

Die aktiven Zentren
der
Cytochrom-c-Oxidase

Strukturuntersuchungen mit EXAFS-Spektroskopie
an Metalloenzymen und Modellkomplexen

Von der
Fakultät für Naturwissenschaften
der
Gerhard-Mercator-Universität — Gesamthochschule Duisburg

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
THOMAS MEYER
aus Bremen

Erster Referent: PROF. DR. GERALD HENKEL

Zweiter Referent: PRIV.-DOZ. DR. MARTIN KÖCKERLING

Datum der Einreichung: 11.03.2002

Datum der mündlichen Prüfung: 19.06.2002

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden unter der Anleitung von PROF. DR. GERALD HENKEL im Institut für Chemie, Abteilung Festkörperchemie der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg im Zeitraum von Mai 1998 bis Juli 2001 durchgeführt.

Meinen lieben Eltern

*Erst wenn wir die nächste Ecke erreicht haben,
wissen wir, was dahinter ist.*

Vorwort

Der Start ins Themengebiet Bioanorganische Chemie ist für mich aufgrund meiner vorherigen Tätigkeit im Bereich der Physikalischen Chemie eine gewaltige thematische Herausforderung gewesen, die durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit im Gebiet Bioanorganik jedoch einen besonderen Reiz enthält.

Das interessante und umfassende Thema dieser Dissertation verdanke ich meinem Doktorvater PROF. DR. GERALD HENKEL. Ich danke ihm herzlich für die engagierte (auch finanzielle) Förderung während meiner Zeit in Duisburg, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, die stets offenstehende Tür sowie die Möglichkeit, meine Ideen eigenständig umzusetzen.

Das Chemiestudium hat meinen Freund DR. JÖRG SCHNEIDER und mich in Oldenburg zusammengeführt. JÖRG war schließlich derjenige, der mich dazu gebracht hat, das Thema dieser Arbeit als Herausforderung anzunehmen. In Duisburg haben wir uns dann nicht nur einen Etagenflur geteilt, sondern auch neben der Arbeit einiges erlebt, wobei auch hier fachliche Diskussionen häufig im Vordergrund standen. Seit er nicht mehr direkt das Leben in der FKC^a beeinflusst, fehlt hier etwas.

DR. JOCHEN GROPE hat mich in die Geheimnisse von „EXAFS“ eingeführt. Lange Diskussionen über die verschiedensten Themen waren bei uns im Büro an der Tagesordnung. Gleichzeitig hat er mir auch den tieferen Zugang zur UNIX-Welt (besonders SuSE-Linux) eröffnet. Daher wurde diese Arbeit nicht mit dem häufig genutzten, allseits bekannten Schreibprogramm erstellt, sondern ist unter Linux mit L^AT_EX^b entstanden. Aus der intensiven Zusammenarbeit mit JOCHEN wurde eine Freundschaft — auch zu seiner Familie — die ich auf keinen Fall missen möchte.

Mit meinem Nachfolger DIPL.-CHEM. BJÖRN LIPPOLD verbinden mich viele Gespräche über die Hydrogenase und gemeinsame Messaufenthalte auf dem DESY-Gelände^c in Ham-

^aFKC: Festkörperchemie.

^bL^AT_EX: <http://www.lyx.org>; komfortable Benutzeroberfläche für das Textsatzprogramm L^AT_EX.

^cDESY: Deutsches Elektronen-Synchrotron.

burg. Ihm wünsche ich für seine Arbeit gleich gute Unterstützung und Mitstreiter — auch für die langen Nächte an der Beamline — wie ich sie erfahren habe.

PRIV.-DOZ. DR. MARTIN KÖCKERLING möchte ich an dieser Stelle ein Dankeschön sagen für seine Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft bei Fragen zur Kristallstrukturanalyse und anderen fachlichen Dingen.

Unsere Sekretärin CHRISTEL VON DER WARTH hat es immer wieder geschafft, auch im Papierkrieg einen klaren Kopf zu behalten. Mit ihr verbinden mich nicht nur viele Formulare und Anträge, sondern auch besonders nette Gespräche im Hochschulalltag.

Die Arbeitsgruppe FKC wurde auch von DR. CHRISTIAN SCHOLTEN mit seiner unkomplizierten Art positiv geprägt. Daraus hat sich bis heute ein intensiver Kontakt erhalten.

Durch die enge Kooperation mit PRIV.-DOZ. DR. TEWFIK SOULIMANE aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. GERHARD BUSE (Institut für Biochemie am Klinikum Aachen) ist diese Dissertation erst ermöglicht worden. TEWFIK hat die hier untersuchte ba_3 -Oxidase isoliert und war immer ein hervorragender Ansprechpartner, wenn es um die Cytochrom-c-Oxidase allgemein oder die ba_3 -Oxidase im Speziellen ging.

Die engagierte Unterstützung durch DR. WOLFRAM MEYER-KLAUCKE bei den EXAFS-Messungen an der Beamline des EMBL^d in Hamburg hat ebenfalls nachhaltig zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne seine nächtlichen telefonischen Ratschläge wären bestimmt einige Nächte an Messzeit verloren gegangen.

DR. JAN HANNS hat während seiner „PostDoc“-Zeit in Hamburg mehr als nur Messzeitbetreuung geleistet. Mit seiner Hilfe konnte ich die Molmassenbestimmungen der Modellkomplexe in der Universität Hamburg durchführen.

Mein Dank gilt allen hier aufgeführten Personen, den Mitstreitern in der Arbeitsgruppe FKC, meiner Freundin STEPHANIE SPODDIG, meinem Freund HOLGER LANGER und allen, die zum positiven Ergebnis meiner Arbeit beigetragen haben, ohne explizit genannt worden zu sein.

JOCHEN, JÖRG und BJÖRN haben mit großer Geduld und bewundernswerter Genauigkeit das Manuskript Korrektur gelesen. Für alle Anregungen und konstruktive Kritik bin ich ihnen sehr dankbar.

^dEMBL: European Molecular Biology Laboratory.

Durchgeführt wurde diese Arbeit im Rahmen des Projektes „*Untersuchungen zur Struktur biologisch aktiver Metallkoordinationszentren*“ des BMBF^e, das auch die notwendigen finanziellen Mittel bereitgestellt hat.

Ich hoffe, dass die vorliegenden Ergebnisse einerseits einen weitergehenden Einblick in die Thematik vermitteln und andererseits dazu animieren, von diesem Ausgangspunkt die Untersuchungen fortzusetzen.

^eBMBF: **B**undes**m**inisterium für **B**ildung und **F**orschung; Verbundprojekt 48 (EXAFS- und XANES-Untersuchungen mit Synchrotronstrahlung zur Struktur und Funktion biologisch wichtiger Metallkoordinationszentren).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einordnung dieser Arbeit	1
1.2	Cytochrom-c-Oxidase: Enzym der Atmung	2
1.2.1	Zellatmung	3
1.2.2	Aufbau der Cytochrom-c-Oxidase	6
1.2.3	Funktionen der Cytochrom-c-Oxidase	7
1.2.4	Funktionsstörungen der Cytochrom-c-Oxidase	10
1.2.5	Die ba_3 -Oxidase aus <i>Thermus thermophilus</i>	12
1.2.6	Strukturuntersuchungen	17
2	Zielsetzung	25
3	Experimenteller Teil	27
3.1	Probenvorbereitung und Lagerung	27
3.1.1	Cytochrom-c-Oxidase	27
3.1.2	Modellkomplexe	29
3.2	Röntgenabsorptionsmessungen	30
3.2.1	Das Röntgenabsorptionsspektrometer des EMBL in Hamburg	30
3.2.2	Messungen am EXAFS-Messstand des EMBL	33
3.2.3	Messstrategie	33
3.2.4	Datenreduktion	35

3.2.5	CHAOS: Ein optimiertes Datenvorauswertungssystem	37
3.2.6	Datenextraktion	41
3.2.7	Modellierung und Anpassung mit Cerius ²	42
3.3	Molmassenbestimmung	45
3.3.1	Allgemein	45
3.3.2	Messung und Auswertung	45
4	Auswertung und Diskussion der Ergebnisse	47
4.1	EXAFS von Cytochrom-c-Oxidasen	47
4.1.1	Allgemeines	47
4.1.2	Die native ba ₃ -Oxidase in kristalliner Form	53
4.1.2.1	Allgemein	53
4.1.2.2	Kupfer-K-Kante	53
4.1.2.3	Eisen-K-Kante	56
4.1.3	Die native, cyanidinhivierte ba ₃ -Oxidase	58
4.1.3.1	Inhibierte und nicht-inhibierte Form der nativen ba ₃ -Oxidase im Vergleich	58
4.1.3.2	Kupfer-K-Kante	59
4.1.3.3	Eisen-K-Kante	61
4.1.4	Die native, azidinhivierte ba ₃ -Oxidase	63
4.1.4.1	Cyanid- und azidinhivierte Form der nativen ba ₃ -Oxidase im Vergleich	63
4.1.4.2	Kupfer-K-Kante	64
4.1.4.3	Eisen-K-Kante	66
4.1.5	Die reduzierte ba ₃ -Oxidase	68
4.1.5.1	Reduzierte und native ba ₃ -Oxidase im Vergleich	68
4.1.5.2	Kupfer-K-Kante	69
4.1.5.3	Eisen-K-Kante	71
4.1.6	Die reduzierte, cyanidinhivierte ba ₃ -Oxidase	74

4.1.6.1	Inhibierte und nicht-inhibierte Form der reduzierten ba_3 -Oxidase im Vergleich	74
4.1.6.2	Kupfer-K-Kante	75
4.1.6.3	Eisen-K-Kante	76
4.1.7	Die reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase	79
4.1.7.1	Azid- und cyanidinhibierte Form der reduzierten ba_3 -Oxidase im Vergleich	79
4.1.7.2	Kupfer-K-Kante	79
4.1.7.3	Eisen-K-Kante	81
4.1.8	Interpretation der Ergebnisse	84
4.1.8.1	Allgemeines	84
4.1.8.2	Imidazol- und Porphyrineinheiten	84
4.1.8.3	Das Cu_A -Zentrum	87
4.1.8.3.1	Der Cu–Cu-Abstand	87
4.1.8.3.2	Methionin-Schwefel und Glutamat-Sauerstoff	88
4.1.8.3.3	Strukturmodelle für das Cu_A -Zentrum	90
4.1.8.4	Das Fe_{a3} – Cu_B -Zentrum	91
4.1.8.4.1	Der Fe–Cu-Abstand	91
4.1.8.4.2	Bindung des Substrats oder Inhibitors	92
4.1.8.4.3	Strukturmodelle für das Fe_{a3} – Cu_B -Zentrum	95
4.2	EXAFS von Kupferkomplexen	97
4.2.1	Allgemeines	97
4.2.2	EXAFS von $[\text{CuI}(\text{btmgp})]$	97
4.2.2.1	Allgemeines	97
4.2.2.2	Kristalline Form	97
4.2.3	EXAFS von $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$	101
4.2.3.1	Allgemeines	101
4.2.3.2	Kristalline Form — Tieftemperatur	102
4.2.3.3	Kristalline Form — Temperaturreihe	105

4.2.3.4	Gelöste Form	112
4.2.4	EXAFS von $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$	118
4.2.4.1	Allgemeines	118
4.2.4.2	Kristalline Form	118
4.2.4.3	Gelöste Form	124
4.2.5	EXAFS von $[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$	128
4.2.5.1	Allgemeines	128
4.2.5.2	Gelöste Form	130
4.2.6	Interpretation der Ergebnisse	132
4.2.6.1	Allgemeines	132
4.2.6.2	Kristalline Formen der Komplexe	132
4.2.6.3	Gelöste Formen der Komplexe	134
4.3	Weitere EXAFS-Untersuchungen	137
4.3.1	EXAFS von $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-2,4,6-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$	137
4.3.2	EXAFS von der Hydrogenase aus <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	141
5	Zusammenfassung und Ausblick	145
6	Anhang	149
6.1	Glossar und Abkürzungsverzeichnis	149
6.2	Nomenklatur von Enzymen	152
6.3	Grundlagen der Methode EXAFS	153
6.3.1	Erzeugung von Synchrotronstrahlung	153
6.3.2	Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)	155
6.3.3	Hochaufgelöste Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)	158
6.3.4	Die Feinstruktur	162
6.3.5	Phasenfunktion und Fourier-Transformation	164

6.3.6	Analyse von EXAFS-Daten	167
6.3.6.1	Vorauswertung	167
6.3.6.2	Auswertung	168
6.3.7	Auswertungsprogramme	170
6.3.8	Vorteile und Grenzen von EXAFS	174
6.4	DORIS-III-Ring am HASYLAB in Hamburg	176
6.5	EMBL-EXAFS-Messstand am HASYLAB in Hamburg	177
6.6	Das Programmpaket EXPROG	178

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Stoffwechsels in einer Zelle (Bezeichnungen der Atmungskettenenzyme I – IV siehe Text).	5
1.2	Kaskadenförmige Weitergabe von Elektronen über die Atmungskettenkomplexe. . .	5
1.3	Innerzelluläre Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran.	6
1.4	Aufbau eines Häm-Porphyrinsystems — Unterschiede zwischen Häm a und Häm b. . .	8
1.5	Funktionen der Cytochrom-c-Oxidase: Katalyse und Protonenpumpe.	9
1.6	Das Cu _A -Zentrum.	15
1.7	Das Fe _{a3} -Cu _B -Zentrum (L = Substrat).	16
1.8	Von MICHEL <i>et al.</i> vorgeschlagener Katalysekreislauf (1998).	22
1.9	Von WIKSTRÖM <i>et al.</i> vorgeschlagener Katalysekreislauf (2000).	23
3.1	EXAFS-Küvette mit KAPTON-Folie im Strahlengang.	29
3.2	Schematischer Aufbau des EMBL-EXAFS-Messstandes (Beamline D2) auf dem DESY-Gelände in Hamburg. ¹⁵³	31
3.3	Mit dem Programm DEPP ermittelte Rauschpegel für ein Spektrum mit a) konventioneller, b) 1–2–4-Schema, c) optimierter Messstrategie.	34
3.4	Ablauf der Datenreduktion und -extraktion mit dem Programmpaket EXPROG (PRG: ausführbares Programm).	36
3.5	An der EMBL-EXAFS-Beamline übliches Auswertungsdatenblatt.	38
3.6	Oben: Gemitteltes Spektrum aus den Einzelspektren des Detektorkanals 7 der Cu-K-Kanten-Messung der vollständig reduzierten ba ₃ -Oxidase aus <i>T.t.</i> , unten: Co-Plot dieses Spektrums (—) mit der Referenz (· · ·).	40
3.7	Auswertung von EXAFS-Daten mit Cerius ²	43

3.8	Dampfdruck-osmometrische Molmassenbestimmung — Messergebnisse für die Komplexe $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (<i>CuSTip</i>) und $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (<i>CuSi</i>) gelöst in Toluol.	46
4.1	Imidazoleinheit — Schematische Darstellung einer Einheit (Nummerierung wie in Tabelle 4.2).	50
4.2	Porphyrineinheit — Schematische Darstellung einer Einheit (Nummerierung wie in Tabelle 4.3).	50
4.3	Ein Kristall der ba_3 -Oxidase.	53
4.4	Native ba_3 -Oxidase (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	54
4.5	Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der nativen ba_3 -Oxidase in kristalliner ($\cdot\cdot\cdot$) und gelöster (—) Form.	54
4.6	Native ba_3 -Oxidase (kristallin) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung ($\cdot\cdot\cdot$).	55
4.7	Native ba_3 -Oxidase (kristallin) — Fe-K-Kanten-Spektrum und k^3 -gewichtete Feinstruktur.	56
4.8	Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der nativen ba_3 -Oxidase in kristalliner ($\cdot\cdot\cdot$) und gelöster (—) Form.	57
4.9	Native ba_3 -Oxidase (kristallin) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung ($\cdot\cdot\cdot$).	57
4.10	Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der nativen (kristallin, —) und nativen, cyanidinhibierten ($\cdot\cdot\cdot$) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.	59
4.11	Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	60
4.12	Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung ($\cdot\cdot\cdot$).	60
4.13	Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	62

4.14 Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	62
4.15 Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der nativen, cyanidinhibierten (—) und nativen, azidinhibierten ba_3 -Oxidase (\cdots), links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.	64
4.16 Native, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	64
4.17 Native, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	65
4.18 Native, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	66
4.19 Native, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	67
4.20 Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen und Fourier-Transformierte der nativen (—) und der reduzierten (\cdots) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.	69
4.21 Reduzierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	69
4.22 Reduzierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) mit der besten Anpassung (\cdots).	70
4.23 Reduzierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	72
4.24 Reduzierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	72
4.25 Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der reduzierten, cyanidinhibierten (\cdots) und reduzierten, nicht-inhibierten (—) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.	74
4.26 Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	75

4.27	Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	75
4.28	Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	77
4.29	Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	77
4.30	Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der cyanid- (—) und azidinhibierten (\cdots) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kante und rechts: Fe-K-Kante.	79
4.31	Reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	80
4.32	Reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	80
4.33	Reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	82
4.34	Reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	82
4.35	Fourier-Transformierte der reduzierten ba_3 -Oxidase mit Sinus- und Modulus-Anteil.	86
4.36	Strukturmodelle für das Cu_A -Zentrum. <i>Links</i> : native, <i>rechts</i> : reduzierte ba_3 -Oxidase.	91
4.37	Strukturmodelle für das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum. <i>Links</i> : native, <i>rechts</i> : reduzierte ba_3 -Oxidase.	95
4.38	Strukturmodelle für das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum inhibiert mit Cyanid. <i>Links</i> : native, <i>rechts</i> : reduzierte ba_3 -Oxidase.	96
4.39	Strukturmodelle für das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum inhibiert mit Azid. <i>Links</i> : native, <i>rechts</i> : reduzierte ba_3 -Oxidase.	96
4.40	[CuI(btmgp)] — Kristallstruktur.	99
4.41	[CuI(btmgp)] — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).	99
4.42	[CuI(btmgp)] — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).	100

4.43	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] — Kristallstruktur.	101
4.44	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts).	103
4.45	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	104
4.46	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — k ³ -gewichtete Feinstrukturen der Messungen bei 300 K (links) und 230 K (rechts).	106
4.47	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstrukturen (oben) und Fourier-Transformierte (unten) der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen.	107
4.48	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin, 300 K) — k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	108
4.49	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin, 230 K) — k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	108
4.50	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin, 150 K) — k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	110
4.51	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin, 80 K) — k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	110
4.52	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Auftragung der Debye-Waller-Parameter der Kupferschale gegen die Temperatur.	111
4.53	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Änderung des R-Faktors bei Variation des Cu–Cu-Abstands für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen.	112
4.54	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (gelöst in THF) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts).	113
4.55	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (gelöst in Toluol) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts).	114
4.56	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstrukturen des Komplexes in kristalliner Form (—) und gelöst in Toluol (- -) bzw. THF (···).	114
4.57	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (gelöst in Toluol) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	116
4.58	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (gelöst in THF) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).	116

