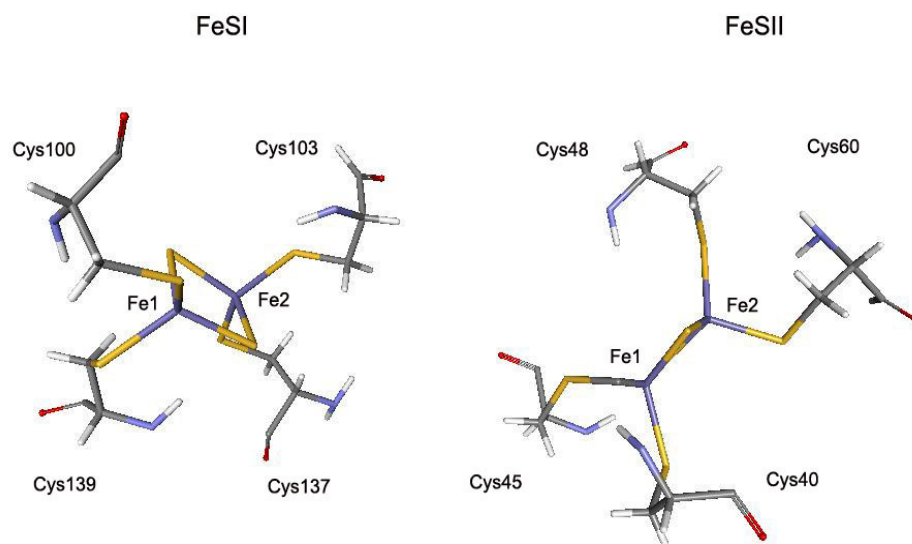


Abb. 3.10: FeSI und FeSII mit koordinierenden Cysteinliganden [nach 1HRL.pdb]

3.3.4 ESR- Spektroskopische Untersuchungen der AOR

Der Mo(V)-Zustand stellt ein $S = 1/2$ -System dar; ESR-Signale des paramagnetischen Zustandes des Molybdän-Zentrums lassen sich bei der AOR ab 120K erkennen. Unbehandelte, d.h. unreduzierte AOR zeigt zunächst ein schwaches ESR-Signal bei $g = 1.97$, das als „resting“-Signal bezeichnet wird. Es wird durch eine stabile Mo(V)-Form verursacht, deren Linienform sich auch nach D_2O -Austausch nicht ändert. Durch präparative Einflüsse liegen ca. 1-7% des Molybdäns in diesem Zustand vor [135]. Bei kurzer Inkubationzeit mit geringer Menge eines Reduktionsmittels oder Substratumsetzung wie z.B. Salicylaldehyd oder Acetaldehyd tritt eine Signalform auf, die als „rapid“-Signal bezeichnet wird. Erkennbar ist eine Protonenaufspaltung, die von einem austauschbaren Proton stammt und zeigt, dass im rapid-Komplex eine Sulfhydroxyl-Gruppe vorliegt. Das „rapid“-Signal der dgAOR gehört dabei zur sog. Typ 2-Gattung [109, 135]. Nach der Behandlung des Proteins mit Dithionitlösung im Überschuss und einer Inkubation von 15-30 min erscheint ein Signal (Abb. 3.11), das analog zur XO als „slow“-Signal bezeichnet wird [21]. Das „slow“-Signal bei $g = 1,97$ ist leicht anisotrop und zeigt eine von einer Hydroxogruppe stammende Protonenkopplung, welche bei Umsetzung im deuterierten Medium verschwindet [135].

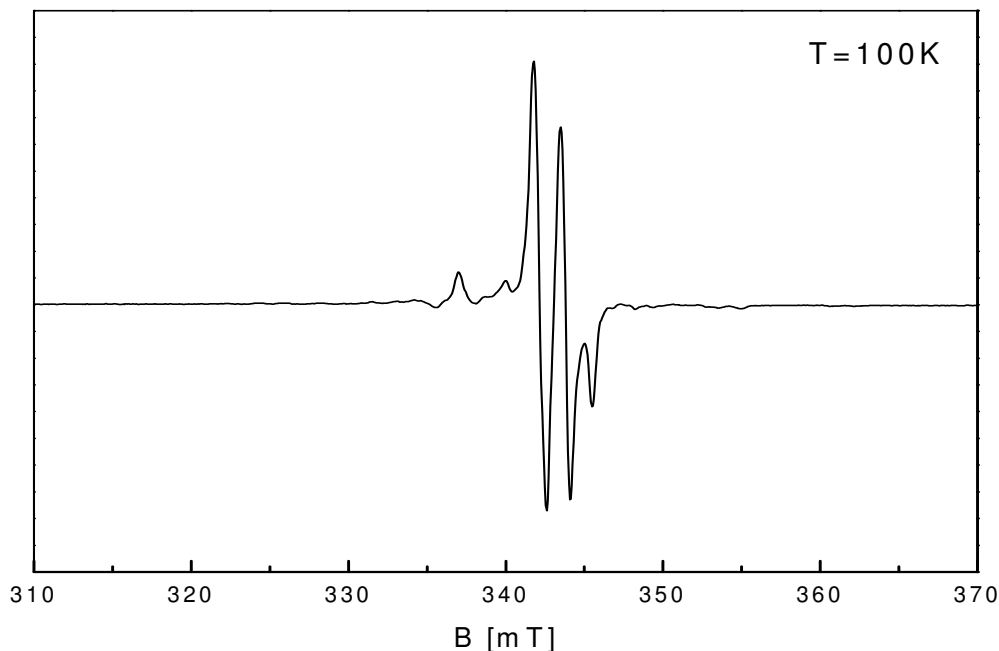


Abb. 3.11: ESR-Spektrum der AOR bei 100K (Aufnahmeparameter s. Kap. 4.2.2). Erkennbar ist das Mo-slow-Signal.

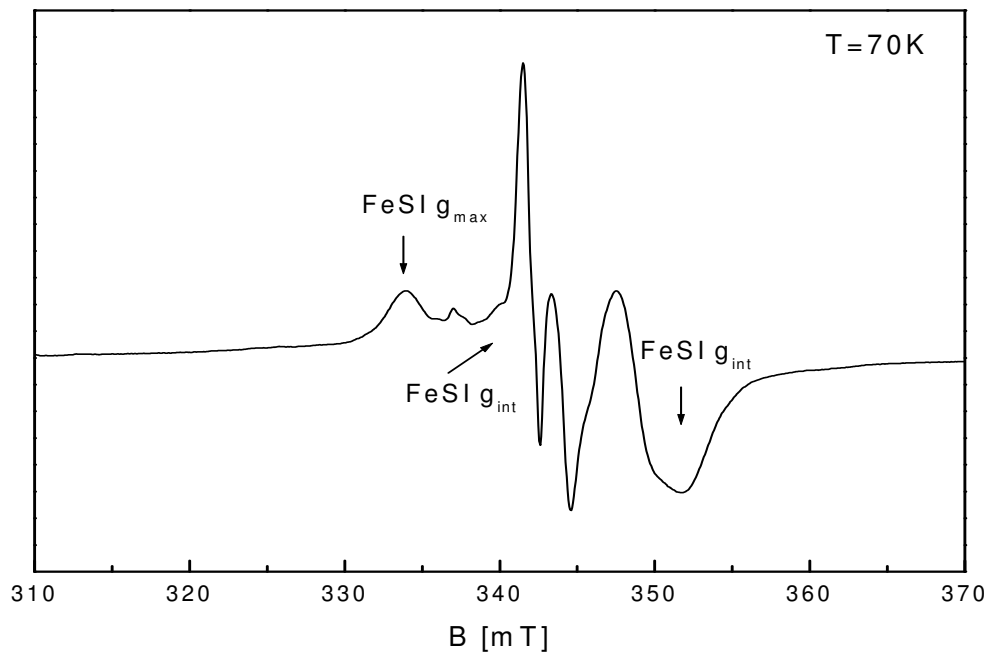


Abb. 3.12: ESR-Spektrum der AOR bei 70K (Aufnahmeparameter s. Kap. 4.2.2). Die Pfeile markieren die g-Eigenwerte des rhombischen FeSI -Signals.

Bei Erniedrigung der Temperatur lässt sich neben dem Mo-slow-Signal ab ca. 77K ein weiteres Signal beobachten, das als FeSI bezeichnet wird (Abb. 3.12). Charakterisiert ist Signal I durch ein Spektrum rhombischen Typs mit den g-Hauptwerten $g_{\min}=1.93$; $g_{\text{int}}=1.94$ und $g_{\max}=2.021$. Ab ca. 45K erscheint schließlich zusätzlich das FeS-Signal II (Abb.3.13). Dieses zeigt Eigenschaften wie stark anisotrope g-Werte und deutlich verbreiteter Linien aufgrund sehr kurzer Relaxationszeiten. Letzteres FeS-Signal weist g-Hauptwerte von $g_{\max}=2.05$; $g_{\text{int}}=1.94$ und $g_{\min}=1.89$ auf. Die Zuordnung der Signale I und II zu den distalen bzw. proximalen FeS-Cluster wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Anhand des unterschiedlichen Temperaturverhaltens der drei Spinzentren der AOR konnte jedoch eine Identifizierung der ESR-Signale bezüglich der beiden Cluster erfolgen [26]. Bei Temperaturen zwischen 20K und 30K kann zunächst eine Aufspaltung des Mo(V) ESR-Signals beobachtet werden, bei einer Erhöhung der Temperatur über 30K verschwindet diese Aufspaltung wieder. Aufgrund der unterschiedlichen Relaxationszeiten T_1 und T_2 der beiden Cluster sowie der Röntgenstruktur konnte die Aufspaltung des Mo(V)-slow-Signals durch eine dipolare Wechselwirkung mit FeSI simuliert werden und ordnet das FeSI-Signal dem proximalen Cluster zu. Der distale Cluster mit dem Pflanzentyp-Cystein-Motiv erhält somit die Zuordnung zum FeSII-Signal [26].

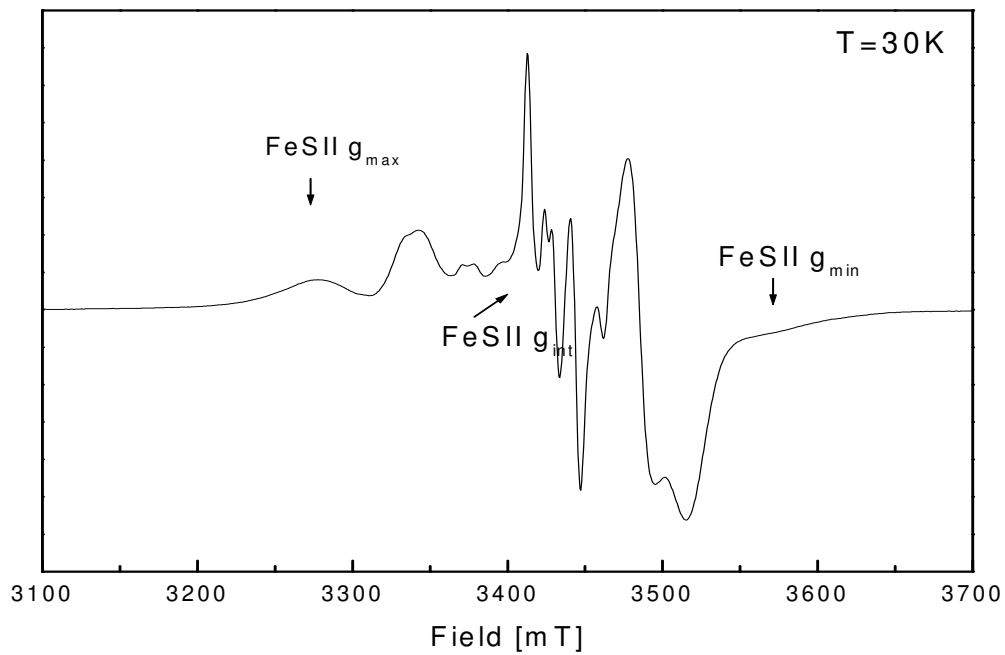


Abb.3.13: ESR-Spektrum der AOR bei 30K (Aufnahmeparameter s. Kap. 4.2.2). Die Pfeile markieren die g -Eigenwerte des rhombischen FeSII-Signals. Bei FeSII g_{int} erkennt man eine Aufspaltung des Mo (V)-Signals.

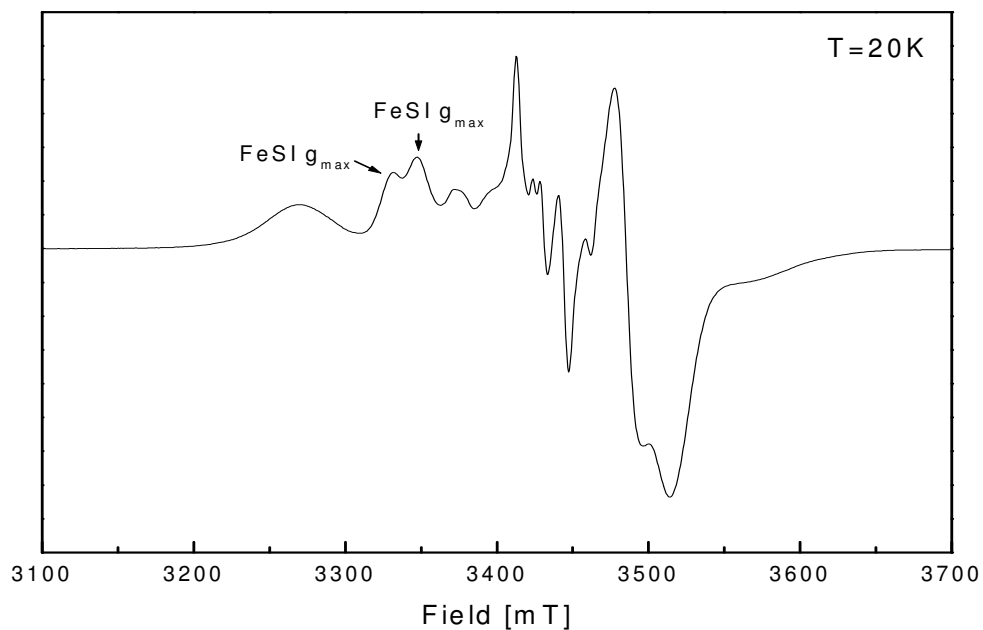


Abb.3.14: ESR-Spektrum der AOR bei 20K (Aufnahmeparameter s. Kap. 4.2.2). Die Pfeile kennzeichnen die Aufspaltung von $g_{max}/FeSI$ bei Temperaturen $< 20K$.

Bei Tieftemperatur-Messungen wird ab $T < 20\text{K}$ eine zweite Aufspaltung von $\approx 18.5\text{ G}$ bei $g_{\text{max}}/\text{FeSI}$ sichtbar (Abb. 3.14). Diese Aufspaltung findet gleichzeitig mit einer Zunahme des FeSII-Anteils statt und kann anhand dieser Merkmale einer FeSI-FeSII-Kopplung zugesprochen werden [26]. Die magnetische Wechselwirkung der beiden Eisen-Schwefel-Cluster kann unter der Verwendung eines Punkt-Dipol-Modells beschrieben werden, dabei wird jeder Cluster auf ein punktförmiges Spinzentrum reduziert, das durch die Spin-Operatoren \mathbf{S}_I für FeSI und \mathbf{S}_{II} für FeSII mit den Werten $S_I = S_{II} = 1/2$ charakterisiert werden. Der Hamiltonian, der das magnetische Verhalten zwischen den beiden wechselwirkenden Spinsystemen beschreibt, lautet [50, 52]:

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_{\text{FeSI}} + \mathbf{H}_{\text{FeSII}} + \mathbf{H}_{I,II} \quad (3.5)$$

\mathbf{H}_{FeSI} und $\mathbf{H}_{\text{FeSII}}$ beschreiben die Spin- Hamiltonians der einzelnen FeS-Cluster mit:

$$\mathbf{H}_{\text{FeSI}} = \beta_e \mathbf{Bg}(\text{FeSI})\mathbf{S}_I, \quad \mathbf{H}_{\text{FeSII}} = \beta_e \mathbf{Bg}(\text{FeSII})\mathbf{S}_{II} \quad (3.6)$$

wobei $\mathbf{g}(\text{FeSI})$ bzw. $\mathbf{g}(\text{FeSII})$ die \mathbf{g} -Tensoren der beiden Eisen-Schwefel-Cluster darstellen. Der Operator $\mathbf{H}_{I,II}$ beschreibt die Wechselwirkung der beiden Dipole mit [12, 52]:

$$\mathbf{H}_{I,II} = \mathbf{S}_I \mathbf{J}_{I,II} \mathbf{S}_{II} = J \mathbf{S}_I \mathbf{S}_{II} + \mathbf{d} \mathbf{S}_I \times \mathbf{S}_{II} + \mathbf{S}_I \mathbf{D}_{I,II} \mathbf{S}_{II} \quad (3.7)$$

wobei $\mathbf{J}_{I,II}$ der elektronische Wechselwirkungstensor ist, der weiter in die isotrope Austauschkopplungskonstante J , den unsymmetrischen Austauschensor \mathbf{d} und einen anisotropen Dipol-Dipol-Tensor $\mathbf{D}_{I,II}$ unterteilt ist.

Die in Abb. 3.14 dargestellte Aufspaltung von $g_{\text{max}}(\text{FeSI})$ lässt sich mit Hilfe der J_{zz} Elemente der $\mathbf{J}_{I,II}$ -Matrix beschreiben. Unter der Annahme einer parallelen Ausrichtung von $\mathbf{g}(\text{FeSI})$ und $\mathbf{g}(\text{FeSII})$ und einer dipolaren Wechselwirkung zwischen den Cluster ist J_{zz} bei dem Punkt-Dipol-Modell abhängig vom Abstand R :

$$J_{zz} = \frac{\beta_e^2 \mu_0}{2\pi} \frac{1}{R^3} g_z(\text{FeSI}) g_z(\text{FeSII}) (3 \cos^2 \text{CHI}_R - 1) \quad (3.8)$$

Die Winkel CHI_R sowie RHO_R beschreiben die Orientierung der \mathbf{g} -Tensoren bezüglich des Verbindungsvektor \mathbf{R} (Abb. 3.15)

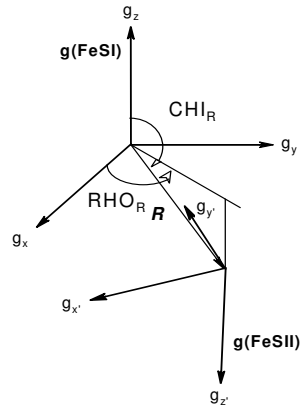


Abb. 3.15: Beschreibung der Orientierung $\mathbf{g}(\text{FeSI})$ und $\mathbf{g}(\text{FeSII})$ bezüglich \mathbf{R} anhand der Euler Winkel CHI_R und RHO_R , mit (\mathbf{gFeSI} : x,y,z ; \mathbf{gFeSII} : x',y',z') [nach 85].

Die Simulation der Aufspaltung ist dabei abhängig von der relativen Orientierung von $\mathbf{g}(\text{FeSI})$ zu $\mathbf{g}(\text{FeSII})$ bzw. der Orientierung der beiden g -Tensoren bezüglich des Verbindungsvektors \mathbf{R} . Mit Hilfe dieses Simulations-Modells lässt sich dadurch die relative Lage der g -Tensoren zueinander bestimmen. Bei der ESR-Simulation wurden verschiedene g_{max} , g_{int} und g_{min} -Orientierungen der g -Tensoren getestet. Eine Simulation der Aufspaltung von $g_{\text{max}}/(\text{FeSI})$ lässt sich ausschließlich unter der Bedingung, dass $g_{\text{max}}/(\text{FeSI})$ annähernd kollinear zu $g_{\text{int}}/(\text{FeSII})$ ausgerichtet ist, erreichen. Abb. 3.16 und Abb. 3.17 zeigen die Ausrichtung der g -Tensoren, die bei der Simulation ermittelt wurden, sowie die dazugehörigen Einzelsimulationen und die Gesamtsimulation der FeS-Signale.

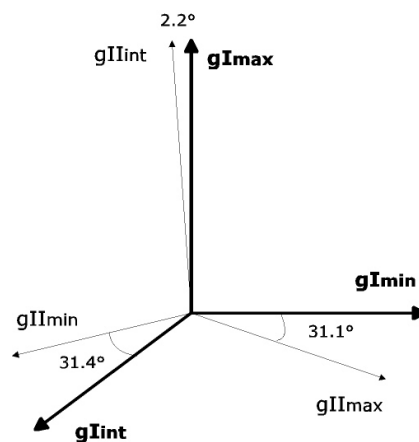


Abb. 3.16: Relative Orientierung von $\mathbf{g}(\text{FeSI})$ und $\mathbf{g}(\text{FeSII})$ bei der ESR-Simulation der $g_{\text{max}}/(\text{FeSI})$ -Aufspaltung [nach 85].

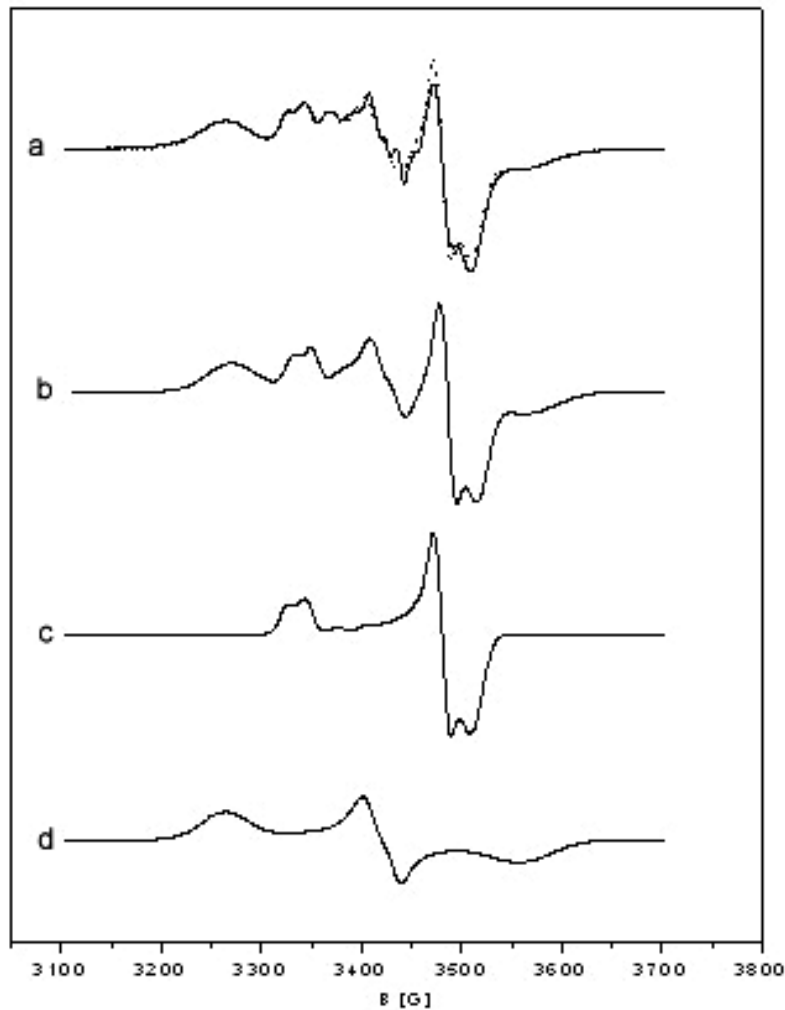


Abb.3.17: a) ESR-Spektrum der AOR (durchgezogene Linie), simuliertes Spektrum (gepunktete Linie); (b) Simuliertes Spektrum als Summe von c) und d); c) simuliertes Einzelspektrum FeSI; d) simuliertes Einzelspektrum FeSII; Simulationsparameter: $\text{CHI}_R = 147^\circ$, $\text{RHO}_R = 47.3^\circ$, $R = 13.5 \text{ \AA}$, $J = -1.8 \text{ G}$ [nach 85].

Neben der AOR konnten auf diese Weise von IOR und XO die ESR-Eigenschaften der magnetisch wechselwirkenden FeS-Cluster beschrieben werden [85]. Dabei kann die Orientierung der einzelnen g -Tensoren innerhalb der FeS-Molekülstruktur jedoch nicht ermittelt werden und bleibt somit ungeklärt. Die parallel zu dieser Arbeit entwickelten ESR-Simulation liefert jedoch wichtige Vorinformationen für die Interpretation der ENDOR-Experimente und kann ergänzend durch diese überprüft werden. Dazu soll die experimentelle Vorgehensweise und die Auswertung der Protonen-ENDOR-Spektroskopie vorgestellt werden (Kap.6). Zunächst erfolgt in Kap. 5 eine Zusammenfassung, die das Ziel an der Untersuchung der beiden FeS-Cluster beschreibt.

4. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen CW- und Puls-ENDOR-Techniken eingesetzt werden, um die Ursachen für die stark unterschiedlichen paramagnetischen Eigenschaften der beiden reduzierten [2Fe-2S]-Zentren der AOR (Signal I und II) zu charakterisieren. Die Schwerpunkte dieser Arbeit lassen sich folgendermaßen gliedern:

Spektrenaufnahme und Simulationstechnik: In der näheren Umgebung der beiden 2Fe-2S-Cluster befinden sich mehrere Protonen, die in Wechselwirkung mit den Spinzentren treten können (Hyperfine Wechselwirkung, vgl. Kap. 2.1.2). Diese sind jedoch durch die Linienbreite in der ESR-Spektroskopie nicht aufgelöst. Aus diesem Grund müssen hochauflösende CW-ENDOR-Messungen herangezogen werden, um diese kleinen Wechselwirkungen darzustellen (vgl. Kap. 2.2). Zunächst ist ein ENDOR-Experiment aufwendiger als ein ESR-Experiment, erstere konnten jedoch in den letzten Jahren durch spezielle ENDOR-Resonatoren und RF-Verstärker standardisiert werden (vgl. Kap. 5.2.1). Dabei müssen die experimentellen Parameter jeder zu untersuchenden Probe soweit angepasst werden, bis eine klare Darstellung der Hyperfeinwechselwirkungen gelingt. Um dies zu erreichen, muss vorab die Reduktion der Enzymprobe so erfolgen, dass eine möglichst signalstarke Probe vorliegt. Anschließend ermittelt man durch Testreihen das Temperaturoptimum, bei dem die ENDOR-Messungen durchgeführt werden. Parallel dazu werden die Geräteparameter ermittelt, die eine deutliche Darstellung der ENDOR-Signale gewährleisten (vgl. Kap. 5.2.3). Die eigentliche Problematik bei der spektroskopischen Untersuchung der AOR beruht nun auf der Tatsache, dass innerhalb des Enzyms drei Reaktionszentren vorliegen, die bei der Präparation gleichzeitig den paramagnetischen Zustand annehmen. Daher liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit zunächst in der Messung hochaufgelöster ENDOR-Spektren, die signifikante Informationen für die einzelnen FeS-Cluster liefern. Wichtige Ansatzpunkte liegen dabei hauptsächlich in der unterschiedlichen g -Anisotropie und dem unterschiedlichen Relaxationsverhalten der beiden FeS-Cluster (vgl. Kap. 3.3.3). Aufgrund der stärkeren g -Anisotropie von FeSII zeigen die ENDOR-Spektren bei Messungen an diesen g -Werten nur Anteile von FeSII. Inwieweit sich dann die überlagernden Bereiche von FeSI und FeSII trennen lassen, ist experimentell zu ermitteln. Zur Klärung dieser Fragestellung soll neben der CW- die Puls-ENDOR-Spektroskopie herangezogen werden. Durch geeignete Pulssequenzen soll eine Trennung der beiden FeS-Signalanteile erreicht werden. Da die wichtigsten Informationen für eine anschließende Simulation der ENDOR-Spektren v.a. im RF-Außenbereich zu finden sind, soll hauptsächlich die Davies-Sequenz zur Klärung dieser

Fragestellung herangezogen werden (vgl. Kap. 2.3). Für die CW- und Puls-Experimente stehen im Arbeitskreis verschiedene CW-ESR/ENDOR-Spektrometer sowie kommerzielle CW/Puls-Spektrometer zur Verfügung. Bevor die eigentliche Analyse der elektronischen Merkmale der FeS-Cluster beginnen kann, soll also mit Hilfe verschiedener magnetresonanzspektroskopischer Techniken, Geräte- und Messparameter sowie Präparationstechniken wie z.B. Isotopensubstitutionen (H/D-Austauschexperimente) eine klare Zuordnung der ENDOR-Signale zu den entsprechenden Eisen-Schwefel-Zentren erreicht werden.

Für die spektroskopischen Untersuchungen an der AOR steht keine kristallinen, sondern eine sog. „Pulverprobe“ zur Verfügung. Für solche ungeordneten Systeme müssen die Daten, die mit Hilfe der orientierungselektiven CW- und Puls-ENDOR gewonnen werden (vgl. Kap 2.2.2) durch Spektren-Simulationen analysiert werden. Ein PC-Programm (Prometheus) wurden von Schmidt entwickelt [121], welches sich auf einen Algorithmus nach Hurst et al bezieht [78]. Dieses Programm benötigt als Eingangsparameter die Strukturkoordinaten der Spinzentren und ihrer Umgebung, dadurch verringert sich jedoch in großem Ausmaß die Anzahl der Variablen bei der Spektren-Simulation. Da für die AOR seit 1995 kristallographische Daten zur Verfügung stehen [118], wurde bei der vorliegenden Arbeit hauptsächlich diese Simulationstechnik nach Hurst et al. herangezogen (vgl. Kap. 5.3.1). Die vorhandene Software wurde aber für mehrere, gleichzeitig auftretende Spinzentren bisher nicht eingesetzt und soll innerhalb der Arbeitsgruppe gegebenenfalls den spezifischen Problemen und dem Umfang einer parallelen Simulation mehrerer Spinzentren angepasst werden (vgl. Kap. 5.3.2).

Elektronische und strukturelle Eigenschaften der FeS-Zentren der AOR: Daten von systematischen, orientierungselektiven Protonen-ENDOR-Untersuchungen an reduzierten 2Fe-2S-Zentren von Molybdopterinhydroxylasen liegen bislang nur in geringer Anzahl vor. Von Finsterbusch wurde dies für die beiden FeS-Zentren der Isochinolin Oxidoreduktase und der Chinaldin Oxidoreduktase durchgeführt [45]. Aufgrund der Problematik, dass für diese Enzyme keine röntgenkristallographischen Strukturdaten vorliegen, konnte jedoch keine eindeutige Simulation der ENDOR-Spektren erreicht werden. Eine Interpretation orientierungselektiver ENDOR-Experimente gelang im Falle von 2Fe-2S-Zentren erstmals bei einem Ferredoxin von *A.platensis* (apFdx) [31]. Dieses Enzym besitzt ein einzelnes 2Fe-2S-Zentrum, ein Umstand, der die Analyse der ENDOR-Spektren gegenüber den überlagerten FeS-Signalen der Molybdopterinhydroxylasen wesentlich erleichtert. Ausgehend von Röntgenstrukturdaten konnte so durch Computersimulationen der

4.Ziel der Arbeit

ENDOR-Spektren ein Modell für 2Fe-2S-Zentren vorgestellt werden, welches die Spindichtevertellung, die Lage des g-Tensors relativ zum FeS-Zentrum sowie die isotropen Kopplungsanteile der Cystein- β -Protonen beschreibt. Dieses apFdx-Modell stellt zunächst den Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen dar. Folgende elektronischen Eigenschaften der beiden reduzierten FeS-Zentren der AOR stehen im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit:

Spindichte: Das Ziel der ^1H -ENDOR-Untersuchung an den FeS-Clustern der AOR liegt zunächst in der Bestimmung der Spindichtevertellung und somit bei der Valenzzuordnung der Fe-Ionen. Mößbauer-Daten zeigen auf, dass bei der AOR im Verlauf des Elektronentransfers bestimmte Fe-Ionen selektiv reduziert werden, lassen aber eine Zuordnung der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ - Zustände zu den einzelnen Fe-Ionen offen [5]. Diese Fragestellung kann hingegen mit Hilfe der ENDOR-Spektroskopie experimentell untersucht werden. Nachdem signifikante Hyperfeinwechselwirkungen spektroskopisch dargestellt werden, ermittelt man bei der Simulation durch Generierung der Signal-Linienverläufe die magnetischen Parameter (vgl. Kap .5.3). Dazu gibt man den beiden Fe-Ionen Spindichte-Werte vor, die sich an das Spinkopplungs-Model orientieren [51]. Bei diesem Modell erhält das reduzierte Fe-Ion einen Spindichte-Betrag von maximal 1.33 mit negativem Vorzeichen, das im oxidierten Zustand bleibende Fe-Ion erhält gleichzeitig einen positiven Spindichte-Wert, beide Spindichten ergeben in der Addition einen Wert von etwa 1.0. Durch die Bestimmung der Spindichte-Vertellung kann man auf diese Weise ermitteln, welches Fe-Ion den Fe^{2+} -Zustand annimmt und welches Fe-Ion im Fe^{3+} -Zustand verbleibt. Diese Valenzzuordnung konnte bei der AOR wegen der relative Größe des Enzyms mittels NMR-Techniken nicht untersucht werden. Im Falle des apFdx erfolgte dies an früherer Stelle [41], so dass diese Vorinformation bei der ENDOR-Spektren-Simulation genutzt werden konnte. Bei der AOR stellt diese Zuordnung dagegen eine offene Variable dar. Inwieweit dabei die Spindichte-Werte der apFdx gefunden werden (Fe1(II): -0.85/Fe2(III): +1.9), stellt eine weiterer Größe dar, den es bei der ENDOR-Simulation der AOR zu ermitteln gilt.

g-Tensor: Der g-Tensor dient der Beschreibung der Symmetrie eines Spinsystems und wird neben den g-Eigenwerten, die bei ungeordneten Proben experimentell durch die ESR erhältlich sind, durch seine Lage bezüglich des Spinzentrums charakterisiert (vgl. Kap. 2.1.2). Dieser Parameter wird bei der Spektren-Simulation parallel zur Spindichte-Vertellung ermittelt. Dabei ist die g-Orientierung die größte zu bestimmende Variable. Stellt man für das orthogonale Drei-Achsensystem durch Drehung um die einzelnen Achsen verschiedene

Raumlagen in nur 10° -Schritten ein, sind immer noch 46656 Raumlagen möglich, die man testweise einstellen kann, um einen einzelnen Linienverlauf zu analysieren (vgl. Kap. 5.3.2.1). Um die Vielzahl der Lösungsmöglichkeiten zu reduzieren, orientiert man sich bei der Simulation v.a. an g-Tensor-Lagen, die sich an der Geometrie des 2Fe-2S-Clusters anlehnt. Nach der Ligandfeld-Theorie wird die Achse mit dem größten Eigenwert (g_{\max}) dabei dem Fe-Fe-Verbindungsvektors zugesprochen [15]. Zu Beginn der Arbeit lagen für die g-Tensor-Orientierung bei 2Fe-2S-Zentren nur Literaturdaten für apFdx vor [31]. Bei dieser Untersuchung zeigte sich jedoch, dass die theoretisch erwartete Raumlage des g-Tensors experimentell nicht bestätigt werden konnte. Vielmehr ergab die Auswertung der ENDOR-Spektren, dass der g-Tensor verkippt zur Cluster-Ebene verläuft und sich in etwa an der tetraedrischen Ligandierung der koordinierenden Cysteine anlehnt. Inwieweit sich eine eindeutige Aussage über die g-Orientierungen bei den beiden 2Fe-2S-Zentren der AOR treffen lässt, stellt ein weiterer Schwerpunkt bei der vorliegenden Untersuchung dar.

Hyperfeinwechselwirkungen

Die Hyperfeinwechselwirkungen der Protonen sind mit der Lage des g-Tensors, der Spindichte und den Protonenkoordinaten verknüpft. Der Verlauf der Hyperfein-Kopplungen über den gesamten g-Wert-Bereich der FeS-Cluster wird durch die ENDOR-Spektroskopie ermittelt und bei der Spektren-Simulation mit Hilfe der Strukturkoordinaten zur Berechnung der elektronischen Parameter verwendet (vgl. Kap.2.2.2 und 5.3). Dazu muss zunächst eine Zuordnung der Signalverläufe zu den entsprechenden Protonen erfolgen. Bei dieser Zuordnung orientiert man sich an den Aufspaltungswerten der Hyperfein-Kopplungen, da große Kopplungen i.d.R. von Protonen mit kurzer Distanz zu den Spinzentren verursacht werden. Zusätzlich geben die $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Austauschexperimente Informationen, welche Bindungspartner bei den Protonen, die signifikante Linienverläufe erzeugen, vorkommen. Neben einem dipolaren Hyperfeinanteil enthalten Protonen, die über eine chemische Bindung mit dem Spinzentrum korreliert sind, isotrope Hyperfeinanteile. Bei der AOR handelt es sich dabei überwiegend um die Cystein- β -Protonen der Cysteinliganden. Isotrope Hyperfeinkopplungen werden iterativ durch einfache Addition zum dipolaren Hyperfeinanteil bestimmt, bis eine Anpassung von simulierten Spektren an die experimentellen Spektren erfolgt. Bei der vorliegenden Untersuchung sollen die Werte der isotropen Hyperfeinkopplungen ermittelt und mit früheren Daten verglichen werden, die im Bereich von 1.6-4.1MHz aufgefunden wurden [31]. Daneben sollen Zusammenhänge zwischen

4.Ziel der Arbeit

isotropen Kopplungen und der Struktur, wie sie bei 4Fe-4S-Cluster aufgefunden wurden [14, 83], überprüft werden.

Hyperfein-Wechselwirkung von Protonen aus der näheren Umgebung eines Spinzentrum sind distanz- und winkelabhängig und liefern neben einem Einblick in die elektronischen Eigenschaften der Redoxzentren Strukturinformationen. Bei der ENDOR-Spektren-Simulation werden die röntgenkristallographischen Daten zunächst unverändert übernommen und können gegebenenfalls den ENDOR-Experimenten angepasst werden. Somit ist eine Möglichkeit gegeben, die Protonenkoordinaten mittels der ENDOR-Spektren-Simulation zu überprüfen und mit den Strukturdaten zu vergleichen. Da alle Protonen mit einer Distanz $< 5 \text{ \AA}$ bei der ENDOR-Simulation einbezogen werden, können weiterhin Struktureigenschaften, die gegebenenfalls eine selektive Reduktion bestimmter Fe-Ionen begünstigen, festgestellt werden. Durch die Anwendung verschiedener spektroskopischer und analytischer Verfahren unter der Verwendung einer hochaufgelösten Kristallstruktur der AOR steht letztlich die Bestimmung der elektronischen Eigenschaften der beiden 2Fe-2S-Cluster sowie struktureller Merkmale in ihrer Umgebung im Mittelpunkt dieser Arbeit.

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation

5.1 Präparation der Aldehyd Oxidoreduktase

Für die Messungen stand eine unbehandelte Proteinprobe zur Verfügung, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Moura der technischen Universität Lissabon isoliert und gereinigt wurde. Die hierzu erforderlichen Arbeitsschritte wurden in vorangegangenen Publikationen ausführlich beschrieben [109, 135]. Die Probe wurde im biophysikalischen Institut in Homburg mit dem Reduktionsmittel Dithionit weiterbehandelt. Dadurch nehmen die Metallzentren ihre paramagnetischen Zustände an und sind für ESR- und ENDOR spektroskopische Untersuchungen vorbereitet. Aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit (ca. 10^{11} Spins/0.1mT Linienbreite, dies entspricht einer Konzentration von etwa 10^{-9} M) ist die benötigte Probenmenge gering. Bei den durchgeführten Messungen im X-Band beträgt das Probenvolumen etwa 100 μ l. An einem Teil der Enzymlösung wurde für weitere Untersuchungen weiterhin ein H/D- Austausch zur Identifikation der linienreichen ENDOR-Protonenresonanzen durchgeführt. Durch Isotopensubstitution an benachbarten Kernen können deren Beiträge zum ESR- bzw. ENDOR- Spektrum kenntlich gemacht werden.

Die Reduktion der AOR fand unter anaeroben Bedingungen in einem Zelt (Coy Laboratory Products Inc.) statt, das mit einer Formiergasatmosphäre (Stickstoff: Wasserstoff 95:5) gefüllt ist. Die Konzentration der Probe lag bei etwa 0.7mM in TRIS-Puffer (pH 7,6). Von der AOR-Probe wurden 150 μ l mit einer gesättigten Dithionit- Lösung behandelt. Für diese wurde 70 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ zu 10 ml 0.1 M Tris- Puffer (pH9.2) gegeben und 50 μ l zu der AOR- Lösung addiert. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur in einem Eppendorfbehälter für eine Dauer von 20 min statt. Die reduzierte Proteinprobe wurde anschließend in ein ESR- Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff gefroren.

Die Deuterierung der Probe erfolgte mit Tris-Puffer (pH 7,6), der anstatt H_2O ausschließlich D_2O als Lösungsmittel enthält. 2 x 100 μ l einer unbehandelten Enzymprobe wurde dazu anaerob mit Tris/ D_2O (pH7.6) zu jeweils 1ml aufgefüllt. Die Proteinlösung wurde auf 2 Zentrifugencaps (Amicon) verteilt, deren Membrane zuvor mit dem deuterierten Tris-Puffer gewaschen wurde. Durch mehrfache Ultrazentrifugation mit 6000 U/min bei 4°C wurden die mit Argon überschichteten Proben auf je 50 μ l eingengt. Die folgende Reduktion fand mit einem deuteriertem TRIS- Puffer (pH 9.2) statt, der zuvor mit Argon entgast wurde. In 5 ml Puffer wurde 70 mg Natriumdithionit gelöst, von dieser übersättigten Reduktionslösung wurde 30 μ l zu den insgesamt 110 μ l der umgepufferten AOR- Lösung gegeben und für 20 min inkubiert.

5.2 Spektrometerbeschreibung und Spektrenaufnahme

Ein allgemeines Problem spektroskopischer Verfahren stellt oftmals die Auflösungsgrenzen dar. Unter Verwendung verschiedener Aufnahmeparameter wie z.B. Variierung der Mikrowellenleistung und der Temperatur bei der CW-ESR sowie verschiedenen RF-Modulationshöhen bei den CW-ENDOR-Experimenten können Hyperfeinwechselwirkungen unterschiedlich deutlich dargestellt werden. Von der AOR-Lösung wurden Messreihen von ENDOR-Spektren aufgenommen, die den gesamten Feldbereich abdecken. Je nach Wahl der Modulationshöhe kann ein Schwerpunkt der Darstellung der Resonanzlinien auf den Außenbereich oder dem linienreichen Innenbereich gelegt werden. Unter den gleichen Bedingungen wurden Spektren der deuterierten Probe gewonnen. Um verbreiterte Protonenkopplungen mit geringer Intensität aufzudecken, wurden Puls-ENDOR-Messungen mit geeigneten Puls-Sequenzen eingesetzt. Unterschiedliche Einstellung bezüglich der Pulsdauer bzw. Pulsabstände stellen darüber hinaus einen Ansatz dar, aufgrund der unterschiedlichen Relaxationszeiten Anteile von FeS-Zentrum I bzw. FeS-Zentrum II zu trennen. Der prinzipielle Aufbau von CW- und Puls-Spektrometern und die Aufnahme von ENDOR-Spektren ist Bestandteil dieses Kapitels.

5.2.1 Aufbau eines CW-ESR- und ENDOR-Spektrometers

Die X-Band-ESR- und ENDOR-Spektren wurden mit verschiedenen Bruker-ESP-Spektrometern aufgenommen (s. Spektrenaufnahme), deren schematischer Aufbau in Abb. 5.1 dargestellt wird. Im folgenden werden die einzelnen Komponenten eines CW-ESR-Spektrometers vorgestellt, die durch weitere Bauteile zu einem CW-ENDOR-Spektrometer ergänzt werden können. Dabei wird allgemein das Messprinzip und die einzustellenden Geräteparameter beschrieben, die für das Verständnis der durchgeführten Experimente notwendig sind. Weiterführende technische Details werden z.B. in [19, 121, 138] aufgeführt.

Die eingesetzten Spektrometer sind als sog. Homodyn-Spektrometer mit Reflexions-Mikrowellensystem konzipiert. Aus technischen Gründen wird bei der ESR-Spektroskopie nicht die Mikrowellenfrequenz, sondern das Magnetfeld verändert. Die Mikrowellenstrahlung wird mittels eines Klystrons erzeugt und gelangt über ein Dämpfungsglied, mit dessen Hilfe die Mikrowellenleistungen angepaßt wird, zum Resonator (Cavity). Die Mikrowellenfrequenz

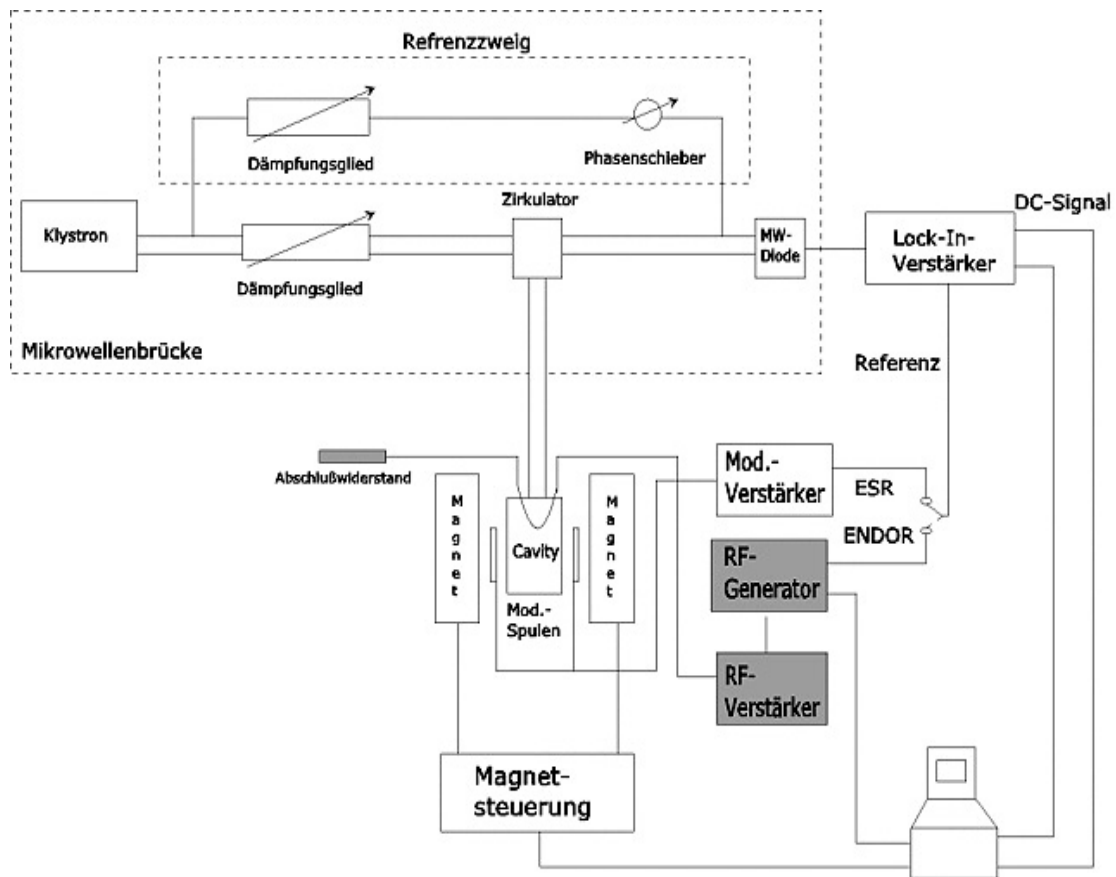


Abb. 5.1: Komponenten eines CW-ESR-Spektrometers. Ein ENDOR-Spektrometer wird um die Radiofrequenzkomponenten (grau) erweitert.

und die Resonatorfrequenz werden so abgestimmt, das im Idealfall eine vollständige Absorption der Mikrowellenleistung erfolgt. Befindet sich eine paramagnetische Probe in der Cavity, kommt es im Resonanzfall zu einer Verstimmung des Resonators. Man beobachtet dann eine Reflexion der Mikrowelle. Ein Zirkulator trennt die hin- und rücklaufende Welle, letztere wird zu einer MW-Diode geleitet, die den Detektor darstellt. Das Messsignal ist im Idealfall proportional zur absorbierten Leistung. Um diese Bedingung einzustellen, ist vor der Messung eine Abstimmung notwendig. Dabei verändert man neben der MW-Frequenz die Koppelgüte der Cavity mit einer Blende (Iris). Der Abstimmvorgang ist mit Hilfe eines Mode-Bildes als sog. Dip beobachtbar. Der Kehrwert der Frequenzbreite des Dips gilt als ein Maß für den Qualitätsfaktor der Cavity, je schärfer die Frequenzdips eingestellt sind, um so

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation

höher ist die Güte und damit die Sensitivität der Messungen. Zusätzlich muss bei der Abstimmung der Arbeitspunkt der Detektordiode eingeregelt werden, dies erfolgt mittels eines Referenzzweiges. Aufgrund des Homodyn-Prinzip ist eine sinusförmige Modulation des statischen Magnetfeldes notwendig. Die Modulation der von der Probe absorbierten Leistung führt zu einem Wechselspannungssignal. Der Vorteil dieser Signaldetektion liegt dann in der Verwendung selektiver Verstärker, die für eine möglichst rauschfreie Verstärkung sorgen. Der nachgeschaltete Lock-In-Verstärker sorgt für eine phasenempfindliche Gleichrichtung durch einen Vergleich von Messsignal mit dem Modulationssignal (Referenz). Durch dieses Messprinzip erhält man statt der Absorption die 1. Ableitung (Abb. 4.2).