4.59	[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] — Strukturmodell basierend auf dem Ergebnis einer MM2-Rechnung.	118
4.60	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] — Kristallstruktur.	119
4.61	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts) für die Messung bei 150 K.	120
4.62	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts) für die Messung bei 20 K.	120
4.63	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstrukturen (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der Messung bei 20 K (—) und 150 K (⋯).	120
4.64	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (⋯). Oben: 20 K, unten: 150 K.	122
4.65	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (gelöst) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts).	125
4.66	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstrukturen (links) und Fourier-Transformierte (rechts) des Komplexes in kristalliner Form (Mess-temperatur: 20 K, —) und gelöst in THF (⋯).	125
4.67	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] — Oben: Vermutete Strukturänderung beim Übergang in den gelösten Zustand. Unten: Kristallstrukturen von [Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (<i>CuSi</i> , links) und [Cu ₂ (S{2,4,6- ^t Bu ₃ C ₆ H ₂ }) ₂ btmgp] (rechts, ohne H-Atome).	126
4.68	[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (gelöst) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (⋯).	128
4.69	[Cu(STtbPh)btmgp] — Kristallstruktur.	129
4.70	[Cu(STtbPh)btmgp] (gelöst) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts).	130
4.71	[Cu(STtbPh)btmgp] (gelöst in THF) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (⋯).	131
4.72	[Fe ₂ (SC ₆ H ₂ -2,4,6- ^t Bu ₃){N(SiMe ₃) ₂ }] — Kristallstruktur.	137
4.73	[Fe ₂ (SC ₆ H ₂ -2,4,6- ^t Bu ₃){N(SiMe ₃) ₂ }] (gelöst) — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k ³ -gewichtete Feinstruktur (rechts).	138

4.74	[Fe ₂ (SC ₆ H ₂ -2,4,6- ^t Bu ₃) ₃ {N(SiMe ₃) ₂ }] (gelöst) — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (· · ·).	139
4.75	Das [NiFe]-Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase im „as isolated“-Zustand (<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F: X = S, Y = O oder N, Z = S; <i>D. gigas</i> : X = O, Y = O oder N, Z = C).141	
4.76	[NiFe]-Hydrogenase aus <i>D. vulgaris</i> Miyazaki F — Fourier-gefilterte, k ³ -gewichtete Feinstrukturen (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der nativen (· · ·) und reduzierten Form (—).	142
6.1	Erzeugung von Synchrotronstrahlung durch ein auf einer Kreisbahn beschleunigtes geladenes Teilchen.	153
6.2	Energiespektrum der Synchrotronstrahlung.	154
6.3	Flugbahn beschleunigter Teilchen in einem Parcours von Magneten.	155
6.4	Vergleich zwischen verschiedenen Strahlungsquellen.	156
6.5	Einfachstreuung (links) und Mehrfachstreuung (rechts).	159
6.6	Konstruktive (links) und destruktive Überlagerung (rechts) von ausgehender und rückgestreuter Photoelektronenwelle.	159
6.7	Röntgenabsorptionsspektrum. <i>E</i> ₁ : konstruktive Überlagerung von Wellen, <i>E</i> ₂ : destruktive Überlagerung im Bereich der EXAFS-Feinstruktur.	160
6.8	Die k ³ -gewichtete EXAFS-Feinstruktur (links) und ihre zugehörige Fourier-Transformierte (rechts).	165
6.9	Auswertung von EXAFS-Daten.	169

Tabellenverzeichnis

1.1	Ausgewählte Ergebnisse von Strukturuntersuchungen an Cytochrom-c-Oxidase und löslichen Domänen der Subunit II. Angaben in [Å].	18
4.1	Untersuchte Proben der ba ₃ -Oxidase aus <i>Thermus thermophilus</i>	48
4.2	Imidazoleinheit — Aufbau aus dem Ergebnis der CSD-Recherche (Nummerierung der Schalen wie in Abbildung 4.1).	49
4.3	Porphyrineinheit — Aufbau aus dem Ergebnis der CSD-Recherche (Nummerierung der Schalen wie in Abbildung 4.2).	50
4.4	Grundmodell für die ba ₃ -Oxidase — Cu-K-Kante.	51
4.5	Grundmodell für die ba ₃ -Oxidase — Fe-K-Kante.	52
4.6	Native ba ₃ -Oxidase (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,29 %).	55
4.7	Native ba ₃ -Oxidase (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 18,35 %).	58
4.8	Native, cyanidinhivierte ba ₃ -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 15,89 %).	61
4.9	Native, cyanidinhivierte ba ₃ -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 17,37 %).	63
4.10	Native, azidinhivierte ba ₃ -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,62 %).	65

4.11 Native, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 17,46 %).	68
4.12 Reduzierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,00 %).	70
4.13 Reduzierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 20,24 %).	73
4.14 Reduzierte, cyanidinhivierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 15,51 %).	76
4.15 Reduzierte, cyanidinhivierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 21,67 %).	78
4.16 Reduzierte, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,53 %).	81
4.17 Reduzierte, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 20,08 %).	83
4.18 Die R-Faktoren der besten Anpassungen an die Fourier-gefilterten Fe-EXAFS.	85
4.19 Cu_A -Zentrum — Ergebnisse der besten Anpassungen für die Kupferrückstreuerschale.	87
4.20 Methionin-Schwefel — Ergebnisse der besten Anpassungen an die Cu-EXAFS.	88
4.21 Glutamat-Sauerstoff — Ergebnisse der besten Anpassungen an die Cu-EXAFS.	89
4.22 $\text{Fe}_{\alpha 3}$ - Cu_B -Zentrum — Die Cu-Fe- bzw. Fe-Cu-Abstände der besten Anpassungen an die Cu- bzw. Fe-EXAFS.	92
4.23 Substrat- oder Inhibitormoleküle — Ergebnisse der Anpassungen an die Cu-EXAFS.	93
4.24 Substrat- oder Inhibitormoleküle — Ergebnisse der Anpassungen an die Fe-EXAFS.	94
4.25 Untersuchte Kupferkomplexe.	98

4.26 [CuI(btmgp)] — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 13,66$) und Kristallstrukturdaten (XRD).	100
4.27 [Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 8,99$ %) und Kristallstrukturdaten (XRD, Messtemperatur: 150 K).	104
4.28 [Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Parameter der Feinstrukturen für die Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen.	105
4.29 [Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Ergebnisse für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen.	109
4.30 [Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Ergebnisse für die Kupferschale für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen.	110
4.31 [Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung für den Komplex gelöst in Toluol ($R = 9,52$ %) und THF ($R = 9,80$ %).	115
4.32 [Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung für die Messung bei 20 K ($R = 8,96$ %) und bei 150 K ($R = 7,51$ %) sowie Kristallstrukturdaten (XRD).	123
4.33 [Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (kristallin) — Ausgewählte Strukturdaten der Kristallstruktur und der EXAFS-Struktur.	123
4.34 [Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 9,62$ %).	127
4.35 [Cu(STtbPh)btmgp] (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 9,85$ %) und Kristallstrukturdaten (XRD).	131
4.36 [Fe ₂ (SC ₆ H ₂ -2,4,6- ^t Bu ₃){N(SiMe ₃) ₂ }] (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 15,2$ %).	139
4.37 [Fe ₂ (SC ₆ H ₂ -2,4,6- ^t Bu ₃){N(SiMe ₃) ₂ }] — Ausgewählte Abstände [Å] und Winkel [°].	139
4.38 [NiFe]-Hydrogenase aus <i>D. vulgaris</i> Miyazaki F — Ergebnis der besten Anpassung (nativ: $R = 6,18$ %, reduziert: $R = 8,17$ %).	143

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Einordnung dieser Arbeit

Eines der wichtigsten Enzyme¹ für das Leben aerober Organismen ist die Cytochrom-c-Oxidase. Sie fungiert als Katalysator für die kontrollierte Umsetzung von Sauerstoff zu Wasser in dessen Verlauf ein Protonengradient über eine Membran erzeugt wird. Dieser Gradient dient zur Synthese von ATP,² dem wichtigsten intrazellulären Energiespeicher und -überträger.³

Die Motivation, sich mit der Funktion dieses Enzyms auseinanderzusetzen, resultiert einerseits aus seiner fundamentalen Bedeutung für die belebte Natur, andererseits aber auch aus der faszinierenden Realisierung einer elektrochemischen Energiegewinnung.

Somit hat die Natur Maßstäbe gesetzt, die der Mensch mit der Entwicklung der Brennstoffzelle mühsam zu erreichen versucht. Es besteht daher ein großes Interesse, die Funktionen der Cytochrom-c-Oxidase zu verstehen, von ihr zu lernen und sich das Prinzip nutzbar zu machen.

An allen wichtigen Aufgaben des Enzyms sind in ihm gebundene Metallionen beteiligt.⁴ Sie unterstützen den Elektronentransfer, fungieren als Bindungsstelle der Substrate oder dienen der Stabilisierung der Proteinstruktur. Das Verständnis der Funktion bedingt demnach

¹Enzym: (*griech.*) en zyme — in der Hefe; 1878 von Friedrich Wilhelm Kühne geprägte Bezeichnung für katalytisch aktive Stoffe, die zuvor als Fermente (*lat.*: fermentum — Sauerteig) bezeichnet wurden; gebräuchliches Synonym: Biokatalysator.

²ATP: Adenosintri-phosphat; Energiespeichermolekül, das aus ADP (Adenosindiphosphat) und Phosphat gebildet wird.

³*Römpp Chemie Lexikon* (Hrsg.: J. Falbe, M. Regitz), Thieme, Stuttgart, **1995**.

⁴H. Vahrenkamp, *Chem. in uns. Zeit* **1973**, 4, 97 - 106.

die detaillierte Aufklärung der Metallumgebung. Unterschiedlichste analytische, spektroskopische und strukturaufklärende Methoden der verschiedenen naturwissenschaftlichen Disziplinen sind hierfür notwendig.

Die systematische Untersuchung der Metallzentren wird häufig an biomimetischen⁵ Modellverbindungen durchgeführt.^{6,7} Bei diesen niedermolekularen Verbindungen fehlt die Proteinmatrix, so dass die Aufklärung von Reaktivitäten und strukturellen Veränderungen der Metallzentren durch unterschiedliche Parameter schneller und einfacher möglich ist. Modellverbindungen, die die Funktionalität des biologischen Vorbilds nachahmen, können auch anstelle des Biomoleküls in der Industrie, Technik oder Medizin eingesetzt werden. Ist die koordinative Umgebung des Metalls im Metalloprotein hingegen nicht genau bekannt, so werden anhand von synthetischen Verbindungen in Form *spekulativer Modelle* auch Strukturvorschläge für das Biomolekül gemacht.^{8,9,10}

Das ist Gegenstand der Bioanorganischen Chemie.¹¹

Die vorliegende Arbeit ist daher in dieses interdisziplinäre Fachgebiet einzuordnen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf den Strukturuntersuchungen der Cytochrom-c-Oxidase. Dieses Enzym wird im Weiteren näher erklärt. Eine Literaturübersicht über Strukturuntersuchungen schliesst sich an.

1.2 Cytochrom-c-Oxidase: Enzym der Atmung

Die Aufnahme von Sauerstoff durch einen Organismus wird Atmung genannt. Der eigentliche Stoffumsatz erfolgt in den Zellen und wird als „Zellatmung“ bezeichnet.³

⁵biomimetisch: Nachahmen von Merkmalen biologischer Systeme.

⁶K. Wieghardt, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1985**, *33*, 961 - 963.

⁷J. A. Ibers, R. H. Holm, *Science* **1980**, *209*, 223 - 235.

⁸S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, **1995**.

⁹K. D. Karlin, *Science* **1993**, *261*, 701 - 708.

¹⁰Zu spekulativen Modellen anhand synthetischer Verbindungen für die Koordination von Cyanid im heterobinuklearen Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase: M. J. Scott, S. C. Lee, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4651 - 4662; M. J. Gunter, K. J. Berry, K. S. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4227 - 4235.

¹¹W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1995**.

1.2.1 Zellatmung

Für den Aufbau von Zellen gibt es zwei Grundprinzipien, die zu den zwei unterschiedlichen Organisationsstufen der Organismen, den Prokaryonten¹² und Eukaryonten¹³, gehören.¹⁴

Bei beiden Zelltypen trennt eine Membran aus einer Phospholipid-Doppelschicht das Cytoplasma der Zelle von der Umgebung ab. In eukaryontischen Zellen sind im Gegensatz zu den prokaryontischen Zellen auch die funktionell unterschiedlichen Zellorganellen von Membranen umschlossen. Kleine ungeladene Moleküle und Gase können durch die Membran diffundieren, während die meisten gelösten, höhermolekularen Substanzen zurückgehalten werden (selektive Permeabilität).

Der Transport von Stoffen über die Membran kann auch gegen einen Konzentrationsgradienten unter Verbrauch von Energie erfolgen. Dabei sorgen in der Membran lokalisierte Membranproteine als Transportproteine für die Aufnahme und Abgabe von Stoffen (aktiver Transportmechanismus). Weiterhin sind erst durch Membrane komplexe Stoffumsetzungen mit einer Trennung der Produkte möglich.¹⁵ Diese Trennung der Produkte ist beispielsweise für den Energiestoffwechsel einer Zelle notwendig.¹⁶

Die einem Organismus zugeführten Nährstoffe werden in den Zellen umgesetzt. Hierbei wird auch der Sauerstoff am Ende mehrerer, nacheinander ablaufender Reaktionen (Redoxkette) reduziert. Bei den prokaryontischen Zellen befindet sich diese Redoxkette in der Zellmembran. Im Fall der eukaryontischen Zelle ist sie hingegen in der Membran der Mitochondrien¹⁷ lokalisiert (mitochondriale Respiration) und macht 5 – 10 % der Membranoberfläche aus.¹⁸

¹²Prokaryonten: Lebewesen ohne echten Zellkern. Die funktionalen Zellstrukturen (Zellorganelle) sind nicht von einer Membran umgeben. Beispiele: Bakterien und Blaualgen.

¹³Eukaryonten: Lebewesen mit echtem Zellkern. Die Zellkompartimente mit unterschiedlichen Funktionen sind durch Membransysteme voneinander getrennt. Beispiele: Algen, Pilze, höhere Pflanzen und Tiere.

¹⁴G. Vogel, H. Angermann, *dtv-Atlas zur Biologie*, dtv, München, **1988**, S. 59.

¹⁵S. Silbernagl, A. Despopoulos, *Taschenatlas der Physiologie*, Thieme, Stuttgart, dtv, München, **1988**, S. 6 ff.

¹⁶G. Vogel, H. Angermann, *dtv-Atlas zur Biologie*, dtv, München, **1988**, S. 9.

¹⁷Mitochondrien: (*griech.*) *mitos* — Faden, *chondros* — Korn; faden- oder körnchenartige Zellbestandteile, deren Membranen aus Lipoproteiden bestehen. Das Innere der Mitochondrien ist durch Querwände oder gewundene Röhren stark gegliedert.

¹⁸M. Klingenberg, A. Kröger in *Biochemistry of Mitochondria* (Hrsg.: E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak), Academic Press London, Warschau, **1967**, S. 11.

Bereits 1925 wurde von D. KEILIN festgestellt, dass in der Redoxkette der Zellatmung mindestens drei unterschiedliche, nacheinander reagierende Enzyme mitwirken. Er bezeichnete diese intrazellulären Hämoproteine als Cytochrom a, b und c.^{19,20,21}

Die Cytochrome werden anhand ihrer Seitenketten am Porphyrinsystem bzw. der Bindung des Metalloporphyrins an das Protein unterschieden. Ihre Absorptionsspektren im Bereich des sichtbaren Lichts weisen jeweils charakteristische Banden auf.^{22,23,24} In den verschiedenen Organismen kommen die einzelnen elektronenübertragenden Hämoproteine in den unterschiedlichsten Kombinationen vor.

Cytochrome sind an der exergonischen und enzymkatalysierten Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser und der Umsetzung von Kohlenstoffverbindungen zu Kohlendioxid maßgeblich beteiligt. Sie sind in Elektronentransportketten — entsprechend ihrem Redoxpotential — hintereinander zur sogenannten Atmungskette angeordnet (Abbildung 1.1). Das Prinzip der Elektronenübertragung beruht auf einem Valenzwechsel des zentralen Eisenatoms im Porphyrinsystem ($\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$).²⁵

Die Elektronen stammen aus der stufenweisen Umsetzung der dem Organismus zugeführten Nährstoffe und werden in der Atmungskette von einem Enzymkomplex zum anderen weitergegeben (Abbildung 1.2). Die Atmungskette besteht aus den vier Enzymkomplexen:²⁶

- NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)
- Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II)
- Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III)
- Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

Gleichzeitig zur Weitergabe von Elektronen transportieren die Atmungskettenkomplexe Protonen über die Membran. Hierdurch wird ein Protonengradient (pH-Gradient) und somit eine elektrische Spannungsdifferenz aufgebaut, die von der ATP-Synthase²⁷ zur

¹⁹D. Keilin, E. F. Hartree, *Proc. Roy. Soc.* **1938**, B125, 171 - 186.

²⁰C. A. MacMunn, *Philosoph. Trans. Roy. Soc. London* **1886**, 177, 267.

²¹R. Lemberg, J. Barrett, *Cytochromes*, Acad. Press, London, **1973**.

²²bzgl. der ba_3 -Oxidase: P. Hellwig, T. Soulimane, G. Buse, W. Mäntele, *Biochem.* **1999**, 38, 9648 - 9658.

²³allg.: M. Dixon, E. C. Webb in *Enzymes*, Vol. 3, Longman Group, **1979**, S. 491 ff. und dort als Ref. 2378 - 80, 2382 und 2384 - 6 zitierte Literatur.

²⁴allg.: M. Linnemann, M. Kühl, *Biochemie für Mediziner*, 4. Aufl., Vieweg, Braunschweig, **1995**, S. 321.

²⁵*Biotechnologie* (Hrsg. D. Schlee, H.-P. Kleber), Teil I, Reihe Wörterbücher der Biologie, Fischer, Jena, **1991**, S. 273; P. Karlson, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 13. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1988**, S. 313 ff.

²⁶vgl. <http://www.scripps.edu/mem/biochem/yagi/mito.html/>.

²⁷Das Enzym ATP-Synthase wird häufig als Komplex V bezeichnet.

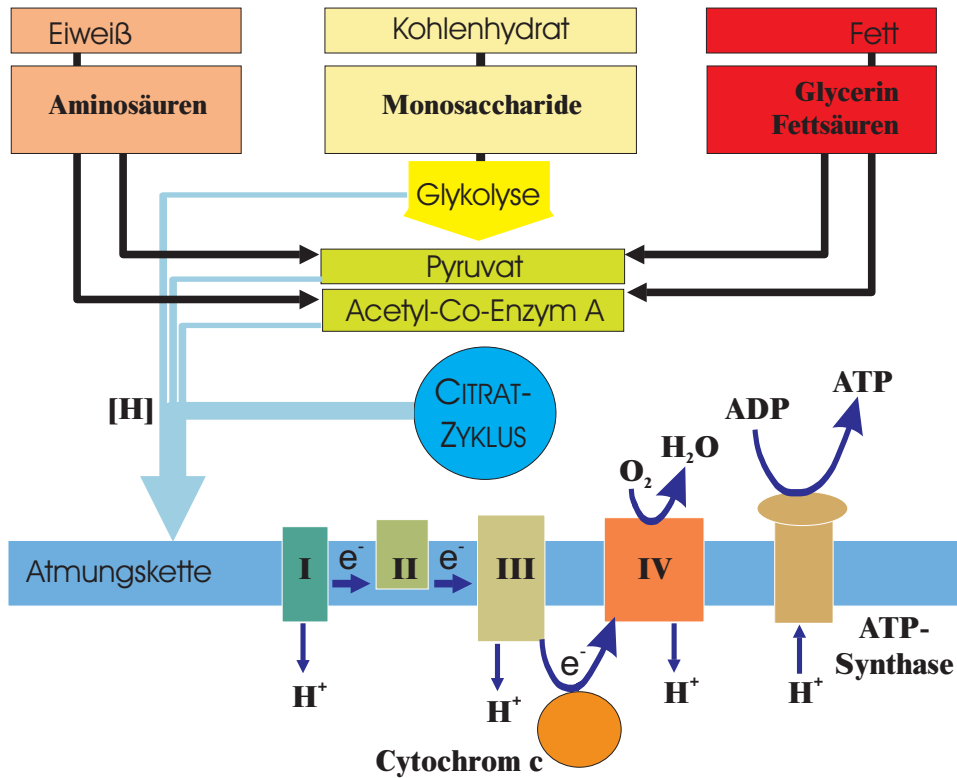


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Stoffwechsels in einer Zelle (Bezeichnungen der Atmungskettenenzyme I – IV siehe Text).

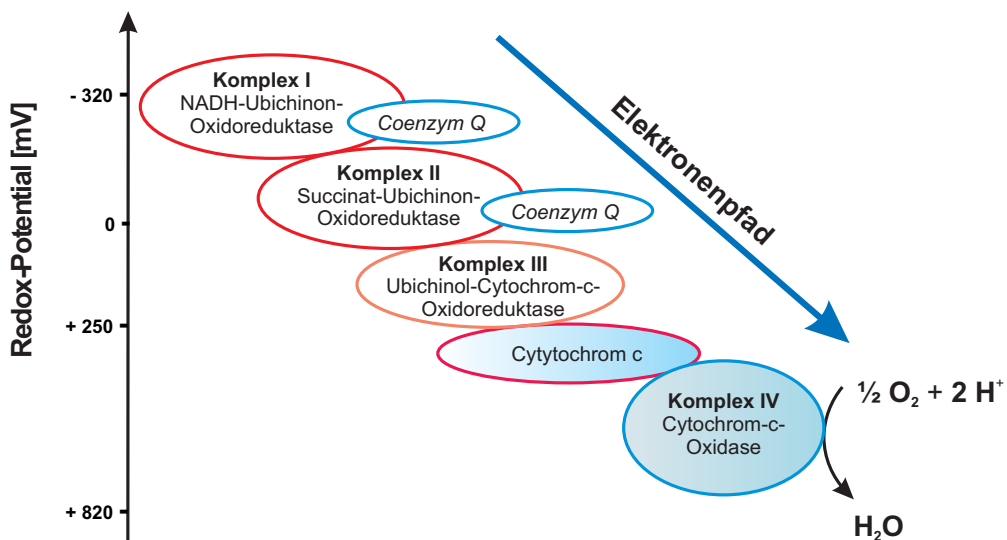


Abbildung 1.2: Kaskadenförmige Weitergabe von Elektronen über die Atmungskettenkomplexe.

Synthese von ATP² verwendet wird. Die gesamte Kette von Reaktionen — mit den Atmungskettenkomplexen und der ATP-Synthase — wird oft als das System der „oxidativen Phosphorylierung“ bezeichnet.

Abbildung 1.3 zeigt am Beispiel der mitochondrialen Respiration schematisch die Anordnung der Atmungskettenkomplexe im Mitochondrium. Die Vergrößerung des Ausschnitts in Abbildung 1.3 macht deutlich, dass die Redoxkette in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

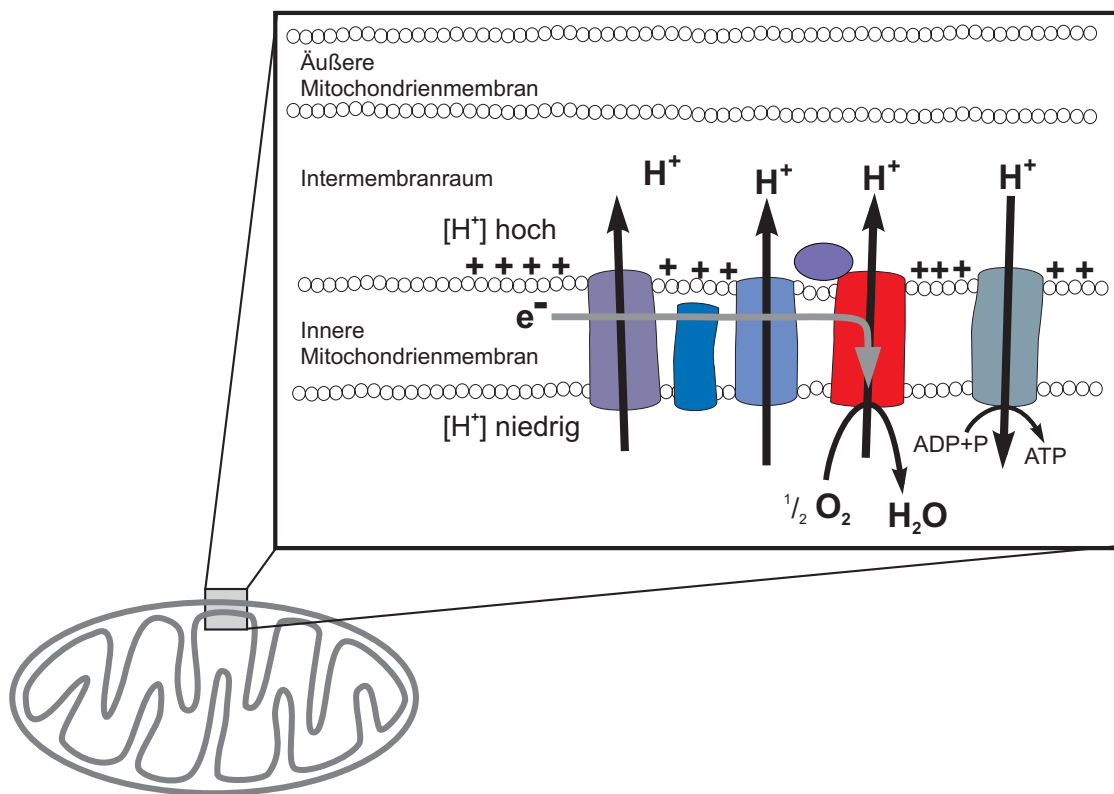


Abbildung 1.3: Innerzelluläre Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran.

1.2.2 Aufbau der Cytochrom-c-Oxidase

Die Cytochrom-c-Oxidase („WARBURG’sches Atmungsferment“,²⁸ Cytochrom-c-O₂-Oxidoreduktase, E.C. 1.9.3.1²⁹) ist das terminale Enzym der Redoxkette. Sie ist als transmembranes Enzym fest in die Plasmamembran der Prokaryonten oder die innere Mitochondrienmembran der Eukaryonten eingebaut.

²⁸nach OTTO WARBURG, der um 1925 die Theorie über die zelluläre Respiration aufstellte.

²⁹Zur Nomenklatur von Enzymen: Abschnitt 6.2 (S. 152).

Das Enzym Cytochrom-c-Oxidase besteht je nach Organismus aus bis zu 13 Untereinheiten (*Subunits*, Abk.: SU). In den Subunits I und II sind die kupfer- und eisenhaltigen Zentren enthalten, die in den verschiedenen Organismen konserviert sind und sich nur geringfügig unterscheiden.³⁰ SU I (ca. 60 kDa) ist auf der inneren Seite der Membran lokalisiert, während die SU II (ca. 26 kDa) Kontakt zur äußeren Seite der Membran hat.

Bis 1985 wurde davon ausgegangen, dass in einem Molekül der Cytochrom-c-Oxidase zwei Kupfer- und zwei Eisenatome enthalten sind. Nach neueren Ergebnissen besitzt die Cytochrom-c-Oxidase allerdings insgesamt drei Kupferatome sowie zwei Häm-Eisenatome pro Molekül.

In der eukaryontischen Oxidase sind zusätzlich noch jeweils ein Zn^{2+} - und ein Mg^{2+} -Ion zu finden. Eine Darstellung über die unterschiedlichen, evolutionär-bedingten Formen der Cytochrom-Oxidase geben M. SARASTE *et al.*^{31,32}

Die verschiedenen Cytochrom-c-Oxidasen werden nach den in ihnen enthaltenen Häm-Porphyrinsystemen benannt. Die Häm-Porphyrinsysteme stammen meist vom Cytochrom-a-Typ ab.

Eine Ausnahme stellt die in dieser Arbeit untersuchte ba_3 -Oxidase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* dar, die neben der „typischen“ aa_3 -Oxidase in diesem Organismus vorkommt. Die ba_3 -Oxidase enthält ein Häm-Porphyrinsystem vom Cytochrom-b-Typ (Häm b) und ein Häm-Porphyrinsystem vom Cytochrom-a-Typ³³ (Häm a_3). Abbildung 1.4 zeigt die Unterschiede zwischen Häm a und Häm b.

Der prinzipielle Aufbau der Metallzentren ist in allen Cytochrom-c-Oxidasen gleich. Er wird in Abschnitt 1.2.5 (S. 12) am Beispiel der hier untersuchten ba_3 -Oxidase dargestellt.

1.2.3 Funktionen der Cytochrom-c-Oxidase

Das Enzym Cytochrom-c-Oxidase fungiert als Katalysator für die Umsetzung von Sauerstoff zu Wasser. Die allgemeine Reaktionsgleichung für den Umsatz eines O_2 -Moleküls ist in Gleichung 1.1 dargestellt.

³⁰C. Ostermeier, S. Iwata, H. Michel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 460 - 466.

³¹M. Saraste, *Ant. v. Leeuwenhoek* **1994**, 65, 285 - 287.

³²M. Saraste, J. Castresana, D. Higgins, M. Lübben, M. Wilmanns in *Origin and Evolution of Biological Energy Conversion* (Hrsg.: H. Baltscheffsky), VCH, New York, **1996**, 255 - 289.

³³Das a-Typ-Häm der ba_3 -Oxidase von *T. thermophilus* unterscheidet sich vom sonst bekannten Häm a, das normalerweise in terminalen Oxidasen vorhanden ist: die Farnesylkette ist gegen eine Geranylgruppe ausgetauscht. Dieser Häm-Typ ist ein typisches Charakteristikum von Sox-b-Typ-Oxidasen und wird daher ausführlich als Häm a_{53} bezeichnet. [M. Lübben, K. Morand, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 21473 - 21479]. Im Folgenden wird jedoch allgemein „Häm a_3 “ bzw. „ Fea_3 “ verwendet.

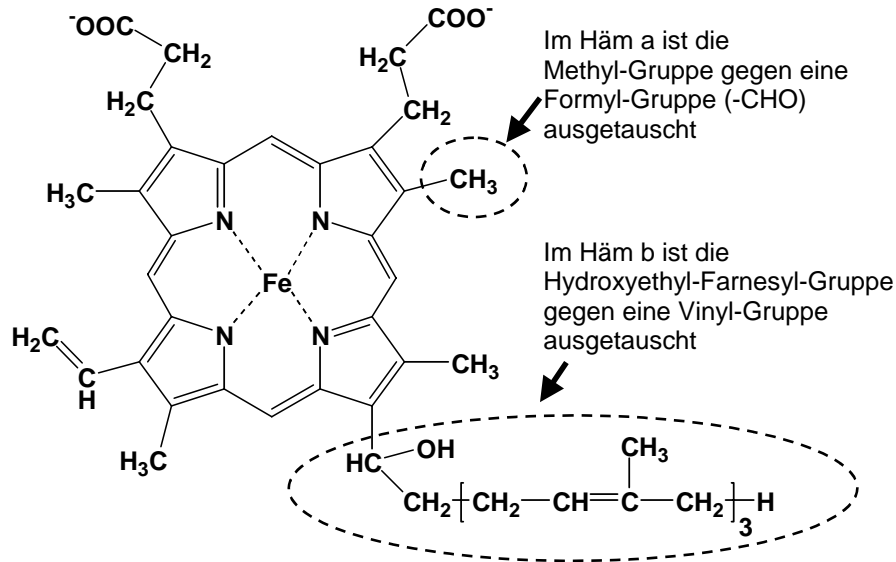
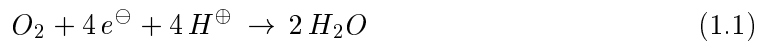


Abbildung 1.4: Aufbau eines Häm-Porphyrinsystems — Unterschiede zwischen Häm a und Häm b.



Die hierfür notwendigen Elektronen werden vom Cytochrom c von der äußeren Seite der Membran³⁴ auf das Cu₄-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase übertragen (Abbildung 1.5).³⁵

Über zwei eisenhaltige Porphyrinzentren (in Abbildung 1.5: Fe_a und Fe_{a3}) gelangen die Elektronen zu dem am aktiven Zentrum gebundenen Sauerstoff auf der inneren Seite³⁶ der Membran. Unter Verbrauch von Protonen erfolgt hier die Umsetzung des molekularen Sauerstoffs zu Wasser.

Diese Reaktion ist ein Vier-Elektronen/Vier-Protonen-Transfer, die u. a. über die Verfügbarkeit an reduziertem Cytochrom c kontrolliert wird. Reaktive Sauerstoffzwischenprodukte, die die Zelle schädigen könnten, treten nicht auf.

Weiterhin fungiert die Oxidase als Protonenpumpe. Protonen werden von der Innenseite der Membran über die Membran auf die Außenseite gepumpt.^{37,38,39} Die Höhe des

³⁴Prokaryonten: periplasmatischer Raum; Eukaryonten: cytosolischer Raum.

³⁵J. J. Regan, B. E. Ramirez, J. R. Winkler, H. B. Gray, B. G. Malmström, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, *30(1)*, 35 - 39.

³⁶Prokaryonten: Cytosol; Eukaryonten: Matrix.

³⁷H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12819 - 12824.

³⁸B. G. Malmström, *J. Bioinorg. Chem.* **1998**, *3*, 339 - 343.

³⁹A. Kannt, T. Soulimane, G. Buse, A. Becker, E. Bamberg, H. Michel, *FEBS Lett.* **1998**, *434*, 17 - 22.

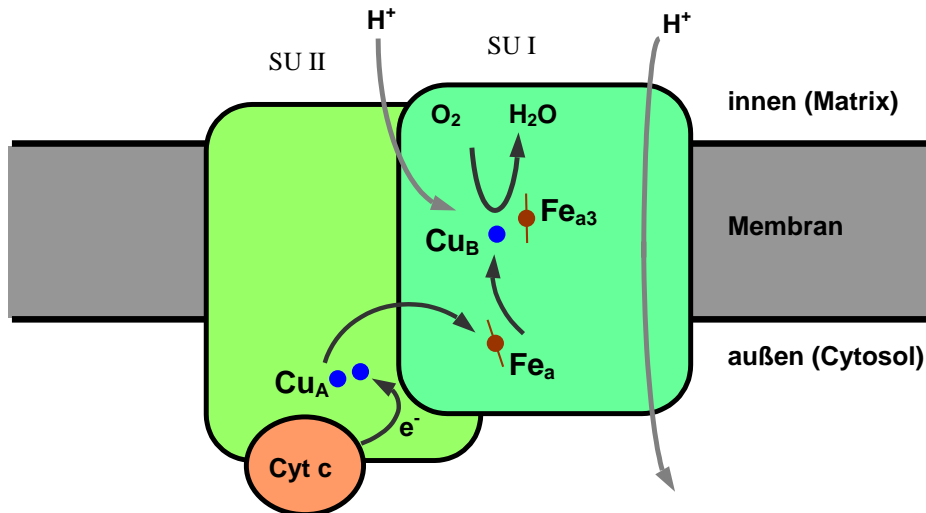


Abbildung 1.5: Funktionen der Cytochrom-c-Oxidase: Katalyse und Protonenpumpe.

Protonenumsatzes durch die ATP-Synthase (Komplex V) kontrolliert die Reaktion der Cytochrom-c-Oxidase. Nimmt die Produktion von ATP ab, so werden weniger Protonen benötigt. Die Cytochrom-c-Oxidase pumpt im Extremfall keine Protonen mehr und geht in einen Ruhezustand — den sogenannten *resting state* — über (vgl. Abschnitt 1.2.6, S. 17).

Der Begriff „*resting state*“ oder „*idle state*“ ist einer von zwei bekannten „oxidierten Zuständen“. Dieser Zustand wird von dem Enzym dann eingenommen, wenn der weitere Elektronenfluss gehemmt oder der weitere Umsatz aus energetischen Gründen für die Zelle nicht notwendig ist.^{40,41} Wird die katalytische Umsetzung des Substrats wieder aufgenommen, so geht der *resting state* in den anderen oxidierten Zustand über, der als Übergangszustand im Katalysezyklus durchlaufen wird.

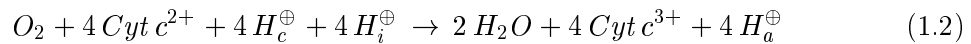
Die Bezeichnung „oxidiert“ ist daher differenziert zu betrachten. Aus Mangel an fehlender Information über das System sind die beiden Zustände heute nicht eindeutig zu unterscheiden. In dieser Arbeit wird aus diesem Grund vom „nativen Zustand“ des Enzyms gesprochen, da die Vermehrung des Bakteriums und die Extraktion sowie die Vorbereitung

⁴⁰Der elektrochemische Gradient über die Membran steigt auf eine Größe an, die weiteres Pumpen von Elektronen und daher den Elektronentransport verhindert. Merkmale dieses Zustandes im Organismus sind eine hohe ATP-Konzentration, eine geringe Konzentration an reduziertem Cytochrom c sowie ein geringer Transport von Elektronen.

⁴¹B. Ludwig, E. Bender, S. Arnold, M. Hüttemann, I. Lee, B. Kadenbach *ChemBioChem* **2001**, 2, 392 - 403.

des Holoenzymen unter atmosphärischem Sauerstoffpartialdruck vorgenommen wurde und somit ein oxidiertes Zustand des Enzyms resultiert.

In Gleichung 1.2 sind beide Funktionen der Cytochrom-c-Oxidase berücksichtigt. Hierin steht H_c^\oplus für die sogenannten chemischen Protonen, die für die Umsetzung von Sauerstoff verwendet werden. H_i^\oplus bzw. H_a^\oplus sind die Protonen, die von der Innenseite (Index i) auf die Außenseite (Index a) gepumpt werden. Der Elektronenüberträger Cytochrom c ist durch *Cyt c* abgekürzt.



Als das terminale sauerstoffkonsumierende System der Redoxkette stellt die Cytochrom-c-Oxidase das Gegenstück zu den sauerstoffproduzierenden manganhaltigen Zentren der photosynthetischen Membran dar.

1.2.4 Funktionsstörungen der Cytochrom-c-Oxidase

Das Funktionieren der Atmungskette ist für den gesamten Organismus lebenswichtig, da hier einerseits die Umsetzung von Sauerstoff katalysiert und andererseits Protonen gepumpt werden, die für die Produktion des Energieträgers ATP notwendig sind.

Liegt in dieser Kette ein Fehler vor, ist der Gesamtablauf der Kette und damit der Umsatz von Sauerstoff bzw. Nährstoffen im Organismus sowie der Energiehaushalt gestört.

In den eukaryontischen Zellen läuft die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien ab. Da die Erbinformation für Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung auch aus der Mitochondrien-DNA stammt, ist schon durch einen Fehler in dieser DNA eine Fehlfunktion der Atmungskette möglich.⁴²

Beim Menschen werden drei der insgesamt dreizehn Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase durch die Mitochondrien-DNA codiert. Zu diesen mitochondrial-codierten Einheiten des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes gehören die katalytisch aktiven Untereinheiten I und II.^{43,44,45} Ein Defekt an den Mitochondrien kann sich somit auf den gesamten Organismus auswirken.