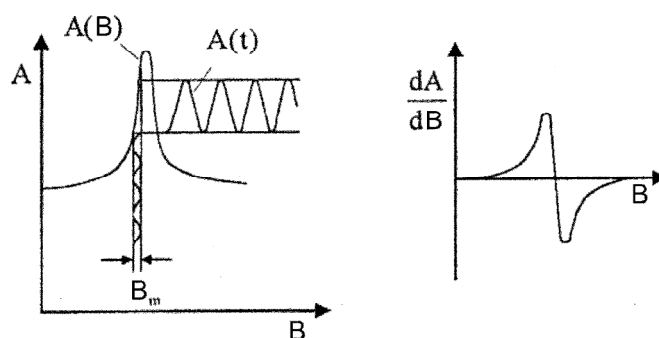


Abb. 5.2: Prinzip der Amplitudenmodulation; links: Umsetzen des Modulationsfeldes B_m an der Absorptionskurve; rechts: resultierende Signalform (nach Schneider/Plato [122])

Bei einer ESR-Aufnahme muss der Einfluss einiger Geräteparameter auf die Spektrendarstellung berücksichtigt werden. Zunächst bestimmt die einzustellende Modulationsamplitude die spektrale Auflösung. Eine große Modulationsamplitude führt zu höheren Signalamplituden. Ist die eingesetzte Modulationsamplitude jedoch größer als die halbe Absorptions-Linienbreite, ergibt sich eine Reduktion der spektralen Auflösung. Daneben ist die einstellbare Zeitkonstante bestimmter Tiefpassfilter so zu wählen, dass keine Formveränderungen des Signals auftreten. Der Magnetfeldsweep erfolgt nach dem Probeneinbau und dem Abstimmvorgang, dabei wird Leistung und Frequenz der Mikrowelle nicht verändert. Zur Kalibrierung des äußeren Magnetfeldes kann in X- und Q- Band-Spektrometern das stabile Radikal DPPH (α, α' -Diphenyl- β -Pikryl-Hydrazyl), dessen g Faktor mit $g = 2.0036$ nahe dem des freien Elektronen ist, oder ein NMR-Gaussmeter verwendet werden. Während der Messung wird das Messsignal mittels PC aufgenommen, Feld und Lock-In werden ebenfalls vom Rechner gesteuert.

Für die ENDOR-Spektroskopie müssen zusätzlich zu den Komponenten eines ESR-Spektrometers die notwendigen Radiofrequenzkomponenten integriert werden (Abb. 5.1). Dazu wird eine RF-Spule benötigt, deren Magnetfeld senkrecht sowohl zum statischen Magnetfeld als auch zu dem der Mikrowelle steht, des weiteren ein RF-Generator mit einem entsprechenden RF-Verstärker. Die Radiofrequenzspule wird einerseits möglichst nahe am Probenort angebracht, darf aber andererseits die Mikrowelleneigenschaft des Resonators nur möglichst geringfügig beeinträchtigen. Zusätzlich ist zu beachten, dass die kontinuierliche Einstrahlung eines starken Radiofrequenzfeldes Probleme bei der Wärmeabführung ergibt. Aus diesem Grund wurden spezielle ENDOR-Cavities entwickelt (s. Spektrenaufnahme).

Die Aufnahme von ENDOR-Spektren erfolgt nach der vorhergehend beschriebenen Messung eines ESR-Spektrums anschließend an einem sogenannten ENDOR-Arbeitspunkt. Bei ENDOR-Messungen erfolgt keine Modulation des statischen Magnetfeldes, sondern eine Modulation der Radiofrequenz im KHz-Bereich. Ein großer Modulationshub ergibt eine geringe spektrale Auflösung, führt jedoch zu einer höheren Signalintensität mit niedrigem Signal-Rausch-Verhältnis. Ein kleiner Modulationshub bewirkt dagegen eine höhere Auflösung der Innenlinien eines Spektrums, die Außenlinien sind dagegen nur nach vielen Additionen der Einzelspektren sichtbar. Die Anzahl der Additionen, um eine klare Darstellung der ENDOR-Signale gegenüber Störsignalen und Hintergrundrauschen zu erhalten, ist dabei abhängig vom gewählten Arbeitspunkt und entspricht der Anzahl der in Resonanz befindlichen Moleküle.

5.2.2 CW-ESR-Spektrenaufnahme und Geräteparameter

Zusätzlich zum Bruker-ESP300-Spektrometer stand ein ESR-Bruker-ElexSys-E680-Spektrometer zu Verfügung, das sowohl im CW- als auch im Puls-Modus betrieben werden kann. Die CW-ESR-Messungen an der AOR erfolgten mit Modulationsamplituden zwischen 1 und 10 Gauss, einer Modulationsfrequenz von 100 KHz und Zeitkonstanten von 42 ms oder 84 ms. Der Magnetfeldsweep wurde im Bereich von 310 mT bis 370 mT durchgeführt und mit einem NMR-Gaußmeter überwacht. Für die Tieftemperaturmessungen von 120 K bis 10 K wurde ein Heliumdurchfluss-Kryostat der Firma Oxford Instruments eingesetzt (E9), wobei die Temperaturregelung über die zugehörige Regeleinheit (ITC4 Oxforts Instruments) oder manuell durch Regulierung des Heliumdurchflusses erfolgte. Mikrowellenleistung und Temperatur wurden variiert. Bei den verwendeten Resonatoren der Firma Bruker lag die Mikrowellenfrequenz bei 9.4 GHz bis 9.7 GHz. Vor jeder Aufnahme eines ENDOR-

Spektrums wurde ebenfalls ein ESR-Spektrum aufgenommen, um den Magnetfeldwert festzulegen, der den ENDOR-Arbeitspunkt darstellt. Die dazugehörigen ESR-Aufnahmen erfolgten an einem ESP300-Spektrometer mit einem TE- Resonator (4102ST7913). Die Messung wurden wie die anschließenden ENDOR- Experimente bei ca. 20K durchgeführt. Die Geräteparameter betragen dabei: Mikrowellenfrequenz ca. 9.47GHz, Mikrowellenleistung 6,3mW, Modulationsamplitude 10mT. Die Zeitkonstante betrug 42ms, die Aufnahmezeit 61,5s.

5.2.3 CW-ENDOR-Spektrenaufnahme und Geräteparameter

Die CW-ENDOR-Messreihen wurden mit einem Bruker ESP300-Spektrometer und einer ENDOR-Cavity (Bruker 4102ST7913) aufgenommen. Zur Erzeugung der RF-Frequenz steht in der Arbeitsgruppe ein Funktionsgenerator Wavetek, Modell 3000 zur Verfügung, dessen Frequenzbereich und Frequenzvorschub durch einen Controller vorgegeben werden. Die Leistung der Radiofrequenzen wurden entweder mit einem EIN 150 RF-Verstärker oder einem Amplifier Research (304002) Verstärker auf etwa 100W verstärkt. Unterschiedliche Temperaturen und Mikrowellenleistungen wurde getestet. Für die Serienmessungen zeigte sich eine Mikrowellenleistung von 6,3 mW als geeignet, eine Sättigung des ESR- Signals zu gewährleisten. Anschließend wurden RF-Frequenzsweeps im Bereich von 5-25MHz durchlaufen und die Spektren an Arbeitspunkten im Abstand von 2 mT aufgenommen, jeweils von der protonierten bzw. der deuterierten Probe. Die Radiofrequenz wurde zum einen mit einer Frequenz von 400kHz hoch-moduliert, bei dieser können Kopplungen $> 5\text{MHz}$ um ν_0 mit einem befriedigenden Signal-Rausch-Verhältnis dargestellt werden. Um Spektren mit einer verbesserten Auflösung des Innenbereichs der ENDOR- Spektren zu erhalten wurde zusätzlich eine Messreihe mit einer RF- Modulation von 100KHz im Abstand von 1mT durchgeführt. Die Anzahl notwendiger Aufsummierungen der Einzelspektren ist dabei abhängig vom jeweiligen Arbeitspunkt. Im Bereich von g_{int} zeigten sich 10-20 Additionen als ausreichend, während an den extremalen g -Faktoren aufgrund weniger beitragender Orientierungen die Anzahl um den Faktor 3-4 erhöht werden musste. Als Ergebnis einer Messreihe lagen dann je nach Abstand der Arbeitspunkte 20-40 ENDOR-Spektren vor. Alle Spektren wurden bei ca. 20K aufgenommen. Die Aufnahme der Einzelspektren betrug 60s, die Time conversion wurde mit 40,49ms und der Frequenzhub mit 100kHz eingestellt.

5.2.4 Aufbau eines Puls-ENDOR-Spektrometers

Um präzise Aussagen über die Hyperfeinwechselwirkung der gekoppelten ^1H -Kerne zu treffen wurden orientierungselektive Puls-ENDOR-Experimente bei verschiedenen Magnetfeldpositionen durchgeführt. Aufgrund meist geringer Echointensitäten sind diese Messungen an kritischen Positionen des Magnetfeldes zeitaufwendig und benötigen eine große Additionsanzahl der Einzelspektren. Nach dem Test verschiedener Pulssequenzen wurde für die vorliegende Untersuchung Pulssequenzen des Davies-Verfahrens eingesetzt [38]. In Abb. 4.3 wird ein Blockschema eines Puls-Spektrometers aufgezeigt.

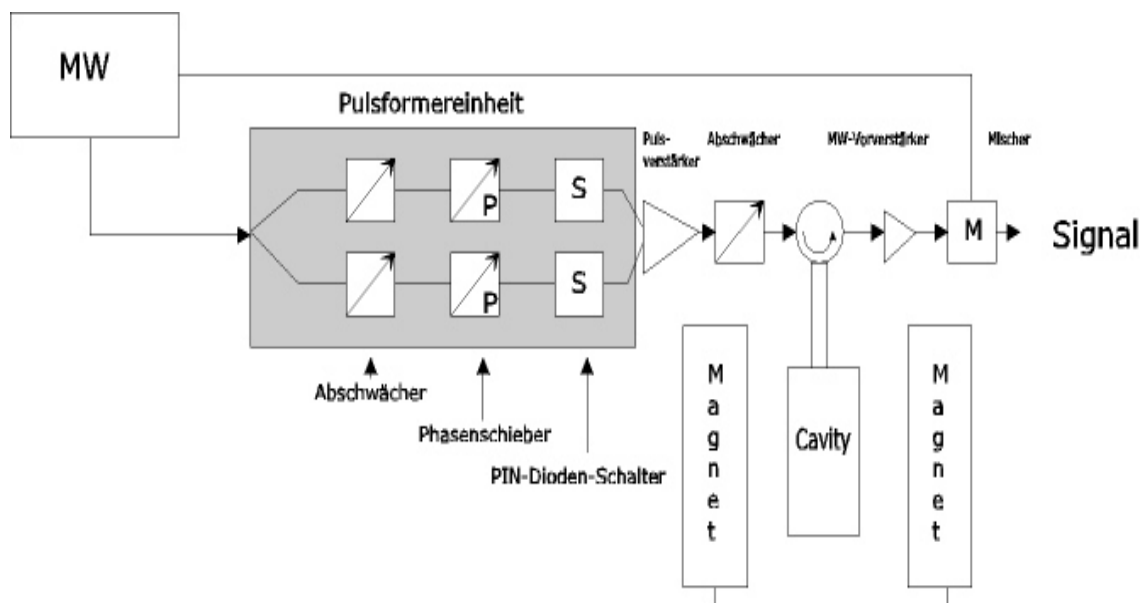


Abb. 5.3: Zusatzkomponenten eines Puls-Spektrometers [nach 84].

Bei der Puls-Spektroskopie arbeitet man mit möglichst hohen Leistungen, um das Mikrowellenfeld am Probenort zu vergrößern. Dazu wird die Ausgangsleistung der Mikrowellenquelle mit einem Wanderfeldröhrenverstärker (TWT) auf ca. 1kW verstärkt. Zuvor werden die erforderlichen Pulsmuster mit Hilfe der Pulsformereinheit erzeugt. Die Pulse haben Längen im Bereich von wenigen Nanosekunden bis zu Mikrosekunden, die Pulsabstände müssen während eines Experimentes variiert werden können. Dies erfordert den Einsatz schneller PIN-Dioden als Mikrowellenschalter. Im Hochleistungsteil ist ein zusätzlicher Abschwächer eingebaut, den man zum Test des Pulsmusters und der

Resonatorkopplung auf eine hohe Dämpfung (60db) einstellt, um die Detektionselektronik zu schützen. Bei der Detektion des Signals wird die Mikrowelle als Referenzphase herangezogen. Dieser Schritt wird in einem Mischer durchgeführt. Um ein gutes Signal-Rauschverhältnis zu erhalten, wird das ursprüngliche Signal vor dem Mischer vorverstärkt. Abstimmung, Parametereinstellungen sowie Spektrenaufnahme erfolgt mit integriertem Rechner. Ausführliche Beschreibung des Geräteaufbaus ist z. B. in [138] zu finden und kann aufgrund der Menge technischer Details hier nur schematisch aufgeführt werden.

5.2.5 Puls-ENDOR-Spektrenaufnahme und Geräteparameter

Die Puls-Experimente wurden mit ESR-Spektrometer Bruker ElexSys E680 und einer Puls-Steuereinheit E385 durchgeführt. Die Davies-ENDOR-Spektren wurden mit der MW-Pulssequenz ($\pi - T - \pi/2 - \tau - \pi - \tau$ -Echo) und einem π -RF-Puls, der während der Zeit T aktiv wird, aufgenommen. Die Sequenz der Mikrowellenpulse, die über einen TWT-Verstärker (Applied Systems Engineering Model 1A)) mit einer Leistung von ca. 1kW eingespeist wurde, wurde so eingestellt, dass ein π -Puls eine Länge von 112ns und ein $\pi/2$ -Puls eine Länge von 56ns hat. Der Radiofrequenzpuls wurde mit einer Länge von 8 μ s gesetzt. Nach einem Abstand von 3 μ s folgte eine Hahn- Echo Sequenz zur Detektion des ENDOR- Effektes. Der Abstand τ der beiden Pulse der Hahn- Echo- Sequenz wurde nach Testmessungen zum einen mit 400ns und zum anderen mit 1200ns gewählt. Die RF wurde in einem Dice Generator erzeugt. Die gesamte Davies-Puls-ENDOR-Sequenz wurde mit einem Zeitabstand von 2-10ms wiederholt. Die Aufnahmezeit der Spektren lag bei 6 bis zu 18 Stunden.

5.2.6 Bearbeitung der ESR- und ENDOR- Spektren

Die Datenaufnahme der ESR-Spektren und der Puls-ENDOR-Spektren auf dem Spektrometer Elexys E680 erfolgte mit dem Programm XEpr auf einer Unix-Workstation. Die CW-ENDOR-Messungen an dem Spektrometer wurden mit einem im Arbeitskreis entwickelten Programm für PC aufgezeichnet. Die bei einer Messserie erhaltenen Spektren werden dabei abhängig vom Arbeitspunkt sowie von den eingesetzten Verstärker, Cavities u.a. Komponenten teilweise von Störsignalen beeinflusst. Zudem enthalten ENDOR-Spektren einen unvermeidbaren Anteil von Hintergrundrauschen. Dieses Hintergrundrauschen kann durch eine geeignete Anzahl von Additionen der Einzelspektren reduziert werden. Während die ENDOR-Signale immer die gleiche Lage im RF-Frequenzbereich aufzeigen, ist der

Rausch-Anteil statistisch verteilt. Bei jeder zusätzlichen Addition eines Einzelspektrums werden so die ENDOR-Signale herausgearbeitet, während sich gleichzeitig das Hintergrundrauschen verringert. Um das Signal-Rauschverhältnis weiterhin zu verbessern, wird nach den ENDOR-Aufnahmen eine sog. Basislinie aufgenommen. Dazu führt man eine ENDOR-Aufnahme an Magnetfeldwerten durch, die außerhalb der ESR-Resonanz liegen und keine ENDOR-Signale enthalten. Man erhält so eine Linie, die nur Rauschen und eventuell vorhandenen Artefakte, also Störsignale, enthält. Die Basislinie sollte dabei die gleichen Anzahl Einzeladditionen enthalten wie das zuvor gemessene ENDOR-Spektrum, damit Artefakte im gleichen Verhältnis wie bei der eigentlichen Messung dargestellt werden.

Für die anschließend Weiterbearbeitung der Spektren stehen im Arbeitskreis die kommerziellen Programme WIN-EPR und XView (Bruker) zur Verfügung. Letzteres kann sowohl von ESR- wie auch von ENDOR-Spektren verschiedenen Spektrenoperationen durchführen. ENDOR-Spektren zeigen teilweise eine nicht gleichmäßig verlaufende Nulllinie, die mit einer Korrekturfunktion ausgeglichen wird. Weiterhin wird dann zu einer verbesserten Darstellung die Basislinie von dem ENDOR-Spektrum subtrahiert. Hauptsächlich werden dabei die Anteil der Störsignale verringert, die sich oft als problematisch bei der Analyse der Spektren erweisen. ^1H -ENDOR-Signale können oftmals sehr verbreitert und intensitätsschwach auftreten (Kap. 2.2.2). Befinden sich Störsignale in gleicher Position, werden dadurch schwache ENDOR-Signale überdeckt und können somit nicht eindeutig identifiziert werden. Die Störsignale können jedoch teilweise anhand ihrer Form als solche erkannt werden, meist treten sie über mehrere Arbeitspunkte an gleichem RF-Frequenzbereich mit gleichem Aussehen auf. Oftmals kann ihr Anteil durch die Basisliniensubstraktion vollständig dezimiert werden. Ist die Interpretation der Störsignale nach den beschriebenen Operationen nicht eindeutig oder überlagern sie weiterhin zu stark Bereiche mit ENDOR-Signalen, muss eventuell mit veränderten Spektrometer-Komponenten (z.B. Verstärker, Abschirmung, usw.) erneut eine Spektren-Aufnahme erfolgen. Durch diese Vorgehensweise steht zunächst die Erhaltung hinreichend aufgelöster, artefaktfreier Spektren im Vordergrund. Ist eine klare Signal-Darstellung erreicht, kann eine Normierung der Spektren erfolgen. Bei der Normierung werden die Spektren durch die Anzahl der Einzeladditionen und der Verstärkungsfaktoren dividiert. Innerhalb einer Messreihe mit unveränderten Probenbedingungen und Geräteparameter können dann die relativen Intensitäten verglichen werden. Bei der vorliegenden Untersuchung spielt dieser Faktor innerhalb einer Messreihe keine große Rolle, ist jedoch entscheidend bei der Interpretation der H^7/D -Austauschexperiment. Vergleicht man ein Spektrum in H_2O -Puffer mit einem Spektrum am gleichen Arbeitspunkt

mit einer Probe im D₂O-Medium, ist die Signalintensität ein entscheidendes Merkmal. Nach der Normierung erhält man Spektren, die zunächst im richtigen Verhältnis der Intensitäten dargestellt werden. ENDOR-Spektren von Proben in D₂O sind meist insgesamt schwächer in der Signalstärken ausgeprägt, so dass die Interpretation, ob es sich um eine einfache Signalerniedrigung oder eine durch den Austausch bewirkte Signaländerung handelt, teilweise erschwert ist. Als Hilfsmittel für eine genauen Analyse sind deshalb Zoomfunktionen in den Bearbeitungsprogramme integriert. Zunächst werden die normierten Spektren übereinander liegend dargestellt. Die einzelnen Spektren können nun in ihrer Größe verändert werden. Durch diese Größenanpassung kann ein optischer Vergleich Details in Signalform und Stärke erfassen. Einerseits können die Signal-Rausch-Verhältnisse angepasst werden, so dass die Nulllinien gleiche Intensitätshöhe aufweisen. Eine andere Art der optischen Anpassung erfolgt, indem man die Signalmaxima der nichtaufgelösten Innenbereiche angleicht. Die Spektrenanalyse erfolgt durch Anwendung beider Methoden. Letztlich benötigt man oft sehr starke Gesamtvergrößerungen aller Spektren, um Details über Signalverläufe zu erkennen. Dabei darf die optische Anpassung der Spektren nicht zu Verzerrungen der Signale und somit zu Fehlinterpretationen führen und ist für jedes Spektrum einzeln festzulegen. Diese Vorgehensweise muss auch bei dem Vergleich der Puls-Spektren mit den CW-Spektren sowie der Puls-Spektren verschiedener Parameter untereinander angewendet werden. Benötigt man wie im Fall der Pulsspektren Differenzspektren (Kap. 6.4), können allerdings nur normierte Spektren herangezogen werden, deren Intensitäten im richtigen Verhältnis zueinander stehen. Sind die Spektrendarstellungen optimiert worden, können Aufspaltungswerte und Linienbreite der Resonanzlinien mit Hilfe der Bearbeitungssoftware bestimmt werden. Eine weitere zusätzliche Funktion von XEpr zur Analyse der Pulsspektren ist die Möglichkeit, Pseudo-Modulationen von Absorptionsspektren zu erzeugen. Damit können die Puls-ENDOR-Spektren in 1. Ableitung dargestellt werden und je nach gewählter Modulationsgröße mit den CW-Daten unmittelbar verglichen werden. Die beschriebene Spektrenanalyse wird auch im Verlauf der Simulation parallel zu dieser durchgeführt, um die Simulation den experimentellen Merkmalen anzupassen. Die abschließende graphische Darstellung der experimentellen und simulierten Spektren erfolgte dann mit dem Programm Origin (Firma Microcal, Version 6.1).

Zur Durchführung einer ENDOR-Simulation müssen Spektren von Arbeitspunkten über den gesamten Magnetfeldbereich vorliegen. Bei der Auswertung der ENDOR-Messreihen paramagnetischer Metalloproteinen liefern erfahrungsgemäß mehrere Protonen Beiträge zu den einzelnen ENDOR-Spektren. Zur Veranschaulichung der Protonen-Linienverläufe

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation

werden diese in einer als Feld-Frequenz-Plot bezeichneten Aufbereitung dargestellt (Abb. 4.4). Dabei wird nicht ein einzelnes Spektrum betrachtet, sondern der Gesamtverlauf signifikanter Linien, die meist nur in den äußeren Frequenzbereichen auftreten. In einem F-Plot werden dazu auf der Abszisse die Messpunkte im Magnetfeld aufgetragen, jede Spalte des Feldplots entspricht somit einem experimentellen Spektrum. Auf der Ordinate wird das Intensitätsmaximum eines ENDOR-Signals aufgetragen, wodurch sich der Linienverlauf eines Häufungspunktes anschaulich verfolgen und markieren lässt. Für diese Darstellungsweise wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die Programme F-Plot bzw.- g-Plot erstellt. Letzteres ist im Simulationsprogramm Phytia integriert und kann neben dem beschriebenen Auftrag der Signalmaxima auch die experimentelle Linienbreite markieren und diese in seiner vertikalen Größe aufzeigen. Nach dieser erweiterten Bearbeitung der Spektren werden die Positionen der Markierungen als ASCII-Datei gespeichert und können dann wiederum von Graphikprogramm wie Microcal Origin eingelesen werden.

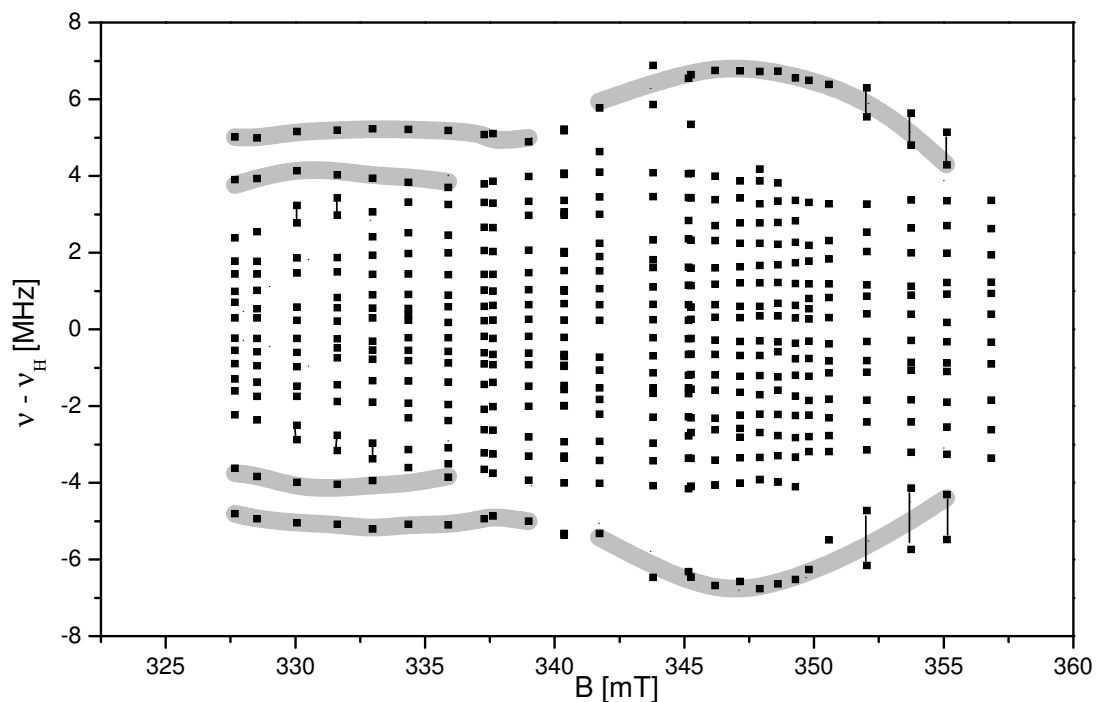


Abb. 5.4: Feld-Frequenz-Plot des Asp-Fdx [nach 86]

5.3 Simulation der ENDOR-Spektren

Bei anisotropen Systemen und Wechselwirkung des Spinsystems mit mehreren Kernspins kann die Analyse der ENDOR-Spektren sehr umfangreich werden. Die mathematisch exakteste Methode zur Berechnung der physikalischen Größen stellt die explizite Lösung der Schrödinger-Gleichung durch Diagonalisierung dar [40, 92, 93, 95, 127]. Eine vereinfachende Möglichkeit bei einer Simulation besteht darin, den Spin-Hamilton-Operator auf wenige Terme zu vereinfachen und mit dem Rest-Operator die Schrödinger-Gleichung in Störungsrechnung erster Ordnung zu lösen. Unabhängig voneinander entwickelten verschiedene Arbeitsgruppen Methoden, um in Näherungsweise ausreichend genaue simulierte Spektren zu generieren [62, 68, 78, 79]. Diese Vorgehensweise hat sich bei der Untersuchung an Übergangsmetallkomplexen als geeignet erwiesen, eine Berechnung der ENDOR-Resonanzen in vertretbarem Zeit- und Rechenaufwand durchzuführen. Da bei der vorliegenden Auswertung die Strukturkoordinaten vorgegeben und zunächst unverändert übernommen wurde, erfolgte die ENDOR-Simulation ausschließlich mit der Methode nach [78]. Bevor das Simulationsprogramm vorgestellt wird, soll zunächst die theoretische Beschreibung der angewandten Methode erfolgen. Eine ausführliche theoretische Darstellung von ENDOR- und ESR-Simulationen an Metalloproteinen ist z.B in [75, 76, 86] aufgeführt.

5.3.1 Theoretische Beschreibung der Simulation von ENDOR-Pulverspektren

Bei der Aufnahme eines ENDOR-Spektrums wird mit der Wahl eines bestimmten Magnetfeldwertes im ESR-Spektrum eine Orientierungsselektion vorgenommen. Daher muss vor einer ENDOR-Simulation das zugrunde liegende ESR-Spektrum simuliert werden. Die Berechnung des effektiven g -Wertes wird mit Hilfe eines auf den Elektron-Zeeman-Term reduzierten Spin-Hamilton-Operators vorgenommen. Wie in Kap.2.1.4 beschrieben, wird bei der Berechnung eines ESR-Spektrums das g -Achsensystem als Bezugssystem verwendet, die Magnetfeldstärke \mathbf{B} wird als Vektor aufgefasst, der gegenüber dem g -Bezugssystem jede beliebige, durch Polar-Koordinaten charakterisierbare Orientierung annehmen kann (Abb. 2.4). Man erhält dann die Bedingungen für die Resonanzfeldwerte nach:

$$B_{\text{Res}} = \frac{h \cdot \nu_0}{\beta_e \cdot g(\theta, \phi)} \quad (5.1)$$

Durch eine hinreichende Anzahl an Orientierungen θ, Φ lassen sich artefaktfreie ESR-Spektren erhalten. Die Simulation von ENDOR-Spektren wird an die ESR-Simulation angeschlossen werden, wenn zu jeder Feldstärke die Parameter θ und Φ aller in Resonanz befindlichen Orientierungen gespeichert wurden. Mit Hilfe dieser Orientierungen kann dann das ENDOR-Spektrum für jeden Arbeitspunkt aufgebaut werden. Von Hurst et al. [78] wurde ein Algorithmus entwickelt, der von einem aus dem Kern-Zeeman- und dem Hyperfeinterm des Protons bestehenden Kern-Hamilton-Operator ausgeht:

$$\hat{H}_N = \hat{\mathbf{S}}\mathbf{A}\hat{\mathbf{I}} - g_N \beta_N \mathbf{B} \cdot \hat{\mathbf{I}} \quad (5.2)$$

Der Tensor \mathbf{A} ist in einen dipolaren und einen isotropen Anteil unterteilt (s. Kap. 2.2) und wird in Frequenzeinheiten berechnet mit:

$$A_{ij} = (A_{DD})_{ij} + A_{iso} \delta_{ij} = -\frac{\beta_e \beta_N g_N}{hr^3} g_i (3r_i r_j - \delta_{ij}) + A_{iso} \delta_{ij} \quad (5.3)$$

mit δ_{ij} als Kroneckersymbol und r_i, r_j Protonen-Richtung bezüglich des Spinzentriums. Ist der Elektronenspin ρ über verschiedene Kerne verteilt, kann der dipolare Anteil der Hyperfeinkopplung wie folgt zusammengesetzt werden [vgl. 121]

$$(A_{DD})_{ij} = \sum_l \rho_l (A_{ij})_l \quad (5.4)$$

wobei mit ρ_l die Spindichte des Atoms l bezeichnet wird.

Unter Berücksichtigung der ENDOR-Auswahlregeln $\Delta M_s = 0$ und $\Delta M_l = \pm 1$ erhält man die folgende Resonanzbedingung [81]:

$$\nu(\mathbf{B}, M_s) = \sqrt{\sum_{i=1}^3 \left[\frac{M_s}{g(\theta, \phi)} \sum_{j=1}^3 g_j h_j A_{ji} - h_i \nu_N \right]^2} \quad (5.5)$$

wobei h_j die Richtungskosinus des Magnetfeldvektors bzgl. des \mathbf{g} -Diagonalsystems bezeichnen.

Die Arbeitsweise einer ENDOR- Simulation bei einem System $S = 1/2$ und Hyperfeinwechselwirkung kann zusammenfassend mit:

$$\hat{H}_{EZ} + \hat{H}_N = \beta_e \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \hat{\mathbf{S}} + \hat{\mathbf{S}} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{\mathbf{I}} - g_N \beta_N \mathbf{B} \cdot \hat{\mathbf{I}}$$

beschrieben werden. Mit Hilfe dieser Vereinfachung kann die ENDOR-Simulation für mehrere Spinzentren gleichzeitig und mit mehreren Protonen für jedes Zentrum vollzogen werden.

5.3.2 Simulationsprogramme

Zur Simulation von Proton- ENDOR- Spektren steht im Arbeitskreis neben den Programmen Prometheus und Iwasaki 1.03 das Programm Phytia zur Verfügung. Aufbau und Arbeitsweise der beiden älteren Programme werden in früheren Dissertationen von Gerhard Schmitt (Prometheus [121]) und Christoph Canne (Iwasaki [29]) ausführlich beschrieben. Phytia integriert beide Programmkomponenten und unterlag in Funktion und Aufbau im Verlauf dieser Arbeit ständiger Erweiterungen. Dabei ist neben der Verbesserung der Spektrendarstellung und Spektrenanalyse sowie der Integration des Feldfrequenzplots v.a. die neu eingeführte Funktion einer gleichzeitigen Simulation mehrere Spinsysteme zu erwähnen. Da bei der untersuchten AOR zwei reduzierte FeS-Zentren innerhalb des Moleküls vorliegen, war diese Erweiterung notwendig, um die Proton- ENDOR- Spektren der AOR komplett auswerten zu können. Als zusätzliche Komponente ist die Möglichkeit gegeben, skalare g-strain-Effekte zu simulieren. Weiterhin wurde im Verlauf dieser Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe ein Programm für eine Automatiksimulation entwickelt. Die unterschiedliche Vorgehensweise der beiden Programme und die allgemeine Simulationstechnik werden in den nächsten Kapitel vorgestellt.

5.3.2.1 Simulationsprogramm Phytia

Vor Beginn einer ENDOR-Simulation muss das dazugehörige ESR-Spektrum simuliert werden. Bei der Simulation von ESR-Spektren mit Pulvercharakter gibt man zunächst die Verteilung der Molekülorientierung bzgl. des äußeren Magnetfeldes an. Zwei unterschiedliche Vorgehensweisen sind bei Phytia vorhanden. Einerseits kann die Orientierungsverteilung per Raster erzeugt werden, eine weitere Methode beruht auf der direkten Berechnung der g-iso-Linie. Weiterhin wird der Magnetfeldsweep, die Anzahl der Datenfelder und die Mikrowellenfrequenz angegeben, die den Experimenten entstammen. Ein weiterer Eingabeparameter ist der g-Tensor des paramagnetischen Zentrums. Der Tensor ist durch seine Hauptwerte und eine Richtungskosinusmatrix definiert. Für eine ESR-Simulation sind zunächst nur die g-Hauptwerte anzugeben. Unter Berücksichtigung des g-Achsensystems als Bezugssystems lassen sich dann die effektiven g-Werte und die Resonanzfeldstärke nach (Gl. 4.1) berechnen. Abschließend führt eine Linienbreitelfunktion zu einer Anpassung des simulierten ESR-Spektrums an die experimentellen Vorlagen. Da im Falle der AOR mehrere Spinzentren vorhanden sind, wurde die ESR-Simulation für beide beteiligten FeS-Zentren durchgeführt und die einzelnen Simulationen zu einem Gesamtspektrum zusammengeführt. Auf diese Art und Weise erhält man eine ESR-Simulation, die bei einer hinreichenden Anzahl berechneter Orientierungen dem realen Absorptionsspektrum mit ausreichender Genauigkeit entspricht (Abb. 5.5).

Ziel einer ENDOR-Simulation ist es zunächst, ein einzelnes Spektrum an einem bestimmten Magnetfeldwert zu simulieren, das dem experimentellen Spektrum am gleichen Arbeitspunkt entspricht. Anschließend ist der Gesamtverlauf der Hyperfeinwechselwirkungen, die im F-Plot aufgezeigt werden, nachzubilden. Bei der Simulation von ^1H -ENDOR-Spektren wird so die Orientierung des g-Tensors, die A-Tensoren sowie die Spindichten berechnet. Ausgangspunkt für die Simulation sind neben den experimentellen Spektren die kristallographische Röntgenstrukturdaten der AOR, die der pdb-Datenbank entnommen sind. Die Berechnung der ENDOR-Resonanzfrequenzen erfolgt dann nach (Gl. 4.5). Als Inputparameter werden für die Simulation zunächst die Aufnahmeparameter benötigt. Diese sind Lage der Arbeitspunkte im Magnetfeld, Mikrowellenfrequenz ν und der Radiowellen-Frequenzsweep.

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation

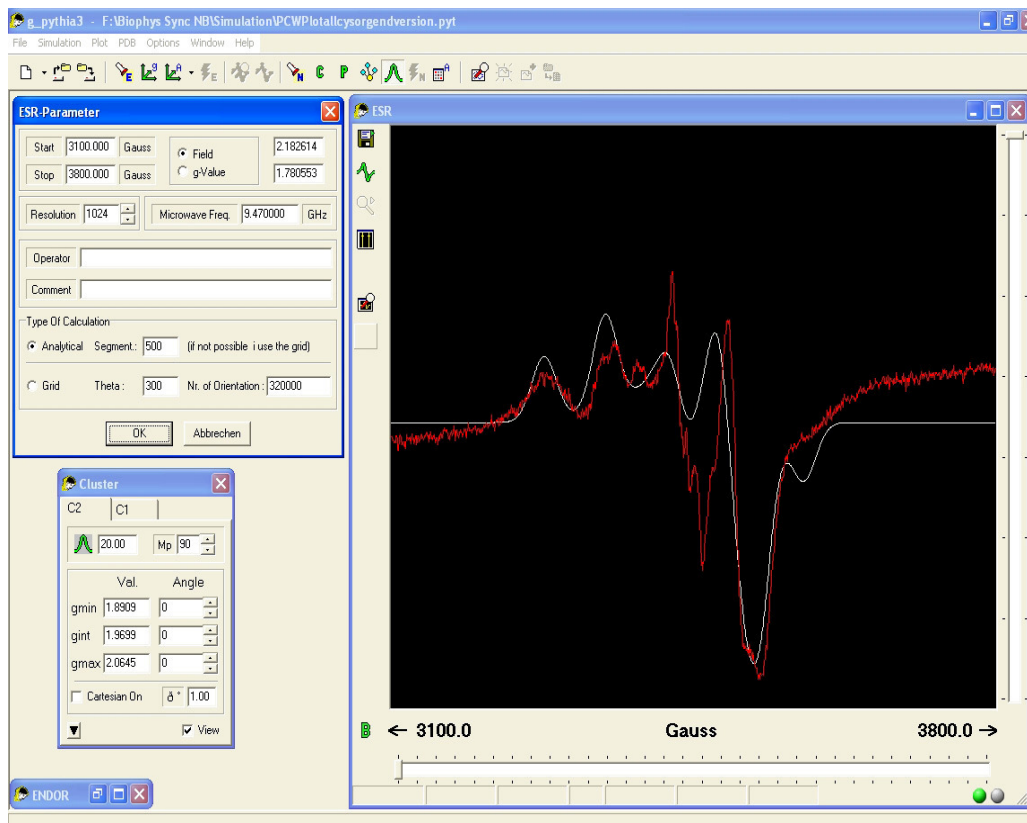


Abb. 5.5: ESR-Simulation mit Phytia, links oben Dialogbox zur Eingabe von Geräte- sowie Aufnahme-Parameter, links unten Dialogbox zu Eingabe der g-Hauptwerte, Linienbreite sowie weiterer Funktionen (s.ENDOR-Screen). Rechts ESR-Fenster mit experimentellem Spektrum (rot), das vor jedem ENDOR-Experiment aufgenommen wird, und simuliertes ESR-Spektrum (weiß).

Da die Kristallstruktur der AOR vorliegt, sind die strukturellen Parameter vorgegeben, können aber im Verlauf der Simulation angepasst werden (Kap. 6.2.4). Zunächst werden die Spinzentren und die Wechselwirkungen der Protonen nach dem Einlesen von PDB-Dateien (Protein Data Base) definiert. Diese Dateien enthalten die kartesischen Koordinaten aller Atome eines Proteins in Bezug auf einen kristallographischen Nullpunkt. Bei der ENDOR-Simulation wird eine Umgebung von maximal 5\AA um das paramagnetische Spinzentrum einbezogen.

Bei einem Reaktions-Zentrum, bei dem die Spindichte über mehrere Atome verteilt ist, muss dann als erstes eine Zuordnung der Spindichteverteilung erfolgen, diese ist bei fehlenden Vorinformationen unbekannt und stellt einen zu ermittelnden Parameter dar. Nach einer vorläufig willkürlichen Festlegung der Spindichteverteilung innerhalb des Rahmens des Spinkopplungsmodells [51] wird dann durch Einstellen verschiedener g-Tensorlagen die Reproduktion signifikanter Kopplung in ihrer Verlaufsform getestet. Anschließend werden

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation

die Werte der Spindichten und der isotropen Kopplung soweit angepasst, bis eine Übereinstimmung zum Experiment erfolgt. Zu der Gruppe der Protonen, die isotrope Kopplungen aufzeigen, gehören bei FeS-Zentren vor allem die Cystein- β -protonen. Während die Geräteparameter durch die Einstellungen bei der Spektrenaufnahme festgelegt sind, müssen also die magnetischen Parameter durch sukzessive Anpassung der Spektrensimulationen an die experimentellen Spektren ermittelt werden. Abb. 5.6 zeigt zusammenfassend die Dialogboxen zur Einstellung von Spindichte (links unten), g-Tensor-Parameter (links unten), Protonen-Verwaltung (rechts) und das simulierte ESR-Spektrum, bei dem die Arbeitspunkte durch Markierungen (links oben, grün Pfeile) angegeben wurden. Die Markierungen entsprechen den Messpunkten der ENDOR-Spektrenaufnahme.

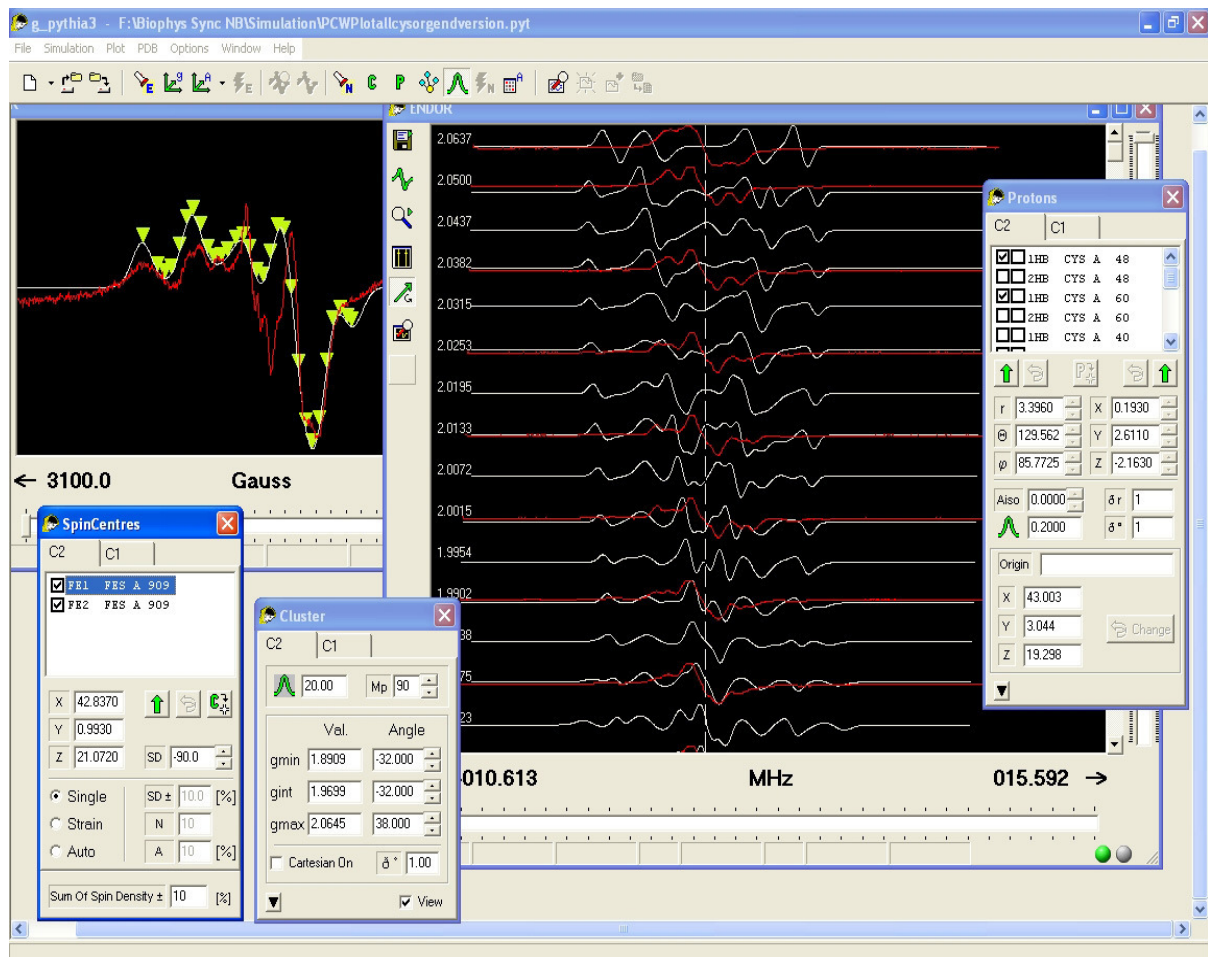


Abb. 5.6: ENDOR-Simulation mit Phytia und dazu notwendige Dialogboxen: simuliertes ESR-Spektrum mit ENDOR-Arbeitspunkte (links oben), Spinzentren mit Spindichte-Angaben (links unten), g-tensor-Werte (Mitte unten) sowie Dialogbox zur Verwaltung und Parameter-Einstellung der Protonen (Mitte, rechts).

Die Dialogbox bei der die g -Eigenwerte anzugeben sind, enthält zusätzlich die Funktion zur Einstellung der g -Orientierung. Diese wird anhand dreier Winkel definiert (Drehung von g_{\max} und $g_{\min} \pm 180^\circ$, $g_{\text{int}} \pm 90^\circ$). Dadurch sind alle Raumlagen des Tensors einzustellen und können als kartesische Koordinaten abgelesen werden. In der Dialogbox der in die Simulation einbezogenen Protonenköpfe können neben der Einstellung der isotropen Kopplungen auch die Protonenkoordinaten angepasst werden.

Der Schwerpunkt einer ENDOR-Simulation, liegt zunächst auf den äußeren Kopplungen, da der innere linienreiche Bereich der ENDOR-Spektren eine Überlagerung zahlreicher Signale darstellt. Zur Vorgehensweise bietet sich an, zunächst die Außenkopplungen mit den größten Aufspaltungswerten zu analysieren, da sie erfahrungsgemäß nur von Protonen mit geringer Distanz zum Spinzentrum verursacht werden. Wichtige Vorinformationen geben dabei die Austauschexperimente, die eine Einschränkung liefern, ob es sich um C-gebundenen oder um NH bzw. OH-Protonen handelt. Die im Feld-Frequenz-Plot erkennbaren Linienverläufe sind nun so nachzusimulieren, dass den einzelnen ENDOR-Resonanzen definierte Protonen zugeordnet werden können. Dabei sind bei den experimentellen Spektren die Verläufe i.d.R. nicht über den gesamten Feldbereich erkennbar. Die Gesamtsimulation eines einzelnen Linienverlaufs darf bei diesen Regionen keine Widersprüche liefern, d.h. Signale produzieren, die im Experiment nicht vorhanden sind. Ist die Möglichkeit der Simulation des Linienverlaufs gegeben, wird eine zweite Außenkopplung in die Simulation mit einbezogen und die bislang gewählten Parameter festgehalten. Nun muss ein Proton ermittelt werden, das eventuell in der Lage ist, diese zweite Außenkopplung nachzuvollziehen. Ist dies nicht zu erreichen, kann die vorher ermittelte Parameterkombination als Lösung ausgeschlossen werden. Im Fall einer erfolgreichen Reproduktion der zweiten Hyperfeinkopplung müssen dann weitere relevante Aufspaltung in die Simulation einbezogen werden, die Anzahl der experimentellen äußeren Signale beträgt bei FeS-Zentren typischerweise 3-4. Können mindestens 3 Außenkopplungen in ihrem Verlauf über den gesamten Magnetfeldbereich nachvollzogen werden, können die gefundenen Parameter in ihre Kombination als Lösung in Betracht gezogen werden, bei 4 Linienverläufen ist sie als relativ sicher zu bewerten. Um die angepassten Parameter zu überprüfen, bezieht man parallel zur Simulation der großen Kopplungen sukzessive austauschbare, ausschließlich dipolar koppelnde Protonen in die Simulation ein und vergleicht die simulierten Resonanzverläufe mit den Austauschexperimenten. Ist auch hier eine Übereinstimmung gegeben, kann die gefundene g -Tensor-Orientierung in die Struktur des Spinzentrums transferiert und mit dessen Geometrie

verglichen werden. Die Vorgehensweise kann auch in umgekehrter Richtung erfolgen, d.h. man wählt zuerst eine g -Tensorlage, die sich in etwa an der Struktur des paramagnetischen Moleküls orientiert und führt dann die Simulation mit dem beschriebenen Testverfahren durch.

Bei einer Simulation von ENDOR- Pulverspektren muss zusätzlich die Linienbreite der Signale berücksichtigt werden, insbesondere im Innenbereich kann zunächst von zwei Ursachen ausgegangen werden:

1. Linienverbreiterung, die durch Resonanzbeiträge von mehr als einem Proton herrühren. Die Linienbreite der einzelnen Protonensignale setzt sich additiv zu einer verbreiterten Gesamtresonanz zusammen und wird dann näherungsweise mit einer Linienbreitelfunktionen angepasst.

2. Linienverbreiterung durch strain-Effekte. Neben der homogenen Linienverbreiterung und inhomogener Linienverbreiterung aus technischen Gründen tragen strain-Effekte zu der Form der Absorptionslinie bei. Phytia gibt die Möglichkeit, g -strain-Effekte automatisch einzustellen, aus Gründen der hohen Rechenkapazität ist diese Funktion auf den Bereich der 3 Hauptwerte des g -Tensors beschränkt. Alle anderen Variablen können dann in ihrer Varianz per Eingabe überprüft werden.

5.3.2.2 Simulationsprogramm Sacopane

Zur Anpassung der Simulationsparameter arbeitet man bei Phytia nach einer iterativen Vorgehensweise. Zuerst sucht man eine Lage des g -Tensors, die in Frage kommt, die Linienverläufe der stark koppelnden Protonen zu reproduzieren. Als Startinformationen können Symmetrieeigenschaften des paramagnetischen Zentrums oder auch durch H/D-Austausch gewonnene Protonenzuordnungen dienen. Nach Festlegung des g -Tensors lassen sich dann in Feinabstimmung die Spindichteverteilung bzw. die isotrope Kopplungsanteile simulieren. Die so ermittelten Parameter erlauben bei eindeutiger Simulierbarkeit aller Arbeitspunkte eine exakte Beschreibung der magnetischen Eigenschaften des paramagnetischen Zentrums. Problematisch zeigt sich die Vielzahl an Lösungsmöglichkeiten, die sich ergeben kann, insbesondere bei der Untersuchung eines einzelnen Resonanzverlaufs. Dabei können aufgrund der Fülle nicht alle Kombinationsmöglichkeiten hinsichtlich der variablen Parameter erfasst werden, eventuell bleiben weitere Lösungsmengen unberücksichtigt. Ein weiteres Problem ist der große zeitlich Aufwand, der bei der iterativen Anpassung der Simulation entsteht. Aus diesem Grund wurde im Verlauf dieser Arbeit

innerhalb der Arbeitsgruppe ein Programm zur Durchführung einer Automatikalkulation entwickelt, die beide Problemstellungen berücksichtigt. Folgende Vorgehensweise wird dabei durchgeführt :

1. Vorgabe eines spektral in weiten Bereichen nachzuvollziehenden Verlaufs unter Berücksichtigung der Linienbreite.
2. Zuordnung eines Protons zu diesem ausgewählten Verlauf.
3. Die Parameter g -Tensorlage, Spindichte und a_{iso} werden in allen Kombinationsmöglichkeiten auf Reproduktion des Verlaufs überprüft.
4. Die automatisch ermittelten Parameter werden schrittweise auf Reproduktion weiterer Verläufe unter Addition zusätzlicher Protonen untersucht.

Die Automatikrechnungen werden mittels des Programms *g-sacopane* vorgenommen, die Ergebnisse werden in eine Datenbank ausgelesen. Die Datenvorbereitung wird in der finalen Version vollständig mit Hilfe von *Phytia* vollzogen, d.h. alle relevanten Parameter für die Automatikrechnung werden mit *Phytia* bestimmt, als Datei abgespeichert und dann von *Sacopane* eingelesen. Das Programm ist dann einerseits in der Lage, die elektronischen Parameter anhand der gewählten Eingaben zu berechnen und andererseits, bei Fixierung einzelner Parameter, den Einfluß von strain-Effekte zu bestimmen. Die Automatik-Kalkulation gewährleistet eine objektive Erfassung aller Lösungsmöglichkeiten und bezieht sich, auf den Simulationsalgorithmus nach [78]. Die Vorgehensweise gestaltet sich anlehnend an die Simulationstechnik von *Phytia*. Zunächst gibt man für eine große Außenkopplung bei den Arbeitspunkten, an denen sie anhand des F-Plots nachvollziehbar ist, die Resonanzpositionen unter Berücksichtigung der Linienbreite an. Diese wird mit Hilfe *Phytia* markiert und ist vom Anwender in ihrer Größe auszuwählen. Weiterhin wählt man ein Proton, das diesen Verlauf reproduzieren soll, die dazugehörigen Koordinaten werden in *pdb*-Formaten aufgenommen. Letztlich werden dann die variablen elektronischen Parameter in einem physikalisch erlaubten Umfang kombiniert und auf Lösungsmöglichkeit überprüft. Die Spannweite der Spindichte ist anlehnend an das Spinkopplungsmodell unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren zu wählen, die isotropen Kopplungswerte lehnen sich an die Minimal- und Maximalwerte aus Literaturdaten der NMR- und ESR- Spektroskopie an. Dann wird eine Drehung des g -Tensor in alle Raumrichtungen durchgeführt, die erhaltenen Lösungen werden gespeichert und auf Reproduktion weiterer Linienverläufe und Protonenzuordnungen getestet. Im Idealfall erhält man nur eine Lösungskombination, die dann wiederum mittels *Phytia* in Feinabstimmung an die Spektren angepasst wird. Ist dies gelungen, können die einzelnen Parameter wieder mit

5. Spektrenaufnahme und Spektrensimulation

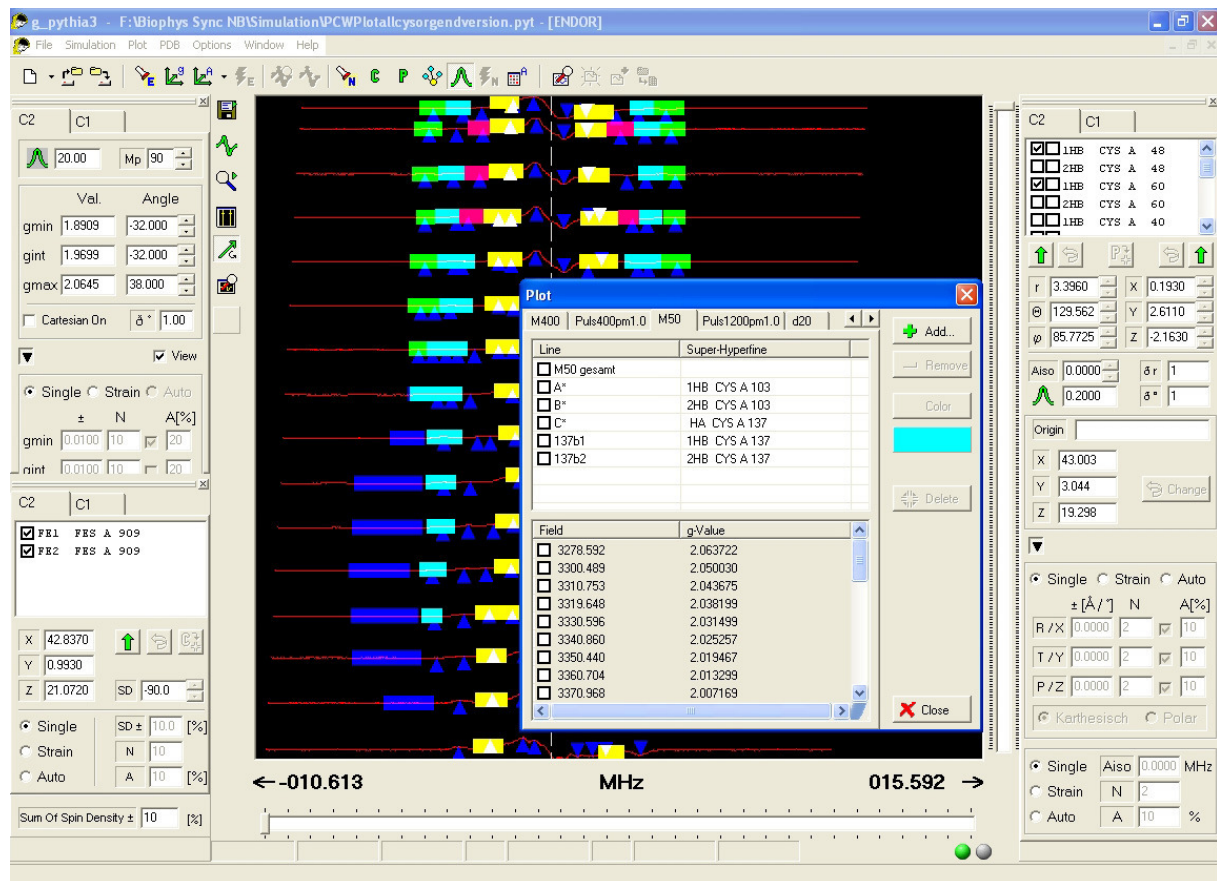


Abb. 5.7: Aufbereitung der Simulation-Daten mit Phytia und dazu notwendige Dialogboxen: Spinzentren mit Spindichte-Angaben (links unten), g-tensor Werte (links oben) sowie ENDOR-Fenster und Dialogbox zur Verwaltung der Linienmarkierung (mitte,) und Parameter-Einstellung der Protonen (rechts).

Sacopane auf ihre Toleranzgrößen untersucht und somit der Einfluss von strain-Effekten bestimmt werden. Fixiert man z. B. die g-Tensorlage, die Spindichte-Verteilung und die isotrope Kopplung eines Protons und lässt dann die Protonenpositionen variieren, die Resonanzpositionen innerhalb der Linienbreite ergeben, kann man den Umfang möglicher Protonenkoordinaten bestimmen.

Die Visualisierung und Modifikationen von Strukturdaten, die in die Proton-ENDOR-Simulation ein- bzw. aus dieser ausgehen, erfolgten mit dem Programm Quanta (Firma Molecular Simulations) auf einer UNIX-Workstation des Arbeitskreises. Weiterhin steht das frei erhältliche Programm WebLabViewer sowie ein ihm Rahmen einer Diplomarbeit entworfenes Programm zur Verfügung.

6. Ergebnis

6.1. Spektrenbeschreibung

Für die Detektion der ENDOR-Resonanzen und zur eindeutigen Klärung ihres Verlaufs über den gesamten Magnetfeldbereich wurden verschiedene CW- bzw. Puls-ENDOR- Messreihen durchgeführt. Für die CW-ENDOR sind Modulation, Verstärkung, Temperatur und weitere Geräte-Parameter optimiert worden. Zunächst wurden die Spektren der jeweils reduzierten Probe in H₂O-Puffer und in D₂O-Puffer Probe bei hoher Modulation (400KHz) aufgenommen. Dabei werden relative breite Linien hervorgehoben. Um eine höhere Auflösung für Aufspaltung < 5MHz um ν_0 der ¹H-ENDOR-Signale zu erhalten, ist anschließend eine Messreihe bei niedriger Modulation (100KHz) im Abstand von 1mT erstellt worden. Daneben ist auch die Technik der Puls- ENDOR herangezogen worden, um hauptsächlich große und verbreiterte Signal-Verläufe aufzuklären bzw. um eine Trennung der Signale beider Zentren zu erreichen. Die eingesetzten Geräteparameter sind in Kap. 5.2 aufgeführt. Bei der folgenden Beschreibung der Spektren wird zunächst auf die hochmodulierten CW-Spektren am jeweiligem Magnetfeld- bzw. g-Wert-Bereich (Arbeitspunkt) eingegangen, essentielle Informationen der niedrigmodulierten Messreihen werden gesondert beschrieben (Kap. 6.1.3).

6.1.1 Hochmodulierte CW- ENDOR- Spektren in H₂O-Puffer

Die ersten ENDOR-Signale treten bei g_{\max} des Eisen-Schwefel- Clusters II auf, der g_{\max} - Wert beträgt 2.063 und wurde durch die ESR-Simulation ermittelt (Kap. 3.3.3). Bei ca. -4.94MHz ist hier ein ENDOR- Signal erkennbar, welches mit einer Linienbreite von ca. 1.2MHz stark verbreitert ist. Diese mit A bezeichnete Linie (Abb. 6.1, I) verläuft symmetrisch, sie erscheint auf der hochfrequenten Seite an gleichem Frequenzbereich mit positivem Vorzeichen. Diesem Signal folgen übergangslos zwei weitere, stark verbreiterte und ineinander laufende Resonanzen, deren Signalmaxima und Linienbreite bei diesem Arbeitspunkt nicht exakt bestimmt werden können. Im Bereich von ca. ± 2 MHz um ν_0 sind dann zwei weitere Signale mit sehr hoher Signalintensität vorhanden. Bei $g = 2.0523$ sind nun 3 deutlich unterscheidbare Außenlinien erkennbar (Abb. 6.1, II), Linie A zeigt sein Intensitätsmaximum bei -4,41MHz

bzw.+ 4,42MHz und besitzt eine Linienbreite von ca. 0.9 MHz. Das ihr unmittelbar benachbarte Signal B weist ein Maximum der Intensität bei $-3.39 \text{ MHz}/3.41 \text{ MHz}$ auf und hat ebenfalls eine Linienbreite von ca. 0.9MHz. Von Linie B deutlich separiert erscheint eine dritte Außenlinie, die als Signal C gekennzeichnet wird. Dieses Signal besitzt ein Signalmaximum bei ca. $-2.41 \text{ MHz}/2.47 \text{ MHz}$ und eine Linienbreite von etwa 0.8 MHz, wobei C in seiner Intensität nicht auf einen Wert gegen Null sinkt, sondern in den Innenbereich des ENDOR-Spektrums übergeht. Das folgende ENDOR- Spektrum bei $g = 2.04$ (Abb.5.1 III) weist keine wesentliche Änderung gegenüber dem Spektrum des vorhergehenden Arbeitspunktes auf. Signal A zeigt einen leicht größeren Aufspaltungswert als zuvor und ist bei der Linienbreite nahezu unverändert. Auch Aufspaltung B ist nur minimal größer geworden, Linie C und B vermischen sich ab diesem Arbeitspunkt wieder. Das letzte Spektrum im Bereich von g_{max} , welches nur Beiträge vom Eisen-Schwefel-Cluster II enthalten kann, wurde bei $g = 2.0275$ aufgenommen (Abb. 6.1, IV). Kopplung A ist in seiner Aufspaltung und Breite unverändert und erreicht somit bei 332 mT und 334 mT seine maximalen Kopplungswert von $A_{\text{max}} = 9.1 \text{ MHz}$. Deutliche Änderung erfahren die beiden anderen Außenlinien B und C, die sich bei diesem Feldwert zu einer sehr breiten Linie vermengt haben. Auch der Innenbereich erfährt an diesem Arbeitspunkt eine Veränderung seiner Form. Bei gleich bleibender Linienbreite von etwa 1.4MHz spaltet diese Linien in 2 Intensitätsspitzen auf (Abb. 6.1, IV).

Ab einem g -Wert von 2.021 ($g_{\text{max}}/\text{FeSI}$) ist eine Resonanzüberlagerung beider Cluster-Signale bei den ESR- bzw. ENDOR-Spektren vorhanden (Abb. 6.2 und 6.3). Die folgenden Arbeitspunkte liefern Signale beider reduzierten Metallzentren bis $g_{\text{min}}/\text{FeSI}$, eine Korrelation der ENDOR- Signale zu den jeweiligen Cluster ist somit erschwert. Aufgrund dieser unklaren Zuordnungsmöglichkeit sollen die hier vorkommenden Außenkopplungen zunächst mit einem * gekennzeichnet werden. Die äußerste Resonanzlinie A* befindet sich bei $g = 2.015$ an gleicher Position wie die zuvor beschriebene Kopplung A (Abb. 6.2, I), Linie B* hat ein Maximum bei $-3.44 \text{ MHz}/3.41 \text{ MHz}$ und ist mit über 2MHz weiterhin deutlich verbreitert. Im Innenbereich ist gegenüber dem überlagerungsfreien vorherigen Arbeitspunkt kein signifikanter Unterschied aufgetreten. Eine Vergrößerung der Aufspaltungswerte um ca. 0.1MHz des Signal A* ist bei $g = 2,00$ erkennbar (Abb. 6.1, II), auch die Signal-Intensität nimmt zu. Eine Aufspaltungszunahme gleicher Größenordnung tritt bei B* auf.

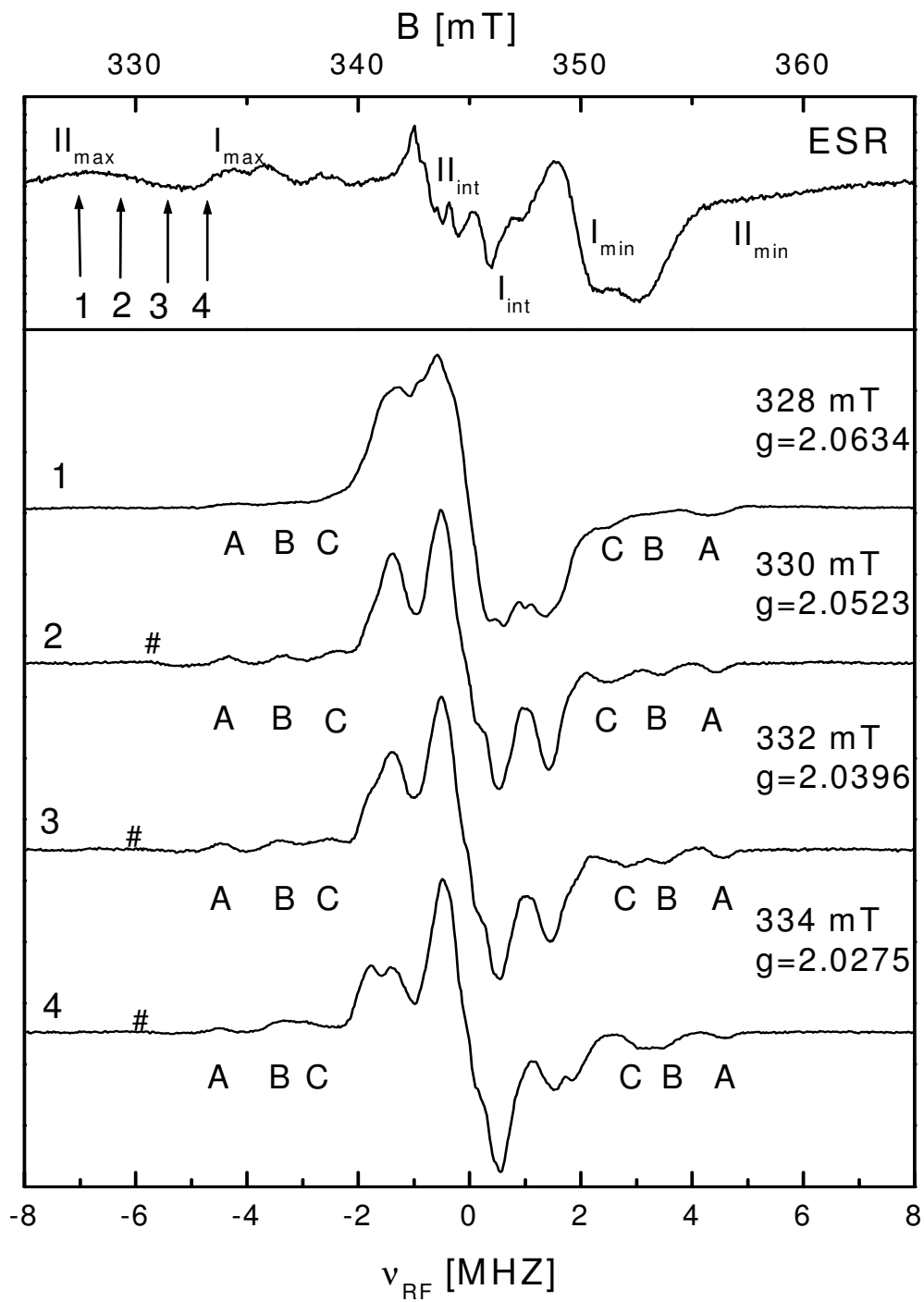


Abb. 6.1: ESR-Spektrum (obere Graphik, die g -Hauptwerte der FeS-Zentren sind mit I bzw II gekennzeichnet); experimentelle ENDOR-Spektren (untere Grafik). Die mit I-IV nummerierten Pfeile geben die jeweiligen Arbeitspunkte im ESR-Spektrum an, die Bezeichnungen A-C beziehen sich auf die im Text beschriebenen Kopplungen im Bereich FeSII. Die mit einem # gekennzeichneten Bereiche stellen Störsignale dar.

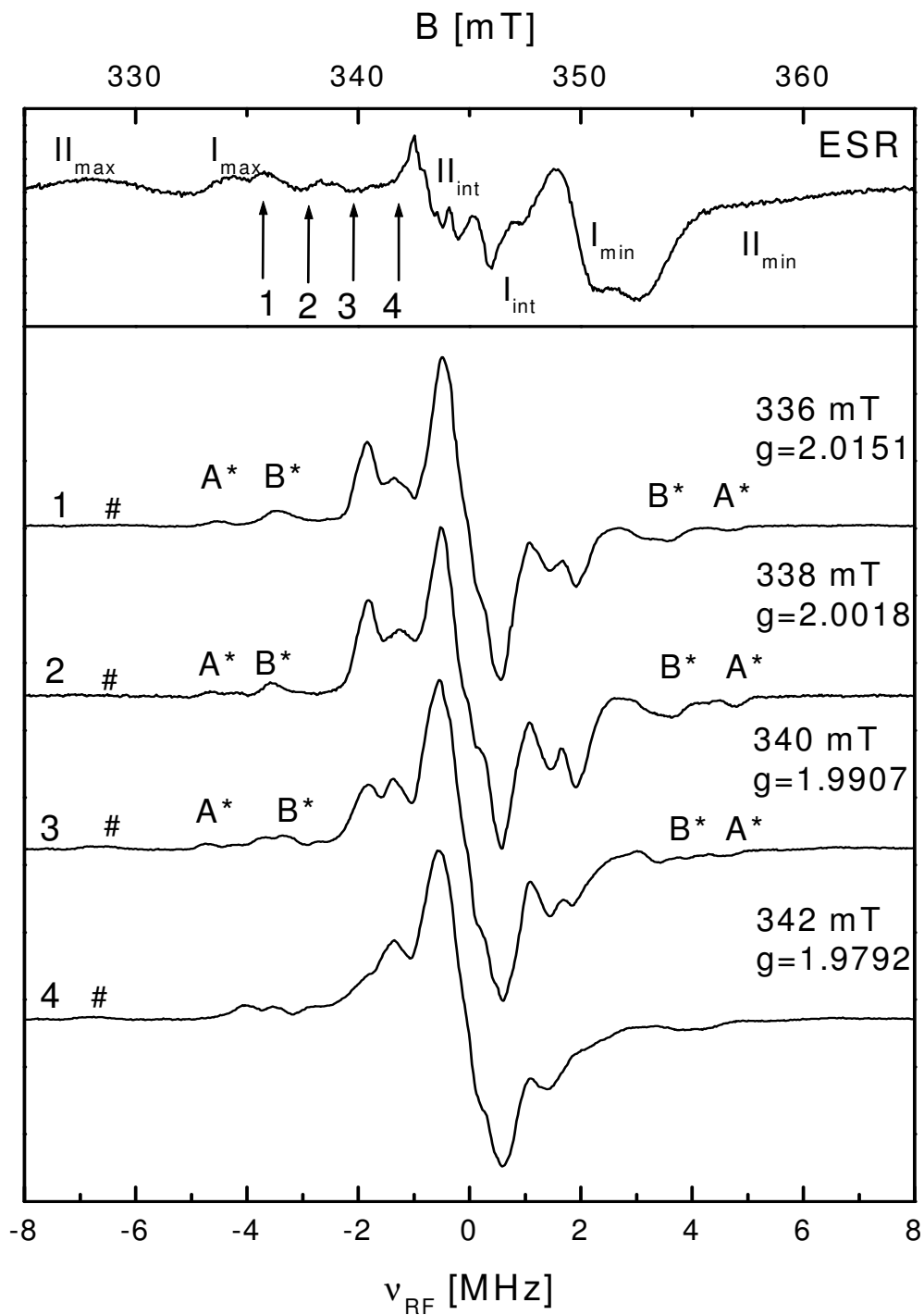


Abb. 6.2: ESR-Spektrum (obere Graphik, die g -Hauptwerte der FeS-Zentren sind mit I bzw II gekennzeichnet); experimentelle ENDOR-Spektren (untere Grafik). Die mit I-IV nummerierten Pfeile geben die jeweiligen Arbeitspunkte im ESR-Spektrum an, die Bezeichnungen A^* und B^* beziehen sich auf die im Text beschriebenen Kopplungen im Bereich FeSI und FeSII. Die mit einem # gekennzeichneten Bereiche stellen Störsignale dar.

Signal A* hat beim folgendem Arbeitspunkt $g = 1.99$ seinen größten Kopplungswert von ca. 9.5MHz, etwa 0.4MHz größer als Signal A im überlagerungsfreien Bereich (Abb. 6.2, III). Auffällig ist ab g_{\max} von FeS- ClusterI eine sprunghafte Zunahme der Signalintensität von A*, dies liefert einen Hinweis möglicher Beiträge beider Zentren zu dieser Kopplung. Bei dem folgenden Arbeitspunkt sind deutlich voneinander separierte Signale im Außenbereich $< \pm 5$ MHz nicht mehr erkennbar, sondern vermischen sich bei $g = 1.979$ zunehmend (Abb. 6.2, IV). Bei diesem Arbeitspunkt neu auftretend ist im Bereich von 4.8MHz bis 5.9MHz im hochfrequenten Bereich ein ca. 1.1MHz breites, intensitätsschwaches Signal. Es zeigt zunächst ein unsymmetrisches Verhalten und ist bei den CW-Spektren nur schwach erkennbar. Dieses Signal, mit D bezeichnet, tritt ab $g = 1.967$ (344 mT) beidseitig in Erscheinung (Abb. 6.3, I). Bis $g = 1.934$ nimmt die Aufspaltung von D einen Maximal-Wert von ca. 13.1MHz an (Abb. 6.3, IV) und verläuft bis g_{\min} von FeSII wieder in den Innenbereich der Spektren. Aufgrund des Verlaufs über g_{\min} des ClusterI hinweg bis zum letzten Arbeitspunkt von ClusterII, kann diese Linien eindeutig FeSII zugeordnet werden. Bei $g = 1.9349$ ist neben Signal D eine weitere, mit C* gekennzeichnete Außenlinie vorhanden, die eine Aufspaltung von 8.6MHz mit relativ hohe Signalstärke aufweist und ca. 0.85MHz breit ist (Abb. 6.3, IV). Kopplung C* ist bis $g = 1.924$ mit einer Größe von ca. ± 4.25 MHz um ν_0 vorhanden (Abb. 6.4, I). Aufgrund des starken Abklingens von C* an Arbeitspunkten nach g_{\min} /FeSI deuten sich Signalanteile des FeSI-Clusters an.

Im nun wieder überlappungsfreien Bereich von FeSII sind neben dem bereits beschriebenen Signal D keine weiteren Außenlinien erkennbar. Verlauf D ist bei g_{\min} /FeSII nicht mehr detektierbar (Abb. 6.4, IV). An diesem letzten ENDOR-Spektrum sind drei Signalmaxima vorhanden, deren äußerste eine Aufspaltung von ± 3.1 MHz zeigt und Aufgrund hoher Intensität von mehreren Protonenbeiträgen stammen kann. Dies gilt ebenso für die beiden näher an ν_0 liegenden Signale.

Somit können also zusammenfassend 4 Kopplungen (A-D) aufgrund der Arbeitspunkte im ESR-Spektrum Metallzentrum FeSII zugesprochen werden. Die Kopplung D wurde bei dieser Messreihe trotz unterschiedlicher Einstellung von Geräteparameter und Temperaturen nur ungenau skizziert und soll bei den Puls-Messungen weiter beschrieben werden. Die Kopplungen A*-C* können aufgrund ihrer Lage zumindest teilweise FeSI zugeordnet werden und lassen sich bei den niedrigmodulierten Spektren detaillierter nachvollziehen.

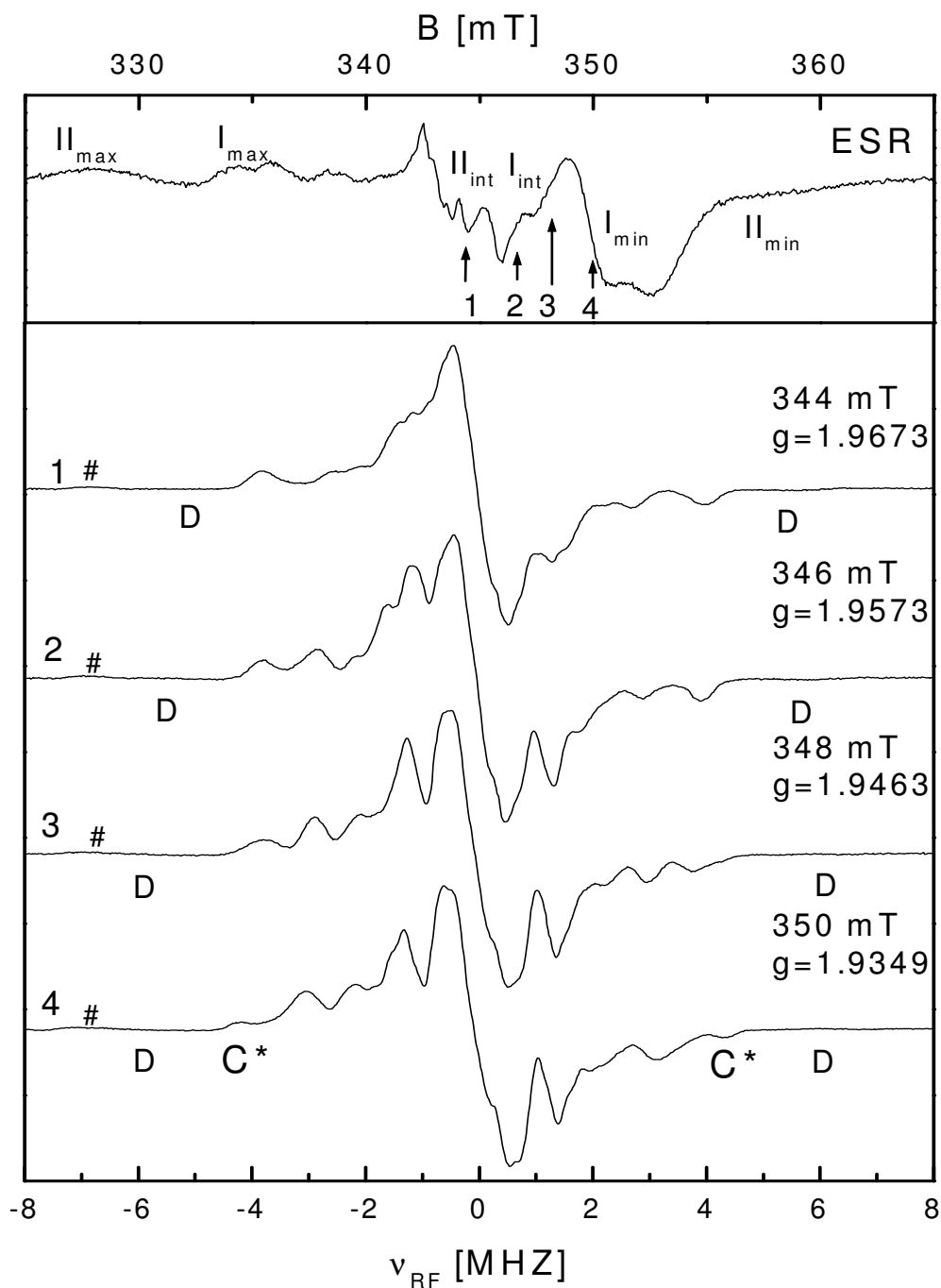


Abb. 6.3: ESR-Spektrum (obere Graphik, die g -Hauptwerte der FeS-Zentren sind mit FeSI bzw. II gekennzeichnet); experimentelle ENDOR-Spektren (untere Grafik). Die mit I-IV numerierten Pfeile geben die jeweiligen Arbeitspunkte im ESR-Spektrum an, die Bezeichnung D und C* beziehen sich auf die im Text beschriebenen Kopplung im Bereich FeSI und FeSII. Die mit einem # gekennzeichneten Bereiche stellen Störsignale dar.

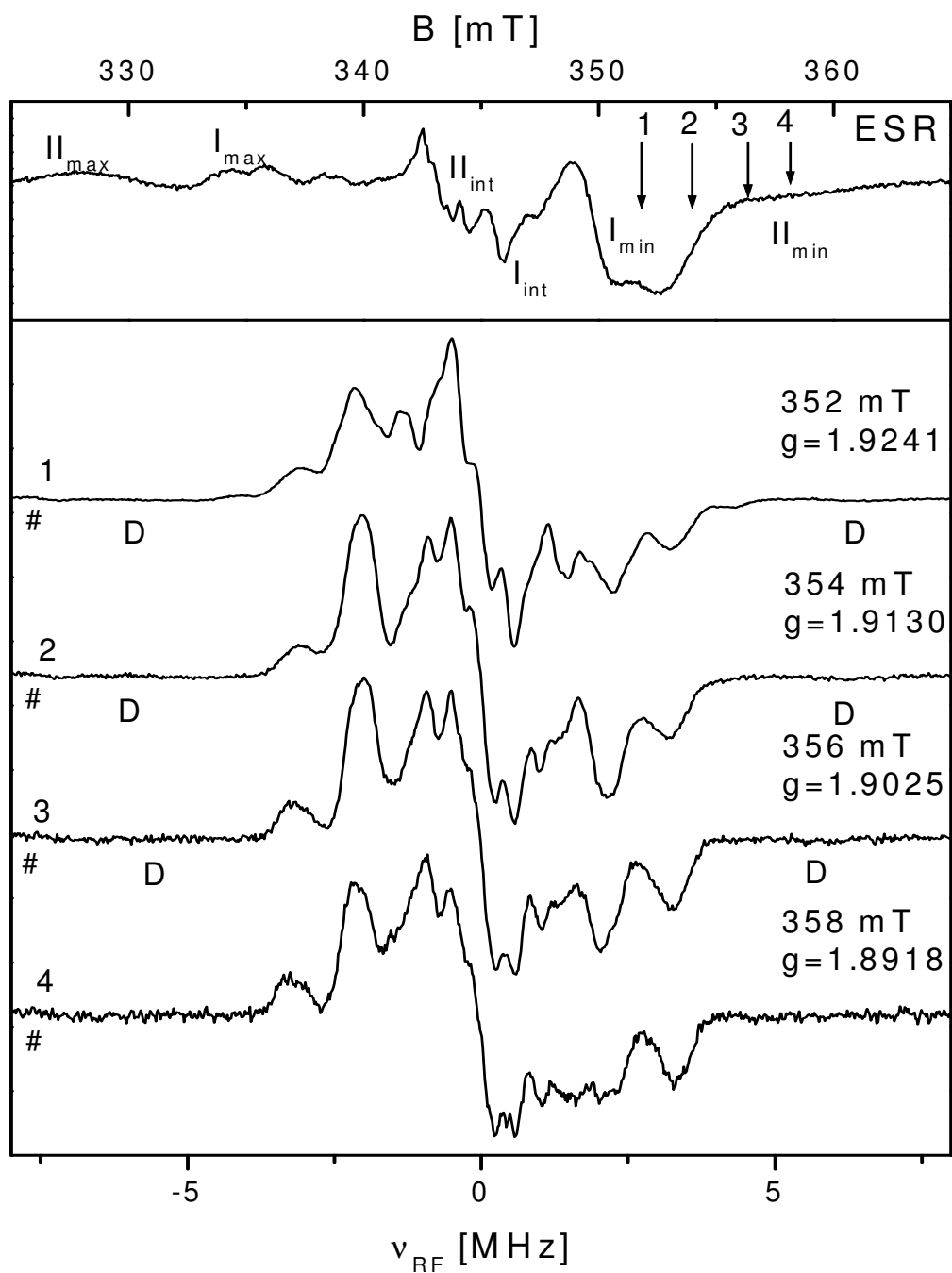


Abb. 6.4: ESR-Spektrum (obere Graphik), die g -Hauptwerte der FeS-Zentren sind mit I bzw II gekennzeichnet; experimentelle ENDOR-Spektren (untere Grafik). Die mit I-IV nummerierten Pfeile geben die jeweiligen Arbeitspunkte im ESR-Spektrum an, die Bezeichnung D und C* beziehen sich auf die im Text beschriebenen Kopplung im Bereich FeSI und FeSII. Die mit einem # gekennzeichneten Bereiche stellen Störsignale dar.

6.1.2 Hochmodulierte CW- ENDOR- Spektren in D₂O-Puffer

Die AOR-Spektren in D₂O-Puffer wurde mit den gleichen Geräteparametern wie die zuvor beschriebene Messreihe aufgenommen. In diesem Medium kann ein ¹H/²D-Austausch von Protonen erfolgen, die an ein N, S- oder O-Atom gebunden sind. Das quantitative Ausmaß der H/D-Austauschs lässt sich dabei nicht bestimmen. Die D₂O-Spektren sind allgemein meist schwächer in der Signalintensität als die Spektren der undeuterten Probe. Nach Normierung (Kap. 5.2.6) können die Spektren beider Proben jedoch miteinander verglichen werden und liefern Informationen über die Art der Protonenbindung. Im Fall eines unveränderten Signals lässt sich die entsprechende Resonanzlinie einem Proton zuordnen, das an ein C-Atom gebunden ist. Zeigen sich bei den Resonanzlinien Änderungen gegenüber der protonierten Probe, deutet dies auf einen N- oder O- Bindungspartner des Protons.

Zunächst soll wieder der überlagerungsfreie Bereich g_{\max} FeSII betrachtet werden. Während bei Signal A keine beidseitige Intensitätsminderung im Vergleich der deuterierten Probe zur nativen Probe erkennbar ist, lässt sich ein Rückgang der Signalthöhe von Signal B erkennen (Abb.6.5, oben). Auch Resonanz C zeigt bei den Austauschexperimenten einen leichten Intensitätsrückgang. Im Innenbereich des ENDOR-Spektrums erfolgt dagegen ein ausgeprägtes Abklingen des Intensitätsmaximums, dieses befindet sich im Bereich ± 1.4 MHz mit einer Linienbreite > 1.1 MHz. Der Innenbereich hat bei den folgenden Arbeitspunkten die gleiche Aufspaltungsgröße und zeigt auch hier einen Signlrückgang bei der deuterierten Probe. Die gleiche Beobachtung trifft ebenfalls auf Linie B und C zu, während bei Linie A kein eindeutiger beidseitiger Rückgang der Intensität erkennbar ist und somit deutlich wird, das an diesem Signal kein austauschbares Proton bzw. Protonen beteiligt sind.

Gleiche Aussagen lassen sich über Kopplungen A* und B* treffen. Bei A* ist keine Intensitätsänderung feststellbar, während bei B* ein Signlrückgang vorhanden ist (Abb. 6.5, unten). Der Intensitätsrückgang von B und B* ist nicht sehr stark ausgeprägt, kann aber mittels genauer Spektrenanalyse (Kap. 5.2.6) als Austausch-Merkmal identifiziert werden. Interessant für die Auswertung ist der Intensitätsrückgang der Innenlinie bei ± 1.9 MHz und im Bereich ± 1.3 MHz, dort wird das Signal nahezu vollständig vermindert (Abb. 6.5, unten).

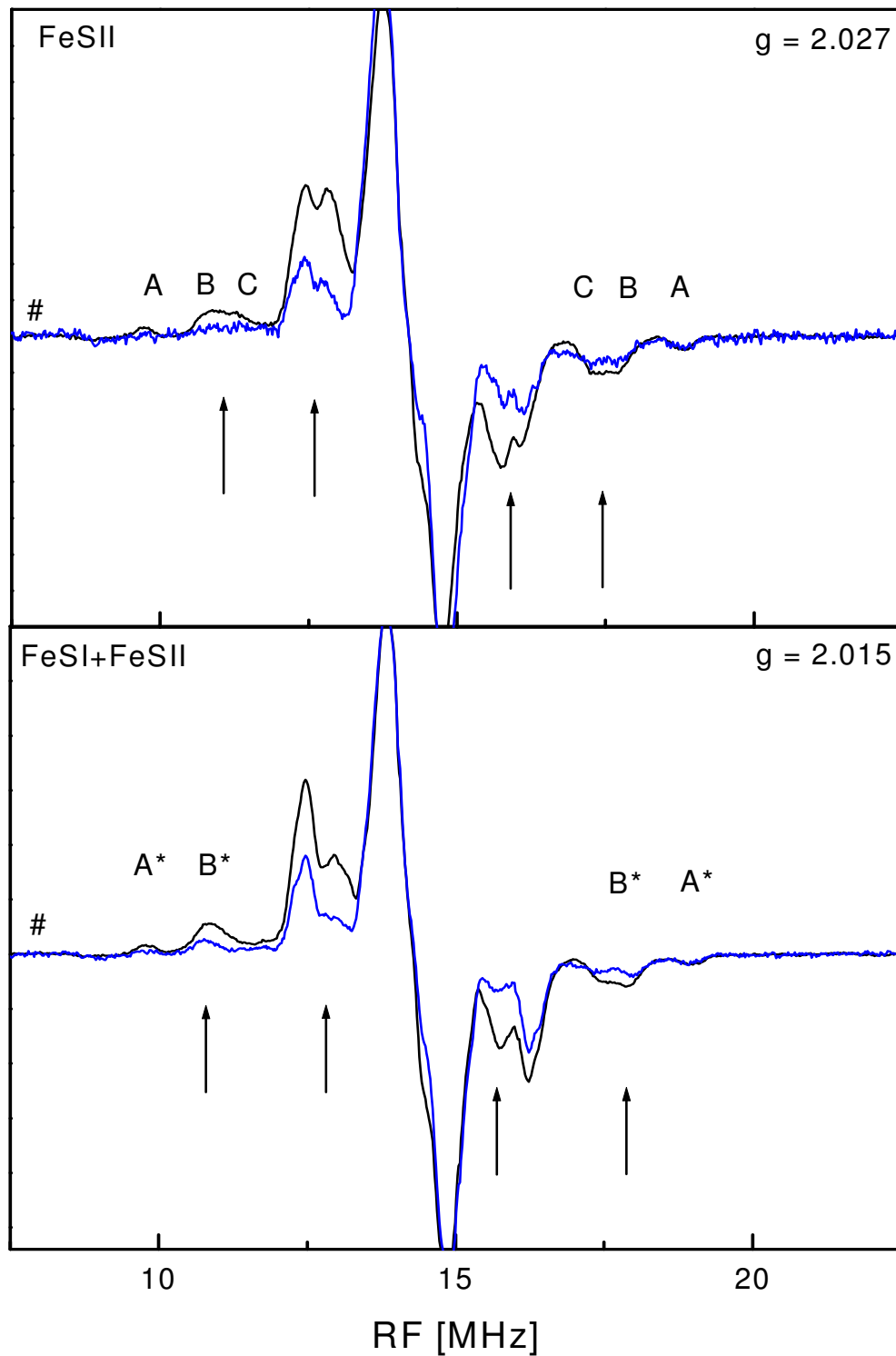


Abb. 6.5: ENDOR-Spektren an verschiedenen Arbeitspunkten in protoniertem (schwarze Linie) bzw. deuteriertem Medium (blaue Linie). Die Pfeile markieren Linien mit reduzierter Intensität (s. Text).

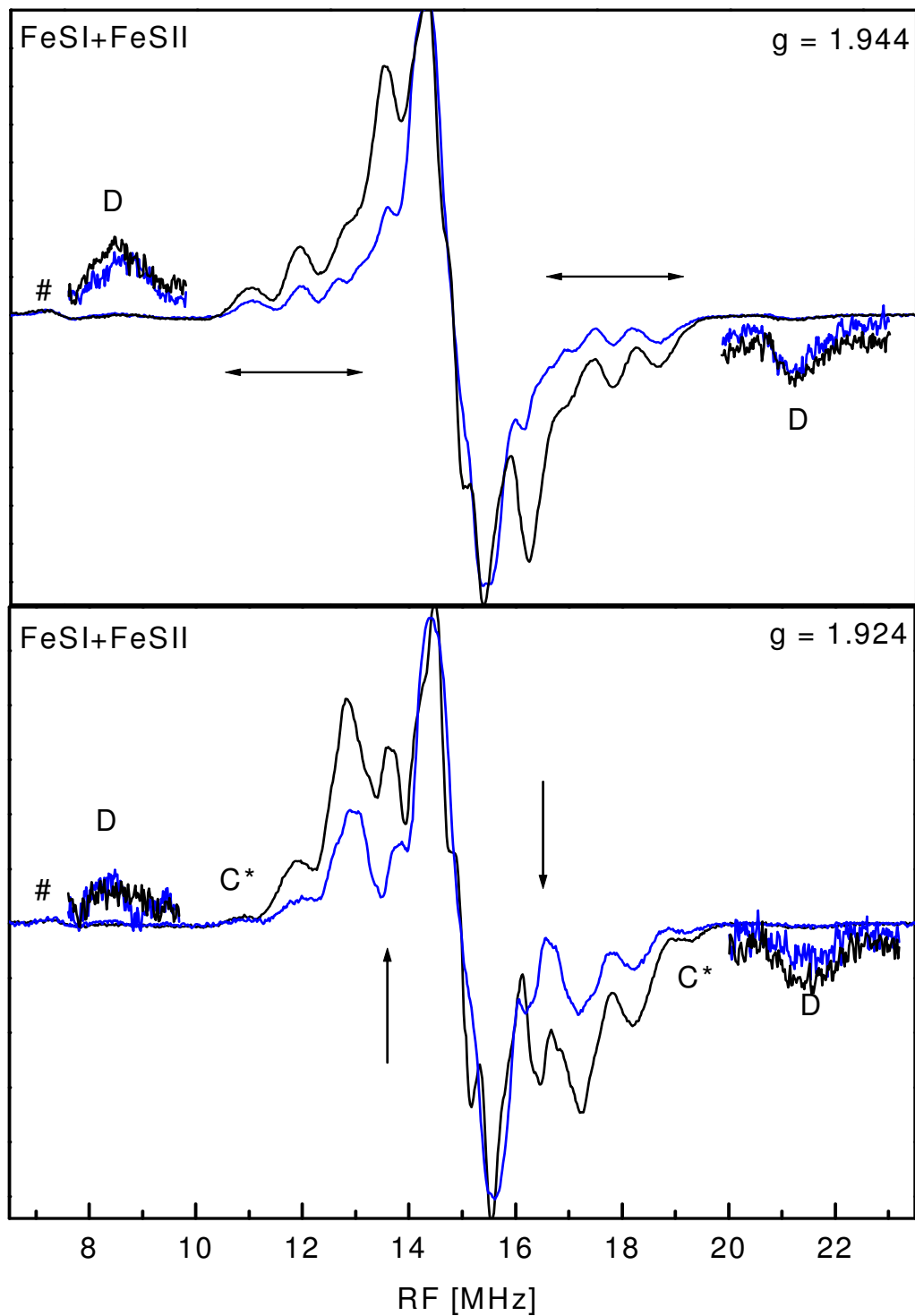


Abb. 6.6: ENDOR-Spektren an verschiedenen Arbeitspunkten in protoniertem (schwarze Linie) bzw. deuteriertem Medium (blaue Linie). Die Pfeile markieren Linien mit reduzierter Intensität (s. Text). Die intensitätsschwache Kopplung D ist jeweils um den Faktor 5 vergrößert.

Bei den Arbeitspunkten im intermediären Bereich beider Spektren zeigt sich weiterhin bei den Innenlinien ein starker Signalrückgang im Vergleich der deuterierten Probe gegenüber der undeuterierten Probe. Bei Kopplung D gibt es dagegen keine Hinweise auf Austauschbarkeit (Abb. 6.6, oben und unten), eine Signalabnahme über die Arbeitspunkten von g_{int} bis g_{min} ist nicht erkennbar. Bei Außenkopplung C^* ist ebenfalls keine signifikante Linienänderung erkennbar (Abb. 6.6, unten). Ein Intensitätsrückgang zeigt sich dagegen an diesem Arbeitspunkt $g_{\text{int}}/\text{FeSI}$ im Bereich $-1.37\text{MHz}/1.51\text{MHz}$ auf (Abb. 6.6, unten).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass A, A^* , C^* und D keine deutlichen Anzeichen für einen H/D-Austausch zeigen und somit aus einer C-H-Bindung resultieren. Bei B, B^* und C liegen dagegen Anzeichen vor, dass Signal-Anteile von austauschbaren Protonen vorliegen. Eindeutig erkennbar sind Änderungen des Innenbereichs. Über alle Arbeitspunkte ist bei RF-Frequenzen von -2.8MHz bis -1.2MHz und andererseits 1.1MHz bis 2.9MHz bei der deuterierten Probe ein deutlicher Signalrückgang zu beobachten. Aufgrund der hohen Signalintensität und der Linienbreite wird erkennbar, dass in diesen Frequenzbereichen mehrere Protonen Signalbeiträge liefern, von denen einige austauschbar sind.

6.1.3 Niedrigmodulierte CW- ENDOR- Spektren in H_2O -Puffer

Die zuvor beschriebenen Spektren mit einem Modulationshub von 400kHz zeigen im nicht-überlagerten Bereich von FeSII eine Darstellung der Außenlinien mit einer zufrieden stellenden Signalintensität und Auflösung. Ausnahme bildet die Aufspaltung D. eine weitere Erhöhung des Modulationshubs ergab keine Verbesserung bei der Detektion dieser Kopplung. Bei Erniedrigung des Modulationshubs werden Außenlinien $> 5\text{MHz}$ allgemein mit niedriger Intensität detektiert und wurden für eine Darstellung der äußeren Resonanzen nicht herangezogen. Mit der niedrigen Modulation der RF-Frequenz kann man dagegen innerhalb des Frequenzbereichs von ca. $10\text{-}20\text{MHz}$ eine höhere Auflösung der ENDOR-Spektren erhalten. Aus diesem Grund wurden niedrigmodulierte Messungen im Abstand von 1mT durchgeführt. Bei diesem Modulationshub zeigen die Spektren ein relativ schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. Dieser Umstand erfordert gegenüber den hochmodulierten Messreihen eine Erhöhung der Einzeladditionen um den Faktor 1.5 bis 2.

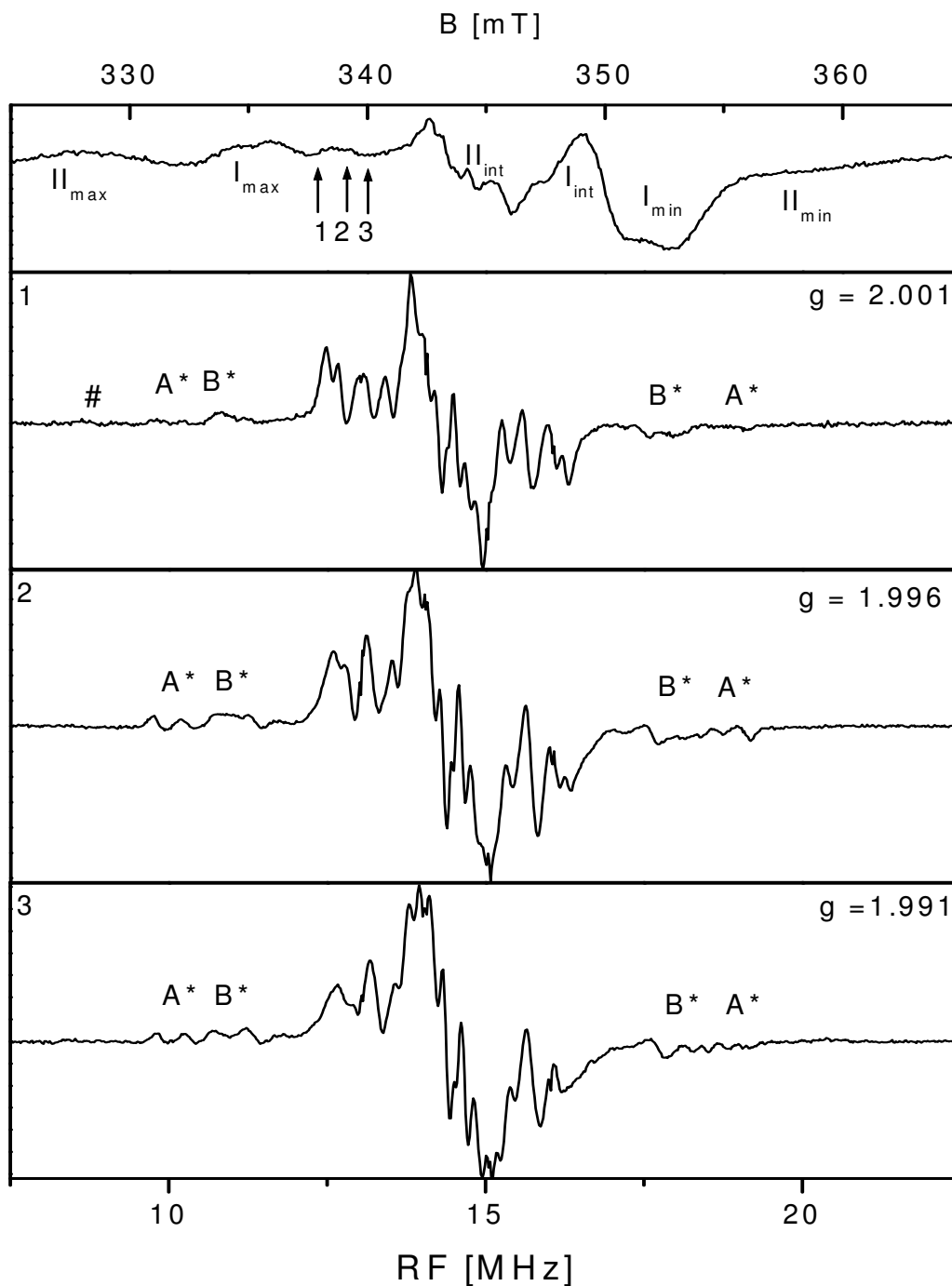


Abb. 6.7: Niedrigmodulierte Spektren im Bereich g_{\max} FeSI. Die mit I-III numerierten Pfeile geben die jeweiligen Arbeitspunkte im ESR-Spektrum an, die Bezeichnung A^* und B^* beziehen sich auf die im Text beschriebenen Kopplungen im Bereich FeSI und FeSII. Die mit einem # gekennzeichneten Bereiche stellen Störsignale dar.