Das Erscheinungsbild für mitochondrial bedingte Krankheiten ist klinisch sehr heterogen. Häufig ist das Gehirn betroffen, da hier der Energiebedarf am größten ist. Bei anderen

⁴²D. C. Wallace, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 1175 - 1212.

⁴³M. Saraste, *Trends Biochem. Sci.* **1983**, *8*, 139 - 142.

⁴⁴W. Sebald, W. Machleidt, J. Otto, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *38*, 311 - 324.

⁴⁵G. Buse, *Naturwiss. Rundschau* **1986**, *39(12)*, 518 - 525.

Patienten treten Muskel- oder Herzbeschwerden auf. Viele mitochondrial bedingte Krankheiten resultieren in einer Akkumulation von organischen Säuren im Körper (Azidose), da diese normale Intermediate des Metabolismus sind. Diese Azidose kann dann weiter schädigend sein oder lebensbedrohend wirken.

Meist sind von mitochondrial bedingten Krankheiten Kinder betroffen. Daneben sind auch Alterskrankheiten wie Parkinson⁴⁶ und Alzheimer oder Diabetes teilweise das Ergebnis einer Fehlfunktion in den Mitochondrien oder werden in ihrem Verlauf davon begleitet. Ungefähr jeder viertausendste Mensch ist von mitochondrial bedingten Defekten betroffen.

Die Diagnose einer mitochondrial bedingten Erkrankung ist aufgrund der sehr unterschiedlichen Erscheinungsbilder sehr schwierig. Eine allgemeine Therapie existiert aufgrund des unvollständigen Verständnisses der komplexen Abläufe in den Mitochondrien heute noch nicht. Die Mediziner versuchen, den Patienten bislang durch die Gabe von Cofaktoren oder Vitaminen (Vitamin C, Vitamin K, Riboflavin u. a.), mit Hilfe von bestimmten Diäten oder einer Verminderung von Einfachzuckern und Fruktose in der Nahrung zu helfen. Eine Gentherapie könnte in Zukunft erfolgversprechend sein.

Bei verschiedenen mitochondrialen Myopathien (z. B. Zidovudine Myopathie⁴⁷, Mitochondriale Enzephalomyopathie⁴⁸ oder Infantile mitochondriale Myopathie⁴⁹) und anderen mitochondrialen Krankheiten sind Störungen an der Cytochrom-c-Oxidase festgestellt worden, die mindestens zu einer geringeren Aktivität derselben führen.⁵⁰ Eine Übersicht über weitere mitochondrial bedingte Krankheiten mit ihren klinischen Erscheinungsbildern sowie Einzelheiten zu den Defekten sind 1997 im Supplement zum *Exceptional Parent Magazine* erschienen.⁵¹

Auch beim Leigh-Syndrom (Subakute nekrotisierende Enzephalomyopathie) liegen bei einem Viertel der Patienten u. a. eine Veränderung der Cytochrom-c-Oxidase und bei weiteren Betroffenen Defekte in anderen Enzymen, die am Energiemetabolismus beteiligt sind,

⁴⁶A. H. V. Schapira, J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark, C. D. Marsden, *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 823 - 827.

⁴⁷P. Chariot, R. Gherardi, *Neuromusc. Disorders* **1991**, *1(5)*, 357 - 363.

⁴⁸J. Zeman, H. Houstkova, Z. Dudkova, L. Stratilova, H. Hansikova, V. Konradova, S. Kmoch, J. Houstek, *Med. Sci. Monit.* **1998**, *4(3)*, 436 - 442.

⁴⁹S. DiMauro, J. R. Mendell, Z. Sahenk, D. Bachman, A. Scarpa, R. M. Scotfield, C. Reiner, *Neurol.* **1980**, *30*, 795 - 804.

⁵⁰S. DiMauro, A. Lombes, H. Nakase, S. Mita, G. M. Fabrizi, H.-J. Tritschler, E. Bonilla, A. F. Miranda, D. C. DeVivo, E. A. Schon, *Pediatr. Res.* **1990**, *28*, 536 - 541.

⁵¹*Mitochondrial and Metabolic Disorders: A Primary Care Physician's Guide*, Reprint des Spezial-Supplements des *Exceptional Parent Magazine*, **1997**, erhältlich unter <http://biochemgen.ucsd.edu/mmdc/ep-toc.htm/>.

vor.⁵² Hierbei soll die Struktur oder die Stabilität des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes durch ein anderes Protein beeinflusst und verändert werden.^{53,54,55,56,57,58,59}

Als klinische Befunde treten beim Leigh-Syndrom häufig Augenbeschwerden, Atemstörungen, Hypotonie und Paresen der Muskulatur sowie Probleme bei der Nahrungsaufnahme auf. Der Tod tritt meist nach einem Jahr infolge von Atemmuskellähmung ein. Allein im Großraum des Universitätsklinikums der RWTH Aachen sind im ersten Vierteljahr des Jahres 2000 acht Fälle des Leigh-Syndroms bekannt geworden.

Viele durchgeführte medizinische Studien haben nicht den Durchbruch erbracht, um Patienten mit dieser Krankheit helfen zu können. Weitere Kenntnisse über die Cytochrom-c-Oxidase und ihren Katalysezyklus sind hierzu notwendig.

1.2.5 Die ba_3 -Oxidase aus *Thermus thermophilus*

Thermus thermophilus ist ein extrem thermophiles, gram-negatives⁶⁰, aerobes Bakterium, das im Wasser heißer Quellen beheimatet ist. Zuerst wurde es in einer heißen Quelle in Japan (Mine, Shizuoka-Prefektur) gefunden.⁶¹ Das Bakterium wächst optimal bei einem pH-Wert von pH 6,3 und in einem Temperaturbereich von 65 – 72 °C.^{62,63,64}

Das große Interesse an dem Organismus *T. thermophilus* liegt u. a. an der besonderen Wärmestabilität der Proteine, die sich aufgrund dieser Eigenschaft leichter in technischen Prozessen einsetzen lassen.⁶⁵

⁵²S. Rahman, R. B. Blok, H.-H. M. Dahl, D. M. Danks, D. M. Kirby, C. W. Chow, J. Christodoulou, D. R. Thorburn, *Ann. Neurol.* **1996**, *39*, 343 - 351.

⁵³R. Van Coster, A. Lombes, D. C. DeVivo, T. L. Chi, W. E. Dodson, S. Rothman, E. J. Orrechio, W. Grover, G. T. Berry, J. F. Schwartz, A. Habib, S. DiMauro, *J. Neurol. Sci.* **1991**, *104*, 97 - 111.

⁵⁴D. M. Glerum, W. Yanamura, R. A. Capaldi, B. H. Robinson, *FEBS Lett.* **1988**, *236*, 100 - 104.

⁵⁵B. H. Robinson, D. M. Glerum, W. Chow, R. Petrova-Benedict, R. Lightowers, R. A. Capaldi, *Pediatr. Res.* **1990**, *28*, 549 - 555.

⁵⁶B. Kadenbach, J. Barth, R. Akgün, R. Freund, D. Linder, S. Possekel, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1271*, 103 - 109.

⁵⁷C. Angelini, N. Bresolin, G. Pegolo, L. Bet, P. Rinaldo, C. Trevisan, L. Vergani, *Neurol.* **1986**, *36*, 1048 - 1052; A. F. Miranda, S. Ishii, S. DiMauro, J. W. Shay, *Neurol.* **1989**, *39*, 697 - 702.

⁵⁸T. Fujii, H. Hattori, Y. Higuchi, M. Tsuji, I. Mitsuyoshi, *Pediatr. Neurol.* **1998**, *18(3)*, 275 - 277.

⁵⁹D. I. Zafeiriou, B. Kaletsko, W. Mueller-Felber, I. Paetzke, G. Kueffer, M. Jensen, *Brain & Development* **1995**, *17*, 117 - 121; M. Elia, S. A. Musumeci, R. Ferri, V. Colamaria, G. Azan, D. Greco, M. C. Stefanini, *Brain & Development* **1996**, *18*, 207 - 211.

⁶⁰Die Gram-Färbung nach H. C. J. Gram ist ein wichtiges systematisches Merkmal zur Unterscheidung von zwei Haupttypen von Bakterienzellwänden.

⁶¹<http://www.g21.bio.uni-goettingen.de/thermus.html/>.

⁶²Die Temperatur für das Wachstum muss im Bereich von 47 – 85 °C liegen.

⁶³T. Oshima, K. Imahori, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1974**, *24(1)*, 102 - 112.

⁶⁴T. Oshima, K. Imahori, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1971**, *17*, 513 - 517.

⁶⁵M. W. W. Adams, R. M. Kelly, *Trends in Biotechnol.* **1998**, *16*, 329 - 332.

Die Fermentation von *T. thermophilus* ist 1984 von K. L. FINDLING *et al.*⁶⁶ bzw. die unter vermindertem Sauerstoffangebot 1993 von A. H. BRESSER und G. BUSE⁶⁷ untersucht worden.

Die ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* ist die kleinste bekannte Cytochrom-c-Oxidase. Sie enthält die beiden katalytisch aktiven Untereinheiten I (562 Aminosäurereste, 62,6 kDa) und II (168 Aminosäurereste, 18,5 kDa)⁶⁸ sowie eine weitere kleine Untereinheit mit 34 Aminosäureresten ohne ein Metallatom, die als Untereinheit IIa (3,8 kDa) bezeichnet wird.^{69,70}

Die ba_3 -Oxidase katalysiert hauptsächlich dann die Umsetzung von Sauerstoff, wenn das Angebot an Sauerstoff (Substrat) in dem Habitat⁷¹ des Organismus verringert ist. Im Gegensatz zur aa_3 -Oxidase aus Rinderherz⁷² ist die ba_3 -Oxidase außerdem in der Lage, die Reduktion von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffoxid unter anaeroben Bedingungen zu katalysieren.⁷³ Ein Vergleich dieser beiden Oxidasen anhand von UV-Vis-, ESR- und Raman-spektroskopischen Ergebnissen ist von W. A. OERTLING *et al.* durchgeführt worden.⁷⁴

Die Präparation der ba_3 -Oxidase unter vermindertem Sauerstoffangebot wurde 1985 von J. A. KEIGHTLEY *et al.*⁷⁵ beschrieben. Aus 100 g Zellmaterial können nach einem von T. SOULIMANE⁷⁶ optimierten Weg 100 mg gereinigte ba_3 -Oxidase gewonnen werden. Das Substrat der ba_3 -Oxidase ist das Cytochrom c_{552} .^{77,78}

⁶⁶T. Yoshida, R. M. Lorence, M. G. Choc, G. E. Tarr, K. L. Findling, J. A. Fee, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 112 - 123.

⁶⁷A. H. Bresser, G. Buse, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 736.

⁶⁸J. A. Keightley, B. H. Zimmermann, M. W. Mather, P. Springer, A. Pastuszyn, D. M. Lawrence, J. A. Lee, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270(35)*, 20345 - 20358.

⁶⁹T. Soulimane, G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber, M. E. Than, *EMBO J.* **2000**, *19(8)*, 1766 - 1776.

⁷⁰T. Soulimane, M. E. Than, M. Dewor, R. Huber, G. Buse, *Prot. Sci.* **2000**, *9*, 2068 - 2073.

⁷¹Habitat: der Ort des Auftretens einer Organismenart.

⁷²G. Stubauer, A. Giuffre, M. Brunori, P. Sarti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 459 - 465.

⁷³A. Giuffre, G. Stubauer, P. Sarti, M. Brunori, W. Zumft, G. Buse, T. Soulimane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14718 - 14723.

⁷⁴W. A. Oertling, K. K. Surerus, O. Einarsdottir, J. A. Fee, R. B. Dyer, W. H. Woodruff, *Biochem.* **1994**, *33*, 3128 - 3141.

⁷⁵J. A. Keightley, B. H. Zimmermann, M. W. Mather, P. Springer, A. Pastuszyn, D. M. Lawrence, J. A. Fee, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20345 - 20358.

⁷⁶T. Soulimane, *Habilitationsschrift*, Rheinisch-Westfälische Technische Universität Aachen, **2001**.

⁷⁷T. Soulimane, M. v. Walter, P. Hof, M. E. Than, R. Huber, G. Buse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *237*, 572 - 576.

⁷⁸M. E. Than, P. Hof, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, G. Buse, T. Soulimane, *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 629 - 644.

Aufbau der Metallzentren

Der prinzipielle Aufbau der Metallzentren ist in allen Cytochrom-c-Oxidase gleich. Im Folgenden wird der Aufbau der Metallzentren am Beispiel der ba₃-Oxidase aus dem Organismus *Thermus thermophilus* erläutert.

In der Subunit I der ba₃-Oxidase befinden sich die beiden Eisenatome. Sie gehören zu den beiden Metallzentren Häm b (axiale Aminosäureliganden: Histidin/Histidin) und Häm a₃ (axiale Aminosäureliganden: Histidin/–), die etwa 14 Å voneinander entfernt sind. In der Subunit II bilden zwei Kupferatome das binukleare Cu_A-Zentrum. Das dritte Kupferatom komplettiert in der Subunit I das aktive Zentrum, das aus Häm a₃ und Cu_B besteht. Die beiden kupferhaltigen Zentren sind ungefähr 22 Å voneinander entfernt.

Im Gegensatz zur Oxidase anderer Organismen sind in der bakteriellen Oxidase aus *Thermus thermophilus* keine zusätzlichen nicht-redoxaktiven Metalle wie Zink oder Magnesium enthalten.^{79,80} Bei der Untersuchung der ba₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* werden die EXAFS-Messungen daher nicht durch eine andere Metallabsorptionskante beeinträchtigt und somit die Auflösung nicht beeinflusst.

Das Cu_A-Zentrum ist für die Übernahme von Elektronen vom Cytochrom c verantwortlich. Der primäre Elektronenakzeptor ist rund ~ 10 Å von der Oberfläche des Moleküls entfernt. Hierdurch resultiert eine effektive Entfernung für den Elektronentransfer zwischen dem Häm des Cytochrom c₅₅₂ (Pyrrol-Ring C) und dem Cu_A-Zentrum von 10 – 15 Å.⁸¹ Der Weg des Elektronenflusses vom Elektronenüberträger Cytochrom c zum Sauerstoff involviert alle redox-aktiven Zentren der Cytochrom-c-Oxidase. Abbildung 1.6 zeigt den Aufbau des Cu_A-Zentrums, wie er aus Ergebnissen von Röntgenstrukturanalysen und EXAFS-Untersuchungen abgeleitet wurde.

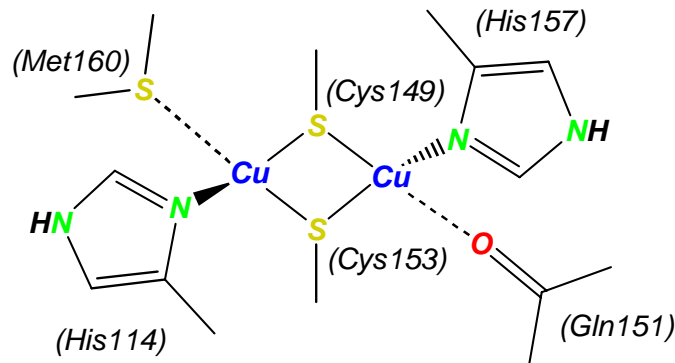
Das Cu_A-Zentrum besteht aus zwei Kupferatomen, die zweifach über Cystein-Schwefel verbrückt sind. Die terminale Koordination der Kupferatome wird durch je einen Histidinrest ergänzt und durch ein terminales Carbonyl-Sauerstoffatom eines Glutamats bzw. ein Schwefelatom eines Methionins vervollständigt. Der Abstand des Glutamat-Sauerstoffatoms und des Methionin-Schwefelatoms vom Kupferatom ist nach den in Tabelle 1.1 (S. 18 in Abschnitt 1.2.6) angegebenen Untersuchungsergebnissen für verschiedene Oxidasen sehr unterschiedlich.

Im nativen Zustand weist das Cu_A-Zentrum der Oxidase eine ungewöhnlich schwache, sehr langwellige Absorption bei 830 nm auf. ESR-Untersuchungen dieser Form haben erge-

⁷⁹G. C. M. Steffens, T. Soulimane, G. Wolff, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1149 - 1157.

⁸⁰G. C. M. Steffens, A. Bresser, P. M. H. Kroneck, G. Buse, *EBEC short reports* **1994**, *8*, 41.

⁸¹M. Gerstein, M. Levitt in *Spektrum der Wissenschaft* **1999**, *2*, 46 - 51.

Abbildung 1.6: Das Cu_A-Zentrum.

ben, dass eine gemischtvalente Spezies mit delokalierter Elektronenverteilung vorliegen muss.⁸² Damit ist der formale Oxidationszustand der beiden Kupferatome der nativen Form Cu^{+1,5}/Cu^{+1,5}.^{83,84,85,86}

BLACKBURN *et al.* haben 1994 aus dem kurzen Cu–Cu-Abstand geschlossen, dass in diesem Zentrum eine Metall–Metall-Bindung existieren könnte.⁸⁷ Da nach heutigem Wissenstand die beiden Metalle über Cystein-Schwefel verbrückt sind, ist ein kurzer Metall–Metall-Abstand alleine kein Beweis für eine derartige Bindung. Weitere Untersuchungen zur Struktur und den Eigenschaften des Cu_A-Zentrums sind in der Literatur beschrieben.^{88,89,90,91,92}

⁸²Sehr kleine g-Anisotropie und ^{63,65}Cu-Kopplung.

⁸³J. A. Fee, D. Sanders, C. E. Slutter, P. E. Doan, R. Aasa, M. Karpefors, T. Vanngard, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1995**, *212*, 77 - 83.

⁸⁴P. M. H. Kroneck, W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. Buse, G. C. M. Steffens, W. G. Zumft, *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 274 - 276.

⁸⁵W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. C. M. Steffens, G. Buse, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 875 - 881.

⁸⁶M. Karpefors, C. E. Slutter, J. A. Fee, R. Aasa, B. Källebring, S. Larsson, T. Vänngård, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2823 - 2829.

⁸⁷N. J. Blackburn, M. E. Barr, W. H. Woodruff, J. v. d. Oost, S. de Vries, *Biochem.* **1994**, *33(34)*, 10401 - 10407. Vgl. auch M. L. Alvarez, D. M. Dooley, *Chemtracts Inorg. Chem.* **1995**, *7*, 19 - 26; H. Bertagnolli, W. Kaim, *Angew. Chem.* **1995**, *107(7)*, 847 - 849; *dies.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *107(7)*, 771 - 773.

⁸⁸H. Beinert, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 512 - 532.

⁸⁹C. Immoos, M. G. Hill, D. Sanders, J. A. Fee, C. E. Slutter, J. H. Richards, H. B. Gray, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 529 - 531.

⁹⁰C. Luchinat, A. Soriano, K. Djinovic-Carugo, M. Saraste, B. G. Malmström, I. Bertini, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11023 - 11027.

⁹¹K. R. Williams, D. R. Gamelin, L. B. LaCroix, R. P. Houser, W. B. Tolman, T. C. Mulder, S. de Vries, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 613 - 614; D. R. Gamelin, D. W. Randall, M. T. Hay, R. P. Houser, T. C. Mulder, G. W. Canters, S. de Vries, W. B. Tolman, Y. Lu, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5246 - 5263.

⁹²J. Salgado, G. Warmerdam, L. Bubacco, G. W. Canters, *Biochem.* **1998**, *37*, 7378 - 7389.