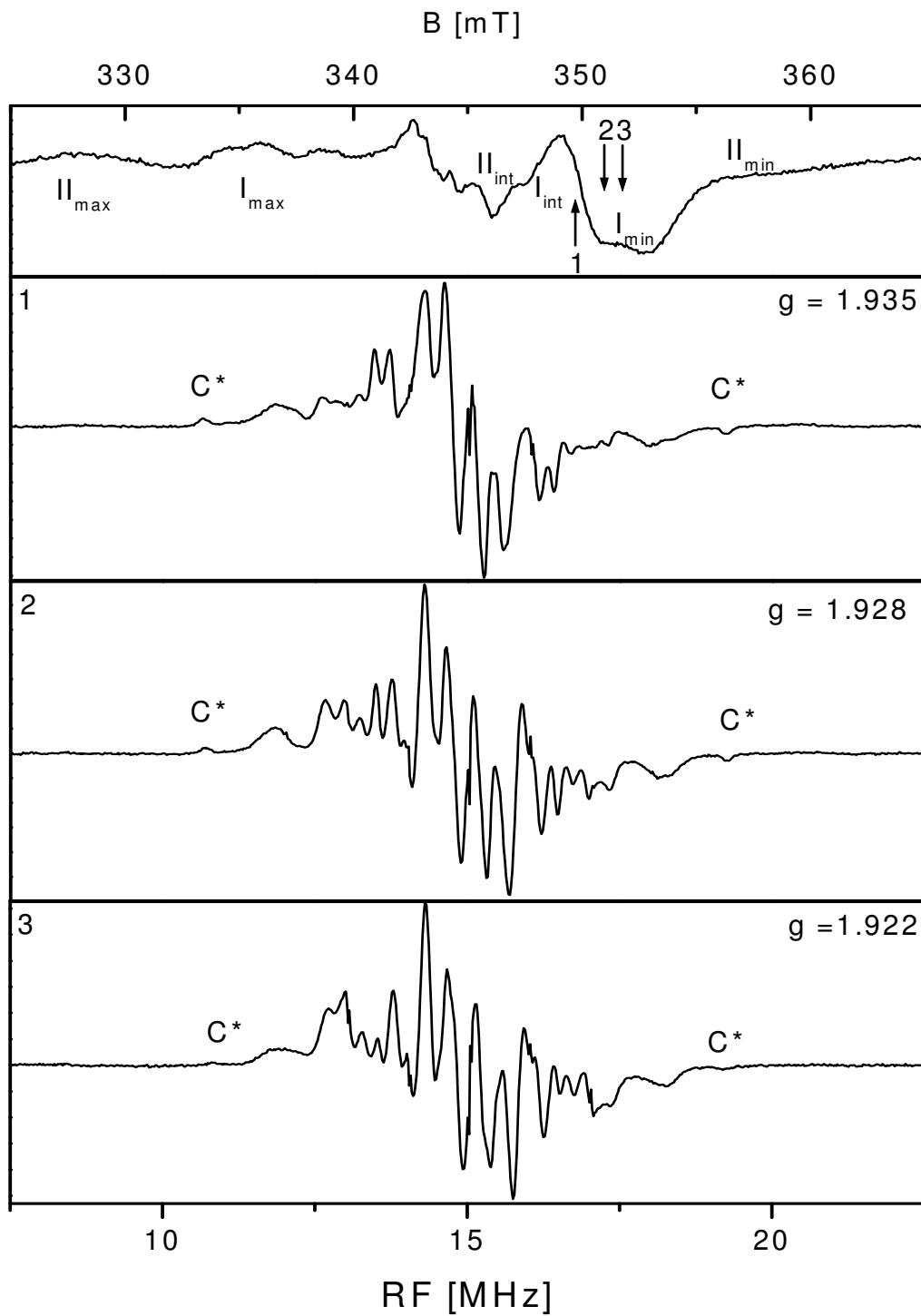


Abb. 6.8: Niedrigmodulierte Spektren im Bereich g_{min} FeSI. Die mit I-III numerierten Pfeile geben die jeweiligen Arbeitspunkte im ESR-Spektrum an, die Bezeichnung C^* bezieht sich auf die im Text beschriebene Kopplung im Bereich FeSI und FeSII.

Im Bereich g_{\max}/FeSII wurden die Kopplungen A-C bei dieser Messreihe nur mit einer relativ geringen Signalintensität erhalten und liefern keine zusätzlichen Informationen für FeSII. Ab g_{\max}/FeSI werden dagegen wichtige spektrale Details aufgedeckt. Kopplungen A* und B* werden zunächst nur schwach detektiert (Abb. 6.7, I). Bei den folgenden Feldpositionen werden diese Linien nun aber mit steigender Intensität und klarer Auflösung gemessen. Diese Entwicklung zeigt sich über den gesamten Bereich g_{\max}/FeSI . Während bei der 400KHz-Modulation zwei verbreiterte Linien erkennbar sind (vgl. Abb. 6.2 und Abb. 6.5), konnte bei der nun vorliegenden Einstellung diese Linien weiter aufgelöst werden (Abb. 6.7, II+III). A* wird mit 2 separierten Linien, B* auf der niederfrequenten Seite mit 2 und auf der hochfrequenten Seiten mit bis zu 4 Linien aufgelöst. Diese Linienentwicklungen deuten auf Anteile von Cluster I in diesem Bereich. Im Innenbereich ist ebenfalls eine bessere Auflösung vorhanden, im Bereich g_{\max}/FeSI sind bis zu 4 separierte Resonanzlinien erkennbar gegenüber 1 bis 2 verbreiterten Linien bei 400KHz Modulationshub.

Im Bereich von g_{int} bis $g_{\text{min}}/\text{FeSI}$ (Abb. 6.8, II+III) zeigt sich eine Auflösung von bis zu 16 Resonanzlinien im Innenbereich von ca. 5-15MHz. Eine Zuordnung zu den Zentren ist den experimentellen Spektren dabei nicht zu entnehmen, zumal bei diesen g-Werten auch Beiträge des Mo(V) slow-Signals vorhanden sein können. Im Außenbereich ergibt sich jedoch ein wichtiges Merkmal. Signal C* ist bei den niedrigmodulierten Spektren klar dargestellt und hat um $g = 1.93$ (Abb. 6.8, I und II) seine größte Aufspaltung mit 8,5MHz. Die Signalintensität dieser Resonanz ist bei $g_{\text{min}}/\text{FeSI}$ deutlich abgeklungen und über $g_{\text{min}}/\text{FeSI}$ bei den CW-Spektren nicht mehr erkennbar. Dieses Merkmal spricht für einen Anteil von FeSI zu dieser Linie. An weiteren Messpunkten bis $g_{\text{min}}/\text{FeSII}$ ergeben die niedrigmodulierten Spektren keine wesentliche Zusatzinformationen gegenüber den hochmodulierten Spektren. Die spektralen Merkmale beider Messreihen mit unterschiedlichen Modulationshuben können nun in einem Feld-Frequenz-Plot zusammengefasst werden (Kap. 6.1.5). Zuvor sollen im nächsten Kapitel die Ergebnisse der Puls-Spektroskopie aufgezeigt werden.

6.1.4 Puls-ENDOR-Spektren

Die von den CW-ENDOR-Spektren gewonnenen Daten bilden die Grundlage für die anschließende Simulation, zeigen aber Lücken bei der Detektion verbreiteter Außenlinien. Ziel der Puls ENDOR-Spektroskopie ist es daher, die Daten anhand einer weiteren

spektroskopischen Methode zu ergänzen, die Anzahl der beobachtbaren Resonanzen auf ihre Vollständigkeit zu überprüfen und eine Möglichkeit zu finden, die Signale der beiden [2Fe-2S]-Zentren zu separieren. Dabei wurden die in Kap. 5.2.5 beschriebenen Davies-Puls-Sequenzen eingesetzt. Bei dieser Pulssequenz können intensitätsschwache Kopplungen in einem Radiofrequenzbereich von 1-30MHz detektiert werden. Eine Möglichkeit der Separierung bei der CW-ENDOR-Spektroskopie ist durch unterschiedliche Temperatureinstellungen bzw. unterschiedlicher Mikrowellenleistung getestet worden. Eine Zuordnung der Clustersignale konnte bei diesen Versuchen jedoch nicht eindeutig erreicht werden. Die Puls-ENDOR-Spektroskopie soll als weitere Methode diese Fragestellung untersuchen. Ein Ansatz liegt in den unterschiedlichen Relaxationszeiten beider Zentren, die sich in dem unterschiedlichen Verhalten der ESR-Signale während einer temperaturabhängigen Versuchsreihe äußern (Kap. 3.3.3). Eine wichtige Erkenntnis aus den Puls-Spektroskopie-Experimenten ist zunächst die Tatsache, dass bei g_{\max} und g_{int} beider Cluster keine weiteren, bei den CW-ENDOR-Spektren eventuell nicht aufgedeckten Resonanzlinien im Außenbereich gefunden wurden (Abb. 6.9). Somit stellt die Resonanz D mit einem A_{\max} -Wert von 13.1 MHz die größte Kopplung dar. Wie beschrieben ist sie bei den CW-Spektren nur stark verbreitert aufgetreten. Dies gilt besonders für den niederfrequenten Bereich. Wie in Abb. 6.9 erkennbar ist, konnte die Puls-Spektroskopie Verlauf D deutlich darstellen. Zusätzlich konnte ein Bereich E im überlagerungsfreien Bereich bei g_{\min}/FeSII , der bei den CW-Spektren zunächst nicht kenntlich wurde, als verbreiteter Signal identifiziert werden. Während dieser Resonanzbereich vor den Arbeitspunkten von g_{\min}/FeSI in den CW-Spektren intensitätsstark vorhanden ist (Abb. 6.8) und mit C^* bezeichnet wurde, geht die Signalhöhe im überlagerungsfreien Bereich bei der CW-Messung fast gegen Null zurück. Wie den Puls-Spektren zu entnehmen ist, sind jedoch schwache Signale weiterhin vorhanden und können somit ClusterII zugesprochen werden. Die bei der CW-Spektroskopie detektierten Aussenkopplungen konnten also durch diese Resonanzlinie ergänzt werden, die Kopplungen A,B,C,A*,B* und C^* wurden bei den Puls-Spektren mit den bei den CW-Spektren beschriebenen Merkmalen detektiert. Der Innenbereich konnte bei der eingesetzten Puls-Sequenz dagegen nicht aufgelöst werden und zeigt keine weiteren signifikanten Resonanzlinien.

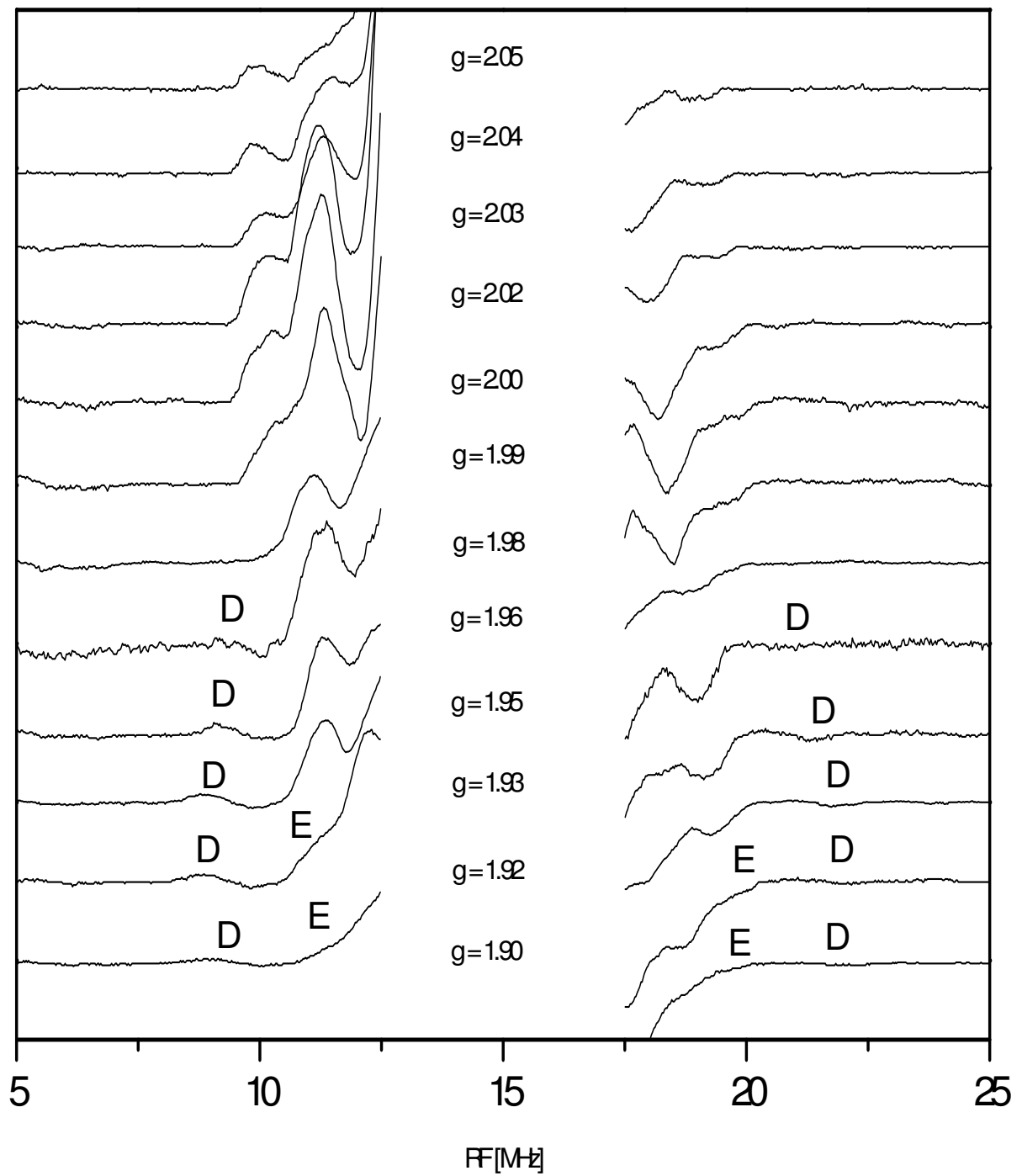


Abb. 6.9: Darstellung der Puls-ENDOR-Spektren über den gesamten g-Wert-Bereich in 1. Ableitung. Mit D und E sind intensitätsschwache Außenlinien gekennzeichnet (Beschreibung s. Text).

Die Davies-Sequenz wurde einerseits gewählt, weil sie geeignet ist, große Aussenkopplung zu erfassen. Gleichzeitig soll versucht werden, bei geeigneten Pulslängen und Pulsabstände die Unterschiede bei den Relaxationszeiten T_1 und T_2 selektiv nutzen, um Signale der beiden FeS-Cluster zu separieren. Die Puls-Spektren wurden nach dem Testen verschiedener Parameter mit zwei unterschiedlichen Pulsabständen ($\tau = 400\text{ns}$ und $\tau = 1200\text{ns}$) aufgenommen. Bei einem Pulsabstand von $\tau = 400\text{ ns}$ konnten alle Außenlinien mit zufrieden stellender Signalstärke dargestellt werden. Bei zunehmender Erhöhung der Pulsabstände bei Verwendung ansonsten gleich bleibenden Parametern reduziert sich die Gesamtintensität des Absorptionsspektrums, gleichzeitig verschlechtert sich das Signal-Rauschverhältnis. Zunehmend bis $\tau = 1200\text{ ns}$ zeigt sich dabei eine, wenn auch zum Teil geringe Änderung in der Spektrenform. Kennlich wird diese Änderung v.a. bei Kopplung D. Diese ist bei $\tau = 1200\text{ ns}$ nicht vorhanden (Abb. 6.10). Die Reduktion von Resonanz D bei $\tau = 1200\text{ ns}$ lässt sich über alle Arbeitspunkte hinweg beobachten. Da sie eindeutig Cluster FeSII angehört, ergeben sich somit Ansätze, dass bei diesem Pulsabstand FeSII unterdrückt, bzw. FeSI dominant detektiert wird.

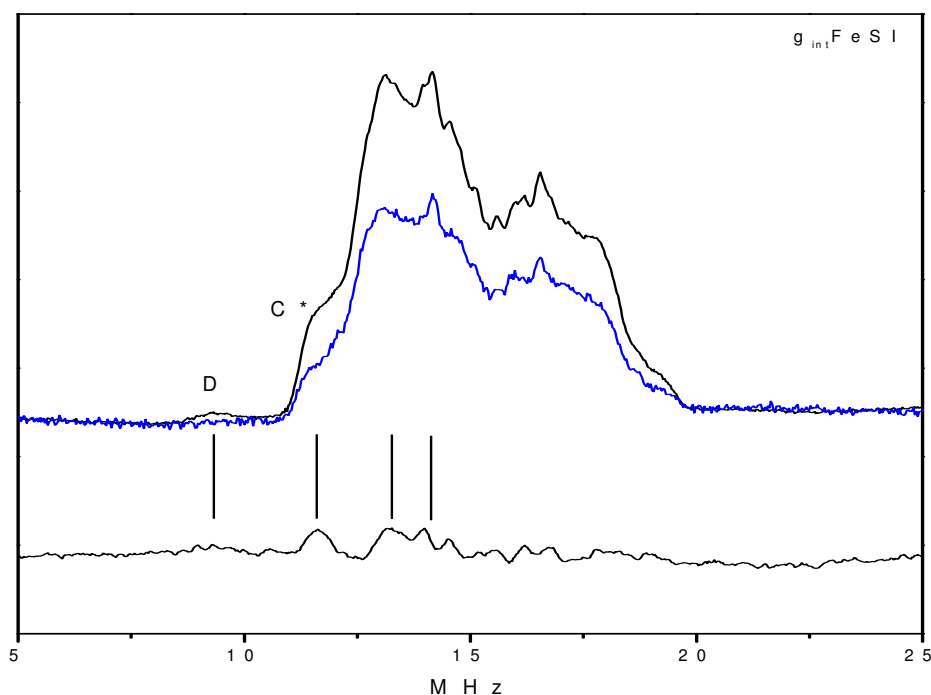


Abb.6.10: normierte Absorptionsspektren (oben, schwarze Linie bei $\tau = 400\text{ ns}$, blaue Linie bei $\tau = 1200\text{ ns}$) und Differenzspektren (unten). Die gekennzeichneten Signale deuten auf Anteile von FeSII

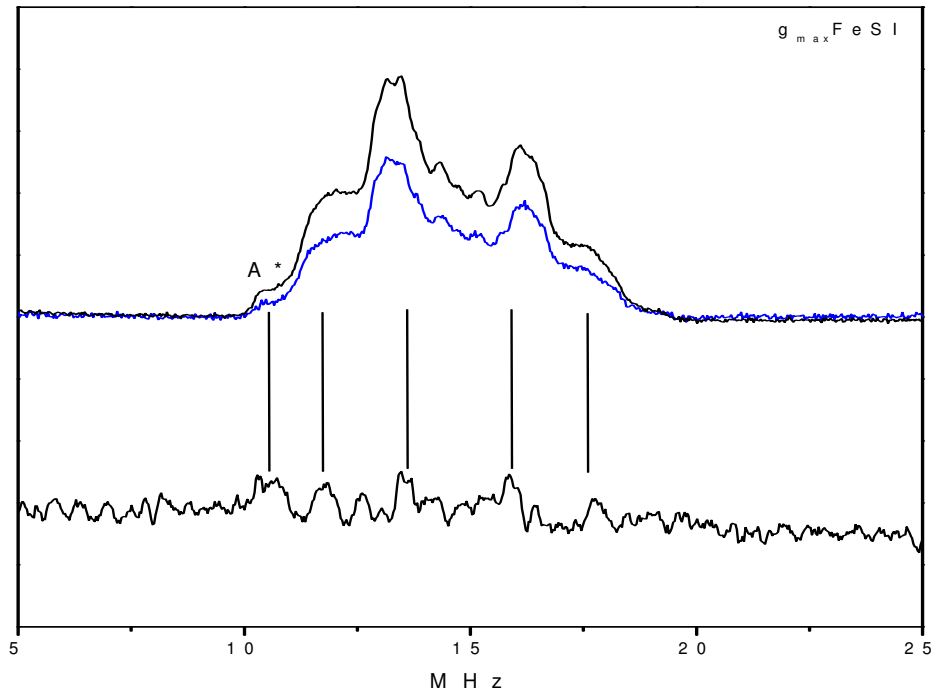


Abb. 6.11: normierte Absorptionsspektren (oben, schwarze Linie bei $\tau = 400$ ns, blaue Linie bei $\tau = 1200$ ns) und Differenzspektren (unten). Die gekennzeichneten Signale deuten auf Anteile von FeSII.

Signal C* ist dagegen bei $\tau = 1200$ ns vorhanden, die Signalstärke ist jedoch zurückgegangen und die Linienform leicht verändert. Resonanzlinie C* wird nach den CW-Daten von FeSI verursacht. Nach Normierung und Bildung von Differenzspektren weisen diese nun Signale auf, die von FeSI und FeSII stammen können (Abb. 6.10). Zu C* tragen demnach beide Cluster Beiträge, zu D nur FeSII bei. Für A* kann die selbe Aussage getroffen werden wie für C*, beide Cluster liefern Beiträge zu diesem Resonanzbereich (Abb. 6.11). Die Spektren deuten also auch bei diesem Arbeitspunkt auf die Möglichkeit, dass Signale von FeSI bei großen Puls-Abständen dominieren bzw. Signale von FeSII abgeschwächt werden. Diese experimentellen Ergebnisse müssen einer Analyse unterzogen werden, bevor eine Simulation durchgeführt werden kann, werden zunächst die experimentellen Daten in einem F-Plot zusammengefasst.

6.1.5 Feld-Frequenz-Plot (F-Plot) der AOR

Nachdem die beschriebenen spektroskopischen Verfahren die unterschiedliche Darstellung der Hyperfeinwechselwirkungen ergeben, werden die Linienverläufe der Außenlinien und z. T. des Innenbereichs in einem Feld-Frequenz-Plot in einer zweidimensionalen Darstellung wiedergegeben (Abb. 6.12). Mit dieser Darstellungsweise lässt sich der Verlauf der Hyperfeinkopplungen über den gesamten Magnetfeldbereich beschreiben. Die Vorgehensweise bei der Erstellung eines sog. F-Plots ist in Kap. 5.2.6 aufgeführt. Für jede Messserie wurde zunächst unabhängig voneinander ein eigener F-Plot erzeugt. Abb. 6.12 zeigt eine Zusammenfassung der beiden F-Plots der CW-Spektren. Dieser Gesamt-Plot wurde um die wesentlichen Erkenntnisse der Puls-Spektren ergänzt. Dabei ist die Linienbreite nicht berücksichtigt (Ausnahme bei D), zur übersichtlichen Darstellung werden nur die Frequenzbereiche der Signalmaxima aufgetragen. ENDOR-Resonanzlinien, die kleiner $\pm 1.0\text{MHz}$ um ν_0 auftreten, sind über den gesamten Magnetfeldbereich an gleicher Position vorhanden. Signale dieser Art stammen von verschiedenen Protonen mit Abständen bis 5 \AA und sind für die Auswertung i. d. R. nicht nutzbar. Sie werden bei der Simulation nicht einbezogen und sind deshalb im F-Plot nicht dargestellt. Essentielle Informationen enthalten dagegen die Verläufe im Außenbereich der ENDOR-Spektren. Wie in Kap. 3.32.3 aufgeführt, zeigen Signale von Cystein- β -protonen große Kopplungswerte, da sie beide Terme der Hyperfeinaufspaltung enthalten. Somit sind ihre Aufspaltungswerte charakteristisch größer als die von ausschließlich dipolar koppelnden Protonen.

Wichtig für die Simulation sind zunächst die überlagerungsfreien Arbeitspunkte bei g_{\max}/FeII und bei g_{\min}/FeII . Die Kopplungen A, B, C, haben im Bereich g_{\max} einen gekrümmten Verlauf, die Aufspaltung von A und B erreichen hier ein Maximum, bevor die Krümmung wieder nach innen verläuft. Signal C zeigt einen steileren Verlauf und ist aufgrund von Überlagerungseffekten weniger klar nachzuvollziehen. Im Bereich von ca. $\pm 2\text{MHz}$ um ν_0 sind bis zu 4 Signale mit deutlicher Verbreiterung und hoher Signalintensität vorhanden. Da frühere ENDOR Simulationen zeigten, dass Resonanzverläufe in diesem Frequenzbereich näherungsweise reproduziert werden können, werden sie bei Auswertung der ENDOR-Spektren berücksichtigt und ihre Signalmaxima im F-Plot aufgetragen. Ihre Verlaufsformen zeigen bis g_{\min} jedoch keine hervorragenden Merkmale. Zwischen g_{int} und g_{\min}/FeII kann der Verlauf D dagegen deutlich aufgezeigt werden. Die Punkte geben die

Mitte der Resonanzlinie wieder, die Linienbreite ist mit Balken dargestellt. Die Signalmaxima von E können aufgrund der geringen Intensität der Resonanz nicht exakt angegeben werden, dieser Bereich ist mit einem Kreis markiert.

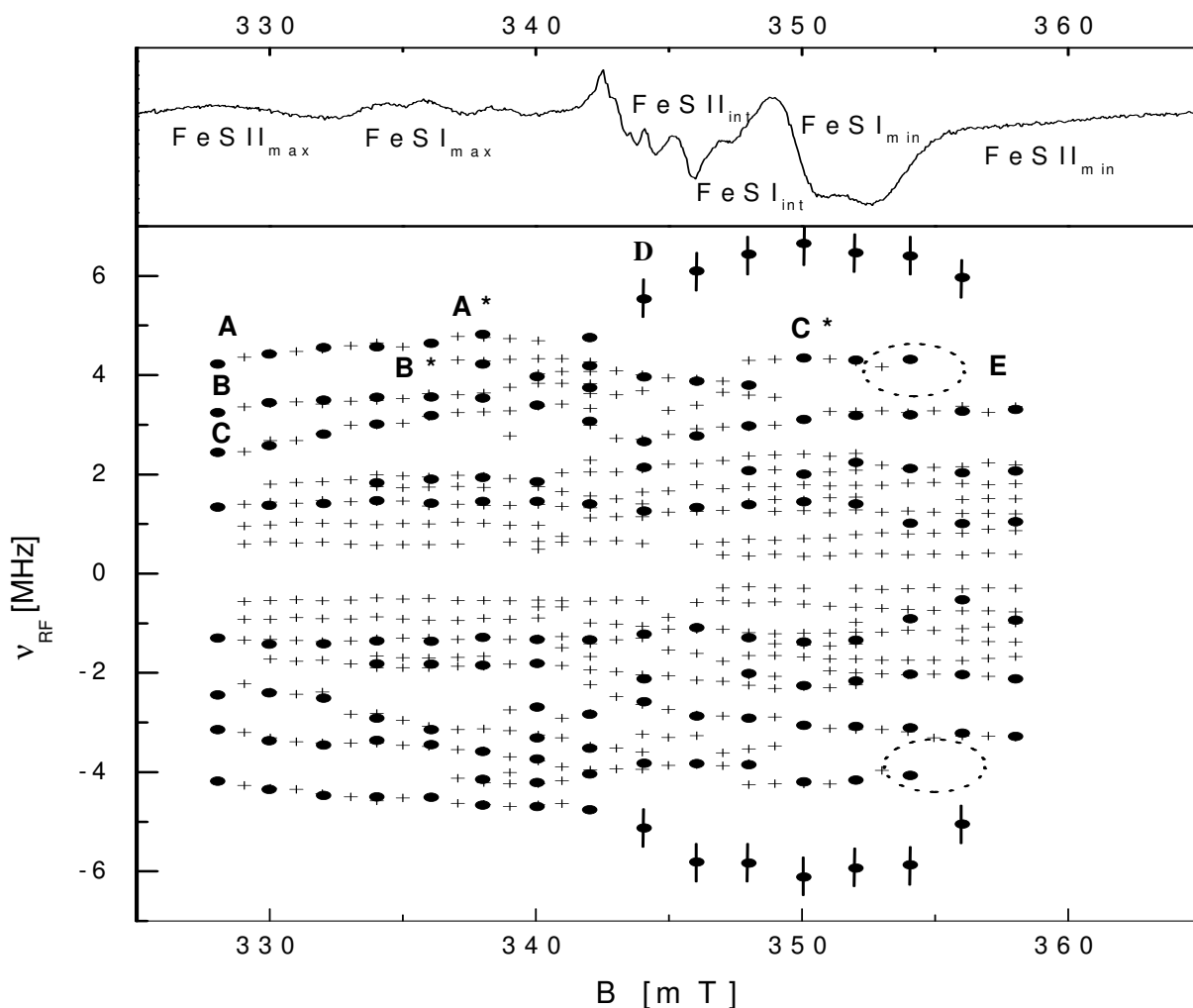


Abb. 6.12: Feld-Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR Spektren. Die mit Punkten gekennzeichneten Signale stammen aus der hochmodulierten Meßreihe (400 kHz), die mit Kreuzen angegebene Signale aus den niedrigmodulierten Aufnahmen (100 kHz). Die vertikalen Linien von D zeigen die Linienbreite an. Die Bezeichnungen A, B, C, D; E; A*; B* und C* beziehen sich auf die im Text beschriebenen Kopplungen. Die gepunkteten Kreise zeigen die Bereiche des verbreiterten Signals E an, das bei den Puls- ENDOR- Spektren detektiert wurden.

6. Ergebnis

Im Magnetfeldbereich zwischen 335mT und 352mT treten Signale beider Cluster überlagert auf, was sich in einer erhöhten Anzahl observierter Resonanzen widerspiegelt. Ein klarer Linienverlauf ist wegen der beschriebenen spektralen Überlagerung und der Linienverbreiterung nur bedingt möglich. Resonanz A* ist infolge seines erstmaligen Auftretens ab g_{\max} FeSI diesem zumindest teilweise zuzusprechen. Der Verlauf zeigt eine ähnliche Krümmung wie Verlauf A. Für Bereich B* kann diese Aussagen aufgrund überlagerter Resonanzen und deutlicher Verbreiterung dieses Signals nur bedingt getroffen werden. Hinweise auf Anteile des Signals C* zu FeSI ergibt sich durch die Tatsache, dass der Verlauf nach dem Arbeitspunkt g_{\min} /FeSI endet. Die beschriebenen Resonanzverläufe und ihre Analyse auf Austauschbarkeit stellen somit die aus der CW-ENDOR und der PULS-Spektroskopie erhaltenen Informationen dar, die neben den Strukturdaten als Basis für die anschließende Simulation dienen. In Abb. 6.13 werden zusammenfassend die Resonanzbereiche mit Hinweisen auf Beiträge austauschbarer Protonen zusammengefasst.

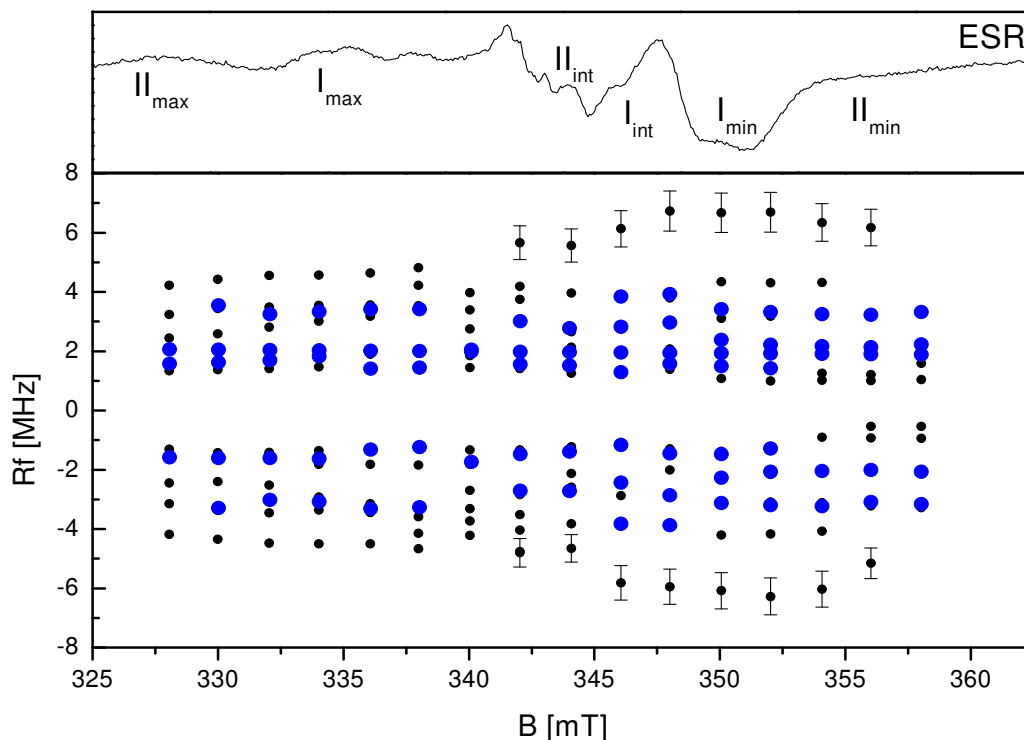


Abb. 6.13: Vergleich der beiden hochmodulierten Messreihen in H₂O-Puffer (schwarzer Plot) und D₂O-Puffer. Die blauen Punkte kennzeichnen Bereiche bei denen eine Signaländerung auftritt.

6.2 Simulation

6.2.1 Simulation FeS-Cluster II

Zunächst soll bei der Simulation der [2Fe-2S]-Cluster FeSII betrachtet werden, da aufgrund der größeren Anisotropie seines ESR-Spektrums überlagerungsfreie Bereiche bei den ENDOR-Spektren vorhanden sind (Abb. 6.1 und Abb. 6.4). In den Magnetfeldbereichen zwischen 328 mT (g_{\max} FeSII) bis 335mT und 353mT bis 358mT (g_{int} FeSII), die im überlagerungsfreien Bereich von FeII liegen, ist davon auszugehen, daß die ENDOR-Signale an diesen Arbeitspunkten ausschließlich von Cluster II stammen. Der F-Plot beschreibt die Form der dort auftretenden Signalverläufe, diese sollen nun bei der Simulation nachgebildet werden. Die Simulation FeSII der experimentellen Spektren orientiert sich zunächst an den äußeren Kopplungen A-D. Wie zuvor beschrieben, haben Kopplung A und B ihre maximale Größe zwischen g_{\max} und g_{int} (A ca. 9.1 MHz bei $g = 2.0256$, B ca. 6.9MHz bei $g = 2.0381$), bevor sie in den Innenbereich übergehen bzw. von Signalanteilen FeSI beeinflusst werden. Der Verlauf der Kopplungen C ist aufgrund überlagerter Beiträge des Innenbereichs und partieller Überlagerung mit Verlauf B weniger deutlich separiert, soll aber dennoch als ein Fixpunkt für die Simulation der ENDOR-Signale herangezogen werden. Verlauf D befindet sich zwischen g_{int} und g_{\min} von FeSII mit einer Maximalaufspaltung von 13.1MHz, die ENDOR-Spektren geben keinen Hinweis auf Beiträge austauschbarer Protonen zu dieser Kopplung. Daher müssen Cysteinprotonen zur Analyse dieser Resonanzlinie herangezogen werden. Verlauf D weist Aufspaltungsgrößen auf, die einerseits nur von Protonen stammen können, die, besitzen sie ausschließlich dipolare Wechselwirkung, Distanzen $< 3\text{\AA}$ haben müssen. Diese geringe Distanz tritt nur bei wenigen NH-Protonen auf, deren Beteiligung an diesem Signal jedoch aufgrund der Austauschexperimente auszuschließen ist. Signal A muss aus diesem Grund ebenfalls auf ein Cystein- β -Proton zurückgeführt werden. Somit standen Verlauf A und D als Startpunkte für die Simulationen fest, alle β -Protonen wurden auf Reproduktion dieser Verläufe getestet und dann um weitere Protonen ergänzt. Berücksichtigt werden muss dabei neben der Lage der Resonanzen die Linienbreiten aller 4 erläuterten Signalverläufe. Sie deuten daraufhin, daß ihr Auftreten möglicherweise durch mehr als eine Protonen- ENDOR- Resonanz verursacht sein kann.

Erstes Kriterium der Spektrensimulation ist die Festlegung der Valenzen auf die beiden Eisenatome sowie die Bestimmung der Lage des g -Tensor bezüglich der molekularen Struktur des FeSII-Zentrums, wobei dann isotrope Kopplungswerte für jedes Proton einzeln eingestellt werden. Für die Valenzzuordnung existieren für die AOR keine NMR-Daten. Die Mößbauerspektren weisen eine selektive Reduktion eines Fe-Ions nach, müssen aber die Frage offen lassen, um welches der beiden Metallzentren es sich handelt [5]. Bei der Strukturanalyse zeigt sich, daß beide Fe-Ionen in etwa gleich nahe an der Proteinoberfläche liegen und somit in Kontakt mit einem Elektronenakzeptor treten können. Bei der vorliegenden Auswertung der spektroskopischen Daten wurde zunächst Fe2 die negative Spindichte zugeteilt. Dieses Fe-Ion ist mit einem Cystein verbunden (Cys60), welches ein Cystein- β -Proton mit der kürzesten Distanz zu einem Fe besitzt (Cys60 β). Für Fe2 des FeSII-Zentrums wurden negative Spindichten von -0.5 bis -1.00 getestet, wobei dann für Fe1 positive Werte festgelegt wurden, die nach dem Spin-Kopplungsmodell summiert ca. 1.0 ergeben. Die Daten sind an die Simulationsparameter des in Kap. 3.1.3.3 beschriebenen apFdx angelehnt. Kopplung A und D können bei dieser Valenzzuordnung annähernd durch β -Protonen der koordinierenden Cysteine des Fe1 (Cys 40 und Cys 45) simuliert werden, indem zunächst g -Tensor- Orientierungen eingestellt wurden, die den Verlauf zwischen g_{\max} und g_{int} (Kopplung A) bzw. zwischen g_{int} und g_{\min} (Kopplung D) wiedergeben. Um den tatsächlichen Verlauf zu reproduzieren ist jedoch eine Addition sehr großer isotroper Hyperfeinanteile, speziell für die Reproduktion von Verlauf D, notwendig (> 6-8MHz). Frühere Studien weisen jedoch keine vergleichbaren A_{iso} -Werte dieser Größenordnung auf. Ein deutlicheres Ausschlußkriterium ist darüber hinaus, das die Grundbedingung der ENDOR-Simulation nicht erfüllt werden konnte. Diese fordert, daß g -Tensor- Orientierungen existieren müssen, mit der mindestens 3 Außenverläufe eindeutig reproduziert werden können. Mehr als 2 Linienverläufe bei den eingestellten g -Tensor-Lagen konnte bei dieser Valenzzuordnung jedoch nicht gleichzeitig wiedergegeben werden. Somit ist die Annahme, daß Fe2 reduziert wird, als Lösungsmöglichkeit auszuschließen

Die entsprechende umgekehrte Valenzzuordnung als die zuvor beschriebene muß somit einer Analyse unterzogen werden. Zunächst wurde für Fe1 eine Spindichte von -0.85 eingesetzt, Fe2 demzufolge ein positive Spindichte von 1.85. Nach dieser Zuordnung sind ebenfalls verschiedene g -Tensor-Orientierungen vorhanden, die einzelne Verlaufsmuster der Kopplungen A bis D wiedergeben. Anhand iterativer Methoden fand sich bei vorliegender

Valenzzuordnung eine g-Tensor-Lage, mit der alle 4 Außenlinien gleichzeitig simuliert werden können. Neben den Spindichten der beiden Eisenatome und der Lage des g-Tensors bezüglich des FeSII-Zentrums müssen dabei parallel die Werte der isotropen Hyperfeinanteile ermittelt werden, erst nach ihrer Addition können die einzelnen Linienverläufe in Aufspaltungsgröße und Verlaufsform reproduziert werden. Abb. 6.14 zeigt die Simulation bei g_{\max}/FeSII . Verlauf A lässt sich mit Cys48H β 1, Verlauf B mit Cys48H β 2 nachvollziehen, mit einem isotropen Kopplungsbeitrag von jeweils 1.7MHz bzw. 3.4MHz. Linie C ist schwieriger zu analysieren, da hier auch Innenlinien der beiden vorher genannten Protonen auftreten. Hauptanteil an Verlauf C haben zunächst die Außenlinien von Cys60H β 1 + H β 2 (Abb. 6.12). Zwischen g_{int} und g_{\max} reproduzieren diese beiden Signal D (60H β 1) mit $a_{\text{iso}} = 1.7\text{MHz}$ sowie Signal C* und E (60H β 2) mit $a_{\text{iso}} = 3.8\text{MHz}$ (Abb. 6.15). Für die 4 H β -Protonen des reduzierten Fe-Ions ist die Bestimmung des isotropen Hyperfeinanteils nur näherungsweise möglich. Der linienreichen Innenbereich wird teilweise durch die Cysteinprotonen des zweiwertigen Fe-Ions verursacht, zusätzlich spielen rein dipolar wechselwirkenden Protonen eine große Rolle bei der Entstehung dieses intensitätsstarken Bereichs. Wegen der geringen Auflösung und der Überlagerung von mehreren Protonen lässt sich dadurch ein Verlauf einzelner Signale nur bedingt nachvollziehen. Um einen hohen Grad an Übereinstimmung zwischen experimentellen und simulierten Spektren zu erhalten, wurden die β -Protonen von Cys40 und Cys45 sukzessiv in die Simulation mit einbezogen und die a_{iso} -Werte soweit angepasst, bis eine größtmögliche Optimierung eintritt. Die so ermittelten Beträge sind allerdings mit Toleranzwerten von $\pm 0,3\text{MHz}$ zu betrachten (Tab. 6.1)

Tab. 6.1: Fe-Ionen und isotrope Hyperfeinanteile der β -Cysteinprotonen FeSII

Fe1 (2 ⁺)	Fe2 (3 ⁺)
Cys40 H β 1; $A_{\text{iso}} = -1.6\text{MHz} \pm 0.3$	Cys48 H β 1 $A_{\text{iso}} = +1.7\text{MHz} \pm 0.2$
Cys40 H β 2; $A_{\text{iso}} = -1.9\text{MHz} \pm 0.3$	Cys48 H β 2 $A_{\text{iso}} = +3.4\text{MHz} \pm 0.2$
Cys45 H β 1; $A_{\text{iso}} = -2.4\text{MHz} \pm 0.3$	Cys60 H β 1 $A_{\text{iso}} = +1.7\text{MHz} \pm 0.2$
Cys45 H β 2; $A_{\text{iso}} = -2,3\text{MHz} \pm 0.3$	Cys60 H β 2 $A_{\text{iso}} = +3.8\text{MHz} \pm 0.2$

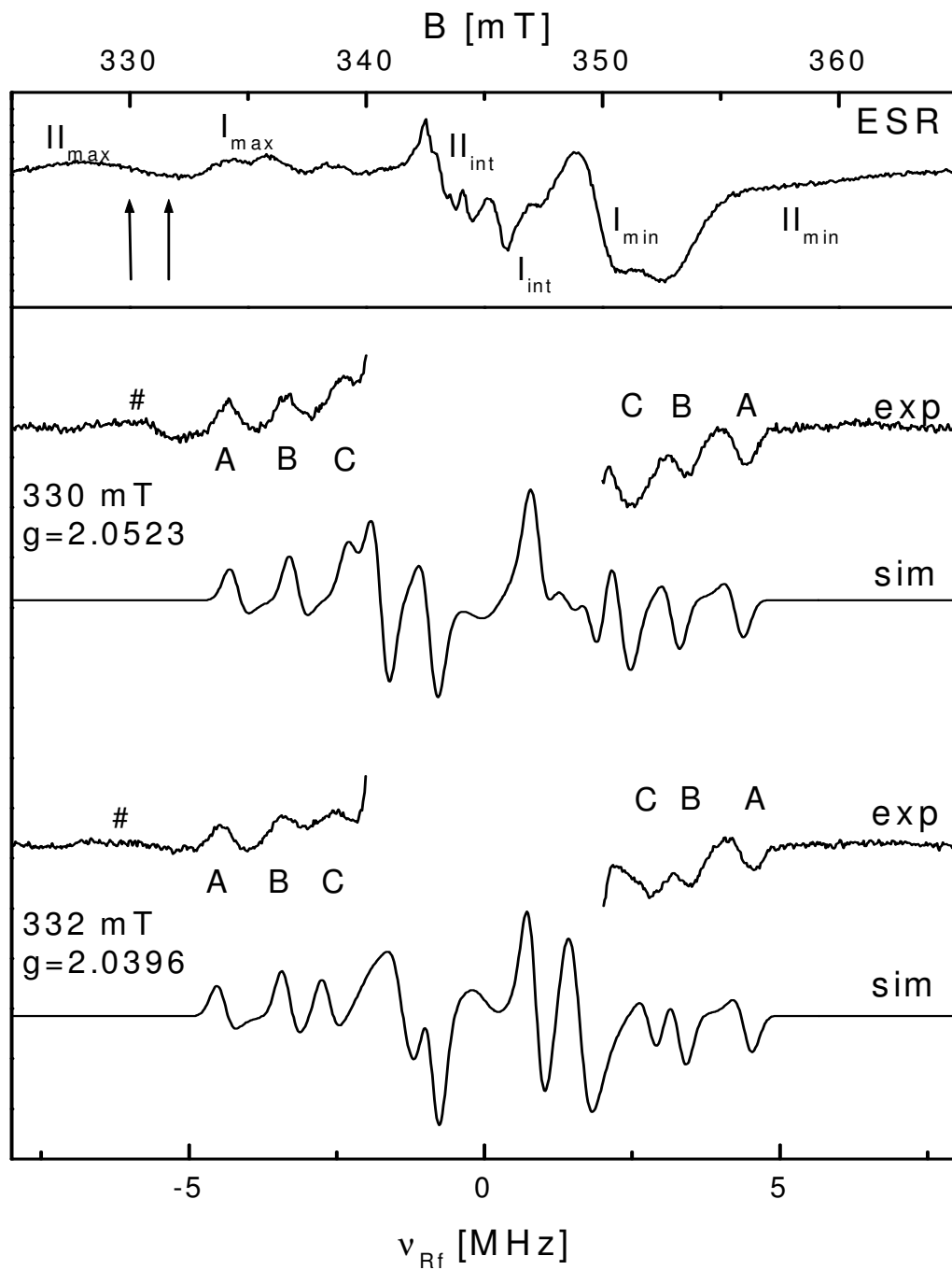


Abb. 6.14: ESR- Spektrum (oben) und Vergleich von experimentellen und simulierten ENDOR-Spektren (unten) an den Arbeitspunkten 330mT und 332mT. Die Simulation der äußeren Kopplungen A, B und C erfolgt durch die 4 Cystein- β -Protonen am Fe (III)- Zentrum (Cys48; Cys60). Zur Darstellung sind von den experimentellen Spektren nur die vergrößerten Außenlinien angegeben.

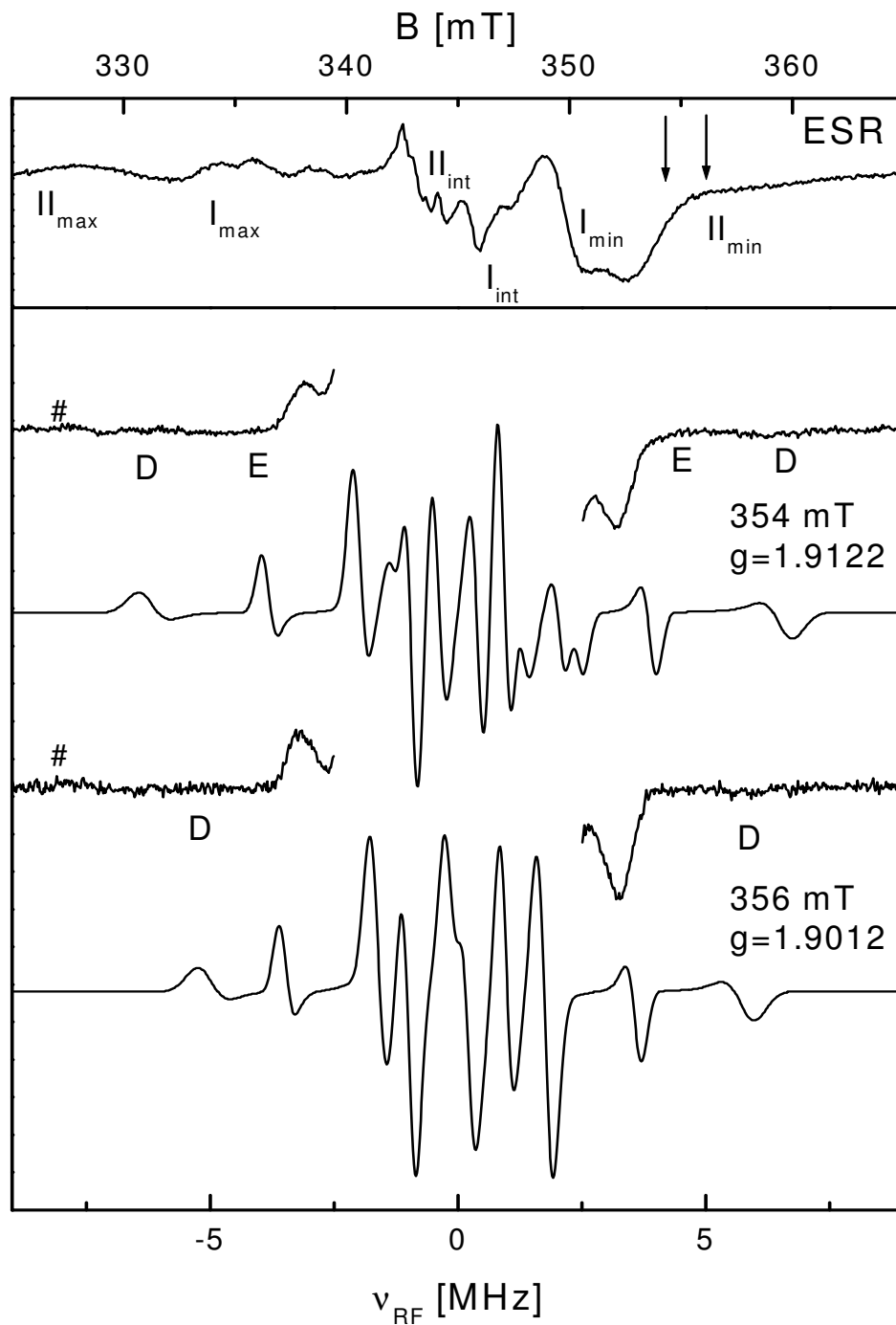


Abb. 6.15: ESR- Spektrum (oben) und Vergleich von experimentellen und simulierten ENDOR-Spektren (unten) an den Arbeitspunkten 354mT und 356mT. Die Simulation der äußeren Kopplungen A, B und C erfolgt durch die 4 Cystein- β -Protonen am Fe (III)- Zentrum (Cys48; Cys60). Zur Darstellung sind von den experimentellen Spektren nur die vergrößerten Außenlinien angegeben.

6. Ergebnis

Tab. 6.2: Zusammenfassung der Simulationsparameter FeS-ClusterII

g-Tensor		$g_{\max}, g_{\min}, g_{\text{int}}$			
		2.0645, 1.969, 1.89			
Orientierung bzgl. pdb.-Strukturdaten		0,6683	0.5221	0.5299	
		-0.3008	0.8412	- 0.4494	
		-0.6804	0.1409	-0.7192	
Spindichte					
Fe1		-0.85 ± 0.1			
Fe2		1.9 ± 0.1			
Proton (Kopplung)	A_{iso} [MHz]	A_{Dip} [MHz]	Orientierung A_{Dip} bzgl. des g-Tensors		
1 β 48 (A)	1.7	7.1759	0.3327	-0.9178	-0.1650
		0.0594	-0.0594	-0.2040	-0.9779
		0.9412	0.9412	0.3408	0.1284
2 β 48 (B)	3.4	3.5053	0.1894	-0.9706	0.1183
		-1.7301	-0.3192	0.0524	-0.9423
		-1.7466	0.9286	0.2350	0.3132
1 β 60 (D)	1.7	11.747	0.7605	0.5062	-0.3666
		-5.9558	-0.6417	0.6995	-0.3239
		-6.2514	0.6992	0.5045	0.8722
2 β 60 (C, E)	3.8	4.5447	-0.6044	0.7538	-0.1890
		-21848	0.7142	-0.4304	-0.5502
		-2.4458	0.3530	0.4965	0.8133

Nachdem die Parameter g-Tensorlage, Spindichte und isotrope Kopplung auf ihre Mittelwerte festgelegt sind, können die Werte der A-Tensoren bestimmt werden. Die Berechnung der A-Parameter erfolgt mit Hilfe des Simulationsprogramms. Die Simulationsdaten der Cystein- β -Protonen am Fe(III) Kern werden in Tab. 6.2 gezeigt. Die erhaltenen Daten können dann durch Transfer der \mathbf{g} -Richtungen in die Struktur einer Interpretation unterzogen werden. Der g-Tensor orientiert sich demnach an der Geometrie des [2Fe-2S]- Zentrums und den koordinierenden Cysteinliganden. Abb. 6.16 zeigt die g-Tensor-Orientierung. Die Darstellung enthält das auf die 4 Cysteinliganden reduzierte [2Fe-2S]- Zentrum, der Ursprung des g-Tensors wurde bei der Simulation dem dreiwertigen Fe²⁺-Kern, den Ort der größeren Spindichte, zugeteilt. Bei der ermittelten Orientierung zeigt g_{\max} etwa in Richtung der Bindung Fe-S(Cys) des Cystein 48, der Winkel zwischen der g_{\max} -Achse und der Bindung beträgt etwa 30°. In den Spektren äußert sich dies daran, daß die beiden β - Protonen des Cys48-Liganden ihr Maximum im Bereich von g_{\max} durchlaufen (Abb. 6.14, Kopplung A und B).

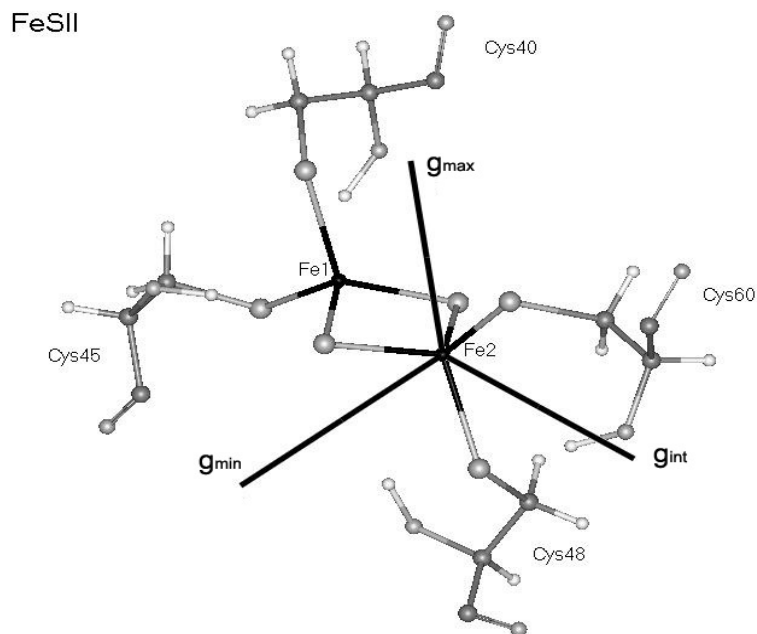


Abb. 6.16: g -Tensor-Orientierung in Bezug auf das FeSII- Zentrum: g_{\max} und g_{int} zeigen in Richtung des Cys48 bzw. des Cys60 -Liganden, g_{\min} liegt etwa 42° aus der Cluster Ebene verkippt.

Die g_{int} -Achse ist in Richtung des Cys 60-Liganden orientiert, der entsprechende Winkel zur Fe-S(Cys)-Bindung beträgt hier etwa 40° . Diese Raumlage des g -Tensors spiegelt in den Spektren die Tatsache wider, dass die beiden β -Protonen des Cys60 Liganden ihre maximale Kopplung im Bereich von g_{int} entwickeln (Abb. 6.12, Kopplung D und C* bzw. E). Die g_{\min} -Achse liegt annähernd in der Cluster-Ebene, der Winkel zwischen der Fe2-S1-Bindung sowie der Richtung von g_{\min} beträgt etwa 42° .

Die Simulation der Außenlinien des FeS-Clusters II ist im F-Plot (Abb. 6.17) aufgezeigt. Bei der Betrachtung des Plots und der g -Tensor-Orientierung ist erkennbar, dass die Hauptachsen des g -Tensors mit bestimmten Protonen assoziiert sind und dadurch die aufgezeigten Verlaufsmuster entstehen. Bei g_{\max} wurde der Verlauf der zwei Aufspaltungen A und B mit den Cys 48- β -Protonen simuliert, die dazugehörige g_{\max} -Achse zeigt in Richtung diese Cysteins. Je weiter nun die Arbeitspunkten der ENDOR Spektren von g_{\max} entfernt liegen, desto kleiner werden die Aufspaltungswerte dieser Protonen. Verlauf C und D werden von Cys60-Protonen simuliert, die g_{int} -Achse liegt in Richtung dieses Liganden. Hier zeigen sich die Maximal-Aufspaltungen im Bereich zwischen g_{int} und g_{\min} .

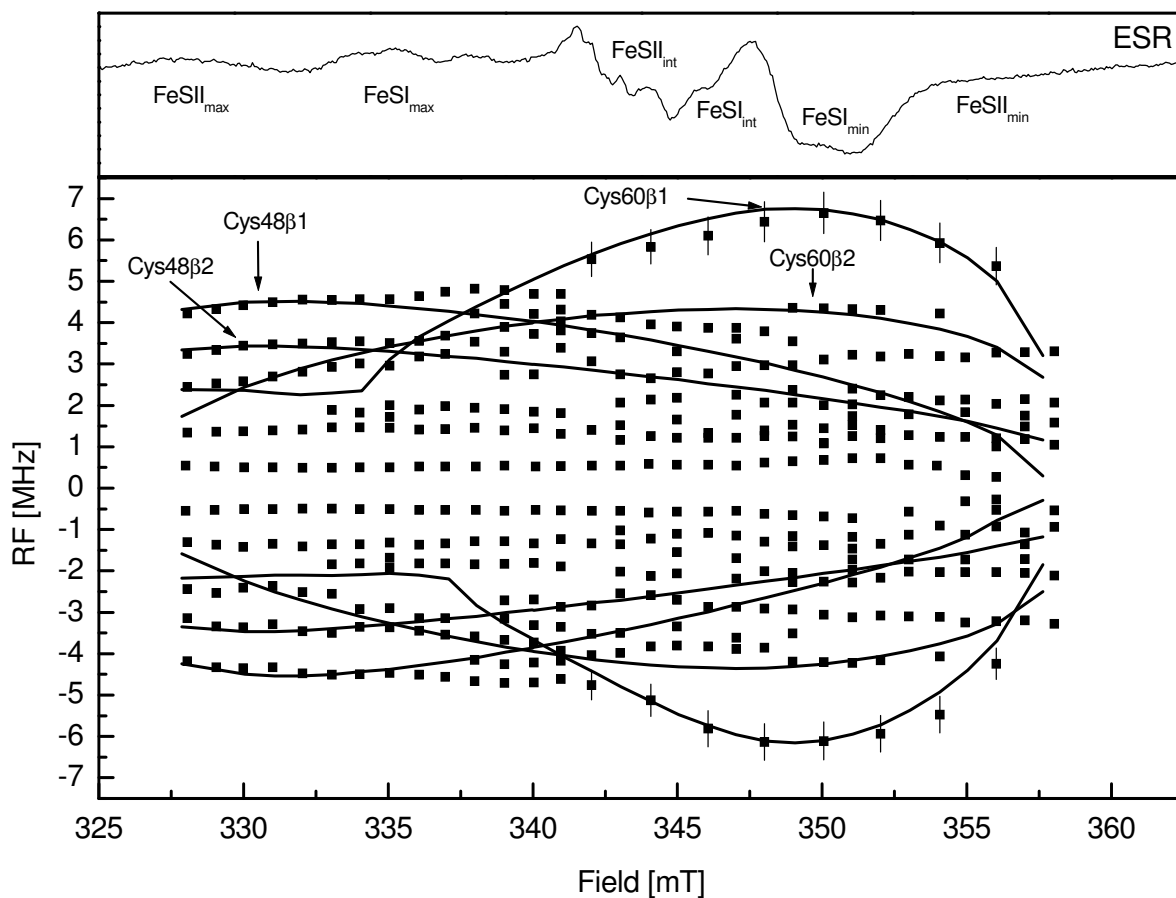


Abb. 6.17: Feld- Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR- Spektren der AOR mit einer Simulation der äußeren Kopplungen der vier Cysteinprotonen am Fe(III) des FeSII-Zentrums. Die Pfeile kennzeichnen die Bereiche der größten Aufspaltungswerte mit den dazugehörigen β -Protonen.

Neben der Anpassung der äußeren Kopplung A bis D müssen die gefundenen Parameter Spindichte und g-Tensor-Orientierung mittels der H7D-Experimente bestätigt werden. Abb. 6.18 und 6.19 zeigen Simulationen von an Stickstoff gebundenen Protonen. Die Wechselwirkungen austauschbarer Protonen mit dem Spinzentrum sind bei der vorliegenden Struktur rein dipolarer Natur. Die dipolar gekoppelten Protonen der Aminosäureseitenkette liefern jedoch nur signifikante Signale, wenn ihr Abstand zum Spin-Zentrum weniger als 4\AA beträgt. Zunächst sollen die Verläufe der NH-Protonen der 4 Cystein-Liganden beschrieben werden. Das an ein Stickstoffatom gebundenes Proton des Cystein 40 hat zu Fe1

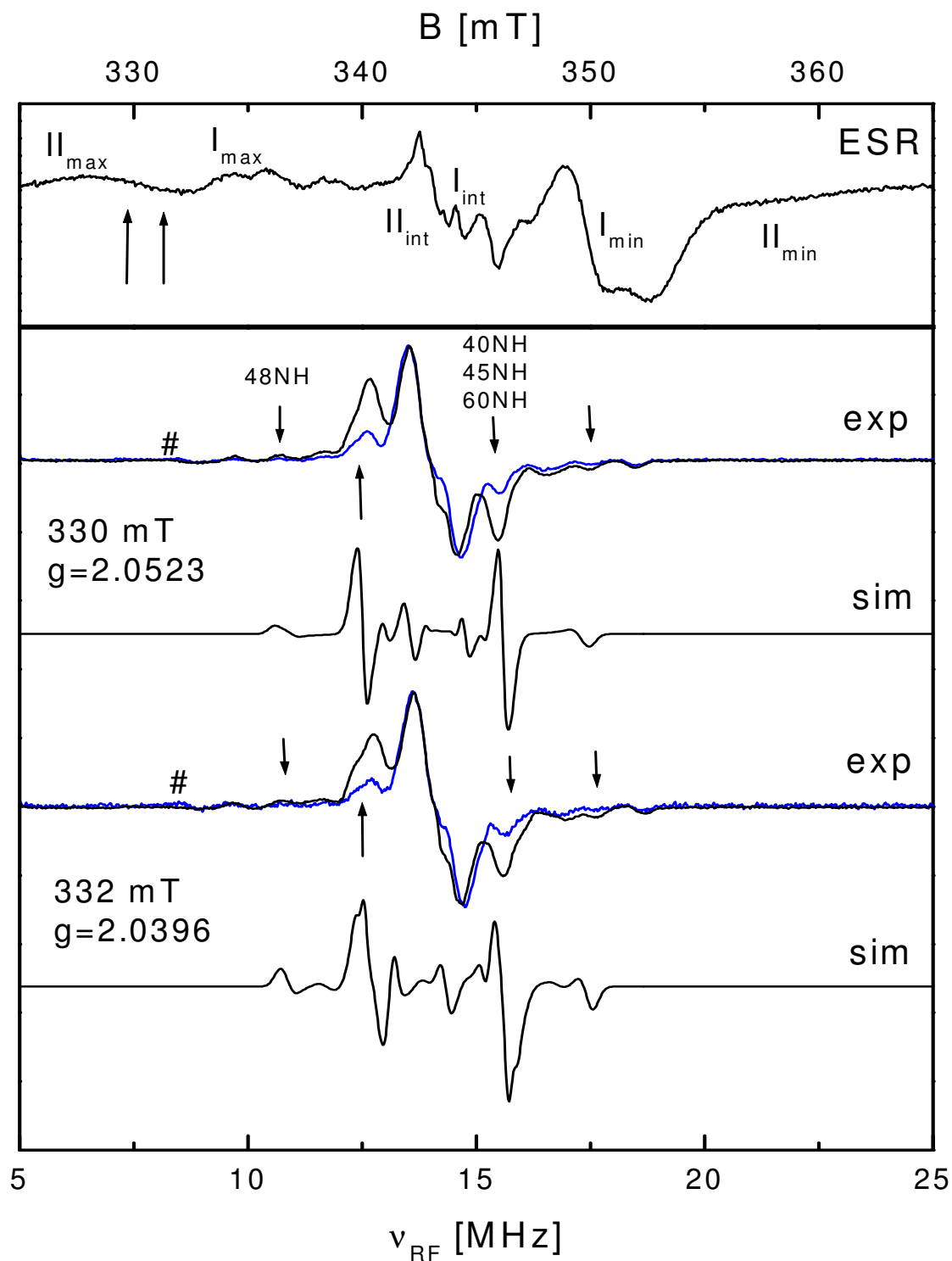


Abb. 6.18: ESR- (oben) und ENDOR-Spektren (unten) an den Arbeitspunkten 330mT und 332mT in protoniertem (schwarze Linie) bzw. deuteriertem Medium (blaue Linie). Die Pfeile markieren Linien mit reduzierter Intensität. Die Simulation erfolgt durch austauschbare NH- Protonen Cys40, Cys45, Cys48 und Cys60.

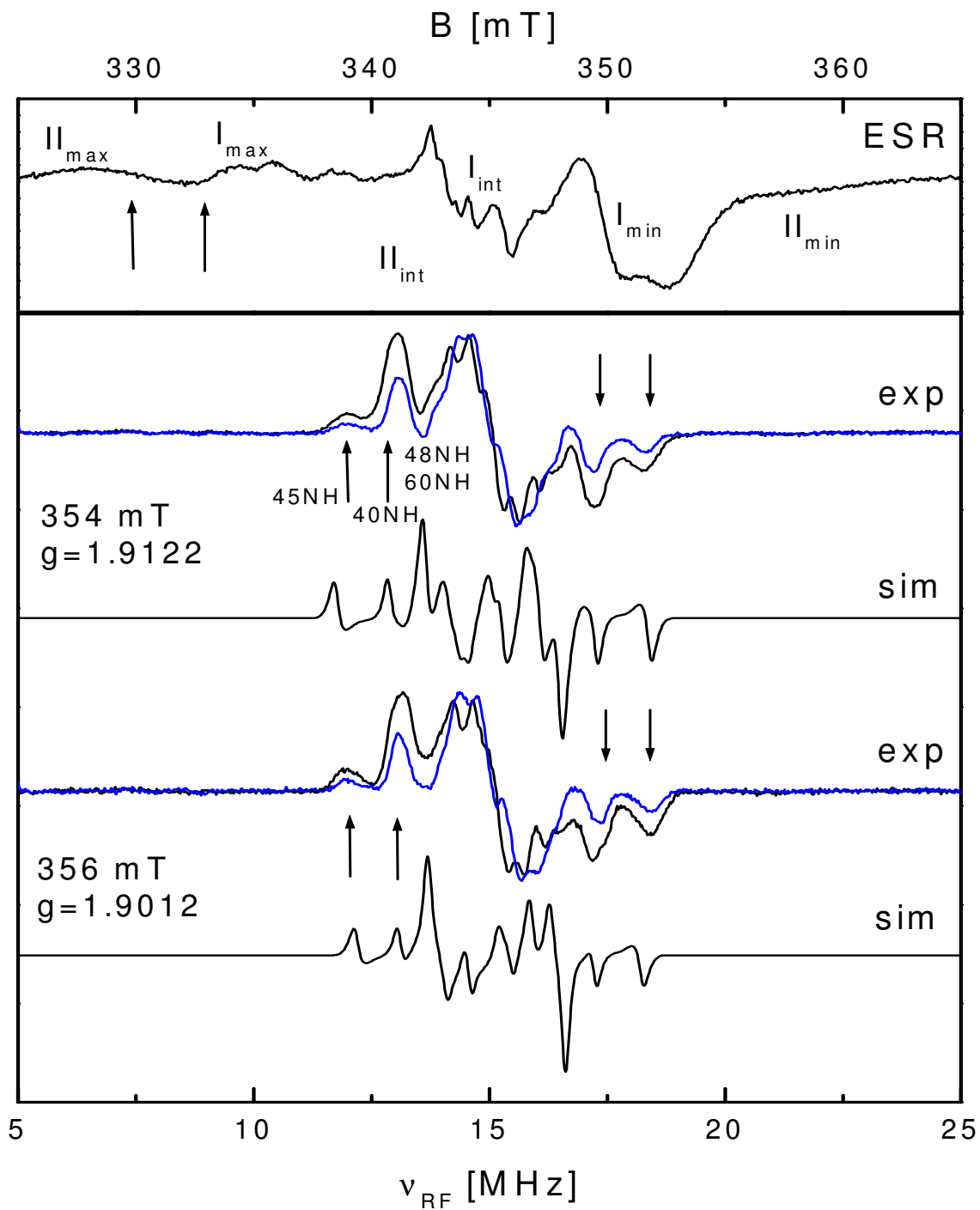


Abb. 6.19: ESR- (oben) und ENDOR-Spektren (unten) an den Arbeitspunkten 354mT und 356mT in protoniertem (schwarze Linie) bzw. deuteriertem Medium (blaue Linie). Die Pfeile markieren Linien mit reduzierter Intensität. Die Simulation erfolgt durch austauschbare NH-Protonen Cys40, Cys45, Cys48, Cys60.

einen Abstand von 2.67\AA , ist also das am nächsten gelegene Proton zu einem Fe-Ion und befindet sich 4.9\AA vom Fe2 entfernt. Nach hinzufügen dieses Protons in die Simulation zeigen sich seine Resonanzlinien über den gesamten Magnetfeldbereich an Positionen, an denen ein deutlicher Intensitätsrückgang bei den Spektren der deuterierten Probe zu beobachten sind. Die selbe Aussage trifft für das NH-Proton des Cys45 zu. Der Abstand zu Fe1 beträgt 2.7\AA und zu Fe2 4.3\AA . Wie bei Cys40NH zeigt dieses Proton von g_{\max} bis g_{int} Signale im Innenbereich, zwischen g_{int} und g_{\min} sind Signale beider Protonen in den intensitätshohen Außenlinien vorhanden (Abb. 6.15 und Abb. 6.16). Ein weniger deutliches Verhalten zeigt das Stickstoffproton von Cys60 und ergibt überwiegend Verlaufsmuster in den spektralen Innenregionen. Das austauschbare Proton des Cys48NH dagegen zeigt bei der Simulation Resonanzlinien, die dem experimentellen Linienverlauf B entsprechen. Verlauf B ist im Bereich g_{\max} FeSII beim H/D-Austausch über mehrere Arbeitspunkte hinweg in der Intensität zurückgegangen (Kap. 6.1.2). Aufgrund der Linienbreite ist anzunehmen, dass dieser Verlauf durch mehr als ein Proton verursacht wird. Verlauf B wird überwiegend durch Signale von Cys48 β 2 und Cys48NH reproduziert. Zusätzlich liefern teilweise Innenlinien der Resonanz A Beiträge zu diesem Signal B.

Die bisher beschriebenen 12 Cysteinprotonen reichen aus, eine befriedigende Simulation der äußeren Linien, des Innenbereichs um ca. $\pm 2.5\text{MHz}$ um ν_0 und der Austauschbarkeit zu liefern. Zwei weitere austauschbare Protonen (Cys43NH, Gln41NH), die nahe am Fe2 gelegen sind, lassen sich ohne Koordinatenkorrektur (s. Kap. 6.2.4) eingliedern und bestätigen nach ihrer Einfügung in die Spektrenreproduktion die gefundenen Parametersätze. Um eine weitere Verbesserung der Simulation zu erhalten, werden zusätzlich zwei nichtaustauschbare, rein dipolar koppelnde Protonen von Arg58 in die Simulation eingefügt (Tab. 6.3). Beide sind weniger als 4\AA von Fe2 entfernt und liefern eine deutlich Verbesserung der Simulation bei g_{\min} FeSII.

Tabelle 6.3 : Protonen für Simulation Cluster FeSII mit Distanzen zu Fe1 bzw. Fe2 in [\AA]

Cystein- Protonen Fe2, Distanz (\AA)	Cystein- Protonen Fe1, Distanz (\AA)	Austauschbare Protonen Distanz Fe2 (\AA)	Dipolare Protonen Distanz Fe2 (\AA)
48 β 1: 3.4	40 β 1: 3.82	40NH: 4.9 (Fe1:2.67)	Arg58 H β 1:3.47
48 β 2: 4.27	40 β 2: 4.53	45NH: 4.3 (Fe1:2.7)	Arg58 H γ 2:3.85
60 β 1: 2.85	45 β 1: 3.44	48NH: 3.39	
60 β 2: 3.87	45 β 2 :3.34	60NH: 3.39	

6.2.2 Simulation FeS-Cluster I

Nachdem die Linienverläufe im g -Wert-Bereich von FeSII simuliert werden konnten und diese auch im Bereich beider Metallzentren eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den experimentellen Spektren ergeben, schließt sich vor der Gesamtsimulation zunächst eine Bestimmung der magnetischen Parameter für das FeSI-Zentrum an. Bei den experimentellen Spektren und dem F-Plot fällt zunächst der Linienverlauf A* auf, dem kein Protonensignal von FeSII zugesprochen werden konnte. Dieser Linienverlauf soll zunächst als Ankerpunkt für die Simulation FeSI betrachtet werden, da das Signal erstmals bei g_{\max} FeSI in Erscheinung tritt. Die Maximalkopplung für Verlauf A* beträgt 9.5MHz und ist somit um ca. 0.4MHz größer als die von Verlauf A. Bereich B*, deren Verlauf undeutlicher erkennbar ist, kann durch die verbreiterte Linienform zumindest teilweise von FeSI verursacht werden. Wegen der großen Linienbreite kann A_{\max} für den Bereich B* nicht exakt festgelegt werden, der Signalebereich deckt sich in seiner Aufspaltungsgröße großteils mit dem von Verlauf B. Eine weitere Charakterisierung dieses Resonanzbereichs muß somit einer detaillierten Analyse unterzogen werden. Ein weiteres spektrales Kriterium für die Simulation FeSI stellt Verlauf C* dar. Die Puls- ENDOR- Spektren, die einen Schwerpunkt auf die Darstellung von Verlauf D, E und C* legten, weisen nach, dass Anteile von FeSI beim Entstehen dieses Signals C* vorhanden sind (Abb. 6.8). Die 3 Signalverläufe A*, B* und C* müssen also bei der Simulation von FeSI reproduziert werden.

Neben den beschriebenen experimentellen Vorgaben ist ein entscheidendes Kriterium zu Beginn der Simulation FeSI die in Kap. 3.3.4. beschriebene ESR-Simulation [85]. Die relative Anordnung der g -Tensoren beider Cluster, um die Aufspaltung des g_{\max} - Signals von FeSI zu reproduzieren, wird durch die ESR-Simulation vorgegeben. Demnach muß g_{\max} von FeSI zum Verbindungsvektor R der beiden Zentren einerseits einen Winkel von $145-153^\circ$ annehmen, zudem müssen die beiden Tensoren- Hauptachsen $g_{\text{int}}/\text{FeSII}$ und g_{\max}/FeSI etwa gleiche Richtungsorientierung besitzen und somit annähernd parallel zueinander verlaufen. Ein weiterer zu berücksichtigender Ansatz betrifft strukturelle Merkmale. Betrachtet man die Umgebung des Zentrums, fällt zunächst die Tatsache ins Auge, dass FeI den geringsten Abstand zum Molybdän- Kofaktor besitzt. Zusätzliche Aspekte, die berücksichtigt werden müssen, liefert ein Strukturvergleich beider Cluster. Dieser Vergleich soll bei der Diskussion der strukturellen Parameter ausführlich vorgestellt werden (Kap.7.1).

6. Ergebnis

Aufgrund der strukturellen Vorinformationen wurde zu Beginn der Simulation zunächst Zentrum Fe2 die positive Spindichte zugeordnet, Fe1 wurde als reduziertes Zentrum eingestuft, mit den entsprechenden Spindichte-Werte von FeSII. Neben dieser Valenzzuordnung wurde weiterhin eine g-Tensor-Orientierung genommen, die sich näherungsweise an die ESR-Simulation anlehnt. Ausgehend von diesem Parametersatz wurden die 4 Cystein- β -Protonen auf Reproduktion der Linienverläufe A*, B* und C* getestet. Linienverlauf A* konnte nach Addition eines isotropen Anteils von ca. 1.6MHz dem β 1-Proton des Cysteinliganden 103 zugeordnet werden. Nach Anpassung der Parameter in Feineinstellung konnte der Verlauf der Kopplung A* exakt simuliert werden. Danach wurde H β 2 des gleichen Liganden in die Simulation einbezogen und konnte nach Addition eines isotropen Kopplungsanteils von 3.4MHz Resonanzbereich B* zugeordnet werden (Abb. 6.20) Bei gleich bleibender Orientierung des g-Tensors und der Spindichte wurden nun die Cysteinprotonen des Cys137 mit einbezogen. Cystein 137 können Linienverläufe im Innenbereich zugeordnet werden, die schwieriger nachzuvollziehen sind, jedoch fehlende Resonanzmuster im F-Plot erklären. 137H β 2 bildet im Bereich g_{\min}/FeSI Resonanzlinien bei C* Als ebenso wichtig für eine eindeutige Simulation hat sich das α -Proton dieses Liganden erwiesen. H α Cys137 hat mit $r = 3.1\text{\AA}$ einen geringen Abstand zu Fe2 und sollte aufgrund seines Bindungsabstands zu Fe2 hauptsächlich dipolar mit diesem gekoppelt sein. Nach Einbezug dieses Protons in die Simulation konnte ohne größere Anpassung Signalverlauf C* reproduziert werden, a_{iso} -Werte von 0-0.4MHz sind dabei zulässig (Abb. 6.21).

Tab. 6.4: isotrope Hyperfeinanteile der Cystein- β -Protonen FeSI

Fe1 (2 ⁺)	Fe2 (3 ⁺)
Cys100 H β 1; $A_{\text{iso}} = -2.3 \text{ MHz} \pm 0.4$	Cys103 H β 1; $A_{\text{iso}} = +1.6 \text{ MHz} \pm 0.2$
Cys100 H β 2; $A_{\text{iso}} = -2.2 \text{ MHz} \pm 0.4$	Cys103 H β 2; $A_{\text{iso}} = +3.4 \text{ MHz} \pm 0.2$
Cys139 H β 1; $A_{\text{iso}} = -2.0 \text{ MHz} \pm 0.4$	Cys137 H β 1; $A_{\text{iso}} = +3.0 \text{ MHz} \pm 0.3$
Cys139 H β 2; $A_{\text{iso}} = -1.3 \text{ MHz} \pm 0.4$	Cys137 H β 2; $A_{\text{iso}} = +2.2 \text{ MHz} \pm 0.3$

6. Ergebnis

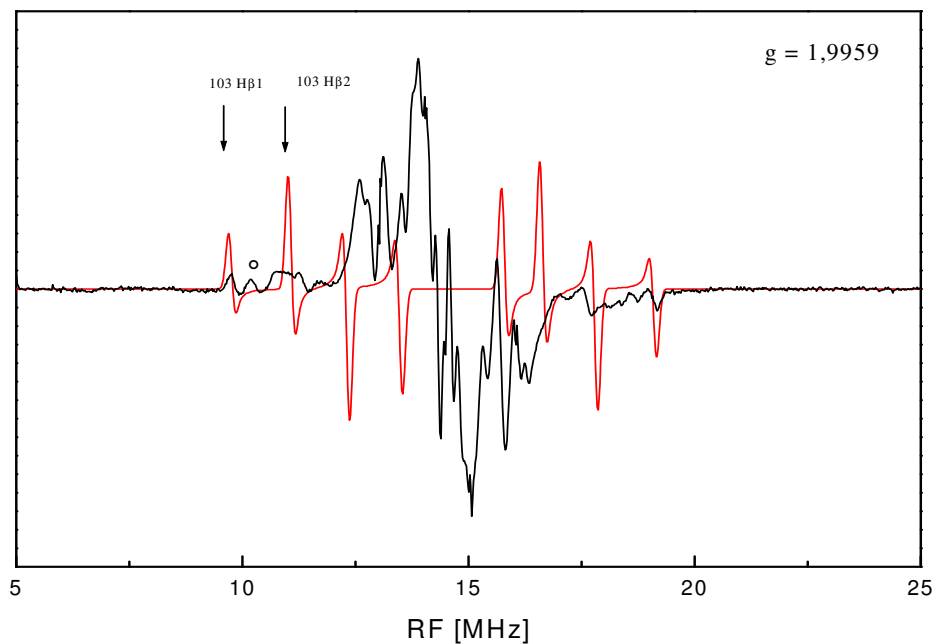


Abb. 6.20: Experimentelles Spektrum (schwarze Linie, Modulationshub 100KHz) und simuliertes Spektrum (rote Linie) für die beiden β -Protonen von Cysteinliganden 103 bei $g = 1,9959$ (die Markierung zeigt Signal A von FeSII)

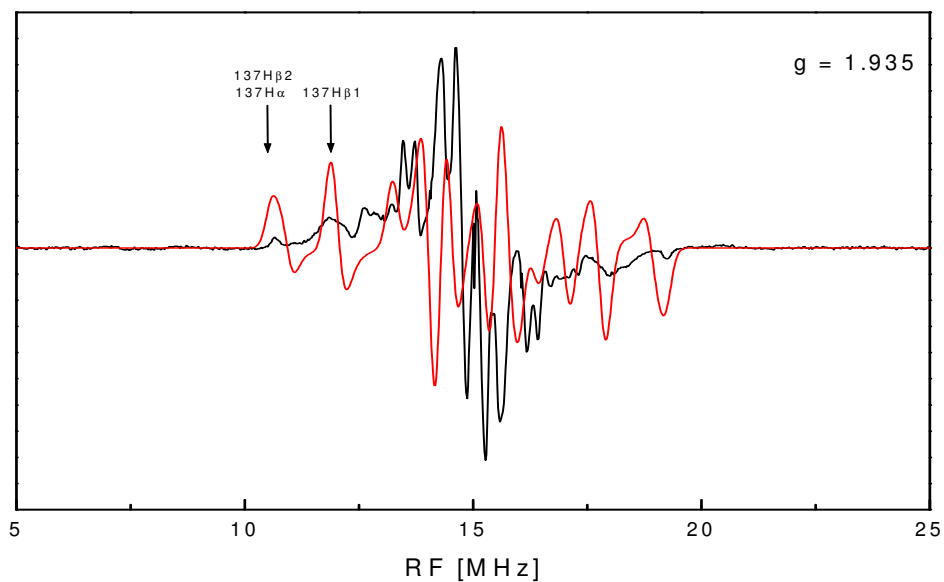


Abb. 6.21: Experimentelles Spektrum (schwarze Linie, Modulationshub 100KHz) und simuliertes Spektrum (rote Linie) für die beiden β -Protonen und das α -Proton des Cysteinliganden 137 bei $g = 1,935$

6. Ergebnis

Tab. 6.5: Zusammenfassung der Simulationsparameter FeS-ClusterII

g-Tensor	$g_{\max}, g_{\min}, g_{\text{int}}$	2.012, 1.938, 1.919			
		-0,6239	0.2027	0.7547	
	Orientierung bzgl.	0.731	0.4929	0.4719	
	pdb.-Strukturdaten	-0.2763	0.8461	-0.4557	
Spindichte					
Fe1	-0.8 ± 0.1				
Fe2	1.9 ± 0.1				
Proton (Kopplung)	A_{iso} [MHz]	A_{Dip} [MHz]	Orientierung A_{Dip} bzgl. des g-Tensors		
1 β 103 (A*)	1.6	7.9358	0.3297	-0.9418	-0.0292
		-3.5929	-0.2309	-0.1119	0.9642
		-4.1362	0.9186	0.3170	0.2635
2 β 103 (B*)	3.4	3.5324	0.1688	-0.9837	0.0285
		-1.6429	0.2168	0.0104	-0.9742
		-1.7466	0.9615	0.1795	0.2237
1 β 137	3.0	2.899	-0.6156	0.7555	-0.2004
		-1.4312	-0.7753	-0.5414	0.3222
		-1.5288	0.1411	0.3689	0.9252
2 β 137 (C*)	2.2	6.1021	0.4831	0.8474	-0.2045
		-3.0362	0.8366	-0.5224	-0.1664
		-3.1626	0.2584	0.0952	0.9646

Anschließend wurden die Cystein- β -Protonen des reduzierten Fe1 in die Simulation einbezogen. Eine Zuordnung zu einzelnen Signale kann bei dem linienreichen Innenbereich auch hier nur bedingt unternommen werden und wegen der Überlagerung beider Cluster nur näherungsweise angegeben werden. Die in Tab. 6.4 aufgeführten Werte der isotropen Hyperfeinanteile liefern jedoch eine zufrieden stellende Gesamtsimulation für den Innenbereich. Die weiteren Simulationsparameter werden in Tab. 6.5 zusammengefasst.

Nachdem die Feinabstimmungen bezüglich Spindichten, Hyperfeinkopplungen und g-Tensorlage eine Angleichung der Simulation an die experimentellen Verlaufsmuster ergeben, wurde die gefundene g-Tensor-Lage in die Struktur transferiert. Die in Abb. 6.21. dargestellte Orientierung weist auch hier wieder die bereits zuvor bei FeSII gefundene Abhängigkeit von der Geometrie des Eisenkerns mit der positiven Spindichte und seiner umgebenden Cysteinliganden auf. Die g_{\max} -Achse liegt in Richtung des Cysteinliganden 103 mit einem Winkel zur Bindungsachse Fe2-S(Cys103) von ca. 30°, also eine gleiche Ausrichtung wie g_{\max} /FeSII zu Cys48.

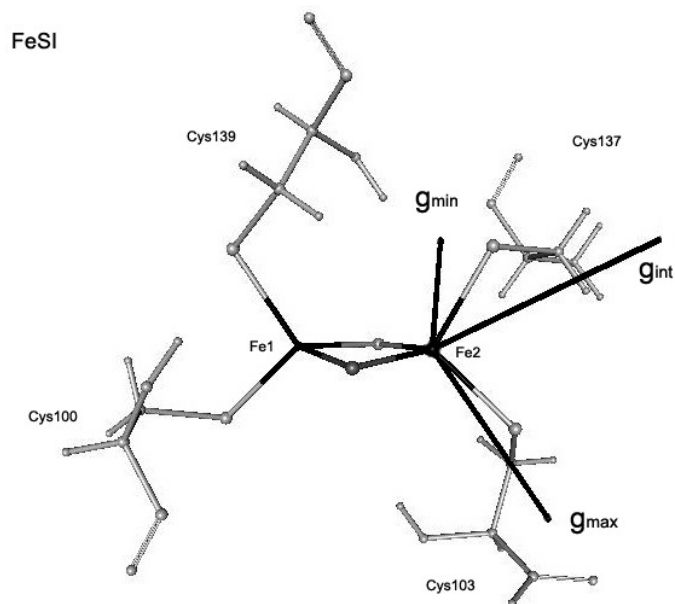


Abb. 6.22: g -Tensor-Orientierung in Bezug auf das FeSI-Zentrum: g_{\max} und g_{int} zeigen in Richtung des Cys103 bzw. des Cys137-Liganden, g_{\min} liegt etwa 45° aus der Cluster-Ebene verkippt.

g_{int} weist etwa gleiche Richtung auf wie die Fe-S(Cys137) Bindung und ist von dieser um 30° verkippt. Auch hier ist die Raumorientierung im Vergleich zu ClusterII annähernd identisch, der Winkel von g_{int} gegen die Bindungsachse ist dort um etwa 10° größer. Etwas stärker aus der Cluster-Ebene verlaufend zeigt bei FeSI die Orientierung der g_{\min} -Achse, der Winkel zur Fe2-S1-Bindung beträgt ca. 45° . Betrachtet man die Simulation der 4 Cystein-Protonen zusammenfassend im F-Plot (Abb. 6.23), wird wieder der Einfluß der g -Tensor Orientierung auf das spektrale Verhalten ersichtlich. An den extremalen Bereichen g_{\max} sowie g_{\min} erkennt man wieder die Maximal-Aufspaltungen der Protonen, zu denen die Hauptachsen ausgerichtet sind. Die hier beschriebene Raumlage gibt dabei den Mittelwert der Orientierungen des g -Tensors FeSI an, die eine zufrieden stellende Simulation erzeugen. Während bei FeSII die Lage relativ genau festzulegen ist, zeigt sich bei FeSI eine größere Spannbreite bei der Determinierung der g -Tensorlage. Die möglichen Raumlagen-Bereiche werden in Kap. 6.2.5 bei der Beschreibung der Automatikalkulation erläutert. Die Lage der beiden g -Tensoren $g(\text{FeSI})$ und $g(\text{FeSII})$ zueinander, die sich nach den Einzelsimulationen findet, werden bei der Beschreibung der Gesamtsimulation aufgezeigt.

6. Ergebnis

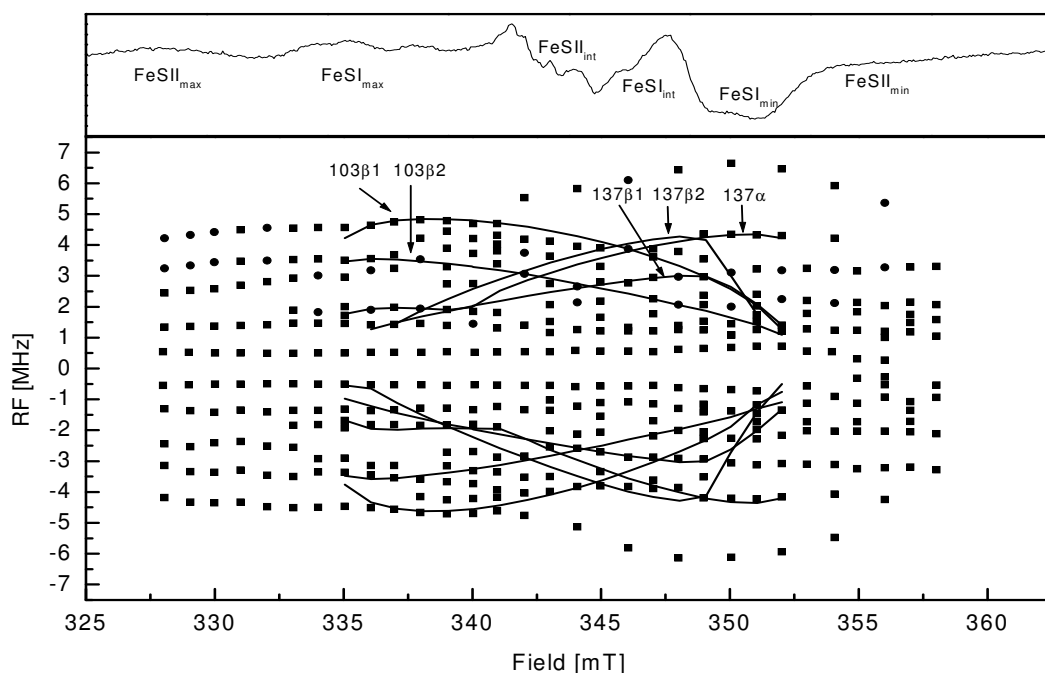


Abb. 6.23: Feld- Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR- Spektren der AOR mit einer Simulation der äußeren Kopplungen der vier Cysteinprotonen am Fe(III)-Zentrum FeSI.

Zusätzliche Kriterien für die Simulation von FeSI stellen letztlich die Überprüfung von austauschbaren, dipolar koppelnden Protonen dar (Tab. 6.6). Drei NH-Gruppen in der näheren Umgebung des paramagnetischen Zentrums wurden deshalb mit einbezogen. Cys100 NH, Phe102 NH und Arg138 NH zeigen Resonanzen, die in Bereichen starken Signalrückgangs bei der deuterierten Probe vorhanden sind. Ihr Verlauf deckt sich bei der anschließenden Vollsimation beider Cluster mit den entsprechenden Häufungspunkten, die eine reduzierte Intensität durch den H/D- Austausch zeigen. Sie werden bei der Gesamtsimulation zusammengefasst.

Tabelle 6.6: Protonen, die bei der Simulation von FeSI einbezogen wurden.

Cystein- Protonen Fe2, Distanz (Å)	Cystein- Protonen Fe1, Distanz (Å)	Austauschbare Protonen, Distanz Fe2 (Å)	Dipolare Protonen Distanz Fe2 (Å)
103β1: 3.22	100β1: 3.82	100NH: 4.95	137 Hα: 3.15
103β2: 4.17	100β2: 4.53	102 NH: 3.45 (Fe1)	
137β1: 4.38	139β1: 3.44	Arg 138 NH: 3.49	
137β2: 3.46	139β2: 4.34		

6.2.3 Gesamtsimulation FeSI und FeSII

Nach den erläuterten Einzelsimulationen müssen die Ergebnisse anhand einer Vollsimation überprüft werden. Zum einem dürfen bei der Addition der simulierten Spektren beider FeS-Cluster keine Signale auftreten, die bei den experimentellen Spektren nicht vorhanden sind. Dies gilt explizit für den Außenbereich $> \pm 5\text{MHz}$ um ν_0 . Da dies bei der Einzelsimulation ein Ausschlußkriterium darstellt, ist auch bei der Addition der Einzelspektren von zusätzlich auftretenden Außenkopplungen nicht auszugehen. Ein weiterer Aspekt ist die Überprüfung aller sich in einer Entfernung $> 5\text{\AA}$ um die beiden Cluster befindlichen Protonen. Diese Protonen dürfen bei der Simulation keine Signale erzeugen, die den experimentellen Spektren widersprechen. Auch dies wurde bei den Einzelsimulationen getestet, bevor sich die Gesamtsimulation anschließt. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß der Befund, daß Protonen, die mehr als 4.5\AA von einem der insgesamt 4 vorhandenen Eisen-Ionen entfernt vorkommen, nur Signale im Radiofrequenzbereich von ca. 13.5MHz bis 15.5MHz liefern und somit keine auswertbaren Informationen erzeugen. Auch rein dipolar koppelnde Protonen mit einem Abstand von $> 4\text{\AA}$ liefern aufgrund der erwähnten Distanzabhängigkeit keine Resonanzen, die essentielle Informationen bei der Simulation liefern. Dies gilt nicht für Cystein- β -Protonen, die wegen der Wechselwirkung über die Fe-S-C β -Bindung isotrope Kopplungsanteile besitzen. Somit wurden letztlich die aufgeführten 26 Protonen (12 für FeSI und 14 für FeSII) für die Simulation herangezogen, um eine Reproduktion aller signifikanten Signale zu erzeugen.

Im Bereich der extremalen Arbeitspunkte bei g_{max} und bei g_{min} beider Cluster lassen sich die Simulationsparameter am genauesten bestimmen. An den beiden intermediären g -Hauptwerten liefert die maximale Anzahl von Orientierungen Beiträge zu den Spektren, die beiden g_{int} -Werte der Cluster liegen zudem nah beieinander, so dass die experimentellen Spektren stark überlagerte Signale ergeben. Zusätzlich hat das reduzierte Molybdänzentrum in diesem Bereich mit dem beschriebenen slow-Signaltyp möglicherweise Anteile an den ENDOR-Spektren. Auf die Simulation des Molybdän-Kofaktors wurde jedoch aus Gründen der Rechenkapazität verzichtet, der Einfluß auf die ENDOR-Spektren kann als gering betrachtet werden, da der Kofaktor keine starken H-Beiträge besitzt und nur eine geringe Breite im Magnetfeld einnimmt. Dies gilt ebenso für Protonen von Wassermolekülen, die zum Teil im nativen Protein vorkommen und teilweise durch den Kristallisationsvorgang bedingt auftreten

und von denen sich einige laut Strukturdaten in den Clusterumgebungen befinden. Da ihre Positionen als sehr variabel betrachtet werden müssen, wurden auch sie bei der Simulation nicht herangezogen. Ebenso wurden bei der Spindichte-Verteilung die Schwefelatome der Cytelinliganden nicht berücksichtigt. Werte bis 0.05 wurden getestet, führen aber zu keiner Veränderung der Gesamtsimulation.

Die gleichzeitige Simulation der FeS- Cluster erfolgt durch Addition der Resonanzsignale beider Zentren. Bei einer Gegenüberstellung der Einzelsimulationen zeigt sich zunächst, dass FeSI und FeSII in den gemeinsamen Bereichen weitgehend an gleichen Positionen Resonanzen aufzeigen, wie es die experimentellen Spektren erkennen lassen. Einzig Resonanz A*, die bei den hochaufgelösten CW- Spektren deutlich separiert erscheint, liegt von ClusterII nicht überlagert vor. Alle anderen Signale von Cluster I befinden sich an Positionen, die auch Signalanteile von Cluster II enthalten. Nach der Addition überlagern sich die Einzelresonanzlinien und geben die experimentellen Linienbreiten weitgehend zufriedenstellend wieder. Oftmals lassen sich die Positionen der Signalmaxima exakt simulieren, wobei die Wiedergabe der Intensitätshöhe an die experimentellen Gegebenheiten nicht eingestellt werden kann. Somit werden die relativen Intensitätshöhen teilweise nicht im experimentell vorhandenen Verhältniss zueinander dargestellt. Abbildungen 6.24-6.26 zeigen die Gesamtsimulationen im Bereich der drei g-Hauptwerte von FeSI auf. In diesen überlagerten Bereichen liefern die beschriebenen 26 Protonen Beiträge zu den simulierten ENDOR-Resonanzlinien. Durch sukzessive Einbeziehung der Protonen wurde teilweise benachbarte Resonanzlinien beeinflusst, dies gilt für die Einzelsimulation der beiden FeS-Zentren wie auch für die Gesamtsimulation. Dieser Effekt ist abhängig vom Arbeitspunkt und den Winkel Φ und θ der Protonen bezüglich des Spinzentrums, für jedes Proton können mehrere Resonanzlinien vorhanden sein, die sich gegenseitig beeinflussen (Kap. 2.2.2). Eine Anpassung an die spektralen Merkmale kann dann durch leichte Korrekturen bezüglich Position und im Fall der Cystein- β -Protonen zusätzlich der isotropen Kopplungswerte zu einer Angleichung an die Linienform ergeben, ist aber aufgrund der großen Anzahl der gegenseitigen Beeinflussung nur näherungsweise durchführbar. Der Einfluß von strain-Effekten auf die Spektren wird in Kap. 6.2.4 und 6.2.6 beschrieben.