Das heterobinukleare $\text{Fe}_{a_3}\text{-Cu}_B$ -Zentrum befindet sich im hydrophoben Kern der Subunit I und liegt rund $\sim 15 \text{ \AA}$ unter der periplasmatischen Oberfläche. An diesem Zentrum wird der zu reduzierende Sauerstoff gebunden.

Das $\text{Fe}_{a_3}\text{-Cu}_B$ -Zentrum (Abbildung 1.7) besteht im oxidierten Zustand des Enzyms aus

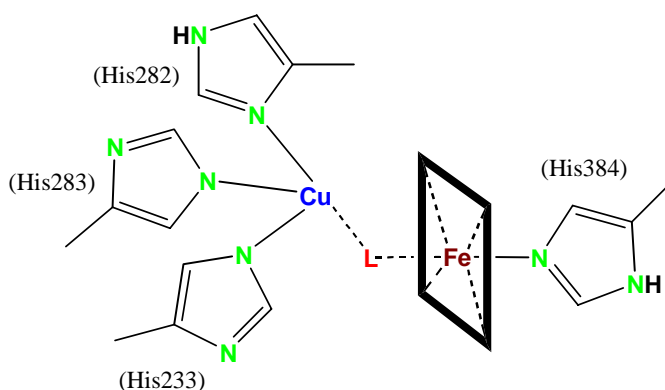


Abbildung 1.7: Das $\text{Fe}_{a_3}\text{-Cu}_B$ -Zentrum (L = Substrat).

einem high-spin Fe^{III} in einem Porphyrinsystem und einem Cu^{II} (d^9). Zur Koordinationssphäre des Cu_B gehören drei Histidingruppen, während am Fe_{a_3} axial ein Histidinrest koordiniert. Zwischen dem Eisen- und dem Kupferatom dieses heterobinuklearen Zentrums befindet sich die Bindungsstelle für das Substrat.⁹³ Das high-spin $\text{Fe}_{a_3}^{\text{III}}$ ($S = 5/2$) ist antiferromagnetisch mit Cu_B^{II} ($S = 1/2$) gekoppelt. Dabei besitzt das heterobinukleare Zentrum einen Spinzustand von $S = 2$.^{94,95} Im vollkommen reduzierten Zustand liegt ein high-spin Fe^{II} und ein Cu^{I} (d^{10}) vor.

Weitere Untersuchungen sollen klären, wie das Substrat oder ein Inhibitor am Metallzentrum koordiniert wird. Hierzu sind bereits Untersuchungen an der aa_3 -Oxidase aus

⁹³W. H. Woodruff, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, 25, 177 - 188.

⁹⁴Y. C. Fann, I. Ahmed, N. J. Blackburn, J. S. Boswell, M. L. Verkhovskaya, B. M. Hoffman, M. Wikström, *Biochem.* **1995**, 34, 10245 - 10255.

⁹⁵B. H. Zimmermann, C. I. Nitsche, J. A. Fee, F. Rusnak, E. Munck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5779 - 5783.

*Paracoccus denitrificans*⁹⁶ und der bo_3 -Oxidase aus *Escherichia coli*⁹⁷ sowie an Modellsystemen durchgeführt worden.^{98,99,100,101}

1.2.6 Strukturuntersuchungen

Die ersten Kristallstrukturen der Cytochrom-c-Oxidase wurden 1995 von H. MICHEL *et al.* und S. YOSHIKAWA *et al.* veröffentlicht.^{102,103} Seitdem sind vor allem die Cytochrom-c-Oxidasen aus Rinderherz und den Bakterien *Paracoccus denitrificans* sowie *Thermus thermophilus* von verschiedenen Arbeitsgruppen röntgenographisch oder röntgenabsorptionsspektroskopisch weiter untersucht worden.¹⁰⁴ Die Tabelle 1.1 enthält ausgewählte Ergebnisse dieser Untersuchungen.^{105,106,107,108,109}

Genaue Informationen über den Aufbau der metallhaltigen Zentren lieferte die Röntgenabsorptionsspektroskopie.¹¹⁰ Schon vor der ersten Kristallstruktur konnte so mit Hilfe der EXAFS-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Kupferatome des Cu_A -Zentrums über Schwefelatome verbrückt sind. Außerdem konnten Modelle für die Metallzentren und die Oxidationsstufen der hierin enthaltenen Metalle sowie die Bindung des Substrats Sauerstoff am heterobinuklearen Zentrum der Oxidase vorgeschlagen werden.¹⁰⁶

⁹⁶M. Vamvouka, W. Müller, B. Ludwig, C. Varotsis, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3030 - 3034.

⁹⁷M. Ralle, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morgan, M. I. Verkhovsky, M. Wikström, N. J. Blackburn, *Biochem.* **1999**, *38*, 7185 - 7194.

⁹⁸M. J. Gunter, K. J. Berry, K. S. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4227 - 4235.

⁹⁹M. J. Scott, S. C. Lee, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4651 - 4662.

¹⁰⁰M. T. Gardener, G. Deinum, Y. Kim, G. T. Babcock, M. J. Scott, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6878 - 6884.

¹⁰¹J. P. Collman, M. Zhong, Z. Wang, M. Rapta, E. Rose, *Org. Lett.* **1999**, *1(13)*, 2121 - 2124; J. P. Collman, M. Rapta, M. Bröring, L. Raptova, R. Schwenninger, B. Boitrel, L. Fu, M. L'Her, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1387 - 1388.

¹⁰²S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, *376*, 660 - 669.

¹⁰³T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069 - 1074. PDB Id.-Nr.: 1OCC

¹⁰⁴H. Michel, J. Behr, A. Harrenga, A. Kannt, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 329 - 356.

¹⁰⁵N. J. Blackburn, M. E. Barr, W. H. Woodruff, J. v. d. Oost, S. de Vries, *Biochem.* **1994**, *33(34)*, 10401 - 10407.

¹⁰⁶A. Müller, S. Weißgräber, G. Buse, T. Soulimane, G. C. M. Steffens, H-F. Nolting, G. Henkel, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1615 - 1619; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1488 - 1492.

¹⁰⁷M. Wilmanns, P. Lappalainen, M. Kelly, E. Sauer-Eriksson, M. Saraste, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 11955 - 11959.

¹⁰⁸N. J. Blackburn, S. de Vries, M. E. Barr, R. P. Houser, W. B. Tolman, D. Sanders, J. A. Fee *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6135 - 6143.

¹⁰⁹P. A. Williams, N. J. Blackburn, D. Sanders, H. Bellamy, E. A. Stura, J. A. Fee, D. E. McRee, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6(6)*, 509 - 516.

¹¹⁰Die Röntgenabsorptionsspektroskopie ist in Abschnitt 6.3 (S. 153) erläutert.

Tabelle 1.1: Ausgewählte Ergebnisse von Strukturuntersuchungen an Cytochrom-c-Oxidase und löslichen Domänen der Subunit II. Angaben in [Å].

	<i>Bacillus subtilis</i>	Rinderherz	Rinderherz	<i>Paracoccus denitrificans</i>
Oxidase	caa ₃ -Oxidase lösl. Domäne Subunit II	aa ₃ -Oxidase	aa ₃ -Oxidase	aa ₃ -Oxidase
Auflösung	(EXAFS)	(2,8 Å)	(EXAFS)	(2,8 Å)
Autor	BLACKBURN <i>et al.</i> ¹⁰⁵	YOSHIKAWA <i>et al.</i> ¹⁰³	HENKEL <i>et al.</i> ¹⁰⁶	MICHEL <i>et al.</i> ¹⁰²
Jahr	1994	1995	1995	1995
Cu–Cu	2,45	2,7	2,46	2,6
Cu–S	2,18	2,21 - 2,30	2,29	2,3
Cu–N	1,93	1,85 - 2,16	1,96 – 2,03	2,1 – 2,2
Cu–S_{Met}	2,65	2,48	—	2,7
Cu–O_{Glu}	—	2,19	—	3,0
Cu–Fe	—	4,5	3,89	5,2

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Oxidase	Quinol-Oxidase Purple CyoA (Mutante)	ba ₃ -Oxidase	ba ₃ -Oxidase lösl. Domäne Subunit II	ba ₃ -Oxidase lösl. Domäne Subunit II
Auflösung	(2,3 Å)	(2,4 Å)	(EXAFS)	(1,6 Å)
Autor	SARASTE <i>et al.</i> ¹⁰⁷	SOULIMANE <i>et al.</i> ⁶⁹	BLACKBURN <i>et al.</i> ¹⁰⁸	BLACKBURN <i>et al.</i> ¹⁰⁹
Jahr	1995	2000	1997	1999
Cu–Cu	2,48	2,42	2,43	2,51
Cu–S	2,07 – 2,25	2,32 – 2,48	2,29	2,27 – 2,42
Cu–N	1,77 – 1,85	2,1	1,96	1,88 – 2,11
Cu–S_{Met}	2,28	2,5	—	2,46
Cu–O_{Glu}	3,02	2,8	—	2,62
Cu–Fe	—	4,39	—	—

Die Tabelle 1.1 enthält weiterhin Ergebnisse für die wasserlösliche Domäne der SU II. Die Ergebnisse der löslichen Domäne geben den Aufbau des Cu_A -Zentrums sehr genau wieder.¹¹¹

Heute wird versucht, andere Zustände als den „oxidierten“ bzw. nativen Zustand des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase zu kristallisieren und strukturell zu charakterisieren. Die Kristallisation des gewünschten Zustands stellt sich hierbei jedoch als großes Problem dar.

Die ersten Kristalle des Holoenzym ba_3 -Oxidase aus *Thermus thermophilus* sind in Gegenwart von Octyl- β -D-Glucopyranosid als Detergenz und 14 % Polyethylenglykolmonomethylether in 20 mM Bis-Tris-Propan-Puffer¹¹² (pH 7,6) bei 20 °C von T. SOULIMANE *et al.* gezüchtet und untersucht worden.¹¹³ Eine geringfügig andere Kristallstruktur wird mit Nonyl- β -D-Glucopyranosid als Detergenz und Bis-Tris-Puffer¹¹⁴ (pH 7,0) erhalten.⁶⁹ Das Ergebnis dieser Kristallstruktur ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Modifikationen an den Oxidasen und die Möglichkeit der Expression in einem anderen Organismus führen dazu, dass die Informationen über die einzelnen Systeme und ihre Metallzentren immer differenzierter werden. BLACKBURN *et al.* ist es an der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* gelungen, den Methionin-Schwefel, der an das Cu_A -Zentrum gebunden ist, durch ein Selen zu ersetzen. Diese Selenomethionin-substituierte ba_3 -Oxidase konnte dann mit der Röntgenabsorptionsspektroskopie sowohl an der Cu-K- als auch an der Se-K-Kante untersucht werden.¹¹⁵ Der Cu-Se-Abstand ist mit 2,55 Å größer als der übliche Wert für derartige Bindungen.¹¹⁶ Das Strukturmodell aus den komplementären Cu-K- und Se-K-Ergebnissen zeigt, dass die beiden Kupferatome und die beiden Schwefelatome des Cu_A -Zentrums im Bereich der Fehlergrenzen in einer Ebene liegen.

Ein weiteres Ziel von Untersuchungen an der Cytochrom-c-Oxidase ist, die Orientierung des gebundenen Substrats zwischen den beiden Metallatomen des heterobinuklearen Zentrums aufzuklären. Die einzelnen Röntgenstrukturen unterscheiden sich in der Anzahl der hier gebundenen Atome. Als verbrückender Ligand ist zwischen dem Cu_B und dem $\text{Fe}_{\text{a}3}$ der nativen ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* nur ein einziges Sauerstoffatom (μ -oxo-Spezies, Hydroxidion oder Wasser-Molekül) gefunden worden.⁶⁹ Nach dem Ergebnis von UV/Vis-spektroskopischen und elektrochemischen Untersuchungen soll im nativen Zustand der ba_3 -

¹¹¹Vgl. C. Dennison, G. W. Canters, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1996**, 115, 345 - 351.

¹¹²Bis-Tris-Propan: $\text{CH}_2[\text{CH}_2\text{NHC}(\text{CH}_2\text{OH})_3]_2$, 1,3-Bis(tris[hydroxymethyl]methylamino)propan.

¹¹³T. Soulimane, U. Gohlke, R. Huber, G. Buse, *FEBS Lett.* **1995**, 368, 132 - 134.

¹¹⁴Bis-Tris: $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, Bis-(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan.

¹¹⁵N. J. Blackburn, M. Ralle, E. Gomez, M. G. Hill, A. Pustuszyn, D. Sanders, J. A. Fee, *Biochem.* **1999**, 38, 7075 - 7084.

¹¹⁶Erwartet für Cu-S_{Met}: ~ 2,47 Å. Vgl. P. Lappalainen, *The Dinuclear Cu_A Centre of Cytochrome Oxidase*, Biological Research Reports from the University of Jyväskylä, Finland, **1995**, S. 33; J. A. Farrar, P. Lappalainen, W. G. Zumft, M. Saraste, A. J. Thomson, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 232, 294 - 303.

Oxidase aus *T. thermophilus* kein Peroxo-Ligand gebunden sein.¹¹⁷ Die Möglichkeit, dass zwei einzelne Sauerstoffionen vorliegen, wird hingegen nicht ausgeschlossen.

Für die native Rinderherz-Oxidase wird eine Peroxo-Spezies (O_2^{2-}) angenommen,¹¹⁸ während das Substrat bei der aa_3 -Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* umgesetzt ist, und sich zwischen den beiden Metallatomen zwei Liganden (ein Wassermolekül an Fe_{a_3} und ein Hydroxidion an Cu_B) befinden sollen.¹¹⁹

Der Katalysekreislauf

Die Umsetzung von Sauerstoff und der Protonentransfer über die Membran erfordern einen ständigen Transport von Elektronen bzw. Protonen durch die Cytochrom-c-Oxidase. Alle vier bereits erwähnten Metallzentren des Enzyms sind an diesem Transfer beteiligt. Die Metalle ändern hierbei ständig ihren Oxidationszustand.

Nach der Bindung von Cytochrom c an die SU II der Cytochrom-c-Oxidase werden Elektronen auf das Cu_A -Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase übertragen, die von dort aus über das Häm-a- bzw. Häm-b-Zentrum an das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum weitergegeben werden. Im Falle der ba_3 -Oxidase wird hierbei zunächst das Häm b und anschließend das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum reduziert.

Bei der Umsetzung der Cytochrom-c-Oxidase mit reduziertem Cytochrom c oder mit anderen chemischen Reduktionsmitteln sind nach weniger als 0,1 s die Hälfte der vorhandenen Häm b umgesetzt, während die Reduktion von 50 % Häm a_3 über 7 s benötigt. Daraus lässt sich schließen, dass beide Hämgruppen nacheinander und nicht parallel mit dem Elektronenüberträger reagieren.¹²⁰

Am Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum wird das Substrat Sauerstoff (O_2) gebunden. Inhibitoren wie Cyanid, Azid oder Kohlenmonoxid konkurrieren mit dem Substrat um die Bindungsstelle am heterobinuklearen Zentrum. Eine Inhibierung blockiert das Metallzentrum und hemmt die Zellatmung irreversibel. Der Sauerstoff ist in der Lage, die vollkommen reduzierte Form der Oxidase in einer schnellen Reaktion in die vollkommen oxidierte Form der Oxidase zu überführen. Diese Umsetzung erfolgt gegenüber der Reduktion des Enzyms so schnell,

¹¹⁷P. Hellwig, T. Soulimane, G. Buse, W. Mäntele, *Biochem.* **1999**, *38*, 9648 - 9658.

¹¹⁸S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fel, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, *280*, 1723 - 1730.

¹¹⁹C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10547 - 10553.

¹²⁰M. Dixon, E. C. Webb in *Enzymes*, Vol. 3, Longman Group, **1979**, S. 500 und dort als Ref. 2755 zitierte Literatur.

dass zunächst nur Untersuchungen des Mechanismus mit Tieftemperatur-Abfangtechniken erfolgreich waren.^{121,122,123}

Nachdem B. CHANCE im Jahr 1981 einen ersten Mechanismus der Sauerstoffreduktion am Fe_{a3} - Cu_B -Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase vorgeschlagen hatte,¹²⁴ beschrieben M. WIKSTRÖM^{125,126} bzw. C. VAROTSIIS *et al.*¹²⁷ die Elektronentransferschritte für einen Mechanismus der stufenweisen Vier-Elektronen/Vier-Protonen-Umsetzung des Sauerstoffs. In diesem Katalysekreislauf ist bereits ein Ferryl-Zustand¹²⁸ für das Fe_{a3} postuliert, der auch in dem sehr ähnlichen Kreislaufschema von S. FERGUSON-MILLER und G. T. BABCOCK¹²⁹ aus dem Jahr 1996 enthalten ist.

Der Sauerstoff diffundiert entlang eines wohldefinierten Weges zum heterobinuklearen Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase.¹³⁰ Dort bindet das high-spin Fe^{2+} den eindiffundierten molekularen Sauerstoff. Nach K. D. KARLIN *et al.* soll dieses Addukt analog dem im Hämoglobin sein.¹³¹ In einer raschen *inner-sphere*-Reduktion wird der Sauerstoff dann zu einem Hydroperoxo-Komplex umgesetzt. Durch die Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Einfachbindung kommt es zur Bildung des intermediären Häm-Oxoferryl⁴⁺-Systems. Nach der Aufnahme von zwei Protonen spalten beide Hydroxo-Metallzentren $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ Wasser ab und werden durch die Aufnahme von zwei weiteren Elektronen zum Ausgangszustand reduziert.

Nach thermodynamischen Überlegungen von D. F. WILSON soll das Peroxid bei der Umsetzung des Sauerstoffs durch die Cytochrom-c-Oxidase eine zentrale Rolle spielen.¹³² Allerdings wird dieses reaktive Zwischenprodukt genauso wie OH-Radikale nicht frei gesetzt. Die einzige bisher bekannte Ausnahme bildet das Meeresbakterium *Pseudomonas nautica 617*, bei dem nicht Wasser, sondern Wasserstoffperoxid gebildet wird.¹³³

¹²¹G. T. Babcock, M. Wikström, *Nature* **1992**, 356, 301 - 309.

¹²²O. Einarsdottir, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1229, 129 - 147.

¹²³A. Sucheta, I. Szundi, O. Einarsdottir, *Biochem.* **1998**, 37, 17905 - 17914.

¹²⁴B. Chance in *Oxygen and Living Processes, An Interdisciplinary Approach*, Springer, New York, **1981**, S. 200 - 209.

¹²⁵M. Wikström, *Nature* **1989**, 338, 776 - 778.

¹²⁶M. Wikström, J. E. Morgan, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(15), 10266 - 10273.

¹²⁷G. T. Babcock, C. Varotsis, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, 25(2), 71 - 80.

¹²⁸In biologischen Systemen ist für Eisen auch die Oxidationsstufe +IV relevant. Für Fe^{IV} -Oxo-Spezies wird auch die Bezeichnung „Ferryl“ verwendet. B. Meunier in *Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes* (Hrsg.: B. Meunier), Imp. College Press, London, **2000**, S. 664.

¹²⁹S. Ferguson-Miller, G. T. Babcock, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2889 - 2907.

¹³⁰I. Hofacker, K. Schulten, *Proteins: Structure, Function and Genetics* **1998**, 30(1), 100 - 107.

¹³¹K. D. Karlin, D.-H. Lee, H. V. Obias, K. J. Humphreys, *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70(4), 855-862.

¹³²D. F. Wilson, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1987**, 18, 51 - 58.

¹³³E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1990**, S. 95.