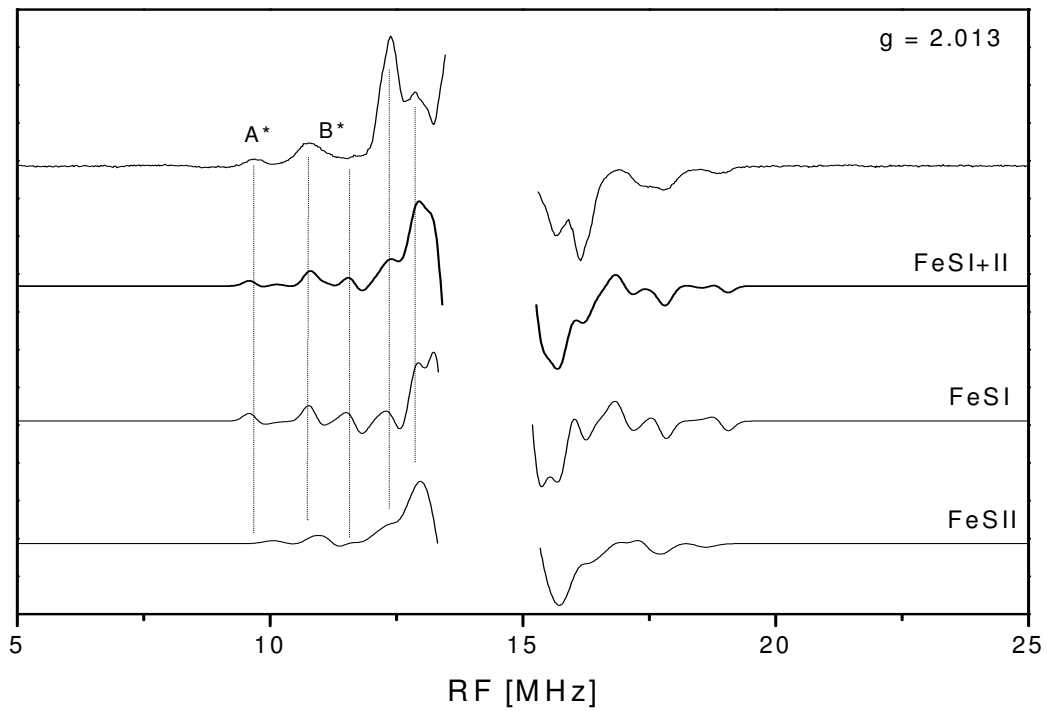


Abb. 6.24: Vollsimulation der beiden $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster am Arbeitspunkt 336mT ($\sim g_{\text{max}}/\text{FeSI}$).

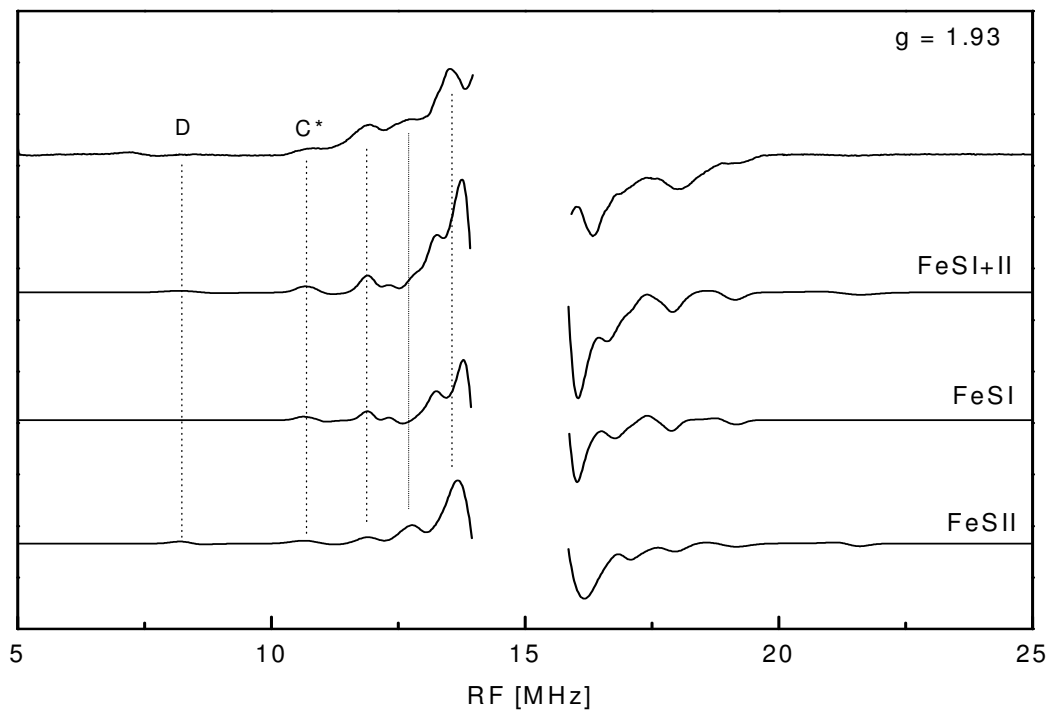


Abb. 6.25: Vollsimulation der beiden $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster am Arbeitspunkt 349 mT ($\sim g_{\text{int}}/\text{FeSI}$).

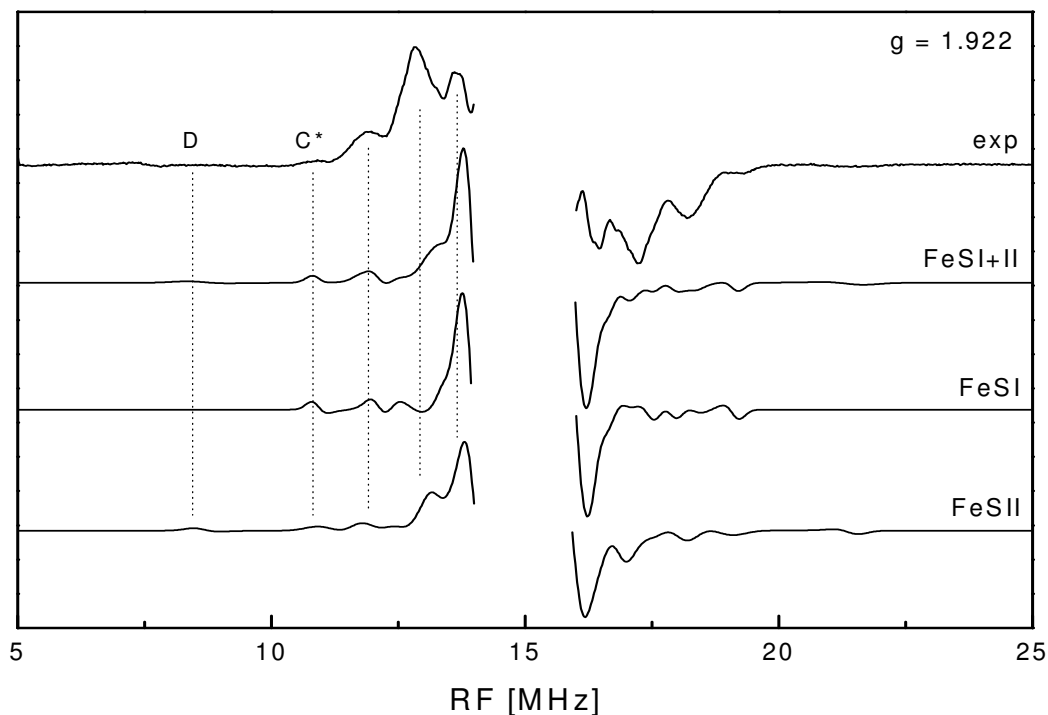


Abb. 6.26: Vollsimulation der beiden [2Fe-2S]-Cluster am Arbeitspunkt 352 mT ($\sim g_{\min}/\text{FeSI}$).

Eine Zusammenfassung der im F-Plot aufgezeigten experimentellen Verlaufsmuster und ihrer Simulation ist in Abb. 6.27 wiedergegeben. Die 8 Cystein- β -Protonen der beiden Fe(III)-Ionen sind aufgeführt und bilden die Verläufe der Außenlinien und deutliche Verlaufsmuster des Innenbereichs nach. Auf die Darstellung der 8 Cystein- β -Protonen der beiden Fe(II)-Kerne wird aus Gründen der Übersicht verzichtet. Sie ergeben Signale im Bereich $\pm 2,5\text{MHz}$ um ν_0 und schließen die Lücken der Verlaufsmuster im Innenbereich. Verlauf C* wird mit einem großen Anteil von Cys137H α bestimmt. Die Resonanzlinien zwischen g_{int} und g_{\min} FeSII mit einer Aufspaltungsgröße von 6-7MHz werden durch Protonen von Arg58 und austauschbarer Gruppen reproduziert. Auch sie werden im Gesamt-Plot nicht aufgeführt. Linienverläufe von austauschbaren Protonen sind im Gesamt-Plot ebenfalls nicht gezeigt und werden in Abb. 6.31 gesondert behandelt.

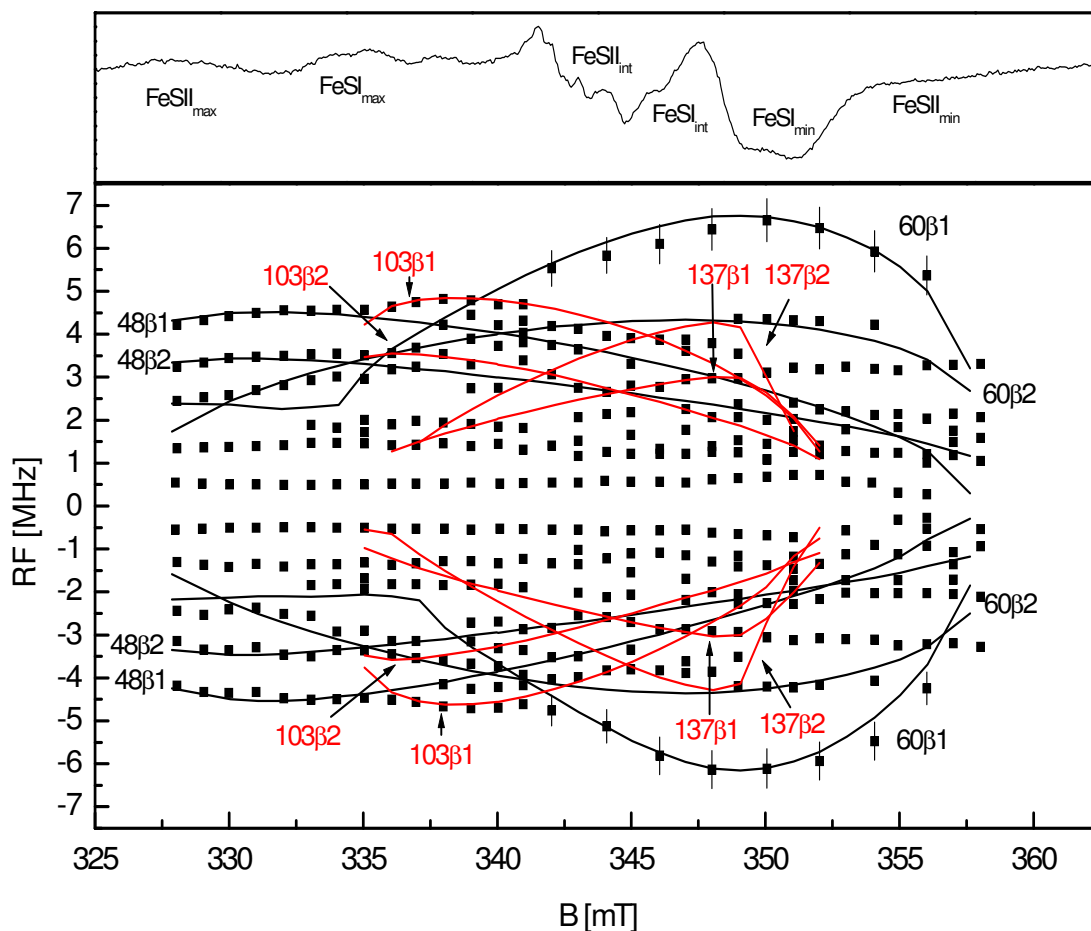


Abb. 6.27: Feld- Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR- Spektren der AOR mit einer Simulation der äußeren Kopplungen der vier Cystein- β -Protonen am Fe(III)-Zentrum des FeSII-Clusters (schwarze Linien) sowie Kopplungen der vier Cystein- β -Protonen am Fe(III)-Zentrum des FeSI-Clusters (rote Linien).

Wie sich schon bei den F-Plots der einzelnen FeS-Cluster zeigte, erkennt man beim Vergleich der Linienverläufe die maximalen Aufspaltungswerte in den Bereichen der g -Hauptwerte der jeweiligen Zentren. Um die Verlaufsmuster simulieren zu können, konzentriert man sich zu Beginn der Simulation an Bereichen großer Kopplungen und passt zunächst die Simulationsparameter so lange an, bis A_{\max} in seinem Betrag erreicht wird. Danach werden die Parameter soweit optimiert, bis der Gesamtverlauf einer Kopplung nachzuvollziehen ist. Dabei deutet sich bei den experimentellen F-Plots die g - Orientierung bereits an. Betrachtet man den Gesamtplot, fällt wieder die Entwicklung der Hyperfeinverläufe in Abhängigkeit

der g -Tensor-Orientierung bezüglich der Cysteinliganden auf. Im Bereich g_{\max}/FeSII verursacht ein β -Protonen-Paar zwei große Außenkopplungen, das gleiche Merkmal erkennt man zwischen g_{int} und g_{min} , auch in diesem Bereich erreichen zwei β -Protonen ihre maximale Hyperfein-Aufspaltung. Bezieht man die Protonendistanzen mit ein, ergeben sich dann Vorinformationen, welche Cystein- β -Protonen für die jeweiligen Aufspaltungswerte in Frage kommen. Auf diese Weise kann man die g -Tensor-Lage auf bestimmte Richtungen einengen. Im Fall FeSI existieren dabei weniger spektrale Charakteristika als bei FeSII. Anhand der simulierten Linienverläufe erkennt man nun auch bei diesem FeS-Komplex je zwei A_{\max} -Bereiche bei g_{\max} und zwei A_{\max} -Bereiche bei $g_{\text{int}}/g_{\text{min}}$.

Betrachtet man die g -Tensoren beider Cluster in ihrer Lage zueinander, interessiert zunächst die Richtung von g_{\max}/FeSI und $g_{\text{int}}/\text{FeSII}$. Dabei wird die parallele Lage beider Achsen durch die ENDOR-Simulation analog zur ESR-Simulation gefunden. Dieses erfordert eine Stellung der g_{\max} zur g_{int} -Achse von ca. 2° . Im Fall der in Abb. 6.28 dargestellten Orientierungen von **$g(\text{FeSI})$** und **$g(\text{FeSII})$** findet sich eine Ausrichtung von ca. $\pm 5^\circ$ um eine exakte Parallelität. Wie aus der Struktur kenntlich wird (Kap. 3.3.2), liegen beide FeS-Cluster-Ebenen annähernd senkrecht zueinander. Bedingt durch diese Lage zeigt g_{\max}/FeSI in Richtung FeSII und verläuft etwa parallel zu $g_{\text{int}}/\text{FeSII}$. Mit dieser Ausrichtung ergibt sich die gefundene dipolare Wechselwirkung der beiden FeS-Komplexe, die durch die Aufspaltung von g_{\max}/FeSI bei der ESR aufgedeckt wird. Zusätzlich soll der Winkel beider Haupt-Achsen zum Verbindungsvektor R zwischen 145 - 153° annehmen, im Fall der ENDOR-Simulation beträgt dieser ca. 150° und ist auch hier im Vergleich zu der ESR-Simulation in etwa identisch[88]. Weiterhin zeigt sich, dass im Fall der ENDOR-Simulation, $g_{\text{min}}/\text{FeSI}$ und g_{\max}/FeSII sowie $g_{\text{int}}/\text{FeSI}$ und $g_{\text{min}}/\text{FeSII}$ nahezu parallel zueinander verlaufen und dadurch auch die Ebenen, die sie aufspannen. Dies ergibt eine Abweichung der Achsenorientierung von ca. 21 - 33° zur ESR-Simulation. Bei dieser wird die Lage der $g_{\text{int}}-g_{\text{min}}$ -Ebene/FeSI zur $g_{\max}-g_{\text{min}}$ -Ebene/ FeSII mit einer relativ hohen Variationsbreite angegeben, während die Parallelität von g_{\max}/FeSI und $g_{\text{int}}/\text{FeSII}$ fixiert ist, um das ESR-Spektrum bei $T < 20\text{K}$ zu klären. Die Genauigkeit bei der Determinierung der g -Orientierung bei der ENDOR-Simulation, im besonderen bei FeSI, wird bei der Automatikalkulation und der g -strain-Analyse dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Angaben der g -Orientierungen einer gewissen Spannbreite unterliegen.

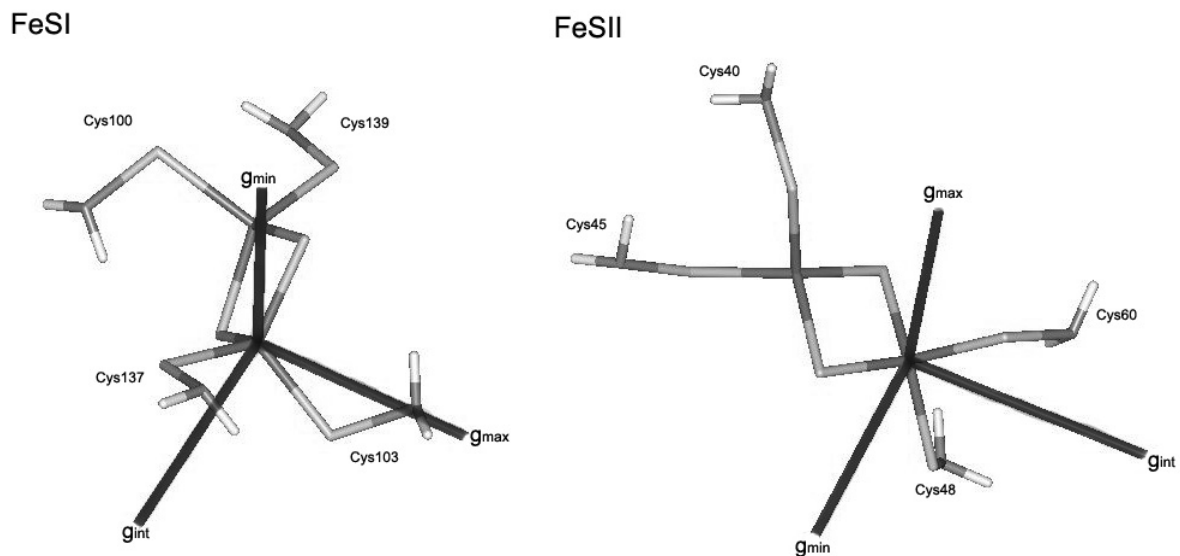


Abb.6.28: Relative Lage der beiden FeS-Komplexe zueinander und Transfer der g -Tensoren $g(\text{FeSI})$ und $g(\text{FeSII})$ in die Struktur, jeweils auf Fe2 der Cluster.

Die abschließende Analyse der Austauschexperimente bietet eine weitere Option zur Überprüfung der Simulationsparameter, die widerspruchsfrei die spektralen Merkmale bestätigen müssen. Neben der g -Tensorlage kann diese Überprüfung v. a. die Werte für die Spindichten eingrenzen. Da die herangezogenen NH-Protonen nur dipolare Hyperfeinanteile besitzen können, müssen sie durch einfache Addition in die Simulationen Bereich durchlaufen, die durch Austauschbarkeit gekennzeichnet sind. Da auch diese Bedingung bei den Einzelsimulationen bereits berücksichtigt wurden, interessiert v.a., inwieweit im gemeinsamen Bereich beider FeS-Zentren die beschriebenen Signalarückgänge nachzuvollziehen sind. Die auffälligsten Merkmale treten bei g_{max} und $g_{\text{min}}/\text{FeSI}$ auf und sind in Abb. 6.29 und 6.30 gezeigt. Bei beiden Arbeitspunkten und in umgebenden Bereichen ist ein beidseitiger Intensitätsrückgang vorhanden. Dieser kann zufriedenstellend mit den angegebenen NH-Gruppen beschrieben werden. Eine große Abweichung der Spindichten von den angegebenen Mittelwerten verschieben die Resonanzlinien zu stark außerhalb dieser Frequenzbereiche und sind deshalb auszuschließen.

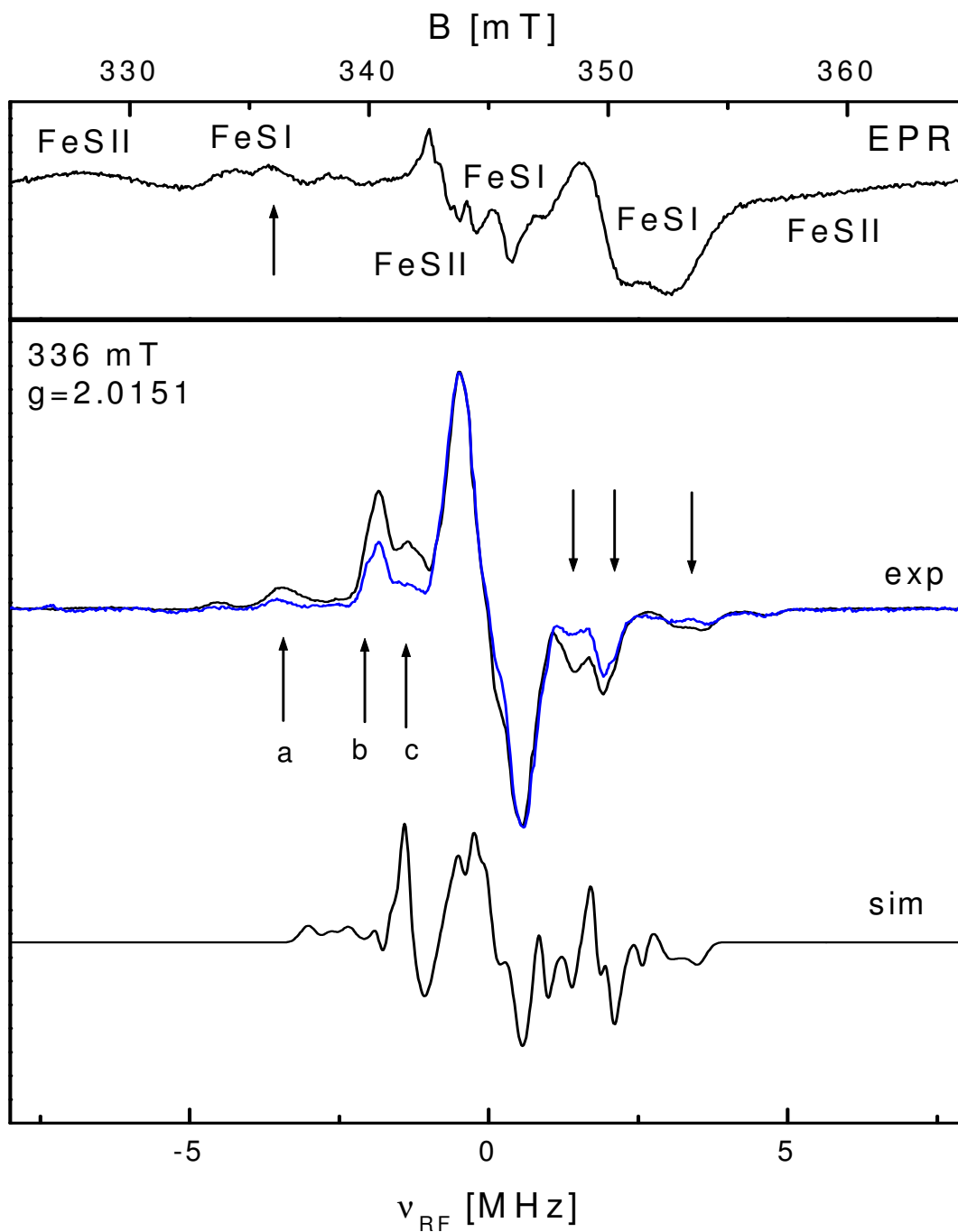


Abb. 6.29: ESR- (oben) und ENDOR-Spektren (unten) am Arbeitspunkt 336 mT in protoniertem (schwarze Linie) bzw. deuterierten Medium (blaue Linie). Die Pfeile markieren Linien mit reduzierter Intensität. Die Simulation erfolgt durch austauschbare NH- Protonen (Cys40, Cys45, Cys48, Cys60) von FeSII und austauschbare NH- Protonen (Cys100, Phe 102 und Arg138) von FeSII (a, b, c, s. Text).

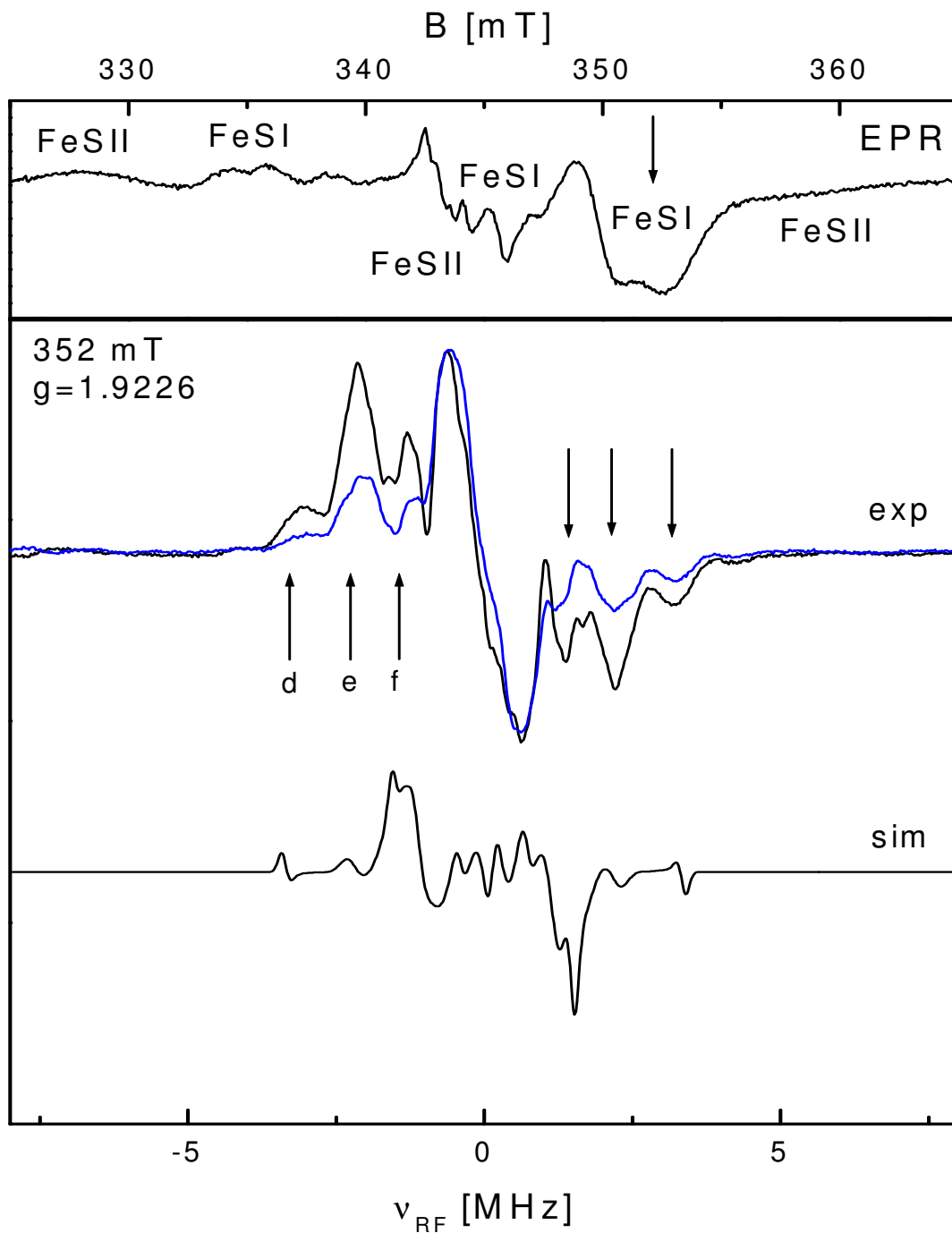


Abb. 6.30: ESR- (oben) und ENDOR-Spektren (unten) am Arbeitspunkt 352 mT in protoniertem (schwarze Linie) bzw. deuterierten Medium (blaue Linie). Die Pfeile markieren Linien mit reduzierter Intensität. Die Simulation erfolgt durch austauschbare NH- Protonen (Cys40, Cys45, Cys48, Cys60) von FeSII und austauschbare NH- Protonen (Cys100, Phe 102 und Arg138) von FeSII (d, e, f, s. Text).

6. Ergebnis

Das mit a gekennzeichnete Signal stammt überwiegend von Cys48NH, Signal b von Cys45NH, während das mit c benannte Signal, welches den stärksten Rückgang erfährt, von Cys40NH, Arg138NH, Cys100NH und Phe102NH verursacht wird. Bei $g = 1.922$ stellt sich der Befund so dar, dass dort Cys40NH, Cys45NH und Arg138NH Signalanteil bei d aufweisen. Der Innenbereich f kann Cys48NH, Cys100NH und Phe102, die mittlere Linie e Cys60NH zugesprochen werden. Die Gesamtverläufe der beschriebenen austauschbaren Protonen lassen sich dann im F-Plot, der die Bereiche der Signaländerung kennzeichnet, zusammenfassen (Abb. 6.31).

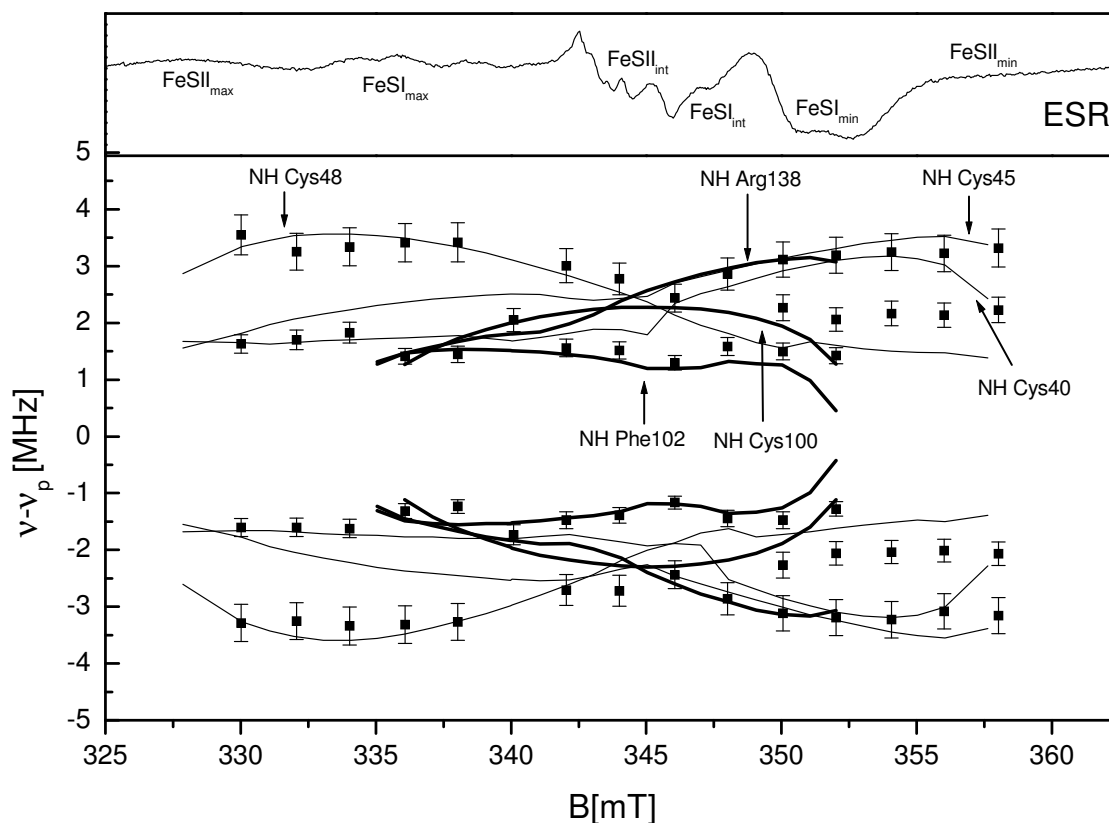


Abb. 6.31: Feld-Frequenz-Plot von Resonanzbereichen, die Signalarückgänge der ENDOR-Spektren der deuterierten Probe im Vergleich zur nicht-deuterierten Probe zeigen ($FeSI$, dicke Linien).

6. Ergebnis

Nach der erfolgter Zuordnung der Protonen zu den jeweiligen Signalen kann nun die Aussagekraft der Signaltrennungsversuche mit Hilfe der Puls-ENDOR-Spektroskopie und der gebildeten Differenzspektren überprüft werden. Wie in Abb. 6.32 ersichtlich wird, wurde diese Differenzierung nur teilweise möglich. Bei g_{\max}/FeSI werden bei den Differenzspektren zwei Signale (A* und Innenbereich) aufgedeckt, die laut Analyse FeSII zugesprochen werden können. Dabei werden der Simulation nach Signale an gleicher Position auch von FeSI generiert. Anteile beider Signale wurden auch durch die Pulsspektren gefunden. Zwischen beiden Resonanzsignalen befindet sich eine weitere Linie (B*), die ebenfalls nach der Simulation von beiden Zentren stammt, bei den Differenzspektrum aber nicht gefunden wird. Somit offenbaren sich bei diesem Arbeitspunkt Lücken bei der Separierung der Signalanteile.

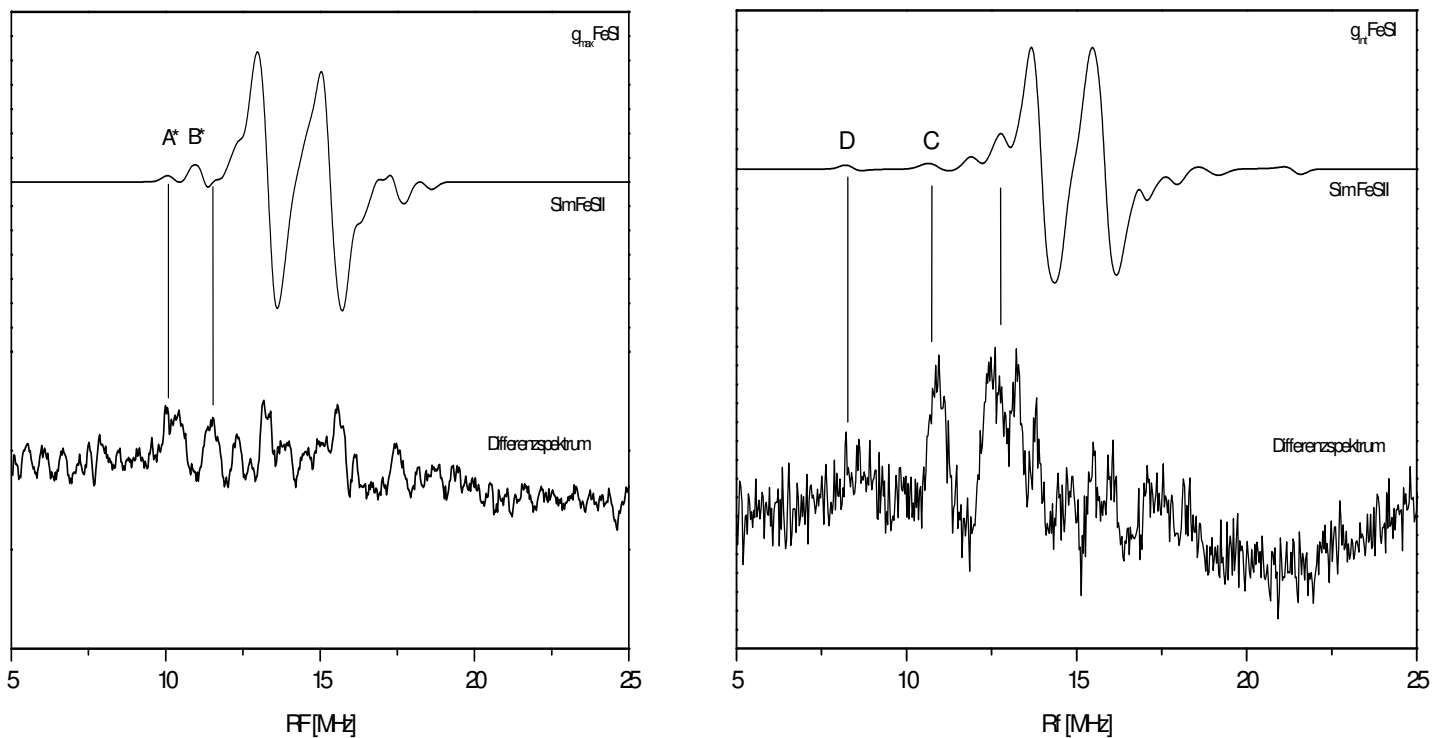


Abb. 6.32: Simulierte Spektren des FeSII an den beiden Arbeitspunkten g_{\max}/FeSI und g_{\min}/FeSI und die dazugehörigen Differenzspektren, die Anteile von FeSII enthalten.

Zwischen g_{int} und g_{\min}/FeSI dagegen konnte für die beiden äußeren Signale D und C* eine Separierung erreicht werden. Die Zuteilung zu den Cluster (D allein von FeSII, C* von beiden Clustern) deutete sich bei CW- und Puls-spektroskopischen Methoden an und konnte

anhand der Simulation nachvollzogen werden. Weiter Unterscheidungen bezüglich der Innenlinien müssen bei den angewandten Puls-Frequenzen in Frage gestellt werden und zeigen die Schwierigkeiten auf, die in ihren magnetischen Eigenschaften nah verwandte Zentren innerhalb diese Systems spektroskopisch zu differenzieren. Prinzipiell ist nach der simultanen Zuordnung der Signale zu den beiden Cluster die Möglichkeit gegeben, weitere Puls-Sequenzen zu testen, die die Zentren selektiv anregen bzw. vermindern können.

6.2.4 Untersuchung von Linienbreiteneffekten

Die experimentellen ESR- und ENDOR-Spektren deuten aufgrund der breiten Resonanzsignale (Kap. 2.1.3) auf den Einfluß von strain-Effekten hin. Die Tatsache, dass die Substrukturen des Proteins einer statistischen Verteilung um einen Mittelwert unterworfen sind, spiegelt sich bei der vorliegenden Untersuchung in Verbreiterungseffekten von z. T. über 2 MHz wider (Resonanz D). Die Heterogenität in der Umgebung des Zentrums führt zu einer statistischen Verteilung der Ligandenfeldstärke, die sich auf den g-Tensor überträgt. Neben der Variation der g-Faktoren ist auch eine Verteilung der g-Tensor-Lage zu berücksichtigen und wird unter dem Begriff g-strain zusammengefasst. Dies ist in gleichem Ausmaß bei den Hyperfeintensoren der Protonen zu berücksichtigen. Es ist davon auszugehen, dass die Koordinaten der Protonen und damit die dipolaren Anteile ihrer Hyperfeintensoren ebenfalls statistisch verteilt sind. Dies gilt auch für die Torsionswinkel, die isotropen Kopplungen eines Cystein- β -Protonen sind somit ebenfalls einer Variationsbreite unterworfen. Diese Effekte werden als A-Strain bezeichnet [vgl. 52] .

Die Berücksichtigung dieser Strain-Effekten bei der Simulation sollte also eine verbesserte Anpassung an die experimentellen Spektren ergeben. Allgemein wurden den in die Simulation einbezogenen Protonen, die eindeutig nachvollziehbare Außenkopplungen erzeugen, zunächst Linienbreiten zugesprochen, die sich denen der experimentellen Spektren anlehnen. Diese Werte haben eine Größenordnung von 0.2MHz- 0.5MHz. Der Einfluss des g-strain-Effekts zeigt sich zunächst bei der Veränderung der g-Tensor-Orientierung. Das 3-Achsen-System bei Fe^{II} kann um alle Achsen in ihren Positionen um ca. $\pm 5^\circ$ unter Einbehaltung der Orthogonalität gedreht werden, ohne das sich die Simulation über alle Arbeitspunkte hinweg qualitativ signifikant verändert. Eine Diskrepanz der Linienpositionen zwischen experimentellen und simulierten Spektren ist nicht für jeden Feldwert zu

vermeiden, kann aber abhängig vom jeweiligen Arbeitspunkt zu einer Verbesserung der Spektrenanpassung bei der im Rahmen der Toleranzgrenzen angewandten Variation der g-Tensor-Lage führen. Um eine zufrieden stellende Wiedergabe aller essentiellen Verläufe zu erreichen wurde die in Kap. 6.2.1 angegebene Orientierung für FeSII gewählt. Letztlich lässt sich eine einzige Positionierung des g-Tensor-Achsen-systems im Falle des untersuchten Pulverspektrums der AOR nicht exakt bestimmen. Vielmehr muss von einer Tensoren-Schar bzw. von einem Tensoren-Raum gesprochen werden. In Abb. 6.33 sind verschiedene g-Tensor- Raumlagen aufgezeigt, die zu einer zufrieden stellenden Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation führen.

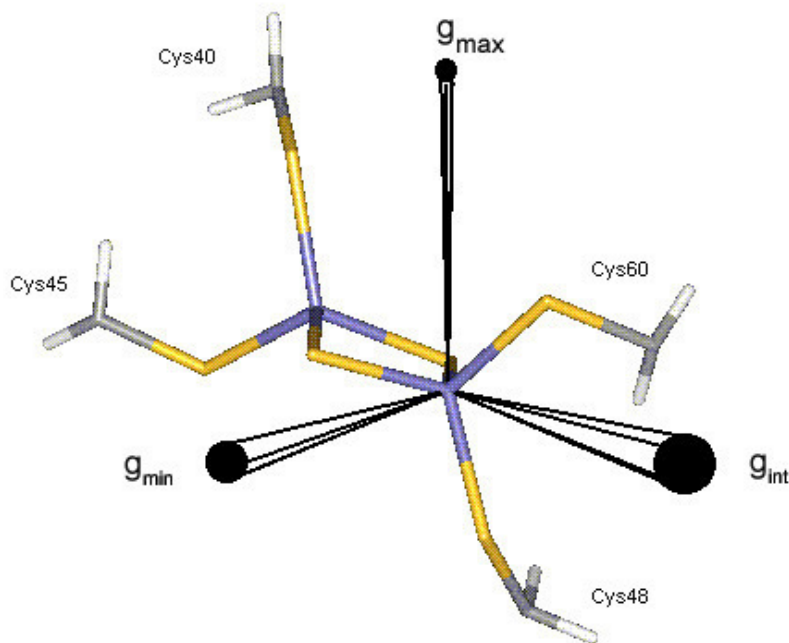


Abb. 6.33: verschiedene g-Tensor-Orientierungen in Bezug auf das [2Fe-2S]-ZentrumII, die eine Reproduktion der experimentellen ENDOR-Spektren erzeugen: g_{\max} und g_{int} zeigen in Richtung des Cys48 bzw. Cys60, g_{\min} liegt annähernd in der von den Schwefelatomen aufgespannte Ebene.

Auf den gleichzeitigen Einbezug aller möglichen g-Tensor-Orientierung mußte bei der Entwicklung des Simulationsprogramms Phytia wegen zu hoher geforderter Rechenleistung verzichtet werden. Ein skalarer strain-Effekt der g-Hauptwerte lässt sich jedoch mit Hilfe des Programms durchführen. Die Streuung der g-Hauptwerte erfolgte in einer Größenordnung von ± 0.01 in dekadischer Unterteilung. Im Bereich der extremalen Arbeitspunkte g_{\max} und g_{\min} FeSII konnte dadurch die Linienform und Linienbreite durch diesen rechenintensiven

6. Ergebnis

Optimierungsprozeß weiter an die experimentellen Spektren angeglichen werden (Abb. 6.34), bei g_{int} ergab sich wegen der Überlagerung der Resonanzen beider FeS-Zentren keine signifikante Verbesserung. Nach dieser Anpassung können die isotropen Hyperfeinkopplungen um $\pm 0.1\text{MHz}$ bis $\pm 0.3\text{MHz}$ um den angegebenen Mittelwert verändert werden, ohne das sich die Simulation qualitativ im Gesamtverlauf verändert. Eine gleichzeitige Einbeziehung mehrerer möglicher a_{iso} -Werte für die jeweiligen Protonen ist im Simulationsprogramm nicht vorhanden und wurde sukzessive getestet.

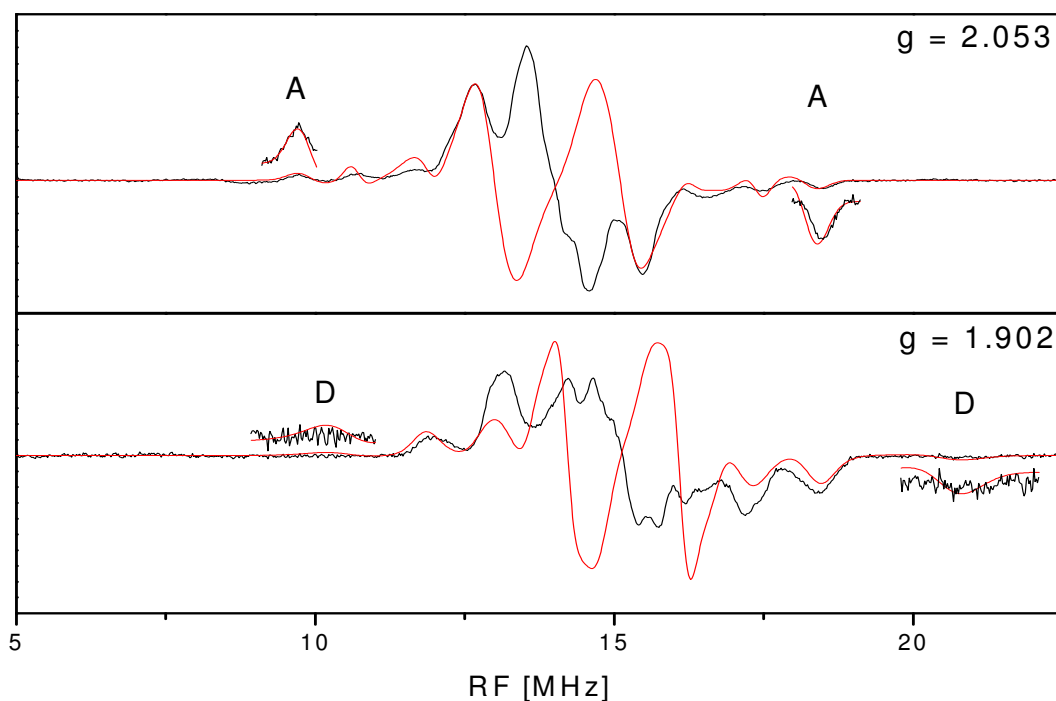


Abb. 6.34: Anpassung der Linienbreite und Linienform durch skalare g -strain-Reproduktion und Positionskorrekturen der in die Simulation einbezogenen Protonen.

Auch eine gleichzeitige Simulation verschiedener möglicher Positionsvariationen für jedes Proton ist aufgrund der sehr hohen Datenmenge, die verarbeitet werden muss, bei Phytia nicht möglich. Die Protonen-Positionen sind den pdb-Datensätzen entnommen. Sie werden bei der Simulation anhand des Abstandes r und den beiden Winkel Φ und Θ angegeben. Nachdem alle vorherigen Parameter im Mittelwert festgelegt wurden und ihre Toleranzgrößen bestimmt wurden, hat eine leichte Änderung der Protonenkoordinaten bei einigen Signalen zu einer verbesserten Anpassung an die Linienverläufe geführt, so das letztlich auch dieser Einfluss in

6. Ergebnis

die Simulation einbezogen wurde (Tab. 6.7). Positionsänderung erfolgte um maximal 0.1\AA beim Abstand r oder um wenige Grad Änderung bei Φ und Θ , die im Rahmen der Toleranzbereiche der Röntgenstrukturdaten liegen ($\Delta b = 0.45\text{\AA}$, angegeben für C-Atome). Für die beiden β - Cystein-Protonen, 48 β 1 und 60 β 1, die separierte Außenlinien hervorrufen, wurde mittels einer Automatikalkulation alle möglichen Koordinaten berechnet, um die Reproduktion der Linienverläufe zu erlauben. Diese werden in Kap. 6.2.6 beschrieben.

Die bei der Simulation FeSII aufgezeigten Einflüsse von g- und A-strain- Effekten müssen analog zur Simulation FeSI berücksichtigt werden. Die für FeSI angegebene g-Tensor-Orientierung unterliegt einer größeren Streuung, wie es bei FeSII zu beobachten ist. Im Fall FeSI wurde die z.T. separiert auftretende Außenlinie A* auf Einflüsse von skalaren Variationen und verschiedenen g-Tensor- Lagen geprüft. Während eine skalare g-strain-Reproduktion keine deutlich Anpassung bezüglich der Linienform ergibt und somit eine

Tab. 6.7: Cystein β -Protonendes FeSII-Clusters bei Fe(III), deren Außenlinien reproduziert werden. Angegeben sind neben den aus den pdb-Datensatz stammenden Protonenkoordinaten die simultan ermittelten Koordinatenanpassungen sowie die isotropen Kopplungskonstanten mit ihrem Toleranzbereich und die angewandten Linienbreiten LB

Cys48 HB1	pdb	Simulation	Cys48 HB2	pdb	Simulation
r_{Fe2} (A)	3,40	3.40	r_{Fe2} (A)	4,27	4.27
Θ (°)	151,91	150.91 ± 1	Θ (°)	154,84	156.84 ± 1
Φ (°)	319,41	323.41 ± 1	Φ (°)	13,01	12.01 ± 1
A_{iso}		1.8 ± 0.1	A_{iso}		3.4 ± 0.1
LB [MHz]		0.3	LB [MHz]		0.2
Cys60 HB1					
r_{Fe2}	2,85	2.85	r_{Fe2}	3,87	3.87
Θ (°)	144,32	142.32 ± 1	Θ (°)	119,51	115.51 ± 1
Φ (°)	153,76	152.76 ± 1	Φ (°)	160,48	156.48 ± 1
A_{iso}		1.7 ± 0.1	A_{iso}		3.8 ± 0.2
LB [MHz]		0.5	LB [MHz]		0.4

allgemeine Linienbreitenzuordnung von 0.2MHz ausreicht, dieses Signal simultan zu beschreiben, ergibt sich für die Raumorientierung des g -Tensors eine breitere Varianz, um den Verlauf zu reproduzieren. g_{\max}/FeSI kann unter der Bedingung der einzuhaltenden Orthogonalität des Achsensystems um ca. $\pm 10^\circ$ gedreht werden, ohne eine deutliche Abweichung des simulierten Linienverlaufs zu den experimentellen Spektren zu ergeben. Die beiden Hauptachsen g_{int} und g_{min} können in noch größerem Ausmaß variiert werden. Eine Größenangabe des g -Tensor-Bereichs FeSI wird aufgrund der großen Anzahl aufgefunderer Einzelorientierungen bei der Automatikalkulation zusammengefasst (Kap. 6.2.5). Auch bei den isotropen Hyperfeinanteilen muss bei FeSI von einer Variierung um einen Mittelwerte ausgegangen werden. Wie bereits früher beschrieben [56], können Veränderungen des Torsionswinkel um bis zu 40° gegenüber den aus den pdf-Daten berechneten Werte schwanken, um die Linienbreiten einzelner Protonensignale zu erklären. Für die 2 β -Protonen des Cys103, die bei g_{\max} teilweise separiert mit einer hohen Auflösung vorliegen, wurden minimale Änderung bezüglich Θ und Φ für eine exaktere Simulation der Linienverläufe eingesetzt. Die Start- Koordinaten aus den pdf- Daten und die Änderung dieser Positionen werden in Tab. 6.8 aufgezeigt. Neben den β -Protonen zeigen sich besonders die dipolar koppelnden Protonen gegenüber Positionsvariationen empfindlich, was für beide FeS-Zentren gilt. Austauschbare Protonen von Aminosäuren, die sich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu den FeS-Clustern befinden, ergeben bei Variationen von bisweilen nur 1° Änderung von Θ u/o Φ bereits deutliche Veränderungen in der Resonanzlage. Somit wurde nach Fixierung der g -Tensor-Lagen und der Spindichten auch bei ihnen geringe Positions-

Tab. 6.8 : Cystein β -Protonen bei Fe(III), deren Außenlinien reproduziert werden. Angegeben sind neben den aus dem pdb-Datensatz stammenden Protonenkoordinaten die simultan ermittelten Koordinatenanpassungen sowie die isotropen Kopplungskonstanten mit ihrem Toleranzbereich und die angewandten Linienbreiten LB.

Cys103 HB1	pdb	Simulation	Cys103 HB2	pdb	Simulation
r_{Fe2} (Å)	3.22	3.22	r_{Fe2} (Å)	4.17	4.17
Θ (°)	106.8	104.8	Θ (°)	102.26	100.3
Φ (°)	126.3	127.3	Φ (°)	102.28	100.3
A_{iso}		1.4 MHz	A_{iso}		3.4MHz
LW [MHz]		0.3	LW [MHz]		0.2

korrekturen eingeführt. Diese führen zu einer verbesserten Anpassung der simulierten an die experimentellen Spektren und liegen weiterhin deutlich unter den Toleranzbreiten der Röntgenstrukturdaten. Die mit Hilfe des Simulationsprogramms Phytia ermittelten Einflüsse von g- und A-strain wurden im Rahmen der beschriebenen Einschränkungen durchgeführt und führen in Feineinstellung zu einer angepassten Reproduktion der Linienformen. Da eine hohe Anzahl verschiedener Effekte gleichzeitig Einfluss zeigen, werden sie zusätzlich einer automatischen Kalkulation unterzogen und die Ergebnisse in Kap. 6.2.5 erläutert.

6.2.5 Automatikalkulation der Simulationsparameter

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen wurde neben dem Simulationsprogramm Phytia, welches interaktiv nach Eingabe der beschriebenen Parameter die simulierten Spektren generiert, das Programm Sacopane zur automatischen Bestimmung der Kombinationsmöglichkeiten aller elektronischen Parameter entwickelt (Kap. 5.3.2.2). Mit diesem Programm können alle physikalischen Variablen bei der ENDOR-Simulation auf ihre Vollständigkeit überprüft werden.

Wie bei der vorhergehend beschriebenen Simulation ist zunächst das FeSII- Zentrum zu betrachten. Die Linienverläufe A-D dienen als Ankerpunkte für die Simulation. A und B treten im Bereich von g_{\max} , C* (+E) und D in der g_{int} Region von FeSII auf. Somit kann zu Beginn der Kalkulationen angenommen werden, dass ein β -Protonenpaar je Cystein für das Auftreten dieser Linienverläufe verantwortlich sind. Verlauf A und D sind nicht austauschbar und können wegen der Größe ihrer Maximalwerte nur von β -Protonen mit geringem Abstand stammen. Im Fall, dass Fe²⁺ das Zentrum der hohen Spindichte darstellt, können prinzipiell nur die beiden Cysteinprotonen $60H\beta_1$ (2.85Å) und $48\beta_1$ (3.4Å) diesen Aufspaltungswert von 13.1MHz erreichen. Versuche, Verlauf D anhand $60\beta_2$ oder $48\beta_2$ zu simulieren führen auch bei optimierter Ausrichtung der Hauptachsen zu diesen Protonen zu keinen zulässigen Werten für die Spindichten und isotropen Kopplungen. Wie bereits die Simulation mit Phytia ergibt, kann der exakte Linienverlauf von D nur anhand $60H\beta_1$ wiedergegeben werden. Dieser Befund konnte auch mittels der Automatikalkulation eindeutig bestätigt werden. Daneben ist $48\beta_2$ aufgrund seines großen Abstandes (4.27Å) bei den durchgeführten Einzelsimulationen nur in der Lage, A_{\max} von Verlauf B oder C/C* zu erreichen. Aufgrund dieses

Ausschlußverfahrens fand sich bei der Simulation mit Phytia nur 1 Lösung der Linienzuweisung zu den 4 β -Protonen. Kritisch zu betrachten bleibt dennoch die gefundene Orientierung des g -Tensors für FeSII. Die Option, dass neben dieser Lage prinzipiell noch weitere Ausrichtungen vorhanden sein können, um die 4 Verlaufsmuster zu generieren, muss in Betracht gezogen werden. Zur Überprüfung wurde zunächst Verlauf D mit 60 β 1 einer Kalkulation unterzogen. Die Spindichte wurden um den Mittelwert von 1.85 (FeIII) und -0.9 (FeII) von ± 0.4 in 0.1 Schritten überprüft, gleichzeitig wurde A_{iso} -Werte von 0-5MHz erlaubt. Dabei finden sich von 23328 einzustellenden Hauptachsen-Richtungen in 10 $^\circ$ -Schritten 27 g -Tensorlagen, die mit verschiedenen Spindichte- und A_{iso} -Werte Kombination D/Cys60 β 1 ergeben. Gleichzeitiger Einbezug von Kombination A/48 β 1 reduziert die Anzahl der g -Tensoren bereits auf 5 Möglichkeiten. Die Addition von Zuordnung B/48 β 1 in die Kalkulation führt dann zu einer einzigen g -Tensorlage, die letztlich nach Einbezug aller 4 Protonen bestätigt wurde. Dabei handelt es sich um die auch bei Phytia ermittelte g -Lage, Werte von Spindichte und isotropen Kopplungen besitzen gleiche Größenordnung und liegen innerhalb der angegebenen Toleranzbereiche.

Die umgekehrte Valenzzuordnung wurde ebenfalls einer Überprüfung unterzogen. Im Fall, dass Fe1 reduziert ist, ergeben sich ebenfalls strukturelle und spektrale Einschränkung, so dass zunächst entweder Cys40 H β 1 und H β 2 die beiden großen Kopplungen jeweils bei g_{max} oder g_{int} bewirken, bzw. Cys45 H β 1 und H β 2 Verursacher dieser Hyperfeinwechselwirkung sind. Die Einzelsimulation der Protonen zeigt, dass einzig 45 β 1 (3.44Å) in der Lage ist, Signal D mit seiner Aufspaltungsgröße zugesprochen zu werden, da die anderen drei Cysteinprotonen zu große Distanzen aufweisen. 45 β 2 befindet sich 4.53Å von Fe1 entfernt kann dadurch auch bei hoher Spindichte und isotroper Kopplung maximale die Aufspaltung von Verlauf C generieren. Jedoch zeigt auch die Automatiberechnung eindeutig, dass die große Aufspaltung D weder von 45 β 1 noch von sonst einem β -Proton des Fe1 in ihrer Verlaufsform simuliert werden kann. Somit ist diese Valenzzuordnung eindeutig auszuschließen.

Die Simulation FeSI ist wegen der erläuterten Situation überlagerter Resonanzen und einer geringen Anzahl von klar zuzuordnenden Signalverläufen wesentlich schwieriger durchzuführen. A*, B* und C* können anhand der spektralen Informationen und der in Kapitel 6.3. durchgeführten Einzelsimulation FeSI zugesprochen werden. Diese 3 Verläufe besitzen jedoch relativ geringe Aufspaltungswerte. Das Fehlen einer großen Kopplung, wie

sie von FeSII zu beobachten ist, lässt eine eindeutige Simulation wie im Fall ClusterII zunächst nicht zu und wurde anhand der strukturellen Vorinformationen und der ESR-Simulation durchgeführt. Mittels der Automatiksimulation wurden zusätzlich alle weiteren Kombinationsmöglichkeiten überprüft. Diese sollen im Folgenden beschrieben werden.

Zunächst muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass auch hier die umgekehrte Spindichtezuordnung als die zuvor beschrieben eine Reproduktion der 3 Verläufe ergibt. Die interaktive Simulation mit Phytia zeigt zunächst, dass Verlauf A* bei invertierter Valenzuordnung nur von 2 sich nahe an Fe1 (FeSI) befindlichen Protonen verursacht sein kann. Dabei handelt es sich um die Cysteinprotonen 139H β 1 mit einem Abstand von 3.4Å oder um 100H β 1 mit einer Distanz von 3.8Å. Weiterhin kann festgehalten werden, dass Proton 100H β 1 mit seiner Entfernung von 4.5Å zu Fe1 nur Aufspaltungswerte erreicht, wie sie Verlauf B* aufzeigt. Somit können allgemein nur 2 Zuordnungsmöglichkeiten in der Lage sein, FeSI zu simulieren: A*/139 β 1, B*/139 β 2, C*/100 β 1 oder A*/100 β 1, B*/100 β 2, C*/139 β 1. Für Fe1 wurden positive Spindichten von 1.4 bis 2.2 ermöglicht und für Fe2 negative Spindichten von -0.4 bis -1.2. Weiterhin wurden für alle beteiligten Protonen isotrope Anteile von 0-5 MHz zugelassen und der g-Tensor in 10°-Schritten in alle möglichen Raumlagen gedreht. Bei keiner der beiden Kombinationen fand sich ein gemeinsamer Parametersatz, um die spektralen Merkmale widerzuspiegeln. Da andere Protonenzuordnungen bei Fe1 aufgrund der benannten Überprüfungen ebenfalls nicht in Frage kommen, kann auch die Automatiksimulation eindeutig ausschließen, dass Fe2 während des Elektronentransfers reduziert wird.

Nachdem die Simulationen Fe1 (FeSI) als reduziertes Fe-Ion identifizierte, müssen die Kopplungen A*-C* auf die Liganden Cys103 und Cys137 zurückgeführt werden. Somit wurde die gleiche Vorgehensweise wie zuvor angewendet. Die Strukturelle Analyse im Vergleich mit den spektralen Merkmale führt wieder zu bestimmten Kombinationsmöglichkeiten. Einerseits ist die Kombination A*/137 β 2, B*/137 β 1 und C*/103 β 1 strukturell in der Lage, die spektralen Vorgaben zu erfüllen. Cys137 β 2 zeigt einen Abstand von 3.46Å zu Fe2, Cys137 β 1 eine Distanz von 4.38Å und Cys103 β 1 eine Distanz von 3.22Å. Letzteres β -Proton hat den kleinsten Abstand zu Fe2 (FeSI), während das Proton 103 β 2 eine Distanz von 4.17Å aufweist. Die Kalkulation wurde wie zuvor unter Verwendung aller Parameterkombinationen vollzogen. Von 23328 einzustellenden g-

Tensororientierungen bleibt bei der 3 Protonen-Linien-Kombinationen ein g-Tensorbereich übrig, der bei der Simulation zur Übereinstimmung mit den 3 Außenkopplungen im F-Plot führt. Bei dieser Situation zeigt g_{\max} Richtung Cys 137 und g_{\min} Richtung Cys103, während g_{int} annähernd in der FeS-Ebene liegt. Diese Orientierung ist somit um ihre Koordinaten gegenüber der in 6.2.2 dargestellten Orientierung, in etwa um 90° verkippt, d.h. g_{int} wurde zu g_{\max} gedreht, g_{\min} zu g_{\max} und g_{int} zu g_{\min} . Mittels Phytia wurde diese prinzipielle g-Tensororientierung wieder iterativ untersucht. Obwohl sie den Austausch-Vergleich zufrieden stellend wiedergibt, kann sie aus mehreren Gründen verworfen werden. Zum ersten dürfen für Cys103 β 1 keine isotropen Anteile $> 0,5$ MHz vorkommen, um Verlauf C* zu simulieren. Dieser Wert ist für ein β -Proton als sehr klein anzusehen. Ein deutlicheres Ausschlußkriterium ist die Lage der g-Hauptachsen bezüglich FeSII. Bei der hier vorliegenden Ausrichtung des g-Tensors konnten die Parameter der ESR-Simulation nicht eingehalten werden, bei der g_{\max} /FeSI parallele Ausrichtung zu g_{int} FeSII erfordert. Bei der hier beschriebenen g-Tensororientierung zeigen beide g_{int} -Achsen Parallelität. Diese Ausrichtung ist jedoch nicht in der Lage, die Aufspaltung g_{\max} /FeSI zu reproduzieren (Kap.3.3.3). Zum andern hält diese g-Tensor-Orientierung weder dem Strukturvergleich mit FeSII noch dem Vergleich der g-Tensororientierung mit anderen Systemen stand (s. Diskussion, Kap.7.1) Prinzipiell zeigt sich jedoch, dass bei 3 Außenlinien, die keine signifikanten Aufspaltungswerte aufweisen, mehr als eine g-Tensor-Lage bzw. Protonenzuordnungen auftreten können.

Bei gleicher Vorgehensweise wie zuvor beschrieben, werden abschließend die mit Phytia gefundenen Simulations-Parameter für FeSI auf Vollständigkeit überprüft. Die Kombinationen A*/Cys103 β 1, B*/Cys103 β 2 und C*/Cys137 α + β 1 wurden nun einer Vollkalkulation unterzogen. Die Analyse ergibt, dass mehrere g-Tensor-Lagen bei Einbezug der 3 Protonen-Verlaufs-Kombinationen berechnet werden, die sich in bestimmten Bereichen befinden. Wie die Simulation mittels Phytia anzeigt, ist die g_{\max} -Hauptachsen bei FeSI auf eine Genauigkeit von ca. 10° um eine mittlere Lage festzulegen. Die mit der Automatikalkulation gefundenen Achsenpositionen zeigen den gesamten Bereich, innerhalb in dem der g-Tensor für FeSI liegen kann. In Abb.6.35 werden die verschiedenen Orientierungen der g-Tensoren durch die Wolken geometrisch veranschaulicht.

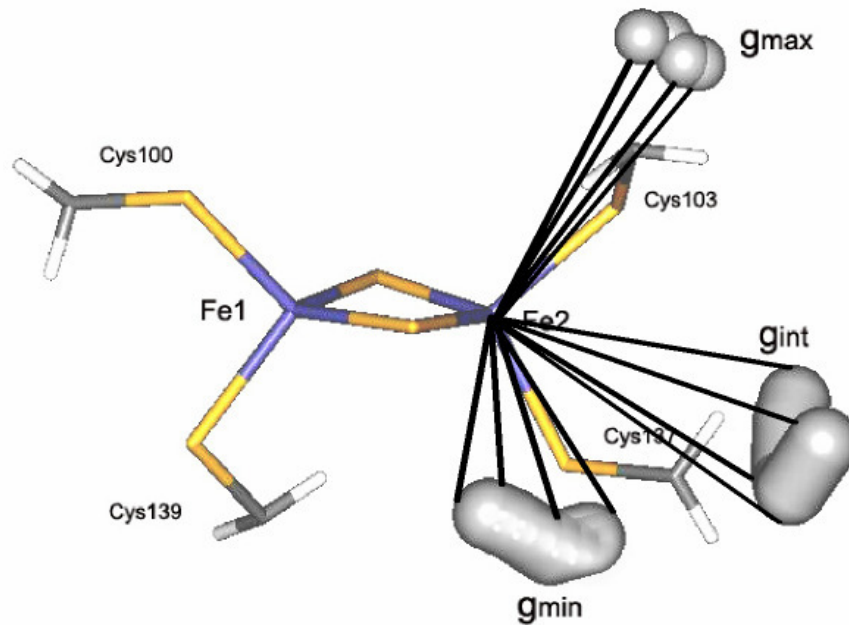


Abb. 6.35: Graphische Zusammenfassung der Bereiche, für die die Lagen der g -Tensor-Achsen bei FeSI möglich sind. Gezeigt sind die Spitzen der jeweiligen Achsen (Länge 3\AA) ausgehend von Fe2.

Wie aus dieser Darstellung erkennbar ist, kann g_{\max} auf einen annähernd kreisförmigen Bereich eingegrenzt werden, der sich aus den Richtungs-Variationen dieser Achse zusammensetzt. Somit lässt sich diese Lage relativ genau auf $\pm 10^\circ$ um einen Mittelwert bestimmen. Bei g_{int} und g_{\min} ist dieser Bereich deutlich größer ausgeprägt und zeigt in der graphischen Zusammenfassung Formen, die im Gegensatz zu g_{\max} nicht konzentriert auf Häufungspunkte zusammengefasst sind, sondern ausgedehnte, gekrümmt verlaufende Bezirke ergeben. Die äußeren Achsenlagen von g_{int} und g_{\min} liegen dabei um ca. $\pm 20^\circ$ um den in Kap. 6.2.2 angegebenen Mittelwert gestreut. In einem engeren Maß kann der g -Tensor FeSI nicht festgelegt werden. Generell unterschiedliche Bereiche zu den beschriebenen g -Tensor-Orientierungen wurden bei der Untersuchung FeSI für die 3 dazugehörigen Kopplungen A^* , B^* und C^* jedoch nicht gefunden. Somit lässt sich also zusammenfassen, dass die β -Protonen des Cysteinliganden 103 die Außenkopplungen A^* und B^* ergeben und g_{\max} in Richtung dieses Liganden zeigt. Cysteinligand 137 liegt annähernd in der g_{int} und der g_{\min} -

Ebene, die Resonanzlinien von Cys137 α + β 2 lassen sich bei C* am deutlichsten nachvollziehen.

6.2.6 Automatikalkulation g-strain

Die zusammenfassende Analyse aller strain-Effekte kann aufgrund der großen Datenmenge nur mit einem Programm erreicht werden, das alle Parameter systematisch auf Kombinationen, die zur Reproduktion der Experimente geeignet sind, untersucht. Die einzelnen Parameter und ihre Auswirkung auf die Spektren wurden in Kap. 6.2.4 beschrieben. Auch hier soll die Vollständigkeit mit Hilfe einer Automatikalkulation überprüft werden, die gleichzeitig alle Effekte einbezieht. Die Bestimmung des g-Tensors und sein Toleranzbereich wurden bei der Automatikalkulation zuvor beschrieben. Da der g-Tensor FeSI nur auf bestimmte Bereiche festlegbar ist, wurden systematische g-strain Effekte nur bei FeSII vorgenommen. Die Toleranzwerte bezüglich der isotropen Hyperfeinkopplungen sowie der Spindichte ergeben bei der Automatikalkulation die gleiche Größenordnung wie bei Phytia. Die Variationen des g-Tensors können ebenfalls mit übereinstimmenden Werten von $\pm 5^\circ$ hinsichtlich der Achsenrichtungen angegeben werden. Zusätzlich kann der Aufenthaltsbereich der Cystein-Protonen nun umfangreich ermittelt werden. Dies gilt vor allem für die Protonen 48 β 1 und 60 β 2. Diese beiden Protonen führen zu Resonanzlinien, die in weiten Bereichen ohne Beeinflussung von anderen Signalen auftreten. Somit können sie für eine Strukturanalyse herangezogen werden. Dazu wurden alle elektronischen Parameter, also g-Tensor, Spindichte-Verteilung und isotrope Hyperfeinanteile mit den angegebenen Mittelwerten festgehalten. Unter Berücksichtigung der Linienbreite wurden nun die Protonenkoordinaten berechnet, die eine zufrieden stellende Reproduktion der Resonanzlinie ergeben. Aufgrund der unterschiedlichen Linienbreite berechneten sich für Cys48 β 1 154 Koordinationen, die sich in einem Umfang von $\pm 0.3\text{Å}$ um die pdb-Ausgangs-Koordinaten befinden. Fasst man diese Koordinaten graphisch zusammen, ergibt sich ein bestimmter Aufenthaltsbereich des Protons, der in Abb. 6.36 dargestellt ist. Für Cys60 β 1 ergibt sich eine größerer Spannbreite von $\pm 0.6\text{Å}$ bei einer berechneten Koordinatenmenge von 36 Positionen. Der Aufenthaltsbereich diese Protons ist weniger dicht konzentriert als 48 β 1, die variabelere Position spiegelt die größere Linienbreite diese Protons wider.

Somit kann einerseits unter Einbezug der Ausgangskordinaten aus der Röntgenkristall-Struktur die ENDOR-Simulation durchgeführt werden. Sind die physikalischen Parameter innerhalb ihrer Bestimmbarkeit festgelegt, können die experimentellen und berechneten Daten herangezogen werden, um die Protonen-Koordinaten auf ihre Varianz zu untersuchen. Dabei ergibt sich ein ergänzender Vergleich zu den kristallographischen Daten. Diese konnten bei der Analyse der ENDOR-Experimente der AOR reproduziert werden, d.h. es fand sich keine Abweichung der pdb-Koordinaten, die der ENDOR-Simulation widersprechen. Die Analyse der Linienbreiten bezüglich der strain-Parameter kann dann herangezogen werden, die Strukturdaten auf ihre Toleranzbereiche zu überprüfen. Dies gelingt bei der Untersuchung separierter Linienverläufe um so genauer, je geringer die Linienbreite ausfällt und sich Resonanzlinien mit möglichst hoher Auflösung über eine große Anzahl von Arbeitspunkten verfolgen lassen.

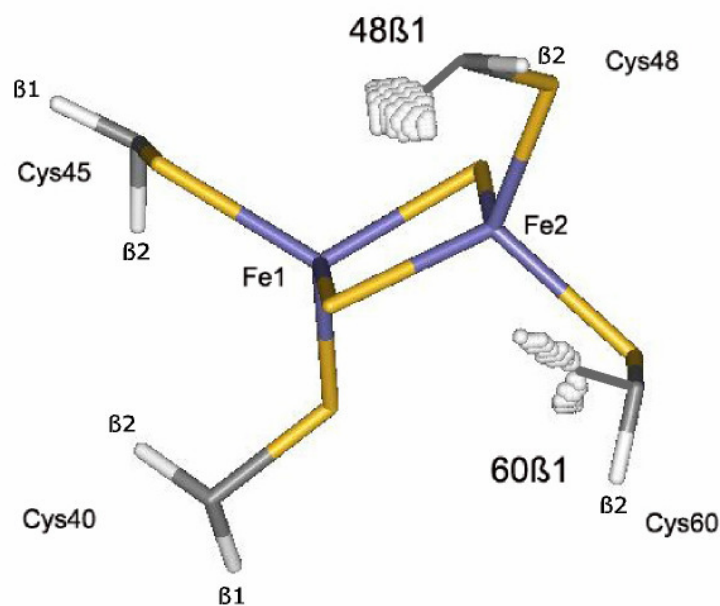


Abb. 6.36: Variation der Protonenpositionen für Cys48β1 und Cys60β1.

7. Diskussion

7.1 Strukturelle Interpretation

7.1.1 Vergleich der Simulationsparameter und Struktur FeSII/AOR mit *A. platensis* Fdx

Als Referenz zu den Ergebnissen der 2Fe2S-Cluster der AOR standen zunächst Protonen-ENDOR-Daten von einem Fdx (*A. platensis*) zur Verfügung [31]. Aufgrund der großen Übereinstimmung von ESR- und ENDOR-Eigenschaften von apFdx und FeSII/AOR soll zunächst die Struktur, Valenzlokalisierung und g-Tensor-Orientierung dieser beiden Spin-Systeme miteinander verglichen werden. Wie in Abb.6.1 erkennbar, zeigen sich im Feld-Frequenz-Plot des apFdx im Vergleich zu dem der AOR ähnlich charakteristische Verlaufsmuster. Eine breite Kopplung, die ein Maximum von 13-14MHz erreicht, befindet sich in einem Bereich zwischen g_{int} und g_{min} . Wie bei Kopplung D der AOR liegt mit dieser Kopplung des apFdx ein stark verbreitertes Signal mit einem asymmetrischen Muster vor. Im Bereich zwischen g_{max} und g_{int} erkennt man 2 Protonenkopplung mit hohen und eine dritte Kopplung mit kleineren Aufspaltungswerten. Diese vier auf Cystein- β -Protonen zurückzuführenden Kopplungen sind den Kopplungen A-D, die bei der AOR für Zentrum FeSII ermittelt wurden, in Form ihres Verlaufs und Aufspaltungswerten auffallend ähnlich.

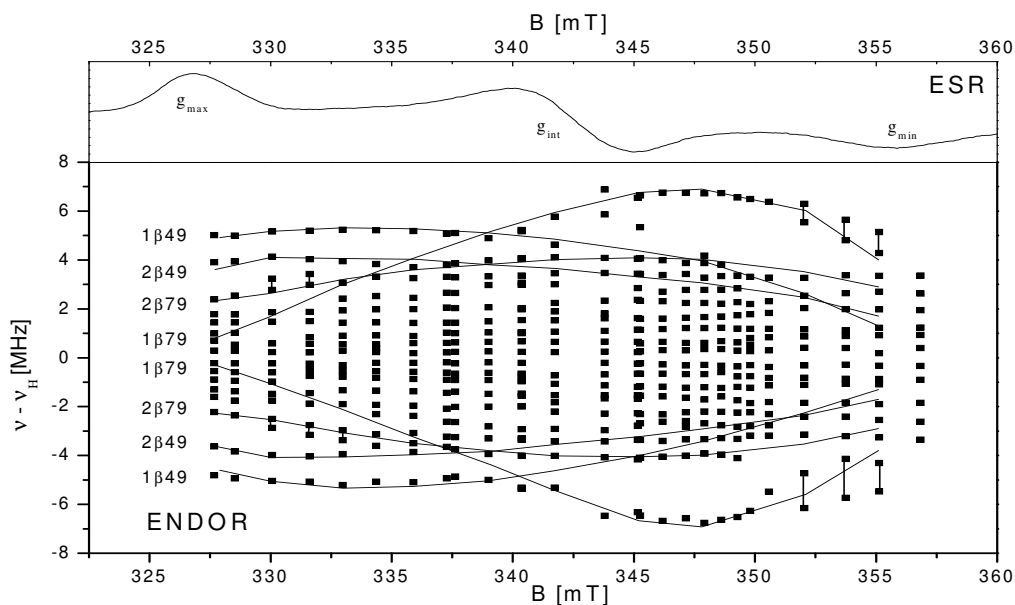


Abb. 7.1.: Experimenteller F-Plot des apFdx mit simulierten Linienverläufen der 4 Cystein- β -Protonen am Fe(III)-Ion[31].

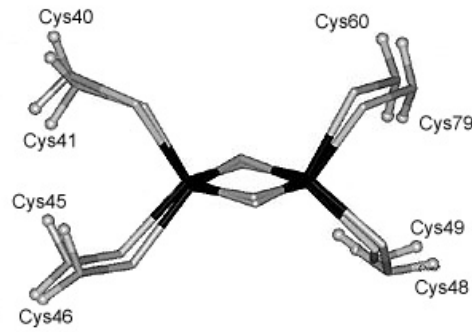


Abb. 7.2: Strukturvergleich der FeS-Cluster von apFdx (Cys 41, 46, 49, 79) und FeSII der AOR (Cys 40, 45, 48, 60)

Beide FeS-Zentren sind mit einem C-X₄-C-X₂-C-X_n-C- Motif in das Protein eingebettet, wie es häufig bei pflanzlichen Ferredoxinen vorliegt. Ein Strukturvergleich der beiden Komplexe zeigt, dass das gleiche Cysteinmotif zu einem hohen Grad an Übereinstimmung bezüglich der Anordnung der Cysteine und damit der Koordinaten der Cystein-β-Protonen führt (Abb. 7.2). NMR-Experimente des apFdx zeigen, dass bei dem Elektronentransfer selektiv das mit Fe1 bezeichnetes Eisen-Ion reduziert wird [41], die Simulation der experimentellen ENDOR-Spektren des apFdx führen zu der selben Valenzzuordnung. Wie in Kap 6.2 beschrieben, wurden die Spindichte-Werte des apFdx auch bei der FeSII- Simulation aufgefunden, mit Beträgen von $+1.9 \pm 0.1$ (Fe2) und -0.9 ± 0.1 (Fe1). Demnach kann bei AOR/FeSII ebenfalls Fe1 als reduziertes Fe-Zentrum identifiziert werden, während Fe2 oxidiert bleibt.

Da bei apFdx erstmals die g-Tensor-Lage für ein [2Fe-2S]-Zentrum bestimmt werden konnte, ist aufgrund der hohen Strukturübereinstimmung dieser Vergleich von großem Interesse. Wie die Simulation der ENDOR-Daten des apFdx zeigte, wird die Lage des g-Tensors bei diesem Metalloprotein durch die Geometrie des FeS-Spinzentrums und den Cystein-Liganden bestimmt. g_{int} zeigt in Richtung des Cys79-Liganden mit einem Winkel zur Fe-S(Cys79)-Bindung von etwa 40°. Eine nahezu identische Orientierung der g_{int} -Achse FeSII/AOR in Richtung des Cys60-Liganden findet sich bei der FeSII-Simulation, der entsprechende Winkel zur Fe-S(Cys60)-Bindung wurde ebenfalls mit ca. 40° aufgefunden. g_{max} /apFdx zeigt in Richtung des Cys49-Liganden, der Winkel zur Fe-S(Cys49)-Bindung wird mit 30° angegeben. Eine identische Ausrichtung der g_{max} -Achse ist bei AOR/FeSII festzustellen, auch hier beträgt dieser Winkel ca. 30° zur Fe-S(Cys48)-Bindung. Der Bindungswinkel zwischen

der Fe2-S1-Bindung der FeS-Cluster und der Richtung g_{\min} beträgt in beiden Fällen ca. 45° . Somit wurde bei beiden FeS-Clustern eine ähnliche g -Orientierung gefunden, die sich spektroskopisch durch entsprechend verwandte Linienverläufe im Feld-Plot äußert.

7.1.2 Vergleich der Simulationsparameter und Struktur FeSI und FeSII

FeS-Zentrum I zeigt eine unterschiedliche Verankerung in das Proteingerüst im Vergleich zu FeSII. Durch das untypische Cysteinmotif ergibt sich eine unterschiedliche Raumlage einiger Cystein- Liganden (Abb. 7.3). Bei einer überlagernden Darstellung der beiden FeS-Cluster der AOR wird offensichtlich, dass Cys48/ FeSII und Cys103/ FeSI (jeweils bei Fe2) nahezu identische Positionen besitzen. Die jeweiligen β -Protonen zeigen beim Abstand und Torsionswinkel bezüglich der Fe-S-C-H-Bindung vergleichbare Werte (vgl. Kap 7.2.3). Dies gilt ebenso für Cys45/ FeSII und Cys100/ FeSI (jeweils an Fe1). Unterschiedlich angeordnet sind dagegen Cys60/FeSII und Cys137/FeSI (an Fe2) sowie Cys40/FeSII und Cys139/FeSI (an Fe1). Durch diesen strukturellen Vergleich können Gemeinsamkeiten und Differenzen der Linienverlauf beider Zentren erklärt werden. Verlauf A und B von FeSII sind in Form und Größe nahezu identisch mit A* und B* , die beiden FeSII-Kopplungen werden durch die beiden β -Protonen von Cys48 hervorgerufen, welche mit ihren strukturellen Daten denen der β -Protonen des Cys103 entsprechen. Die Abstände der β -Protonen sind für Cys137 dagegen wesentlich größer als für Cys60, auch die Torsionswinkel der Fe-S-C-H-Bindung zeigen deutliche Unterschiede. Dieser strukturelle Unterschied zeigt sich spektroskopisch v.a. durch das Fehlen einer großen Kopplung, wie sie durch Cys60H β 1 des FeSII-Clusters hervorgerufen wird.

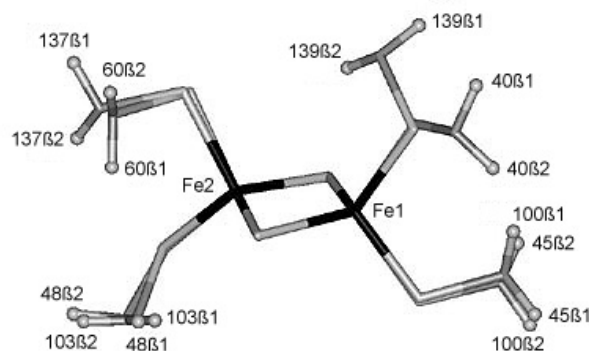


Abb.7.3: Strukturvergleich FeSI und FeSII der AOR mit den koordinierenden Cysteinliganden und den dazugehörigen β -Protonen

Wie in Kap. 6.2.2 beschrieben, wurden die Spindichte-Werte von FeSII auch für die FeSI-Simulation mit Beträgen von $+1.95 \pm 0.1$ (Fe2) und -0.9 ± 0.1 (Fe1) bestimmt. Somit kann bei beiden Zentren Fe1 als reduziertes Fe-Atom identifiziert werden. Eine hohe Übereinstimmung findet sich ebenso bei der g-Tensor-Lage des FeSI-Clusters, die Orientierung weist auch hier, ähnlich wie bereits zuvor für FeSII und apFdx gefunden, eine Abhängigkeit von der Geometrie des FeS-Clusters und seiner umgebenden Cysteinliganden auf. Die g_{\max} -Achse FeSI liegt in Richtung des Cysteinliganden 103 mit einem Winkel zur Bindungsachse Fe2-S(Cys103) von ca. 40° , hat also die gleiche Ausrichtung wie die g_{\max} -Achse an FeSII zu Cys48. g_{int} an FeSI weist in etwa in die gleiche Richtung wie die Fe-S(Cys137) Bindung und ist von dieser um 30° verkippt. Auch hier ist die Raumorientierung im Vergleich zu ClusterII annähernd identisch, der Winkel von g_{int} gegen die Bindungsachse ist dort um etwa 10° größer. Etwas stärker von der Cluster-Ebene abweichend zeigt bei FeSI die Orientierung der g_{\min} -Achse, der Winkel zur Fe2-S1-Bindung beträgt aber ebenfalls ca. 45° . Bei beiden Spinsystemen liegt die g_{int}/g_{\min} -Ebene um ca. $20\text{-}30^\circ$ zur FeSSFe-Ebene verkippt.

7.2. Diskussion der Simulationsparameter

7.2.1 Valenzzuordnung und Spindichte

Wie die Simulation der beiden FeS-Zentren der AOR zeigten, ist eine Reproduktion der ENDOR-Spektren und der Linienverläufe nur unter der Bedingung möglich, dass jeweils Fe1 das reduzierte Fe-Ion darstellt. Zu dem selben Resultat führte eine quantitative Studie der ESR-Eigenschaften der drei interagierenden Metallzentren der AOR, die im Verlauf der vorliegenden ENDOR-Studien vorgestellt wurden [105]. Ausgangspunkt dieser Analyse stellt die in Kap. 3.3.4 beschriebenen magnetische Wechselwirkung der Spinzentren dar, die sich in der Aufspaltung des Mo(V)-slow- und des FeSI- g_{\max} -Signals bei Tieftemperatur-Experimenten zeigt. Die Simulation dieser Aufspaltungen beruht wiederum auf einem Punktdipol-Model, unter Berücksichtigung der Kristallstruktur, der ESR-Linienbreiten und des beschriebenen Temperaturverhaltens (vgl. Kap 3.3.4). Die beobachtete Austauschwechselwirkung zwischen dem Mo(V)-Zentrum und dem FeSI Zentrum lässt sich durch $\mathbf{J}_{\text{Mo,FeSI}} \cdot \mathbf{S}_{\text{Mo}} \cdot \mathbf{S}_{\text{FeSI}}$, die Wechselwirkung zwischen den beiden FeS-Cluster nach Gl.3.7 beschreiben. Eine numerische Simulationen der Aufspaltungen wurden mit verschiedenen Parametersätzen hinsichtlich g-Orientierungen, Austauschkopplungskonstanten J und

Valenzzuordnung durchgeführt. Bei dieser Vorgehensweise, die die Oxidationsstufen und die Distanzen der Reaktionszentren einbezieht, sind verschiedene Parametersätze vorhanden, die die magnetische Wechselwirkung der 3 Spinsysteme der AOR reproduzieren können. Aufgrund einer quantitativen Analyse mit unterschiedlichen Valenzzuordnungen wurde der Elektronentransport mit Mo-Fe1(FeSI)-Fe1(FeSII) vorgeschlagen. Zu der gleichen Zuordnung der reduzierten Fe-Ionen führt die vorliegende ENDOR-Analyse, die andere Valenzzuordnung eindeutig ausschließen kann und daneben die **g**-Orientierungen bezüglich der FeS-Cluster-Geometrie bestimmt.

Betrachtet man 2Fe2S-Zentren ohne Liganden und Aminosäureumgebung, sind keine deutlichen Merkmale in der Cluster-Struktur erkennbar, die die selektive Reduktion eines Fe-Ions begünstigen. Somit kann auf einen Einfluss der benachbarten Proteinmatrix auf die Lokalisation der Valenzen und die Größe der Redoxpotentiale geschlossen werden. Bei Zentrum FeSI lässt sich beobachten, dass insgesamt vier H-Brücken zwischen den S^γ-Atomen und räumlich nahe liegenden Protonen vorliegen, jeweils 2 bei Fe1 und Fe2 [116]. Zunächst liegt also eine symmetrische Verteilung in der Umgebung beider Fe-Ionen vor, wobei Cys139 (Fe1) mit dem MCD-Kofaktor eine H-Brücke ausbildet. Da diese H-Brücke die einzige Kopplung des Kofaktors mit FeSI darstellt, ist davon auszugehen, dass über diese Verbindung der Elektronen-Transfer stattfindet. Bei der Analyse der Strukturdaten erkennt man, dass in der Umgebung von Fe1 gegenüber Fe2 eine doppelt so hohe Anzahl von permanenten NH-Dipolen mit einem Abstand $< 4\text{Å}$ vorliegen (Tab. 7.3). Noch stärker ausgeprägt fallen bei dem distalen FeSII-Cluster die Unterschiede bei der Verteilung der NH-Dipole aus. Hier lässt sich bereits bei der Ausbildung von H-Brücken ein unsymmetrisches Muster erkennen. Auf Seiten von Fe1 sind die S^γ-Atome der Cystein-Liganden an vier, bei Fe2 an zwei H-Brücken beteiligt [116]. Weiterhin fällt bei der Betrachtung der Umgebung von Fe1 und Fe2 wieder eine unsymmetrische Verteilung der Anzahl der NH-Dipole auf. Bei Fe1 befinden sich insgesamt 11 Protonen $< 4\text{Å}$ in der Umgebung, wovon neun N-gebunden sind. Bei Fe2 dagegen fällt die Anzahl der NH-Dipole mit vier deutlich kleiner aus. Gleiche Merkmale finden sich bei apFdx, hier liegen ebenfalls mehr NH- oder OH-Gruppen in Wasserstoffbrücken-Distanz auf Seiten von Fe1. In Abb. 7.4 ist die Verteilung der NH-Dipole beider FeS-Zentren der AOR zusammengefasst. Aufgrund der Struktur der Cluster-Umgebung ergeben sich deutliche Hinweise, dass die unterschiedliche Polarität der Proteinmatrix die Valenzlokalisierung auf bestimmte Fe-Ionen festlegt. Bei verschiedenen Modellsystemen führten Deletionen oder Modifikationen von Wasserstoff-Bindungen zu

7. Diskussion

starker Veränderung der elektronischen Eigenschaften eines FeS-Zentrums [4, 14, 32]. Studien bei einem Rubredoxin zeigen, dass bereits bei einer kleinen Änderung einer H-Brücken-Distanz eine Änderung des Redoxpotentials um bis zu 80 mV zu beobachten ist [99]. Ausführliche Untersuchungen bei 4Fe4S-Cluster weisen nach, dass punktuelle Änderung solcher lokalen Ladungsträger eine starke Veränderung der elektrochemischen Eigenschaften der Metall-Zentren bewirken [33]. Bei einer Adx-Mutante konnte durch eine Punktmutationen in der Umgebung des Metallzentrums eine Änderung des Redoxpotentials von -70 mV festgestellt werden [136].

Tab. 7.1: Protonen mit Distanzen $< 4\text{Å}$ in der Umgebung der FeS-Cluster

FeSI: Fe1	FeSI: Fe2	FeSII: Fe1	FeSII: Fe2
Cys100 NH (2.89)	Cys137 Ha (3.15)	Cys40 NH (2,67)	Cys60 H β 1 (2.85)
Cys139 H β 2 (2.99)	Cys103 H β 1 (3.22)	Cys45 NH (2,69)	Arg58 H β 1 (3.32)
Gly101 NH (3.24)	Cys139 NH (3.29)	Glu41 NH (3,01)	Gly43 NH (3.39)
Cys100 H β 1 (3.38)	Cys103 NH (3.37)	Gly46 NH (3.36)	Cys48 H β 1 (3.40)
Phe102 NH (3.45)	Cys137 H β 2 (3.46)	Cys45 H β 1 (3.44)	Cys60 NH(3.40)
Cys139 NH (3.50)	Cys139 H β 2 (3.49)	Gln44 NH (3.45)	Arg58 H γ 2 (3.75)
Cys103 NH (3.86)	Arg138 NH (3.49)	Ala47 NH (3.53)	Gly43 H α 2(3.79)
Gln99 H β 2 (3.88)	Thr140 H γ 22 (3.63)	Gly39 NH (3.54)	Glu41 NH(3.86)
Arg138 NH (3.97)		Gln42 NH (3.55)	Cys60 H β 2(3.87)
		Gly43 NH (3.59)	Cys48 NH(3.90)
		Cys40 H β 1 (3.82)	

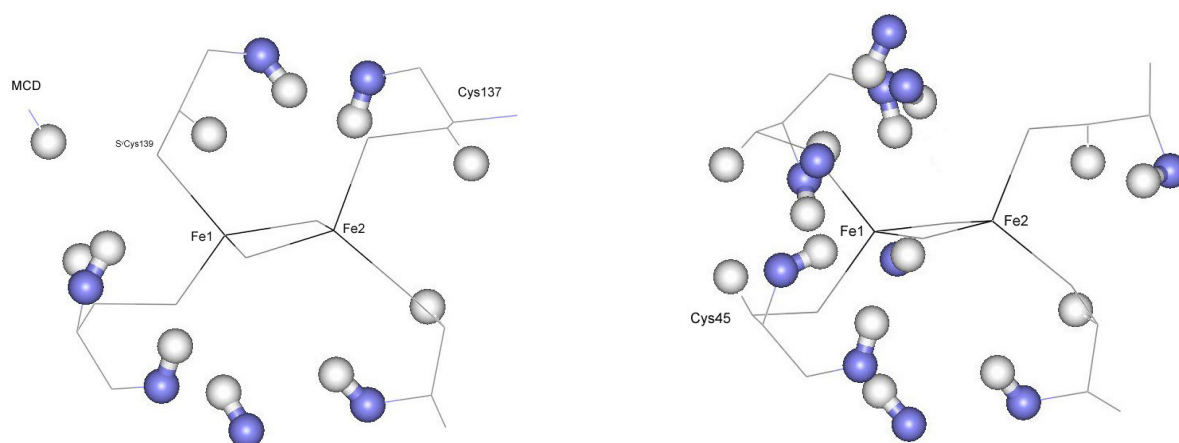


Abb. 7.4: Verteilung der NH Dipole (N blau, H grau) in der Umgebung der FeS-Cluster. Der Elektronentransport verläuft vom MCD-Kofaktor über eine H-Brücke von N2 (MCD) und Cys139 zu Fe1. Einzige Verbindung von FeSI zu FeSII besteht über eine H-Brücke zwischen Cys137 und Cys45, welches mit Fe1/FeSII verbunden ist.

Die ermittelten Werte der Spindichte-Verteilung von ca. -0.9 (Fe(II)) und 1.9 (Fe(III)) bestätigen zunächst das Prinzip der antiferromagnetischen Kopplung, nach dem in einem Fe(II)-Fe(III)-Dimer der oxidierte Kern einen positiven Spinprojektionskoeffizienten und der reduzierte Kern einen negativen Koeffizienten erhält. Die theoretischen Werte von +7/3 und -4/3 konnten dabei in 2Fe-2S-Cluster bisher nicht aufgefunden werden. Für tetraedrisch von Schwefelatomen koordinierte Eisenkomplexe wurde ein Kovalenzfaktor d_b als Korrekturterm vorgeschlagen [107]. Dieser gibt das Verhältnis der im Komplex vorliegenden Spinpopulation zur maximalen, im ionischen Fall erreichbaren Spinpopulation an, also 4 für Fe^{2+} und 5 für Fe^{3+} . Bei einem unkomplexierten Fe^{3+} -Ion entspricht $d_b = 1$, bei den vorliegenden 2Fe-2S-Komplexen wurden Werte von 0.65 für Fe (III) und 0.75 für Fe (II) eingeführt. Durch Multiplikation der Kovalenzfaktoren mit den Spinprojektionskoeffizienten, erhält man die als effektiven Spinpopulationen bezeichnete Werte von 1.5 für Fe (III) und -1.0 für Fe (II). Diese Werte zeigen eine bessere Übereinstimmung der Spindichteverteilungen bei 2Fe2S-Zentren [31]. 1H -ENDOR-Untersuchung bei hsAdx und einem Rieske-ISP ergaben Spindichten von -0.6/+1.6 (hsAdx) sowie -0.55/1.6 (Rieske-ISP) und weisen ebenfalls niedrigerer Werte als die theoretisch erwarteten Spindichten auf [87]. Die aus den ENDOR-Simulationen erhaltenen Werte stimmen insoweit mit den theoretischen Betrachtungen überein, dass sie niedriger als die Spinprojektionskoeffizienten ausfallen und die Maximal-Werte in realen 2Fe2S - Komplexen nicht erreicht werden.

7.2.2 g-Tensor-Orientierung

Die g-Tensor-Orientierung ist ein elektronischer Parameter, der durch ESR-Einkristall-Untersuchungen oder im Falle polykristalliner Proben experimentell nur durch die ENDOR-Analyse bestimmt werden kann. Die bis dato bei 2Fe2S-Zentren gefundenen Orientierungen bestätigen dabei nicht den theoretisch erwarteten Ausrichtungen der g-Hauptachsen [15]. Nach Berechnung der Ligandfeld-Theorie sollte die Achse des größten g-Hauptwertes g_{max} in der Fe-Fe-Ebene liegen. Bei beiden FeS-Zentren der AOR sowie apFdx konnte dagegen die zuvor beschriebene, aus der Cluster-Ebene verkippte Orientierung ermittelt werden. Prinzipiell die selbe Ausrichtung wird bei hsAdx gefunden [87]. Bei diesem Vertebraten-Fdx mit einem Spin-System axialer Symmetrie konnte ebenfalls die g-Tensor-Lage festgelegt werden, die Orientierung g_{max} zeigt anhand der ENDOR-Analyse auch bei diesem 2Fe2S-Protein in Richtung eines Cysteinliganden. Somit sind insgesamt vier Fälle von 2Fe-2S-

Clustern dokumentiert, bei denen der g -Tensor hinsichtlich der FeS-Molekül-Ebene verkippt vorliegt. g_{\max} sowie g_{int} spiegeln die tetraedrischen Ligandierung des Spinzentriums annähernd wider, die g_{int}/g_{\min} -Ebene verläuft ca. $20\text{-}30^\circ$ verkippt zur FeSSFe-Ebene. Gegensätzlich zeigt sich die g -Orientierung bei einem $2\text{Fe}2\text{S}$ -Spinzentriums eines Rieske-ISP [18, 87]. Bei diesem liegt g_{int} in etwa senkrecht zur FeS-Cluster-Ebene, mit einer Abweichung von ca. 25° zur Normalen der Ebene. Ein weiterer deutlicher Unterschied zeigt sich hier bei der g_{\min} -Richtung, diese verläuft annähernd entlang des Fe1-Fe2-Vektors, die g_{\max} und g_{\min} -Ebene gibt bei diesem Spinzentrum annähernd die Lage der Cluster-Ebene wieder. Vergleicht man die g -Orientierung der vier beschriebenen $\text{Cys}_4\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Komplexe mit dem $\text{Cys}_2\text{His}_2\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Komplex, verursacht demnach die unterschiedliche Ligandierung die abweichende Raumlage des g -Tensors. Ein relevanter Einfluss der Ligandierung auf die g -Eigenwerte zeigte sich bereits bei ESR-Experimenten. Mutationen in der Umgebung des Zentrums ($\text{Cys} \rightarrow \text{Ser}$, Ala) identifizieren einen unmittelbaren Einfluss auf die ESR-Eigenschaften, die z.B. bei Fumarat-Reduktase [139], cpFdx [103], Xanthin-Oxidoreduktase [80] sowie Qor [46] zu einer Änderung der g -Anisotropie führen kann. Inwieweit durch den Ligandenaustausch die g -Orientierung verändert wird, konnte an den ungeordnet vorliegenden Systemen mittels ESR-Untersuchungen nicht bestimmt werden und benötigt zur Lösung dieser Fragestellung Experimente der orientierungselektiven ENDOR-Spektroskopie.