Mittlerweile existieren verschiedene Vorstellungen über den Ablauf der Sauerstoffumsetzung am $\text{Fe}_{\text{a}3}\text{-Cu}_{\text{B}}$ -Zentrum. Untersuchungen von O. EINARSDOTTIR *et al.* aus dem Jahr 1988 bestätigen die Bildung eines Hydroperoxid-Intermediates.¹³⁴ Die Einflüsse verschiedener Faktoren wie pH-Wert und Temperatur auf die Reaktion werden darin verglichen und eine Vorstellung von der Position bestimmter Wasserstoffbindungen in Relation zum Sauerstoffliganden des $\text{Fe}_{\text{a}3}$ entwickelt.

Basierend auf spektroskopischen Daten (u. a. Resonanz-Raman) haben H. MICHEL *et al.* einen katalytischen Zyklus aufgestellt, der die stufenweise Reduktion des Sauerstoffs und die Änderung der Oxidationszustände der beiden Metallatome des heterobinuklearen Zentrums im Kreislaufschema zeigt (Abbildung 1.8).^{104,135} Eine weitere Darstellung des Katalysekreislaufs stammt aus dem Jahr 2000 von der Arbeitsgruppe um M. WIKSTRÖM und ist in Abbildung 1.9 dargestellt.¹³⁶

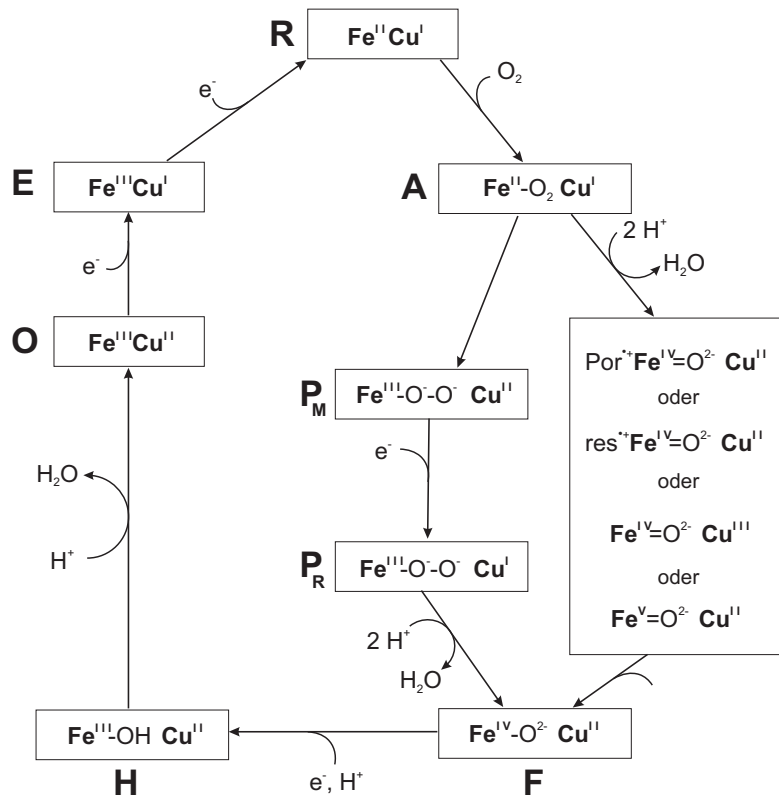
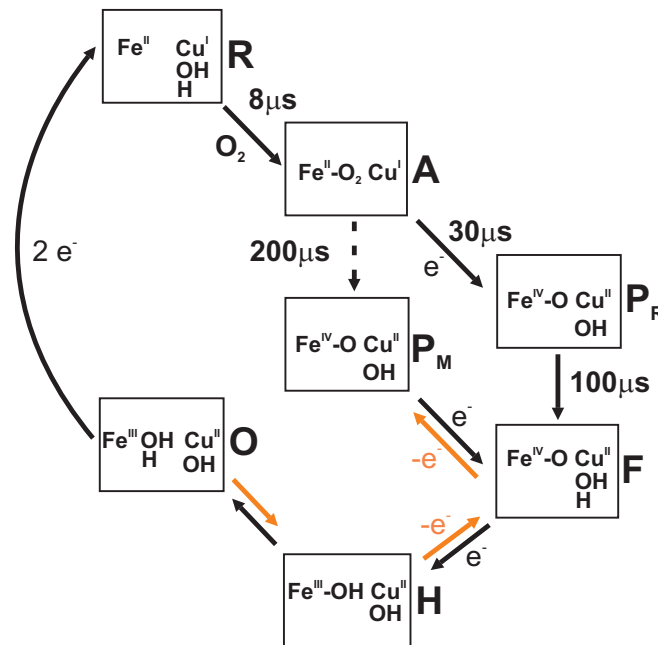


Abbildung 1.8: Von MICHEL *et al.* vorgeschlagener Katalysekreislauf (1998).

¹³⁴O. Einarsson, M. G. Choc, S. Weldon, W. S. Chaughey, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*(27), 13641 - 13654.

¹³⁵H. Michel, *Biochem.* **1999**, *38*, 15129 - 15140.

¹³⁶M. Wikström, *Biochem.* **2000**, *39*(13), 3515 - 3519.

Abbildung 1.9: Von WIKSTRÖM *et al.* vorgeschlagener Katalysekreislauf (2000).

Der oxidierte Zustand des heterobinuklearen Zentrums im Katalysekreislauf ist in den Abbildungen 1.8 und 1.9 mit (O) bezeichnet. Über den sukzessiven Transfer von Elektronen vom Häm a kommt es zur Bildung des zur Hälfte (E) und vollständig reduzierten $\text{Fe}_{\text{a}3}\text{-Cu}_{\text{B}}$ -Zentrums (R). Durch die Bindung des Substrats Sauerstoff wird die Oxy-Komponente (A) gebildet. Weiterer Elektronentransfer führt zur Generierung des Peroxo-Intermediates (P). Dieser Zustand (P) wäre durch internen Elektronentransfer wieder zum oxidierten Zustand überführbar. Spektroskopische Untersuchungen legen jedoch nahe, dass es an dieser Stelle zur Bildung eines Fe^{IV} -Zustands — des Ferryl-Zustands — kommt.¹³⁷

Unter der Annahme, dass bereits an dieser Stelle die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung gespalten ist, werden von MICHEL *et al.* alternative Strukturen angegeben (vgl. Abbildung 1.8), für deren Bildung jedoch ein weiteres Elektron notwendig ist. Dieses soll aus der Umgebung des heterobinuklearen Metallzentrums kommen. Die plausibelste Erklärung für die Herkunft dieses Elektrons ist, dass es von einem an einen Histidin-Liganden des Cu_{B} -Zentrums gebundenen Tyrosin stammt.^{118,138,139}

Die Freisetzung eines Moleküls Wasser im Katalysekreislauf von MICHEL *et al.* führt dann zur Bildung des klassischen Oxo-Ferryl-Zustands (F), dessen Existenz von beiden Arbeits-

¹³⁷M. Fabian, G. Palmer, *Biochem.* **1999**, *38*, 6270 - 6275; *dies.*, *Biochem.* **2001**, *40*(6), 1867 - 1874.

¹³⁸F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, H. Michel, *Biochem.* **1999**, *38*(29), 9179 - 9184.

¹³⁹M. Karpefors, P. Ädelroth, A. Namslauer, Y. Zhen, P. Brzezinski, *Biochem.* **2000**, *39*, 14664 - 14669.

gruppen bestätigt wird. Nach dem Transfer eines weiteren Elektrons und der Aufnahme von zwei weiteren Protonen wird über den Hydroxy-Zustand (H) das zweite Molekül Wasser abgegeben und wieder der Ausgangszustand des oxidierten Zentrums (O) erreicht.

Die Schemata in den Abbildungen 1.8 und 1.9 basieren hauptsächlich auf den Untersuchungen sowie kinetischen Messungen der beiden Arbeitsgruppen von MICHEL und WIKSTRÖM. Enthalten sind in den Darstellungen nur die Protonen, die für die Umsetzung des Sauerstoffs benötigt werden. Die über die Membran gepumpten Protonen sind nicht abgebildet. Details des Katalysezyklus werden noch kontrovers diskutiert.¹³⁶

Kapitel 2

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit sind Beiträge zur Strukturaufklärung der Cytochrom-c-Oxidase. Die strukturelle Charakterisierung der Cytochrom-c-Oxidase in verschiedenen stationären Zuständen ist für das Verständnis des Katalysekreislaufs der Sauerstoffumsetzung unabdingbar. Somit werden native und reduzierte Formen des Enzyms aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* (ba_3 -Oxidase) Gegenstand der röntgenabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen sein, bei der folgende Fragestellungen im Vordergrund stehen:

- Wie ändern sich die Abstände in den Metallzentren beim Übergang in den reduzierten Zustand des Enzyms ?
- Sind die beiden schwach koordinierenden Liganden im Cu_A -Zentrum mit der EXAFS-Spektroskopie detektierbar?
- Wie sind Substrat und Inhibitor am heterobinuklearen Zentrum des Enzyms gebunden?

Als Untersuchungsobjekt soll die ba_3 -Oxidase dienen, um möglichst hochaufgelöste Spektren erhalten zu können (Abwesenheit einer störenden Zn-K-Kante). Dazu wird die native ba_3 -Oxidase chemisch reduziert sowie inhibiert. Die Strukturen dieser Formen sollen mit der Struktur der nativen ba_3 -Oxidase verglichen werden.

Um den Einfluss der Kristallisation zu klären, soll die ba_3 -Oxidase ferner in kristalliner Form gemessen und der Unterschied zur Struktur in gelöster Form ermittelt werden. Dieser Vergleich soll auf geeignete Modellkomplexe für das Cu_A -Zentrum ebenfalls in kristalliner und gelöster Form ausgedehnt werden.

Schließlich soll neben der Messung und Auswertung der röntgenabsorptionsspektroskopischen Daten die Methode EXAFS optimiert und weiterentwickelt werden, um künftig noch besser von ihrer unvergleichlichen Möglichkeit der Strukturaufklärung unabhängig vom Aggregatzustand der Proben profitieren zu können.

Kapitel 3

Experimenteller Teil

3.1 Probenvorbereitung und Lagerung

3.1.1 Cytochrom-c-Oxidase

Die ba_3 -Oxidase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* ist von T. SOULIMANE¹⁴⁰ vom Institut für Biochemie des RWTH-Klinikums Aachen unter Leitung von G. BUSE¹⁴¹ isoliert worden. Das gelöste Enzym liegt in wässriger Lösung mit dem Detergenz Triton X-100¹⁴² (0,1 %) und dem Puffer Bis-Tris-Propan¹¹² (pH 7,0) vor. Die weitere Präparation der einzelnen Proben erfolgte in enger Kooperation.

Zur Inhibierung der nativen Form der ba_3 -Oxidase wurde das Enzym mit wässriger Kaliumcyanidlösung bzw. wässriger Natriumazidlösung (beide 5 mmol/l) im Überschuss versetzt und vier Tage im offenen System gerührt.¹⁴³ Durch Zentrifugation konnten die Proben auf ungefähr 4 mmol/l aufkonzentriert werden.

Bei der Präparation der reduzierten und reduziert-inhibierten Enzyme musste darauf geachtet werden, dass keine Re-Oxidation auftritt. Die Umsetzungen erfolgten daher unter Argon (Qualität 4.8) in einem ATMOSBAG.¹⁴⁴ Da eine Umsetzung der aufkonzentrierten

¹⁴⁰Priv.-Doz. Dr. T. Soulimane, derzeit: Paul-Scherrer-Institut, Life Sciences, OSRA/007, 5232 Villigen, Schweiz.

¹⁴¹Prof. Dr. G. Buse, Institut für Biochemie, RWTH-Klinikum Aachen, Pauwelsstraße 30, 52057 Aachen.

¹⁴²Triton X-100: $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, $n \approx 9,5$, Polyethylenglykol-[p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl]-ether, CAS-Nr.: 9002-93-1.

¹⁴³K. K. Surerus, W. A. Oertling, C. Fan, R. J. Gurbiel, O. Einarsdottir, W. E. Antholine, R. B. Dyer, B. M. Hoffmann, W. H. Woodruff, J. A. Fee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3195 - 3199.

¹⁴⁴ATMOSBAG: Mobile „Zwei-Handschuh-Box“ der Fa. Aldrich, Volumen des verwendeten ATMOSBAGS: 50 l (behandelt mit Ethylenoxid).

Proben wegen der Überschreitung des Löslichkeitsproduktes nicht möglich war, erfolgte die Aufkonzentration der Proben durch Zentrifugation nach der Umsetzung. Die Öffnung der Zentrifuge und der gesamte Zentrifugenraum wurden hierzu abgedichtet und kontinuierlich mit Stickstoff gespült.

Als Kontrollsubstanz für die Güte der Inertgasatmosphäre diente eine Probe des Proteins Cytochrom c_{552} , das mit Sauerstoff schnell reagiert. Vor und nach der Präparation der Proben wurde von der Kontrollsubstanz ein UV/Vis-Spektrum (PERKIN-ELMER, *Lambda 5* UV/Vis-Spektrometer) aufgenommen. Eine Verschiebung der Hauptbande konnte nicht festgestellt werden, so dass auch für die präparierten Proben eine Re-Oxidation durch Sauerstoff ausgeschlossen werden kann.

Die zu reduzierenden Proben wurden mit Natriumdithionitlösung behandelt. Hierbei kam es sofort zu einem deutlich sichtbaren Farbumschlag von rotbraun zu dunkelbraun. Die Proben wurden 15 min gerührt, zur Inhibierung mit den bereits genannten Lösungen im Überschuss umgesetzt und weitere zwei Stunden gerührt.¹⁴⁵ Die mit Cyanid umgesetzte Probe verfärbte sich dabei rotorange, während sich die azidinhibierte farblich nicht veränderte. Die Zentrifugation erfolgte schrittweise jeweils ungefähr 20 min lang unter Stickstoff bei 20 °C mit 5100 U/min, bis eine Konzentration von ungefähr 4 mmol/l erreicht war.

Alle Enzymlösungen wurden mit Hilfe von handelsüblichen sterilen Insulin-Spritzen blasenfrei in die Küvetten gefüllt und die Einfüllöffnungen mit Sekundenkleber geschlossen. Im Falle der kristallinen Cytochrom-c-Oxidase diente eine einseitig mit KAPTON-Folie¹⁴⁶ beklebte Küvette als Probenbehälter. Die Kristalle stammten aus Kristallisationsansätzen für die Röntgenstrukturanalyse und wurden nicht weiter selektiert. Die Küvettierung der Kristalle erfolgte zusammen mit Mutterlauge, um ein Verwittern der Kristalle zu verhindern. Schließlich wurde der Küvettenraum mit KAPTON-Klebeband¹⁴⁷ verschlossen.

Als Küvetten dienten selbstkonstruierte, 1 mm starke Rahmen aus Polystyrol, deren Fenster mit Hilfe von Zwei-Komponenten-Kleber mit KAPTON-Folie¹⁴⁶ beklebt worden waren (Abbildung 3.1).

Die einzelnen Küvetten wurden in einem Gemisch aus Trockeneis/Ethanol oder Trockeneis/Methanol schockgefroren und in Flüssigstickstoff bis zur Messung aufbewahrt. Das

¹⁴⁵Die Inhibierung der reduzierten ba_3 -Oxidase verläuft wesentlich schneller als bei der nativen Form. Vgl. A. Giuffrè, E. Forte, G. Antonini, E. D'Itri, M. Brunori, T. Soulimane, G. Buse, *Biochem.* **1999**, *38*, 1057 - 1065.

¹⁴⁶Kapton®: Polyimid-Film der Firma DuPont, Typ HN, Dicke 19,1 μm . Kapton®-Film ist durchsichtig und bernsteinfarben; hohe Beständigkeit gegenüber Strahlung; max. Dauergebrauchstemperatur 250 - 320 °C, min. Dauergebrauchstemperatur - 270 °C; CAS-Nr.: 25036-53-7; <http://www.dupont.com/kapton/>.

¹⁴⁷Kapton®-Klebeband: Polyimid-Film der Firma 3M, Tape 5413, Kapton®-Typ H.

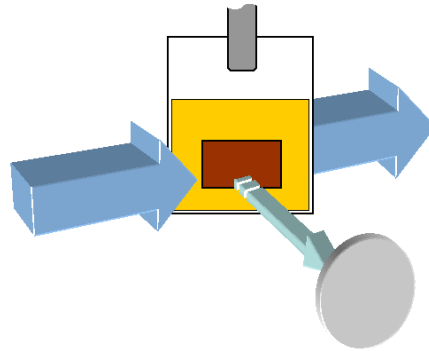


Abbildung 3.1: EXAFS-Küvette mit KAPTON-Folie im Strahlengang.

Schockgefrieren gewährleistet einerseits eine Konservierung des molekularen Zustands der Verbindungen, wie er bei Raumtemperatur vorliegt, und andererseits das Ausschließen eines Konzentrationsgefälles während der Abkühlphase. Gleichzeitig wird eine Blasenbildung in der Küvette durch eine langsame Auskristallisation der Substanzen und die Bildung von Eiskristallen verhindert.

3.1.2 Modellkomplexe

Die in dieser Arbeit gemessenen Modellkomplexe wurden in Handschuhboxen unter Inertgasatmosphäre synthetisiert und dort in die Küvetten eingefüllt.

Für die Proben mit organischen Lösungsmitteln dienten Lösungsmittel-resistente Küvetten aus 1 mm starkem Aluminium mit einer Reinheit von 99,5 %. Das Fenstermaterial bestand hierbei aus KAPTON-Klebefilm.¹⁴⁷ Einseitig mit KAPTON-Folie¹⁴⁶ beklebte Küvetten aus Polyvinylchlorid fanden für die Präparation aller kristallinen Proben Verwendung. Die Kristalle der Modellkomplexe wurden mit Polyethylen-Pulver¹⁴⁸ (spektralfotometrische Qualität, ALDRICH) verrieben, um sowohl eine optimale Konzentration für die Messungen (Kantenhöhe von $\mu \approx 1$) als auch eine homogene Verteilung sicherzustellen. Das Gemisch wurde im Küvettenraum eng gepackt und dieser mit Hilfe von KAPTON-Klebeband verschlossen.

Das Schock- und Tiefgefrieren erfolgte nach dem allgemein üblichen Verfahren unmittelbar nach dem Ausschleusen aus der Handschuhbox. Weitere Einzelheiten zur Präparation der einzelnen Proben sind den jeweiligen Abschnitten in Kapitel 4 ab S. 97 zu entnehmen.

¹⁴⁸Die Charge ist nach dem Ergebnis einer TXRF-Analyse frei von Kupfer und Zink.

3.2 Röntgenabsorptionsmessungen

3.2.1 Das Röntgenabsorptionsspektrometer des EMBL in Hamburg

Alle röntgenabsorptionsspektroskopischen Messungen wurden am DESY in Hamburg durchgeführt. Der genutzte Messstand für die XAS-Messungen befindet sich am DORIS-III-Ring in der Halle des HASYLAB¹⁴⁹ und wird vom EMBL¹⁵⁰ Outstation Hamburg¹⁵¹ betrieben. Detaillierte Informationen über die Instrumentierung sind in der Literatur dargestellt.¹⁵²

Das Spektrometer des EMBL ist mit einem 2-stufigen Helium-Kryostaten zur Messung bei Temperaturen bis zu 17 K und für den Fluoreszenzmodus mit einem 13-Element-Germanium-Detektor ausgestattet. Aus diesem Grunde ist dieses Spektrometer für die Untersuchung von empfindlichen Proben mit geringer Konzentration besonders geeignet.

Die Energiekalibrierung der Spektren erfolgt hier nicht wie bei einem herkömmlichen Spektrometer über die Messung der Absorptionskante einer Metallfolie, stattdessen liefert ein statischer Si(220)-Kristall am Ende des Strahlengangs die Braggreflexe, die zur automatischen Energiekalibrierung eines Spektrums während der Datenvorbereitung genutzt werden (Abbildung 3.2¹⁵³). Für die Kalibrierung der Energieachse eines Spektrums werden mehrere Punkte genutzt und somit kann eine Genauigkeit in der Energie von bis zu 0,1 eV über den gesamten Messbereich erreicht werden.

Der einfallende Synchrotronstrahl wird über einen temperierten Doppel-Monochromator aus zwei Si(111)-Kristallen geleitet. Ein leichtes Verstimmen (*Detuning*) der beiden Monochromator-Kristalle gegeneinander verhindert höhere harmonische Schwingungen im monochromatisierten Strahl. Ein 1,8 m langer, toroidaler goldbeschichteter Spiegel fokussiert den Strahl in horizontaler Richtung. Diese optischen Systeme sind sowohl zum Synchrotron als auch zum Experiment hin durch 0,4 mm dicke Beryllium-Fenster abgetrennt und befinden sich unter Hochvakuum. In der Probenkammer (Messhütte) wird die Intensität des Strahls vor und hinter der Probe im Kryostaten über Ionisationskammern

¹⁴⁹HASYLAB: Hamburger Synchrotronstrahlungslabor; HASYLAB, c/o DESY, Notkestr. 85, 22603 HAMBURG; <http://www-hasyllab.desy.de/>.

¹⁵⁰EMBL: European Molecular Biology Laboratory, Hauptsitz in Heidelberg.

¹⁵¹EMBL Outstation Hamburg, c/o DESY, Notkestraße 85, 22603 Hamburg; <http://www.embl-hamburg.de/>.

¹⁵²C. Hermes, E. Gilberg, M. H. J. Koch, *Nucl. Instr. Meth.* **1984**, *222*, 207; R. F. Pettifer, C. Hermes, *J. Phys. Coll.* **1986**, *C8*, 127; R. F. Pettifer, C. Hermes, *J. Appl. Cryst.* **1985**, *18*, 404 - 412.

¹⁵³Vorlage aus: <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/EXAFS/>.

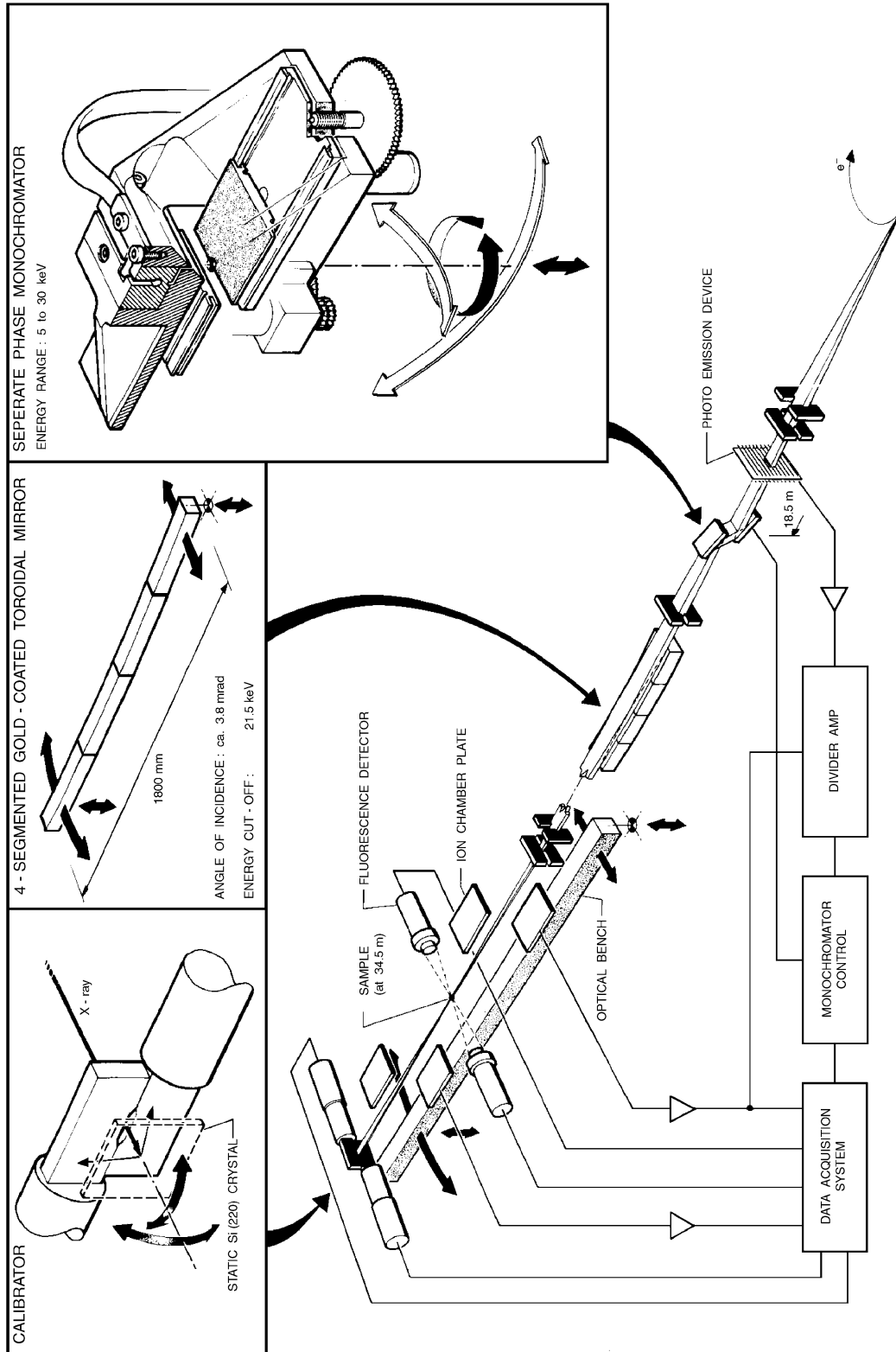


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des EMBL-EXAFS-Messstandes (Beamline D2) auf dem DESY-Gelände in Hamburg.¹⁵³

detektiert. Am Ende des Strahlengangs ist der Si(220)-Kristall für die Energiekalibrierung fest montiert.

Senkrecht zum Strahlengang befindet sich für die Messung von Proben von geringer Absorberkonzentration der 13-Element-Germanium-Fluoreszenzdetektor, dessen Elemente mit Stickstoff gekühlt sind.¹⁵⁴ Die einzelnen Parameter des EMBL-EXAFS-Messstandes sind im Anhang aufgelistet (Abschnitt 6.5, S. 177).

Über ein CAMAC-System¹⁵⁵ werden die aufgenommenen Messdaten an einen IBM-kompatiblen PC weitergeleitet, der wiederum mit einem PC zur Datenauswertung vernetzt ist. So können schon während einer Messung die gewonnenen Daten kontrolliert und vorausgewertet werden.

Die Messung eines Röntgenabsorptionsspektrums beginnt mit der höchsten Energie oberhalb der Absorptionskante. Schrittweise werden computergestützt die Schrittmotoren des Monochromatorsystems gefahren, um die Wellenlänge des einfallenden Strahls schrittweise zu verändern. So wird der gesamte Messbereich bis zu einigen 100 eV unterhalb der Kante abgefahren und jeder Punkt so lange gemessen, bis eine vorher im Parameterfile festgelegte Anzahl an Zählereignissen (*counts*) in der ersten Ionisationskammer (I_0) erreicht worden ist. Die Intensitätsdaten werden dabei in der zweiten Ionisationskammer (I) und mit dem Fluoreszenzdetektor erfasst. Je nach Größe des Messbereichs, Anzahl der zu erreichenden Zählereignisse und Intensität des einfallenden Strahls dauert ein Messdurchgang (*scan*) ungefähr 1 bis 1 1/4 Stunden. Ein Scan besteht dabei aus mehreren Fluoreszenz-Einzelspektren, deren Anzahl gleich der Zahl der Detektorelemente (*channels*) ist — in diesem Fall sind es 13 Detektorelemente.

In Abhängigkeit von der Konzentration der Probe werden zur Erzielung akzeptabler Signal/Rausch-Verhältnisse mehrere Scans nacheinander gemessen. Dabei gilt die Faustregel, dass die Summe aller Kantenhübe der gemessenen Scans ungefähr 500 000 Counts betragen soll. Für Proben mit geringer Konzentration sind, gemäß dieser Regel, ungefähr 10 bis 100 Scans notwendig.

Letztendlich kann aber nur ein Kompromiss zwischen der benötigten Messzeit und dem Signal/Rausch-Verhältnis erzielt werden. Die in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Strategien zur Optimierung von Messungen haben einen entscheidenden Einfluss auf das Signal/Rausch-Verhältnis und damit auf das Ergebnis insgesamt.

¹⁵⁴S. P. Cramer, O. Tench, M. Yocum, G. N. George, *Nucl. Instrum. Methods* **1988**, A266, 586 - 591.

¹⁵⁵CAMAC: **C**omputer **A**utomated **M**easurement and **C**ontrol.

3.2.2 Messungen am EXAFS-Messstand des EMBL

Alle Proben für die Tieftemperaturmessungen wurden an der Beamline unter Flüssigstickstoff an den Probenhalter geschraubt und im Kryostaten des Spektrometers bis auf die Messtemperatur abgekühlt.

Aufgrund der geringen Konzentration der Absorberatome wurden von allen Enzympräparationen Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Modellkomplexe sind — bis auf eine Ausnahme (vgl. Abschnitt 4.3, S. 137) — im Absorptionsmodus gemessen worden. Durch den Vergleich aller Spektren einer Messreihe konnten für alle Proben Strahlenschäden ausgeschlossen werden.

Als Folge der Verbesserungen an der Beamline sind keine Cu-Hintergründe in den Spektren vorhanden.¹⁵⁶ Regelmäßige Messungen von leeren Küvetten bestätigen dies.¹⁵⁷

3.2.3 Messstrategie

Die Messung eines EXAFS-Spektrums erfolgt nach einem vorher konfigurierten Parameterfile, das neben dem Messbereich und der Anzahl der zu messenden Scans auch die Schrittweite des Monochromator-Motors enthält. Außerdem wird festgelegt, welche Zahl an Zählereignissen im Referenzkanal für einen Messpunkt erreicht werden muss.

In einem konventionellen Messschema wird jeder Punkt in einem Spektrum mit der gleichen Referenzintensität gemessen. Nahe der Absorptionskante ist das Spektrum wesentlich besser bestimmt. Je größer k ist, desto stärker verrauscht ist die gewichtete Feinstruktur, d. h. das Signal/Rausch-Verhältnis ist schlechter. Besonders problematisch ist das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis bei hohem k im Fluoreszenzmodus und bei Proben mit niedriger Konzentration. Hier liefern herkömmliche Messstrategien nur unzufriedenstellende Ergebnisse. Das Ziel einer Verbesserung des Messschemas ist daher ein konstantes Signal/Rausch-Verhältnis über den gesamten Messbereich. Dies wird durch ein Gewichtungsschema erreicht, bei dem die Region des Spektrums, die weiter von der Absorptionskante entfernt liegt, mit einer höheren Referenzintensität gemessen wird.

J. GROPPE beschreibt in seiner Arbeit¹⁵⁶ den Vorteil einer Optimierungsstrategie mit der Unterteilung des gesamten Messbereichs in drei verschiedene Regionen und einem Gewichtungsfaktor der verschiedenen Messbereichsregionen von 1, 2 bzw. 4 als „1–2–4-Schema“.

¹⁵⁶Vgl. J. Groppe, *Dissertation*, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 1999.

¹⁵⁷Die in einer Messsession festgestellten Cu-Hintergründe (im Mittel ungefähr 10 % des Gesamtbeitrags) konnten bei der Wiederholung der Cu-K-Kanten-Messung der vier betroffenen Enzymproben nicht mehr beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den gemessenen Spektren eine weitere Optimierung durch eine differenziertere Aufteilung eines Spektrums in mehrere und noch kleinere Regionen erreicht werden. Die Anzahl der Regionen der zuletzt gemessenen Spektren beträgt acht.

Abbildung 3.3 zeigt eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Messstrategien mit jeweils einem Beispiel für die konventionelle Messstrategie (ohne Gewichtung einzelner Regionen), das 1-2-4-Schema und die optimierte Messstrategie.¹⁵⁸

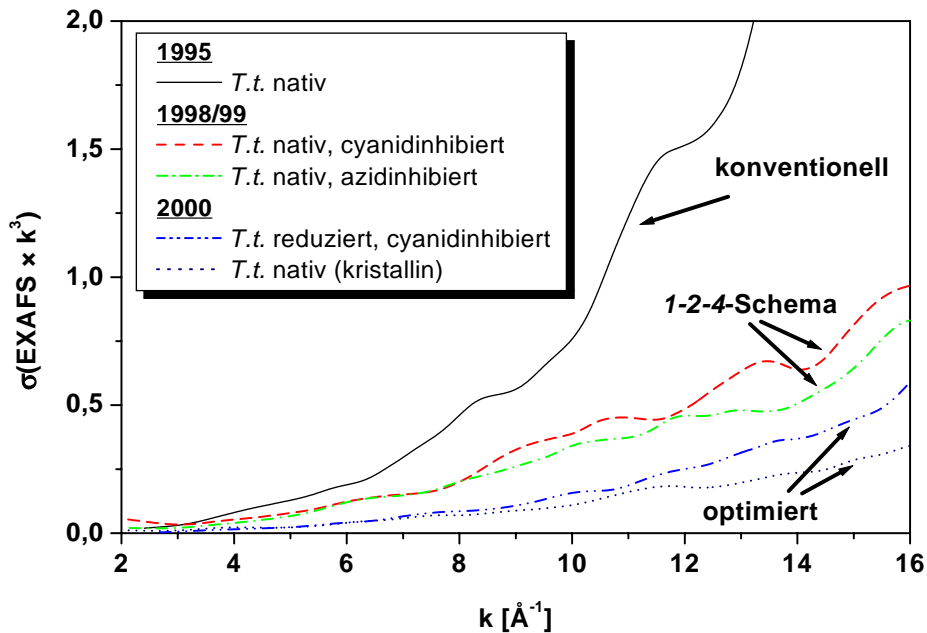


Abbildung 3.3: Mit dem Programm DEPP ermittelte Rauschpegel für ein Spektrum mit a) konventioneller, b) 1-2-4-Schema, c) optimierter Messstrategie.

Die Beispiele stammen aus Cu-K-Kanten-Spektren der ba₃-Oxidase mit einer Konzentration von jeweils etwa 4 mmol/l. Alle Messungen wurden an der EXAFS-Beamline des EMBL in Hamburg durch J. GROPPE (1997) und T. MEYER (1998/1999 und 2000) durchgeführt. Die Graphen für den Rauschpegel konnten alle mit dem Programm DEPP¹⁵⁹ erzeugt werden.

¹⁵⁸Die Verringerung des Rauschens ist auch durch eine Verbesserung der Messapparatur bedingt, deren Anteil aus den Graphen nicht eliminiert werden kann.

¹⁵⁹vgl. Abschnitt 6.3.5, S. 164.

Es wird deutlich, dass die verschiedenen Spektren der ba₃-Oxidase in Abhängigkeit von der verwendeten Messstrategie unterschiedlich starkes Rauschen aufweisen. Durch die Aufteilung des Messbereiches in eine Vielzahl von Regionen verringert sich der Rauschpegel. Auch der Anstieg des Rauschpegels mit steigendem k verändert sich deutlich.

Die weiter optimierte Messstrategie nutzt auch die vorhandene knappe Messzeit durch eine Verbesserung des Verhältnisses Aufwand/Nutzen besser aus. Während früher für eine Feinstruktur rund 30 Scans gemessen werden mussten, wird mit der weiter optimierten Messstrategie bereits mit 13 Scans eine bessere Spektrenqualität erreicht.¹⁶⁰

3.2.4 Datenreduktion

Die Datenreduktion wird mit dem Programmpaket EXPROG¹⁶¹ durchgeführt; dabei findet gleichzeitig die Energiekalibrierung statt.

Bei jedem Messdurchgang (*scan*) werden im Absorptionsmodus ein Spektrum bzw. im Fluoreszenzmodus — entsprechend der Anzahl der Detektorelemente (*channels*) — 13 Einzelspektren aufgenommen. Die Datenvorauswertung mit dem Programmpaket EXPROG erfolgt für jeden Scan durch den Aufruf einer Batch-Datei, wobei die Programme mit den dazu notwendigen verschiedenen Parameterdateien automatisch aufgerufen und abgearbeitet werden.

Die Programme zur Datenreduktion im Programmpaket EXPROG sind in Abbildung 3.4 namentlich aufgeführt. Eine Kurzbeschreibung der einzelnen Programme ist im Anhang enthalten (Abschnitt 6.6, S. 178). Nach einer Totzeitkorrektur mit dem Programm *corr-dea* werden alle Spektren zur Eliminierung von Ausreißern einzeln gesichtet. Es folgt die Kalibrierung der Energie mit Hilfe der aufgenommenen Braggreflexe für die Energieachsenkalibrierung.

Im Falle von Fluoreszenzmessungen werden die Einzelspektren mit dem Programm *mulel* zu einem Spektrum summiert. Die Mittelung der erhaltenen energiekalibrierten Spektren aller Scans zu einem einzigen Spektrum erfolgt zum Abschluss der Datenreduktion mit Hilfe des Programms *average*. An dieser Stelle können eventuell vorhandene Glitches im Spektrum, die als scharfe Peaks eindeutig nicht zur EXAFS-Oszillation gehören, mit dem Programm *degdat* entfernt werden.

¹⁶⁰Im üblichen 5-Bunch-Modus und Strahlströmen von ungefähr 140 bis 70 mA dauert die Messung eines Scans (bestehend aus 13 Einzelspektren; vgl. Abschnitt 3.2.1, S. 30) ungefähr 1 bis 1 1/4 Stunde.

¹⁶¹EXPROG: *EMBL EXAFS data analysis and evaluation program package for PC/AT*, H.-F. Nolting & C. Hermes (1992).