7.2.3 Isotrope Hyperfeinkopplungskonstanten

Analysen bezüglich der Einflüsse der räumlichen Anordnung von Cys- β -Protonen, die direkt mit dem Spinzentrum verbunden sind, wurden hauptsächlich für $4\text{Fe-}4\text{S}$ -Zentren beschrieben [vgl. 14]. Die Größe der isotropen Kopplung zeigt eine Abhängigkeit von geometrischen Parametern und wird durch den Torsionswinkel Φ (Fe-S-C-H_β) beeinflusst [14, 83]. Für $2\text{Fe}2\text{S}$ -Zentren liegen dagegen wenige Literaturdaten vor, eine Gesetzmäßigkeit wie im Fall der $4\text{Fe}4\text{S}$ -Kubane konnte bis dato nicht aufgezeigt werden [31]. Zunächst soll ein Vergleich der isotropen Hyperfeinkopplungen beider AOR Spinzentren und apFdx gegeben werden. Die A_{iso} -Beträge werden zunächst auf einen Wert von 100%-Spindichte normiert, da diese von der Spindichte am Eisenzentrum abhängen [103]. Die normierten A^*_{iso} -Kopplung eines β -Cystein-Protons am Eisenzentrum Fe_I ist dann gegeben durch:

$$A^*_{\text{iso}} = \frac{A_{\text{iso}}}{\rho(\text{Fe}_I)} \quad (6.1)$$

7. Diskussion

Der Vergleich zwischen den Protonenpositionen (Abstand r , Torsionswinkel Φ bzgl. der Fe-S-C-H $_{\beta}$ -Bindungsachsen) und den normierten isotropen Kopplungen ist in Tab. 7.2. (Vergleich apFdx mit FeSII) und Tab. 7.3 (Vergleich FeSI mit FeSII) wiedergegeben.

Tab. 7.2: Vergleich der Abstände r , Torsionswinkel Φ (Fe-S-C-H $_{\beta}$) und isotroper Kopplungen A^*_{iso} der Cystein- β -Protonen von apFdx und FeSII/AOR.

apFdx	r (Fe2) (Å)	TW Φ (°)	A^*_{iso} [MHz]	AOR/ FeSII	r (Fe2) (Å)	TW Φ (°)	A^*_{iso} [MHz]
1βCys49	3.116	-2.2	0.9	1βCys48	3.40	4.9	0.9
2βCys49	4.017	116.5	2.2	2βCys48	4.27	124.5	1.8
1βCys79	3.008	1.7	2.2	1βCys60	2.85	-0.2	1.0
2βCys79	3.966	117.7	2.3	2βCys60	3.872	-118	2.0

Tab.7.3: Vergleich der Abstände r , Torsionswinkel Φ und isotroper Kopplungen A^*_{iso} der Cystein β -Protonen von FeSI und FeSII.

AOR/ FeSI	r (Fe2) (Å)	TW Φ (°)	A^*_{iso} [MHz]	AOR/ FeSII	r (Fe2) (Å)	TW Φ (°)	A^*_{iso} [MHz]
1βCys103	3.22	7.6	0.9	1βCys48	3.40	4.9	0.9
2βCys103	4.17	127	1.8	2βCys48	4.27	124.5	1.8
1βCys137	4.38	175.3	1.6	1βCys60	2.85	-0.2	1.0
2βCys137	3.46	56.2	1.2	2βCys60	3.872	-118	2.0

Zunächst wird erkennbar, dass die 3 identischen Anordnung von Cys49 (apFdx), Cys48 und Cys103 (AOR) sowie die ähnlichen Torsionswinkel der β -Protonen zu isotropen Kopplungen vergleichbarer Größe führen. $1\beta_{48}$, $1\beta_{103}$ sowie $1\beta_{49}$ weisen jeweils einen Torsionswinkel von ca. 0° auf und stehen nahezu senkrecht zur Fe-S-Bindung. Diese 3 Protonen besitzen relativ kleine normierte isotrope Kopplungen von 0.9 MHz. Gleiche annähernd senkrechte Anordnung zur Fe-S-Bindung zeigen $1\beta_{60}$ und $1\beta_{79}$. Bei diesen wird im direkten Vergleich eine Abweichung von A^*_{iso} um ca. 0.6 MHz kenntlich, wobei sich die Hyperfeinkopplung von $1\beta_{60}$ wiederum an diejenigen von $1\beta_{48}$, $1\beta_{103}$ und $1\beta_{49}$ anlehnt. Der Unterschied zwischen $1\beta_{60}$ und $1\beta_{79}$ lässt sich mit den beobachtbaren strain-Effekten erklären, die bei beiden Protonen am stärksten auftreten und sich in der starken Linienverbreiterung äußert (Kap. 6.2.6). Bei beiden β -Protonen ist dadurch die Bestimmung der isotropen Hyperfeinkopplungen und der Torsionswinkel erschwert. Deutliche unterschiedliche Werte ergeben sich auch im Vergleich der beiden Liganden Cys137 und Cys60. Die β -Protonen dieser Liganden zeigen differente Raumlagen und erklären in diesem Fall die unterschiedlichen Werte. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gefundenen Kopplungen nach Normierung mit den Werten für $[4Fe_4S]$ -Systemen vereinbar sind, während sich eine Abhängigkeit vom Torsionswinkel nach [14, 83] nicht aufweisen lässt. Diese Diskrepanz könnte zum einen auf der gegensätzlichen g-Tensor-Orientierung bei $4Fe_4S$ -Zentren beruhen, daneben liegen bei diesen FeS-Zentren delokalisierte Valenzen vor. Im Hinblick auf die hier gefundenen isotropen Kopplungen der Cys- β -Protonen an $2Fe_2S$ -Systemen können weitere NMR- und ENDOR-Experimente an diesen Cluster dazu dienen, die erhaltenen Werte auf Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich der geometrischen Parameter zu überprüfen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden 2Fe-2S -Zentren der AOR mit Hilfe von CW- und Puls-ENDOR-Techniken untersucht und mittels Simulationssoftware analysiert. Die in Kap.4 beschriebenen Fragestellungen konnten dabei folgendermaßen aufgeklärt werden:

Aufnahme und Simulation der CW-und Puls-ENDOR-Spektren der AOR (vgl. Kap. 5 und 6)

Mit Hilfe moderner CW-und Puls-ENDOR-Spektrometer konnten die an früherer Stelle beschriebenen ESR-Signale hochaufgelöst dargestellt werden, so dass die paramagnetischen Eigenschaften der beiden FeS-Zentren bei der vorliegenden, nicht-orientierten Probe extrahiert werden konnte. Dazu wurden verschiedenen Messparameter getestet und soweit optimiert, bis eine klare Signaldarstellung der FeS-Signale gelang. Dabei konnte gezeigt werden, dass verschiedene Geräteparameter notwendig sind, um ENDOR-Signale, die bei unterschiedlichen Frequenzbereichen auftreten, darzustellen. ENDOR-Signale, die mit Kopplungswerten $> \pm 4\text{MHz}$ auftreten (Außenbereich), erforderten bei der AOR RF-Modulationshübe von 400KHz , um eine zufrieden stellende Signaldarstellung zu erreichen. Liegt der Schwerpunkt der Signalaufklärung bei Kopplungen $< \pm 4\text{MHz}$ (Innenbereich), müssen kleinere RF-Modulationshübe gewählt werden, um die Signalverläufe aufzuklären. Bei der Untersuchung der AOR zeigten sich RF-Frequenzhübe von 100KHz als geeignet, diese Problematik zu lösen.

Da bei der Untersuchung von Übergangsmetallkomplexen, die innerhalb eines Aminosäureengerüsts vorliegen, große Außenkopplungen eine wichtige Rolle bei der Analyse spielen, mussten weiterhin Puls-ENDOR-Experimente eingesetzt werden, um diese Linienverläufe zweifelsfrei aufzuklären. Dabei kann die Puls-Davies-Sequenz zufrieden stellende Ergebnisse bei dieser Art der Signalaufklärung liefern. Einerseits konnte sie bei der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden, um Kopplungen, die bei der CW-Technik nur undeutlich auftreten, in ihrem Verlauf aufzudecken. Weiterhin ließ sich bei geeigneten Puls-Abständen eine Trennung der Signale der beiden FeS-Moleküle im Ansatz durchführen. Große Puls-Abstände ergaben eine Möglichkeit, das FeSII-Zentrum, welches sehr kurze Relaxationszeiten aufweist, bei seinen Außenkopplungen zu unterdrücken, so dass Signalanteile von FeSI aufgedeckt werden konnte. Diese Trennung erwies sich als wichtiges Hilfsmittel, um eine Simulation des überlagerten Bereich durchzuführen.

Um die Auswertung der ENDOR-Spektren der AOR durchzuführen, wurde eine Simulation nach dem Algorithmus von Hurst et al. [78] vollzogen. Da für FeII überlagerungsfreie Bereiche vorliegen, konnte für die Bewältigung dieser Aufgabe zunächst das Programm Prometheus [121] herangezogen werden, welches unter Einbezug der Koordinaten des Spinzentrums und der umgebenden Protonen eine interaktive Simulation ermöglicht. Um letztlich eine schnelle und parallele Simulation beider FeS-Signale durchzuführen, wurde diese Software innerhalb der Arbeitsgruppe ständig verbessert und in seiner Funktion um wichtigen Merkmalen erweitert, so dass in letzter Version ein Programm zur Verfügung steht (Phytia), das auch komplexe Simulationsvorgänge in vertretbarem Zeitrahmen erlaubt. Um die große Anzahl von Lösungsmöglichkeiten auf ihre Vollständigkeit zu überprüfen, wurde weiterhin ein Programm entwickelt (Sacopane), das die gesamte Spannbreite der Parametervariationen erfasst und auf die Simulationsmöglichkeit aller signifikanten Linienverläufe überprüft. Aufgrund dieser Neuentwicklung und die sukzessiver Verbesserung der Programmhandhabung stehen in letzten Versionen Programme zu Verfügung, welche die umfangreiche Simulation der Linienverläufe mehrerer Spinzentren ermöglicht. Aufgrund der Möglichkeit, Spinzentrum und die g -Tensor-Orientierung innerhalb des Zentrums visuell darzustellen, kann eine vereinfachende Simulation ohne Koordinatentransformation in andere Programme wie z.B. WebLabViever durchgeführt werden.

Elektronische und strukturelle Eigenschaften der AOR (vgl. Kap. 5 und 6)

Spindichte: Bei der vorgestellten Untersuchung zeigte sich, dass jeweils bei den mit Fe1 gekennzeichneten Fe-Ionen negative Spindichten von ca. -0.85 und bei den mit Fe2 bezeichneten Fe-Ionen positive Spindichten von ca. 1.85 auftreten. Einerseits bestätigt diese Spindichte-Verteilungen, die auch bei apFdx [31], hsAdx und btRieske-ISP [87] in vergleichbarer Größenordnung aufgefunden wurden, das Spinkopplungsmodell. Andererseits zeigte sich aber erneut, dass die experimentell gefundenen Werte realer Systemen die theoretisch erwarteten Maximalwerte nicht erreichen. Prinzipiell ermöglicht die Ermittlung der Spindichte die Lokalisierung der Valenzen und dient somit zur Aufklärung der Stationen des Elektronentransfers. Bei beiden 2Fe-2S-Zentren werden im Falle der AOR die Fe1-Ionen reduziert. Somit konnte die Fragestellung bezüglich des Elektronentransports experimentell eindeutig geklärt werden. Da diese Problematik der Mößbauer-Spektroskopie sowie bei relativen großen Metalloproteinen der NMR-Technik nicht zugänglich ist, bietet die ENDOR-Technik eine Möglichkeit, diese Untersuchungen auch auf eine Vielzahl weiterer Enzyme

anzuwenden. Da bei der ENDOR-Simulation die Strukturdaten herangezogen werden, wird auch der Einfluss der Aminosäureumgebung und der Polarität in der Nähe des Spinzentrums offenbar. Bei beiden FeS-Zentren der AOR ergibt die Struktur-Analyse, dass die Verteilung der permanenten Dipole sowie der H-Brücken unsymmetrisch ausfällt und die selektive Reduktion bestimmter Fe-Ionen beeinflusst. Inwieweit die umgebenden Protonen bei der AOR Einfluss auf ESR-/ENDOR-Eigenschaften und die Stärke des Reduktionspotentials nehmen, kann durch weiterführende Experimente wie Punktmutationen in unmittelbarer Nähe der Fe-Cluster aufgedeckt werden [vgl. 87, 88].

g-Tensor: Eigenwerte und Orientierung des g-Tensors sind Größen, die neben der Spindichte notwendig sind, um die elektronischen und magnetischen Eigenschaften eines Moleküls zu beschreiben [15, 16, 55]. Wie im Falle des apFdx orientiert sich die Lage des g-Tensors beider FeS-Cluster der AOR nicht ausschließlich an der Geometrie des FeS-Zentrums, sondern lehnt sich deutlich an die Symmetrie der Cystein-Ligandierung an. Bei allen drei 2Fe2S-Cluster ist die Lage des g-Tensors aus der Cluster-Ebene verkippt und zeigt mit den beiden Hauptwerten g_{\max} und g_{int} in Richtung bestimmter Cysteinliganden. Ähnliche Orientierung fand sich auch im Falle der hsAdx [87]. Gegensätzliche Raumlage bzgl. des Spinzentrums fand sich dagegen bei einem btRieske-ISP [18, 87]. Inwieweit die g-Eigenschaften von der Ligandierung beeinflusst wird, kann z.B. anhand Punktmutationen wie Cys-Ser-Austauschmutanten untersucht werden. Dies erfolgte bereits durch ESR-Experimente an Molybdopterinhydroxylasen [46, 80, 88, 139], diese konnten jedoch die relative g-Orientierung aufgrund nichtkristalliner Proben nicht aufklären. Orientierungsselektive ENDOR-Untersuchungen an Austauschmutanten wurden bislang nicht publiziert und bieten eine zusätzliche experimentelle Option bei der Untersuchung von FeS-Zentren bezüglich der g-Tensor-Lage.

Wie in Kap. 3.3.4 aufgeführt, lassen sich die ESR-Eigenschaften der interagierenden FeS-Cluster anhand eines Punkt-Dipol-Modells beschreiben [85]. Die ESR-Simulation, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ergab eine parallele Ausrichtung von g_{\max}/FeSI zu $g_{\text{int}}/\text{FeSII}$, ließ aber die relative g-Orientierungen offen. Die bei dieser Arbeit ermittelten g-Orientierungen mittels der orientierungsselektiven ENDOR-Spektroskopie stehen in Übereinstimmung mit der ESR-Simulation (vgl. Kap 6.2.3) und beschreiben die g-Orientierungen bezüglich der Cluster-Struktur.

Neben der Beschreibung von paramagnetischen Wechselwirkungen der Redoxzentren kann die Lage des g-Tensors weiterhin herangezogen werden, um die Interaktion von Proteinen zu

beschreiben, zwischen denen Elektronen-Transferprozesse stattfinden. Dies wurde erstmals bei der Analyse von Membranproteinen beschrieben [25]. Hinsichtlich der Fragestellung, welchen Einfluss die Orientierung des g -Tensors bei der Interaktion mit einem physiologischen Reaktionspartners der AOR spielt, erfordert jedoch zunächst die Aufklärung des bislang unbekanntem Elektronenakzeptors.

Hyperfeinwechselwirkung: Während die dipolaren Kopplungen der Protonen unmittelbar mit der Lage des g -Tensors und den Koordinaten der Protonen korrelieren und bei der Spektren-Simulation berechnet wurden, stellen die isotropen Kopplungskonstanten Werte dar, die iterativ ermittelt werden. Die Werte der AOR liegen in Bereichen früherer NMR-Experimenten an Ferredoxinen sowie der ENDOR-Analyse des apFdx [56], hsAdx sowie btRieske-ISP [87]. Ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen isotropen Kopplungen und des Torsionswinkels zwischen β -Protonen und Spinzentrum konnte dabei nicht gefunden werden. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit vorgenommenen Simulation der ENDOR-Spektren der AOR können weitere Untersuchungen an verwandten Molybdopterinhydroxylasen dazu dienen, die erhaltenen Simulationsparameter der isotropen Kopplungen der β -Protonen (sowie die Lage der g -Tensoren und die Spindichtevertelung) zu vergleichen. Dies bietet sich v.a. im Falle derjenigen Molybdopterinhydroxylasen an, von denen in den letzten Jahren Strukturdaten erhältlich sind (vgl. Kap. 3.2). So sollten die Ergebnisse der AOR im Vergleich mit denen verwandter Enzyme zur weiteren Aufklärung der elektronischen Eigenschaften von Molybdopterinhydroxylasen und ihrer Reaktionszentren dienen.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Achim C., Golinelli M.P., Bominaar E.L., Meyer J., Münck E. J., Am. Chem. Soc. 118, 8168-8169, 1996
- [2] Aliverti A., Hagen W.R., Zanetti G., FEBS Letters 368, 220-224, 1995
- [3] Andrade S.L.A., Brondino C.D., Feio M.J., Moura I., Moura J.J.G., Eur.J.Biochem. 267, 2054-2061, 2000
- [4] Banci L., Bertini I., Savllini G.G., Luchinat C., Inorg.Chem.35, 4248-4253, 1996
- [5] Barata B.A.S., Liang J., Moura I., LeGall J., Moura J.J.G., Hanh Huynh B., Eur.J.Biochem. 204, 773-778, 1992
- [6] Barber M.J., Bray R.C., Lowe D.J., Coughlan M.P., Biochem.J. 153, 297-307, 1976
- [7] Barber M.J., Coughlan M.P., Rajagopalan K.V., Siegel L.M., Biochemistry 21, 3561-3568, 1982
- [8] Beinert H., Holm R.H., Münck E., Science 277, 653-659, 1997
- [9] Beinert H., Eur.J.Biochem. 267, 5657-5664, 2000
- [10] Beinert H., Kennedy M.C., Eur.J.Biochem. 186, 5-15, 1989
- [11] Beinert H., J.Biol. Inorg.Chem. 5, 2-15, 2000
- [12] Bencini A., Gatteschi D., Electron Paramagnetic Resonance of Exchange Coupled Systems, Berlin Springer Verlag 1990
- [13] Berry, E. A., Guergova-Kuras M., Huang L. S., Crofts A.R., Annu.Rev. Biochem. 69, 1005-1075, 2000
- [14] Bertini I., Ciurli S., Luchinat C., Structure and Bonding 83, 1-53, 1995
- [15] Bertrand P., Guigliarelli B., Gayda J.P., Beardwood P., Gibson J.F., Biochim.Biophys. Acta 831, 261-266, 1985
- [16] Bertrand P., Gayda J.P., Biochim.Biophys.Acta 579 107-121, 1979
- [17] Bonin R., Martins B.M., Purvanov V., Fetzner S., Huber R., Dobbek H., Structure 12 1425- 1435, 2004
- [18] Bowman M.K., Berry E.A., Roberts A.G., Kramer D.M. Biochemistry 43, 430-436, 2004
- [19] Bracic G., Diplomarbeit, 1998

9. Literaturverzeichnis

- [20] Bray R.C. The Enzymes 12 299-419, 1975
- [21] Bray R.C., Adv. Enzymol Relat. Areas Mol. Biol.51, 107-165, 1980
- [22] Bray R.C., Gutteridge S., Biochemistry 21, 5992-5999, 1982
- [23] Bray R.C., Engel P.C., Mayhew S.G, Flavins and Flavoproteins 707-722, de Gruyter, Berlin, 1984
- [24] Bray R.C., Turner N.A., LeGall J., Barata B.A.S., Moura J.J.G., Biochem.J. 280, 817-820, 1991
- [25] Brugna M., Rodgers S., Schricker A., Montoya G., Kazmeier M., Nitschke W., Sinning I., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 97, 2069-2074, 2000
- [26] Caldeira J., Belle V., Asso M., Guigliarelli B., Moura I., Moura J.J.G., Bertrand B., Biochemistry 39, 2700-2707, 2000
- [27] Cammack R., Adv.Inorg.Chem. 38, 281-322, 1992
- [28] Canne C., Finsterbusch S.I., Lingns J., Kappl R., Fetzner S., Hütterman J., Biochemistry 36, 9780-9790, 1997
- [29] Canne C.; Dissertation, Universität des Saarlandes, 1999
- [30] Canne C., Lowe D.J., Fetzner S., Adams B., Smith A.T., Kapl ., Bray R.C., Hüttermann J., Biochemistry 38, 14077-14087, 1999
- [31] Canne C., Ebelshäuser M., Gay E., Shergill J.K., Cammack R., KapplR., Hüttermann J., J.Biol.Inorg.Chem. 5, 514-526, 2000
- [32] Capozzi F., Ciurli S., Luchinat C., Struct.Bonding 90, 127-160, 1998
- [33] Chen K.S., Bonagura C.A., Tilley G.J., McEvoy J.P., Jung Y.S., Armstrong F.A., Stout C.D., BurgessB.K., Nat.Struct.Biol. 9, 188-192, 2002
- [34] Choi E.Y.,Stockert A.L., Leimkühler S.Hille R., J.Inorg.Bio. 98, 841-848,
- {35} Correia dos Santos M.M., Sousa P.M.P., Goncalves M.L.S., Romao M.J., Moura I., Moura J.J.G., Eur.J.Biochem.271, 1329-1338, 2004
- [36] Coucouvanis D., Adv.Inorg.Biochem.9, 75-122, 1994
- [37] Crouse B.R., Meyer J., Johnson M.K., J.Am.Chem.Soc. 117, 9612-9613 ,1995
- [38] Davies E.R., Phys.Lett. 74A, 1-2, 1974
- [39] Dobbek H., Gremer L., Meyer O., Huber R., Proc. Natl., Acad. Sci. USA 96, 8884-8889
- [40] Dowsing R.D., Gibson J.F., J.Chem.Phys. 50, 294, 1969

9. Literaturverzeichnis

- [41] Dugad L.B., LaMar G.N., Banci L., Bertini I., *Biochemistry* 29, 2263-2271, 1990
- [42] Dunham W.R., Bearden A.J., Salmen I.T., Palmer G., Sands R.H., Orme-Johnson W.H., Beinert H., *Biochim.Biophys.Acta* 253, 134-152, 1971
- [43] Dunham W.R., Sands R.H., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 312, 255-261, 2003
- [44] Enroth C., Eger B.T., Okamoto T., Nishino T., Pai E.F., *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 97, 10723-10728, 2000
- [45] Finsterbusch, J.; Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, 1995
- [46] Frerichs-Deeken U., Goldenstedt B., Gahl-Janßen R., Kappl R., Hüttermann J., Fetzner S., *Eur.J.Biochem.* 270, 1567-1577, 2003
- [47] Fritz J., Anderson R., Fee j., Palmer G., Sands R.H., Tsibris J.C.M., Gunsalus I.C., Orme Johnson W.H., Beinert H. *Biochim.Biophys.Acta.* 253, 110-133, 1971
- [48] Fukuyama K., *Photosynthesis Research* 81, 289-301, 2004
- [49] Garland S.A., Hoff K., Vickery L.E., Culotta V.C., *J.Mol.Biol.* 294, 897-907, 1999
- [50] Gates K.E., Griffin M., Hanson G.R., Burrage K., *J.Magn.Res.*135, 104-112, 1998
- [51] Gibson J. F., Hall D.O., Thornley J.H., Whatley F.R., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 56, 987-990, 1966
- [52] Griffin M., Muys A., Noble C., Wang D., Eldershaw C., Gates K.E., Burrage K., Hanson G.R., *Mol.Phys.Rep.*26, 60-84, 1999
- [53] Guigliarelli B., Bertrand P., *Adv.Inorg.Chem.* 47, 53-129, 1999
- [54] Gurbiel R.J., Batie C.J., Sivaraja M., True A.E., Fee J.A., Hoffman B.J., Ballou D.P. *Bochemistry* 28, 4861-4871, 1989
- [55] Gurbiel R.J., Doan P.E., Gassner G.T., Macke T.J., Case D.A., Ohnishi T., Fee J.A., Ballou D.P., Hoffman B.M., *Biochemistry* 35, 7834-7845, 1996
- [56] Gutteridge S., Bray R.C. *Biochem. J.* 189, 615-623, 1980
- [57] Gutteridg S., Tanner S.J., Bray R.C., *Biochem.J.* 175, 869-878 ,1978
- [58] Hänzelman P., Meyer O., *Eur.J.Biochem.* 255, 755-765, 1998
- [59] Hänzelmann P., Dobbek H., Gremer L., Huber R., Meyer O., *J.Mol.Biol.* 301, 1221-1235, 2000
- [60] Hahn E., *Phys.Rev.* 80, 580-594,1950
- [61] Hay P.J., Thibeault J.C., Hoffmann R., *J.Am.Chem.Soc.* 97, 4884-4899, 1975

- [62] Henderson T.A., Hurst G.C., Kreilik R.W., *J.Am.Chem.Soc.* 107, 7299-7303, 1985
- [63] Hidalgo E., Ding H., Demple B., *Trends.Biochem.Sci.* 22, 207-210, 1997
- [64] Hille R., Massey V., *J.Biol.Chem.* 257, 8898-8901, 1982
- [65] Hille R., Hagen W.R. Dunham W.R., *J.Biol.Chem.* 269, 10569-10575, 1985
- [66] Hille R., *Chem.Rev.* 96, 2757-2816, 1996
- [67] Hille R., *J.Bioinorg.Chem.* 2, 804, 1997
- [68] Hoffman B.M., Martinsen J., Venters R.A., *J.Magn.Res.* 59, 110-123, 1984
- [69] Holm R.H., Kennephol P., Solomo E.I., *Che.Rev.* 96, 2239-2314, 1996
- [70] Howes B.D., Bennet B., Bray R.C., Richards R.L., Lower D.J., *J.Am.Chem.Soc.* 116, 11524-11625, 1994
- [71] Howes B.D., Bray R.C., Richards R.L., Turner N.A. Bennett B., Lowe D.J., *Biochemistry* 29, 6120-6127, 1996
- [72] Howes B.D., Bray R.C., Richards R.L., Turner N.A., Bennett B., *Biochemistry* 35, 1432-1443, 1996
- [73] Huber R., Duarte R., Moura I., Moura J.J.G., LeGall J., Liu M., Hille R., Romao M.J., *Procl.Natl Acad Sci.USA* 93, 8846-8851, 1996
- [74] Huber R., Hof P., Duarte R.O., Moura J.J.G., Moura I., Liu M.Y. LeGall J., Hille R., Archer M., Romao M.J., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 8846-8851 1996
- [75] Hüttermann J., *Biol.Magn.Res.* 13, 219-252, 1993
- [76] Hüttermann J., Däges GP., Reinhard H., Schmidt G., Nuclear magnetic resonance of paramagnetic macromolecules, pp165B192. Ed GN La Mar. Kluwer Academic Publishers
- [77] Hughes R.K., Bennett B., Bray R.C., *Biochemistry* 31, 3073-3083, 1992
- [78] Hurst G.C., Henderson T.A., Kreilik R.W., *J.Am.Chem.Soc.*, 107, 7294-7299, 1985
- [79] Iwasaki M., *J.Magn.Res.*16, 417-423, 1974
- [80] Iwasaki T., Okamoto K., Nishino T., Mizushima J., Hori H., Nishino T., *J.Biochem.*127 771-778 2000
- [81] Jeschke G., Einführung in die ESR-Spektroskopie, Skript zur Vorlesung (online pdf.-Datei) 1998
- [82] Kappl R.; Dissertation, Universität Regensburg, 1988
- [83] Kappl R., Ciurli S., Luchinat C., Hüttermann J. *J.Am.Chem.Soc.* 121, 1925-1935, 1999

- [84] Kappl R., Hüttermann J., Fetzner S., metal ions in biological systems Vol.39, 481537
2002 Marcel Dekker In., Nev York
- [85] Kappl R. Craciun C., Hüttermann J., Unveröffentlichte Daten
- [86] Kappl R., Bracic G., Hüttermann J., J.Biological Magnetic Resonance Vol.28, Berlin
Springer, 2006
- [87] Kappl R., Ebelshäuser M., Hannemann F., Bernhardt R., Hüttermann J., Appl. Magn.
Reson. 30, 427-459, 2006
- [88] Kappl R., Sielker S., Rangelova K., Wegner J., Parschat K., Hüttermann J., Fetzner S.
Biochemistry 45, 14853-68, 2006
- [89] Khoroshilova N, Popescu C, Münck E, Beinert H, Kiley PJ, Proc.Natl.Acad.Sci. USA
94, 6087-6092, 1997
- [90] Kirmse,R.; Stach, J. ESR-Spektroskopie; Akademie-Verlag: Berlin 1985
- [91] Kisker C., Schindelin H., Baas D., Retey J., Meckenstock R.U., Kroneck P.M.H., FEMS
Microbiol.R. 22, 503- 521, 1999
- [92] Kopp M., Mackey J.H., J. Comput.Phys.3, 539, 1969
- [93] Kreiter A., Hüttermann J., J.Magn.Res. 93, 12-26, 1991
- [94] Langen R., Jensen G.M., Jacob U., Stephens P.J., Warshel A., J.Biol.Chem. 267, 25625-
25627, 1992
- [95] Lefebvre R., Maruani J., J. Chem.Phys.1480, 1965
- [96] Lin IJ., Gebel E.B., Machonkin T.E., Westler W.M., Markley J.L., J.Am.Chem.Soc.
125,1464-1465, 2003
- [97] Low D.W., Hill M.G., J Am Chem Soc. 122, 11039-11040, 2000
- [98] Lowe D.J., Richards R.L., Bray R.C., JBIC 3, 557-558, 1998
- [99] Lowe J.D.,metal ions in biological systems Vol 39 455-480 2002 Marcel Dekker In.,
Nev York
- [100] Luykx D.M., Duine J.A., de Vries S., Biochemistry 37, 11366-11375, 1998
- [101] Malthouse J.P.G., Gutteridge S., Bray R.C., Biochem J.185, 767-770, 1981
- [102] Marquet A., Florentin D., Ploux O., Tse Sum Bui B., Phys.Org.Chem. 11, 529-535,
1998
- [103] Meyer J., Fujinaga J., Gaillard J., Lutz M., Biochemistry 33, 13642-13650, 1994

- [104] Mims W.B., *Pro.R.SocLond.* 283, 452-457, 1965
- [105] More C., Asso M., Roger G., Guigliarelle B., Caldeire J., Moura J., Bertrand B., *Biochemistry* 44, 11628-11635, 2005
- [106] Mouesca J.M., Rius G., Lamotte B., *J.Am.Chem.Soc.* 115, 4714-4731, 1993
- [107] Mouesca J.M., Noodlemann L., Case D.A., Lamotte B., *Inorg.Chem.* 34, 4347-4359, 1995
- [108] Moura J.J.G., Xavier A.V., Bruschi M., LeGall J., Hall D.O., Cammack R., *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 72, 782-789, 1976
- [109] Moura J.J.g., Xavier A.V., Cammack R., Hall D.O., Bruschi M., LeGall J., *Biochem.J.* 173, 419-425, 1978
- [110] Mukherjee R.N., Stack T.B.P., Holm R H., *J.Am.Chem.Soc.* 110, 1850, 1988
- [111] Noodleman L., Norman J.G., Osborne J.H., Aizman A., Case D.A., *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3418- 3426, 1985
- [112] Okamura T., Takamizawa S., Ueyama N., Nakamura A., *Inorg.Chem.* 37, 18-28, 1998
- [113] Pilato R.S., Stiefel E.I., *Bioinorganic Catalysis*, Reedijk J. (Hrsg.), Marcel Decker, NY 1993, 131-188, 1999
- [114] Rao K.K., Cammack R., Hall D.O., Johnson C.E., *Biochem.J.* 122, 257-265, 1971
- [115] Rebelo J., Macieira S., Dias J.M., Huber R., Ascenso C.S., Rusnak F., Moura J.J.G., Moura I., Romao M.J., *J.Mol.Biol.* 297, 135- 146, 2000
- [116] Rebelo J.M., Dias J.M., Huber R., Moura J.J.G., Romao M.J., *J.Biol.Inorg.Chem.* 6, 791-800, 2001
- [117] Rist R., Hyde J.S.; *J. Chem.Phys.* 52, 4633-4643, 1970
- [118] Romao M.J., Archer M., Moura I., Moura J.J.G., LeGall J., Engh R., Schneider M., Hof P., Huber R. *Science* 270, 1170-1176, 1995
- [119] Romao M.J., Rösch N., Huber R., *JBIC* 2, 782-785, 1997
- [120] Romao M.J. Knäblein J., Huber R., Moura J.J.G *Prog.Biophys molec.Bio.* Vol 68, 121-144, 1997
- [121] Schmidt G.P.; *Dissertation, Universität des Saarlandes*, 1996
- [122] Schneider F., Plato M., *Elektronenspinresonanz*, Verlag Karl ThiemeKG, München 1971
- [123] Schweiger A.; *Puls-Elektronenspinresonanz-Spektroskopie: Grundlagen, Verfahren und Anwendungsbeispiele; Angewandte Chemie Heft 3* 223-350, 1991

9. Literaturverzeichnis

- [124] Seidler A., Jaschkowitz K., Wollenberg M., *Biochem.Soc.Trans.* 29, 418-421, 2001
- [125] Sigel A., Sigel H., Eds., *Metal Ions in biological systems* Vol. 39 2002 Marcel Dekker In., New York
- [126] Tanner S., Bray R.C., Bergmann F., *Biochem.Soc.Trans.* 6, 1328-1330, 1978
- [127] Taylor P.C., Baugher J.F., Kriz H.M., *Chem.Rev.* 75, 2, 203-239, 1975
- [128] Thapper A., Rivas M.G., Brondino C.D., Ollivier B., Fauque G., Moura I., Moura J.J.G. *J.Inorg.Biochem.* 100, 44-50, 2005
- [129] Thoenes U., Flores O.L., Neves A., Devrees B., Van Beeumen J.J., Huber R., Romao M.J., LeGall J., Moura J.J.G., Rodrigues-Pousada C., *Eur.J.Biochem.* 220, 901-910, 1994
- [130] Trautwein A.X., Bill E., Bominaar E.L., Winkler H., *Structure and Bonding* 78, 1, 1991
- [131] Trivelli X., Bouillac S., Tsan P., Krimm I., Lancelin J.M., *Photosynthesis research* 79, 357-367, 2004
- [132] Truglio J.J., Theis K., Leimkuhler S., Rappa R., Rajagopalan K.V., Kisker C., *Structure* 10, 115-125, 2000
- [133] Trumpower B.L: *Biochim.Biophys.Acta* 639, 129-155, 1981
- [134] Tse sum Bui B., Florentin D., Fournier F., Ploux O., Mejean A., Marquet A., *FEBS Lett.* 440, 226-235, 1998
- [135] Turner NA., Barata BA.S., Bray R.C., Deistung J., LeGall J., Moura J.J.G. *Biochem. J.* 243, 755-761, 1987
- [136] Uhlmann H., Bernhardt.R., *J.Biol.Chem.* 270, 29959-29966, 1995
- [137] Verhagen M.F.J.M, Link T.A., Hagen W.R., *FEBS Lett.* 361, 75-78, 1995
- [138] Weil J.A., Bolton J.R., Wertz J.E.; *Elektron Paramagnetic Resonanz* John Wiley and sons, New York 1994
- [139] Werth M.T., Cecchini G., Manodori M., Ackrell B.A.C., Schröder I., Gunsalus R.P., Johnson M.K., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, 8965-8969, 1990
- [140] Young C.G. *JBIC* 2, 810-816, 1997

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Die beiden möglichen Einstellungen des Spinnmoments eines freien Elektrons in einem Magnetfeld B_0 (S. 4).

Abb. 2.2: Energieniveauschema für ein System mit $S = 1/2$ im Feld B_0 (S. 5).

Abb. 2.3: Form einer homogen verbreiterten Absorptionslinie (Lorentzkurve) und inhomogen Linienverbreiterung als Superposition homogener Linien (Gaußkurve (S. 12).

Abb. 2.4: Darstellung der Magnetfeldrichtung anhand einer Arbeitspunktkugel (g-Ellipsoid), (S. 14).

Abb. 2.5: Darstellung der Projektion aller Linien konstanten g-Werts eines Systems mit rhombischem g-Tensor (S. 15).

Abb. 2.6: Pulverspektrum mit axialem g-Tensor und rhombischem g-Tensor eines Systems $S = 1/2, I = 0$ (S. 16).

Abb. 2.7: Energieniveauschema von ENDOR-Übergängen für ein Spinsystem $S = 1/2, I = 1/2$ (S. 17).

Abb.2.8: Anordnung der ENDOR-Linien eines $S = 1/2, I = 1/2$ -Systems (S. 18).

Abb. 2.9: Energieniveauschema von ENDOR-Übergängen für ein Spinsystem $S = 1/2, I = 1$, (S. 19).

Abb. 2.10: Anordnung der ENDOR-Linien eines $S = 1/2, I = 1$ -Systems (S. 19).

Abb. 2. 11: Relaxationswege eines $S=1/2, I=1/2$ -Spinsystems (S. 20).

Abb. 2.12: ESR-Pulverspektrum mit drei ausgewählten Arbeitspunkten und simulierte ENDOR-Spektren (S. 22).

Abb. 2.13: giso-Linien von drei Arbeitspunkte und die Projektion der jeweiligen g-iso-Linien auf den A-Tensor (S. 23).

Abb. 2.14: Zwei-Puls-Echo-Sequenz zur Erzeugung von Elektronenspinechos (S. 24).

Abb.2.15: Schematische Darstellung des Magnetisierungsvektors in einem rotierenden Koordinatensystem bei einem Zwei-Puls-Echo-Experiment (S. 25).

Abb. 2.16: Davies-ENDOR-Sequenz mit den drei Unterteilungen Präparation (MW- π -Puls), Polarisationstransfer (RF- π -Puls) und Detektion (Hahn-Sequenz) (S. 26).

Abb. 2.17: Besetzung der Energieniveaus bei einem Davies-ENDOR-Experiment eines Spinsystems $S = 1/2$, $I = 1/2$ (S. 27).

Abb. 3.1: Verschiedene Formen der FeS-Zentren (S. 30).

Abb.3.2: g-Tensor-Orientierung verschiedener 2Fe2S-Komplexe (S. 36).

Abb. 3.3.: Struktur der Reaktionszentren der 3 Molybdopterin-Gruppen (S. 37).

Abb. 3.4: Struktur des Molybdopterin-Kofaktors, (S. 40).

Abb.3.6: ESR-Signale der XO, (S. 42).

Abb.3.7 :ESR-Spektren von Tieftemperatur-Messungen bei verschiedenen Molybdopterin-hydroxylasen (S.44).

Abb.3.8.: Proteinstruktur der AOR (S. 45).

Abb.3.9: Schematische Darstellung der 3 Reaktionszentren der AOR (S. 47).

Abb. 3.10: Reaktionsmechanismus der AOR (S. 48).

Abb. 3.11: FeSI und FeSII mit koordinierenden Cysteinliganden (S. 49).

Abb. 3.12: ESR-Spektrum der AOR bei 100K (S.50).

Abb. 3.13: ESR-Spektrum der AOR bei 70K (S.51).

Abb.3.14: ESR-Spektrum der AOR bei 30K (S. 52).

Abb.3.15: ESR-Spektrum der AOR bei 20K (S. 52).

Abb. 3.16: Beschreibung der Orientierung $g(\text{FeSI})$ bezüglich R anhand der Euler Winkel CHI_R und RHO_R , (S. 54).

Abb.3.17: Relative Orientierung von $g(\text{FeSI})$ und $g(\text{FeSII})$ bei der ESR-Simulation der $g_{\text{max}}/\text{FeSI}$ -Aufspaltung (S. 54).

Abb. 3.18:ESR-Simulation der AOR (S. 55)

Abb. 5.1: Komponenten eines CW-ESR-Spektrometers (S. 63).

Abb. 5.2: Prinzip der Amplitudenmodulation; links: Umsetzen des Modulationsfeldes B_m an der Absorptionskurve; rechts: resultierende Signalform,(S. 64).

Abb. 5.3: Zusatzkomponenten eines Puls-Spektrometers (S. 67).

Abb. 5.4: Feld-Frequenz-Plot des Asp-Fdx (S. 71).

Abb. 5.5: ESR-Simulation mit Phytia (S. 77).

Abb. 5.6: ENDOR-Simulation mit Phytia (S. 79).

Abb. 5.7: Aufbereitung der Simulation-Daten mit Phytia (S. 81).

Abb. 6.1: ESR-Spektrum und experimentelle ENDOR-Spektren (AP 328, 330, 332 und 334mT), (S. 84).

Abb. 6.2: ESR-Spektrum und experimentelle ENDOR-Spektren (AP 336, 3380, 340 und 342mT), (S. 85).

Abb. 6.3: ESR-Spektrum und experimentelle ENDOR-Spektren (AP 344, 346, 348 und 350mT), (S. 87).

Abb. 6.1: ESR-Spektrum und experimentelle ENDOR-Spektren (AP 352, 354, 356 und 358mT), (S. 88).

Abb. 6.5: ENDOR-Spektren an verschiedenen Arbeitspunkten in protoniertem bzw. deuterierten Medium (S. 90).

Abb. 6.6: ENDOR-Spektren an verschiedenen Arbeitspunkten in protoniertem bzw. deuterierten Medium (S. 91).

Abb. 6.7: Niedrigmodulierte Spektren im Bereich g_{\max} FeSI (S. 93).

Abb. 6.8: Niedrigmodulierte Spektren im Bereich g_{\min} FeS (S. 94).

Abb. 6.9: Puls-ENDOR-Spektren über den gesamten g -Wert-Bereich in 1. Ableitung (S. 97).

Abb. 6.10: normierte Absorptionsspektren und Differenzspektren bei g_{int} /FeSI (S. 98).

Abb. 6.11: normierte Absorptionsspektren und Differenzspektren bei g_{\max} /FeSI (S. 99).

Abb. 6.12: Feld-Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR Spektren (S. 101).

Abb. 6.13: Vergleich der beiden hochmodulierten Messreihen in H₂O-Puffer und D₂O-Puffer (S. 102).

Abb. 6.14: ESR- Spektrum und Vergleich von experimentellen und simulierten ENDOR-

Spektren an den Arbeitspunkten 354mT und 356mT (S. 106).

Abb. 6.15: ESR- Spektrum und Vergleich von experimentellen und simulierten ENDOR-Spektren an den Arbeitspunkten 354mT und 356mT (S. 106).

Abb. 6.16: g- Tensor- Orientierung in Bezug auf das FeSII- Zentrum (S. 109).

Abb. 6.17: Feld- Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR- Spektren der AOR mit einer Simulation der äußeren Kopplungen der vier Cysteinprotonen am Fe(III) des FeSII-Zentrums (S. 110).

Abb. 6.18: ESR- und simulierte ENDOR-Spektren an den Arbeitspunkten 330mT und 332mT in protoniertem bzw. deuteriertem Medium (S. 111).

Abb. 6.19: ESR- und simulierte ENDOR-Spektren an den Arbeitspunkten 354mT und 356mT in protoniertem bzw. deuteriertem Medium (S. 112).

Abb. 6.20: Experimentelles Spektrum und simuliertes Spektrum für die beiden β -Protonen von Cysteinligand 103 bei $g = 1.9959$ (S. 116).

Abb. 6.21: Experimentelles Spektrum und simuliertes Spektrum für die beiden β -Protonen und das α -Proton des Cysteinligand 137 bei $g = 1.935$ (S. 116).

Abb. 6.22: g- Tensor- Orientierung in Bezug auf das FeSI- Zentrum (S. 118).

Abb. 6.23: Feld- Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR- Spektren der AOR mit einer Simulation der äußeren Kopplungen der vier Cysteinprotonen am Fe(III)-Zentrum FeSI (S. 119).

Abb. 6.24: Vollsimulation der beiden [2Fe-2S]-Cluster am Arbeitspunkt 336mT ($\sim g_{\max}/\text{FeSI}$) (S. 122).

Abb. 6.25: Vollsimulation der beiden [2Fe-2S]-Cluster am Arbeitspunkt 349 mT ($\sim g_{\text{int}}/\text{FeSI}$) (S. 122).

Abb. 6.26: Vollsimulation der beiden [2Fe-2S]-Cluster am Arbeitspunkt 352 mT ($\sim g_{\min}/\text{FeSI}$) (S. 123).

Abb. 6.27: Feld- Frequenz-Plot der experimentellen ENDOR- Spektren der AOR mit einer Simulation der äußeren Kopplungen (S. 124).

Abb.6.28: Relative Lage der beiden FeS-Komplexe zueinander und Transfer der g-Tensoren **$g(\text{FeSI})$** und **$g(\text{FeSII})$** (S. 126).

Abb. 6.29: ESR- und simuliertes ENDOR-Spektrum am Arbeitspunkt 336 mT in protoniertem bzw. deuterierten Medium (S. 127).

Abb. 6.30: ESR- und simuliertes ENDOR-Spektrum am Arbeitspunkt 352 mT in protoniertem bzw. deuterierten Medium (S. 128).

Abb. 6.31: Feld-Frequenz-Plot von Resonanzbereichen, die Signallückgänge der ENDOR-Spektren der deuterierten Probe im Vergleich zur undeuterierten Probe aufzeigen (S. 129).

Abb. 6.32: Simulierte Spektren des FeSII an den beiden Arbeitspunkten g_{\max}/FeSI und g_{\min}/FeSI und die dazugehörigen Differenzspektren, die Anteile von FeSII enthalten (S. 130).

Abb. 6.33: verschiedene g-Tensor-Orientierungen in Bezug auf das [2FE-2S]-ZentrumII, die eine Reproduktion der experimentellen ENDOR-Spektren erzeugen, (S. 132).

Abb. 6.34: Anpassung der Linienbreite und Linienform durch skalare g-strain Reproduktion und Positionskorrekturen der in die Simulation einbezogenen Protonen (S. 133).

Abb. 6.35: Graphische Zusammenfassung der Bereiche, auf die sich die Lagen der g-Tensor-Achsen bei FeSI bestimmen lassen (S. 140).

Abb. 6.36: Variation der Protonenpositionen für Cys48 β 1 und Cys60 β 1(S. 142).

Abb. 7.1.: Experimenteller F-Plot des apFdx mit simulierten Linienverläufen der 4 β -Protonen am Fe(III)-Kern (S. 143).

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 7.2: Strukturvergleich der FeS-Cluster von apFdx und FeSII der AOR (S. 144)

Abb.7.3: Strukturvergleich FeSI und FeSII mit den koordinierenden Cysteinliganden und den dazugehörigen β -Protonen (S. 145).

Abb. 7.4: Verteilung der NH Dipole in der Umgebung der FeS-Cluster (S. 148).

Meinen besonderen Dank gilt Herrn Prof. Jürgen Hüttermann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die intensive Betreuung beim durchführen der Arbeit sowie für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Reinhard Kappl für seine Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen, die diese Arbeit begleitet haben.

Meinen Dank gilt auch Herrn Prof. Moura der technischen Universität Lissabon und seiner Arbeitsgruppe, von der die Enzymprobe isoliert und gereinigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde.

Danken möchte ich auch Herrn Gerhard Bracic für die zahlreichen Erweiterungen und Verbesserungen der Simulationsprogramme, die im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Innerhalb der Arbeitsgruppe bedanke ich mich weiter bei Herrn Christoph Müller für die vielen Hilfestellungen bei der Durchführung der ESR- und ENDOR-Messungen und Frau Cora Craciun für die ESR-Simulation der Aldehyd Oxidoreduktase und die Puls-ENDOR-Experimente an der Aldehyd Oxidoreduktase, die begleitend zu dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, Heike Luxenburger, Chandrima Pahl, Kalina Ranguelova, Erik Singer und Michael Ebelshäuser für das freundliche Arbeitsklima.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Regine Kaleja (Sekretariat), Herrn Josef Marx (Labor), den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt, Gerd Rothaar und Rüdiger Stumpf sowie Herrn Elmar Arendt (elektronische Werkstatt) für die Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt aber meinen Eltern Bernhard und Mathilde Dell und meiner Familie, die mir mit ihrer liebevollen Anteilnahme während meines Studiums und meiner Promotion stets zur Seite standen.

Lebenslauf

Name: Thomas Dell

Geburtsdatum 12.07.70

Geburtsort Saarlouis

Beruflicher Werdegang

schulische Ausbildung: Sept. 1976 - Juli 1980
Grundschule Schwarzenholz
Sept. 1980 - Juli 1981
Hauptschule Schwarzenholz
Aug. 1981 - Juli 1988
Realschule Heusweiler

betriebliche Ausbildung: Aug. 1988 - Jan. 1992
Mess- und Regelmechaniker
Saarstahl AG, Völklingen

berufliche Tätigkeit: Feb. 1992 - Aug. 1992
Facharbeiter, Saarstahl AG

schulische Weiterbildung: Sept. 1992 - Juni 1995
Saarlandkolleg Saarbrücken
Abschluss: Hochschulreife

Zivildienst: Juli 1995 - Sept. 1996
Schwerbehindertenbetreuung
Arbeiterwohlfahrt Saarbrücken

Studium: Okt. 1996 - Dez. 2001
Universität Kaiserslautern
Biologie (Studiengang Diplom)

berufliche Tätigkeit: Jan. 2002 - Aug. 2007
wissenschaftlicher Mitarbeiter
Universitätsklinik Homburg (Abt. Biophysik)

seit Jan. 2002 Ausbildungsreferent für
Sportfischerprüfung
Landesfischereiverband Saar

seit Jan. 2008 Projektmanagement „Ökologische und
Nachhaltige Bildung“
Ökologisches Schullandheim Gersheim