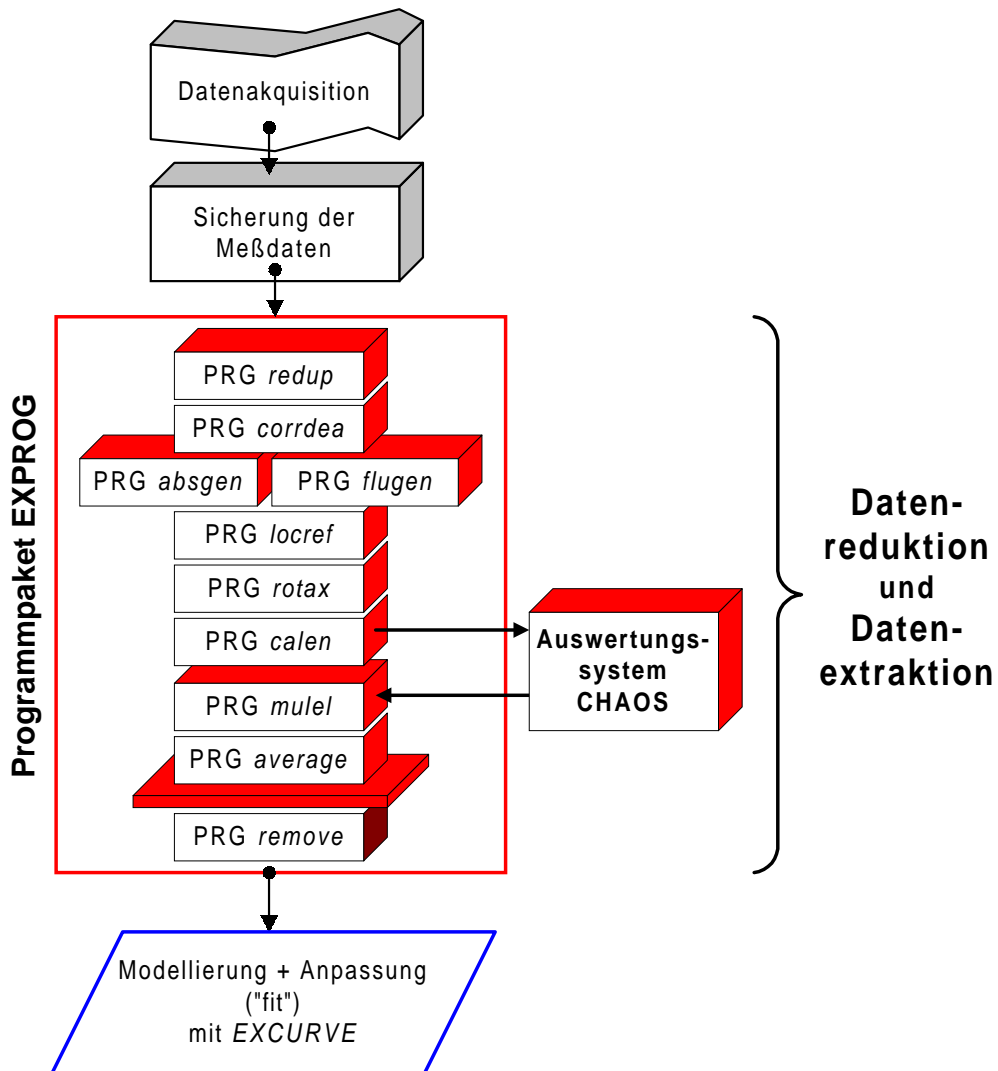


Abbildung 3.4: Ablauf der Datenreduktion und -extraktion mit dem Programmpaket EXPROG (PRG: ausführbares Programm).

Geringere Abweichungen in den Einzelspektren können aufgrund des schlechten Signal/-Rausch-Verhältnisses meist nicht festgestellt werden. In der Dissertation von J. GROPE¹⁵⁶ wurde daher eine Verbesserung der Standardmethoden vorgestellt. Aufbauend auf diesen Grundideen wurde das Konzept zum Erkennen von geringen Störungen in Einzelspektren — beginnend mit den Messungen in den Jahren 1998/1999 — noch weiter verbessert und zu einem System weiterentwickelt, das später den Namen CHAOS erhielt.¹⁶² Alle in dieser Arbeit enthaltenen Daten sind mit dem System CHAOS vorausgewertet worden. Im Jahr 2000 hat B. LIPPOLD das System CHAOS eingesetzt und danach weiter systematisiert. Er beschreibt die Vorteile von CHAOS in seiner Diplomarbeit¹⁶³ am Beispiel von Hydrogenasedaten. Im Folgenden wird das System CHAOS allgemein dargestellt.

3.2.5 CHAOS:

Ein optimiertes Datenvorauswertungssystem

EXAFS-Spektren können nicht-reproduzierbar auftretende Störungen enthalten, deren Herkunft schwer zu analysieren ist. Daher ist es unabdingbar, jedes einzelne Spektrum auf Störungen hin zu untersuchen und diese zu eliminieren. Mit der herkömmlichen Datenvorauswertung können diese Artefakte aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses in den Einzelspektren nur schwer oder nicht erkannt werden. Zur Verbesserung der Datenvorauswertung wurde daher das System CHAOS (*Channel Analyzing and Omitting System*)¹⁶² entwickelt, mit dem Artefakte weitestgehend erkannt und somit eliminiert werden können.

Grundlage der folgenden Beschreibung dieses Systems sind EXAFS-Daten, die mit einem Mehr-Elemente-Fluoreszenzdetektor gesammelt wurden. Das System lässt sich an dem Auswertungsdatenblatt (vgl. Abbildung 3.5), das für die Messungen in Hamburg am EMBL-EXAFS-Messstand D2 mit einem 13-Element-Fluoreszenz-Detektor entwickelt wurde, nachvollziehen. Die einzelnen Messdurchgänge (*scans*) sind horizontal eingetragen; jedes Kästchen steht für ein Einzelspektrum, das über einen Kanal des Fluoreszenzdetektors (*channel*) aufgenommen wurde.

Bei Verwendung des EXPROG-Programms *mulel* führt die Summation der einzelnen Spektren eines Scans zu einem Datenfile mit der File-Endung *sum* (*sum-file*).¹⁶⁴ Die Anzahl der *sum-files* entspricht der Gesamtzahl an Scans. Alle *sum-files* werden danach zu einem

¹⁶²**CHAOS: Channel Analyzing and Omitting System**; System zur Kanal-Analyse und Eliminierung von (fehlerbehafteten) Daten aus dem Gesamtdatensatz. Die Namensgebung für dieses System erfolgte durch T. Meyer und B. Lippold.

¹⁶³B. Lippold, *Diplomarbeit*, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 2000.

¹⁶⁴Eine Kurzbeschreibung ausgewählter Programme des EXPROG-Programmpakets befindet sich in Abschnitt 6.6, S. 178.

		Datum: _____															
		Anmerkung: Fluoreszenz / Cu-K-Kante															
MESSUNG: Cytochrom-c-Oxidase aus T.t.		ORDNER: CuDU					BLATT: 1										
Scan	File	Channel													E-Kalibration		
		1 ⁴ c1	2 ⁵ e2	3 ⁶ e3	4 ⁷ e4	5 ⁸ e5	6 ⁹ e6	7 ¹⁰ e7	8 ¹¹ e8	9 ¹² e9	10 ¹³ ca	11 ¹⁴ cb	12 ¹⁵ cc	13 ¹⁶ cd	α	β	
1	e1	/		?				?			/						
2	e2	/											?				
3	e3	/					/						?				
4	e4																

Abbildung 3.5: An der EMBL-EXAFS-Beamline übliches Auswertungsdatenblatt.

einziges Spektrum gemittelt. Bei dieser Vorgehensweise kann nur kontrolliert werden, ob ein *sum-file* von den anderen abweicht oder nicht. Problemstellen, die nur in den Daten eines einzigen Channels auftreten, können hierdurch meist nicht erkannt werden, da diese nur 1/13 der gesamten Datenmenge eines *sum-files* ausmachen und somit nicht deutlich hervortreten.

Das Besondere des Systems CHAOS ist die Analyse der Spektren eines einzigen Channels. Auftretende charakteristische Problemstellen eines Detektorkanals können hierdurch in der Regel erkannt werden.

Bei der Auswertung nach dem System CHAOS wird wie folgt vorgegangen: Die einzelnen Spektren eines Channels werden gemittelt, so dass — für den Fall eines 13-Element-Detektors — insgesamt 13 gemittelte Datenfiles entstehen. Bei der Verwendung des EXPROG-Programms *average* erhalten diese Dateien die File-Endung *axt*.

In den *axt-files* ist das Signal/Rausch-Verhältnis gegenüber einem Einzelspektrum so weit verbessert, dass eine optische Bewertung der Daten eines Channels leicht möglich ist. Ein Co-Plot aller 13 *axt-files* vereinfacht das Auffinden von Fehlern zusätzlich.

Oft unterscheiden sich die einzelnen *axt-files* nur geringfügig, so dass sich auch an dieser Stelle noch keine definitive Aussage über Fehler (Ausreißer) treffen lässt. In diesem Fall werden ähnlich aussehende *axt-files* untereinander gemittelt. Sie dienen als Referenz

(*Ref1*) für den Vergleich mit den übrigen *axt-files*, da sie ein noch besseres Signal/Rausch-Verhältnis besitzen.

axt-files, die in guter Übereinstimmung mit der Referenz *Ref1* sind, können zur Bildung einer zweiten, noch verbesserten Referenz (*Ref2*) durch erneute Mittelung der *axt-files* hinzugenommen werden. Mit diesem Vorgehen können nach und nach die Daten jedes Channels durch Vergleich mit der gebildeten Referenz analysiert werden.

Schließlich entscheidet eine Bewertung des *axt-files* mit „gut“ oder „schlecht“ (fehlerbehaftet) über die Eliminierung von Daten dieses Channels. In Abbildung 3.6 ist an einem Beispiel gezeigt, wie aufschlussreich der Vergleich eines einzelnen *axt-files* mit einer Referenz ist. Ohne die dahintergelegte Referenz kann der problematische Bereich im Spektrum nicht erkannt oder vielleicht bestenfalls vermutet werden (Abbildung 3.6, oben).

Ein Co-Plot des einzelnen *axt-files* mit der Referenz (Abbildung 3.6, unten) ermöglicht die Entscheidung, ob in diesen Daten des einzelnen Detektorkanals Ausreißer vorhanden ist. Das Beispiel stammt aus der für diese Arbeit durchgeführten Datenanalyse der Cytochrom-c-Oxidase in reduzierter Form. Im Co-Plot sind die Ausreißer des gemittelten Spektrums von Detektorkanal 7 im Vergleich zur Referenz, die aus den Spektren von insgesamt neun Kanälen besteht, deutlich zu erkennen.

Die beschriebene Vorgehensweise für die Channel-Analyse ist auch auf die Untersuchung der gemittelten Spektren einzelner Scans (*sum-files*) übertragbar. Nach dem gleichen Schema werden bei der Scan-Analyse zuerst die einzelnen *sum-files* untereinander verglichen. Ähnlich aussehende *sum-files* können dann zu einer Referenz gemittelt werden, die mit einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis die Entscheidung ermöglicht, ob einzelne *sum-files* Ausreißer enthalten.

Wurden nach dieser Vorgehensweise ganze Scans eliminiert, so muss gegebenenfalls die Channel-Analyse erneut durchgeführt werden. Voraussetzung für diesen Schritt ist allerdings, dass die Eliminierung des gesamten Scans aufgrund von Einzelspektren dieses Scans erfolgen musste, die bei der Channelanalyse nicht eliminiert worden waren. Das Vorgehen ist dann mit einer Schachbrett-artigen Rasterauswertung vergleichbar.

Ein Beispiel für die Daten der ba_3 -Oxidase in vollständig reduzierter Form soll zeigen, welche Auswirkungen die Anpassung an eine offensichtlich fehlerbehaftete Feinstruktur haben kann.

Bei der Vorauswertung sind zwei unterschiedliche Feinstrukturen extrahiert worden. Die eine Feinstruktur (α) enthält nur die Daten der Messung, die nach einer Analyse mit dem System CHAOS für „gut“ befunden wurden. Die andere Feinstruktur (β) ist nach dem

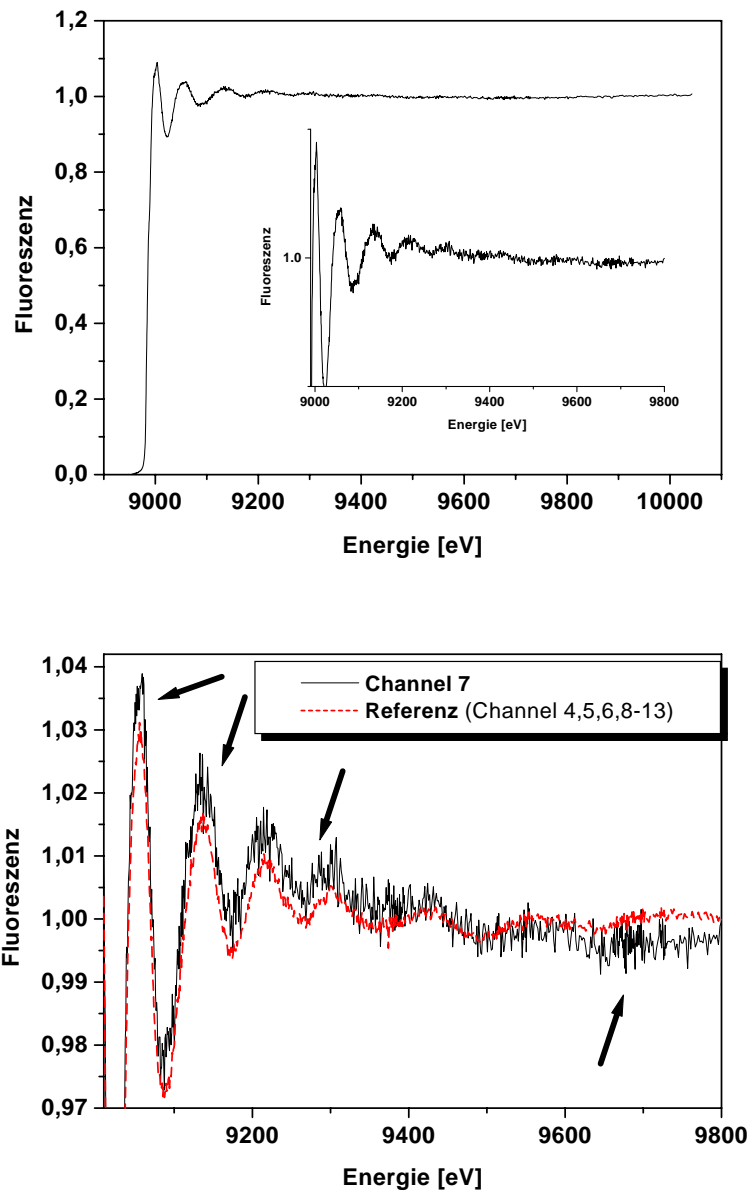


Abbildung 3.6: Oben: Gemitteltetes Spektrum aus den Einzelspektren des Detektorkanals 7 der Cu-K-Kanten-Messung der vollständig reduzierten ba_3 -Oxidase aus *T.t.*, unten: Co-Plot dieses Spektrums (—) mit der Referenz (···).

herkömmlichen System ausgewertet worden und enthält zusätzlich auch die Daten, die bei der einfachen Vorauswertung nicht als fehlerbehaftet erkannt wurden. Bei diesem Beispiel handelt es sich um die Daten der Detektorkanäle 2 und 7.

Die R-Faktoren der beiden Anpassungen unterscheiden sich nur geringfügig. Die Einzelparameter der Modelle weisen jedoch gravierende Unterschiede auf. Besonders sensibel auf die Ausreißer reagieren bei der Verfeinerung die Debye-Waller-Parameter, die bis zu einem gewissen Grad die Übereinstimmung des Modells mit dem Experiment verbessern können. Neben dem R-Faktor dienen sie häufig ebenfalls zur Bewertung der Güte einer Anpassung.

In diesem Beispiel beträgt der Debye-Waller-Parameter für die Kupferschale in der α -Anpassung $0,010 \text{ \AA}^2$, während dieser Parameter bei dem Modell für den β -Datensatz einen Wert von $0,022 \text{ \AA}^2$ hat. Der Debye-Waller-Parameter des Schwefels im Abstand von $2,39 \text{ \AA}$ hingegen ändert sich von $0,007 \text{ \AA}$ (α -Datensatz) auf $-0,004 \text{ \AA}$ (β -Datensatz). Das Modell für den β -Datensatz enthält hiernach Werte, die außerhalb eines realistischen Bereiches für Schalen bei diesen Abständen vom Absorber liegen. Artefakte in Datensätzen, die mit Hilfe der verfeinerten Datenanalyse erkannt werden können, wirken sich auf das Ergebnis deutlich aus. Daher ist es absolut notwendig, die gemessenen Daten nach dem verfeinerten System vorauszuwerten und die hiermit erkennbaren Fehler im Vorfeld zu eliminieren.

Ein weiteres Beispiel, bei dem die Vorteile der Anwendung des Systems CHAOS sehr deutlich werden, beschreibt B. LIPPOLD am Beispiel der Auswertung von [FeNi]-Hydrogenase-Daten aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F.¹⁶³ Die Notwendigkeit der verfeinerten Datenvorauswertung mit dem System CHAOS können auch für die hier untersuchten Daten bestätigt werden.

3.2.6 Datenextraktion

Nach der Datenreduktion erfolgt die Datenextraktion mit dem EXPROG-Programm *remove*. Sie besteht aus der Entfernung des Untergrunds, der Festlegung des Energiebereichs oberhalb der Kante sowie dem Extrahieren der EXAFS-Feinstruktur aus dem Röntgenabsorptionsspektrum (vgl. Abbildung 3.4, S. 36). Zuerst wird der Energiebereich oberhalb der Absorptionskante für die EXAFS-Feinstruktur festgelegt und anschließend eine polynomiale Spline-Funktion zur Entfernung des langwelligen Untergrunds angelegt.

Für einen EXAFS-Bereich von 1000 eV werden für die Spline-Funktion etwa drei bis fünf Knotenpunkte gewählt. Ist die Anzahl der Knotenpunkte zu groß, so besteht die Gefahr, dass langwellige Beiträge der eigentlichen Messdaten mit entfernt werden. Da die Fourier-Transformierte eine reziproke Darstellung des Spektrums im k -Raum ist, wirkt sich die

Subtraktion langwelliger Anteile zuerst auf die Beiträge bei geringem Abstand R vom Absorberatom aus. Deshalb kann die Höhe der Hauptpeaks der ersten Schale im Fourier-transformierten Spektrum bei der Festlegung der korrekten Anzahl an Knotenpunkten als Kriterium dienen. Sollte die Höhe der Peaks durch die Zahl der Knotenpunkte beeinflusst werden, muss deren Anzahl verringert werden.

Mit der Normalisierung der Absorptionskantenhöhe schließt die Datenvorauswertung ab. Der erhaltene EXAFS-Feinstruktur-Datenfile kann direkt zur Modellierung und Anpassung in ein entsprechendes Programm eingelesen werden.

3.2.7 Modellierung und Anpassung mit Cerius²

Die Auswertung aller EXAFS-Daten erfolgte hier mit dem EXAFS-Modul des Programmpakets Cerius² der Firma msi¹⁶⁵ unter dem Betriebssystem IRIX 6.5 (vgl. Abschnitt 6.3.7, S. 170). Das Schema in Abbildung 3.7 zeigt, in welcher Abfolge die Daten mit dem Programm Cerius² ausgewertet wurden.¹⁶⁶ Eine Beschreibung der verwendeten modifizierten Oberfläche dieses Programms enthält die Arbeit von J. GROPE.¹⁶⁶ Da EXCURVE und demgemäß auch Cerius² nur maximal 1000 Datenpunkte eines Spektrums einlesen können, kam das Programm DEPP¹⁵⁹ zur Verminderung der Anzahl von Datenpunkten zur Anwendung. Mit Hilfe des Programms DEPP konnten auch stark verrauschte Spektren dynamisch adaptiv geglättet werden.

Für die Daten der hier untersuchten ba₃-Oxidase wurde die Phasenberechnung nach VON BARTH/HEDIN-LUNDQVIST^{167,168} für jede Absorptionskante einmal durchgeführt und für die Auswertung aller Daten genutzt. Für die unterschiedlichen Modellsysteme und die Hydrogenase mussten jeweils eigene VON BARTH/HEDIN-LUNDQVIST-Phasen nach der speziellen Umgebung des Absorberatoms generiert werden.

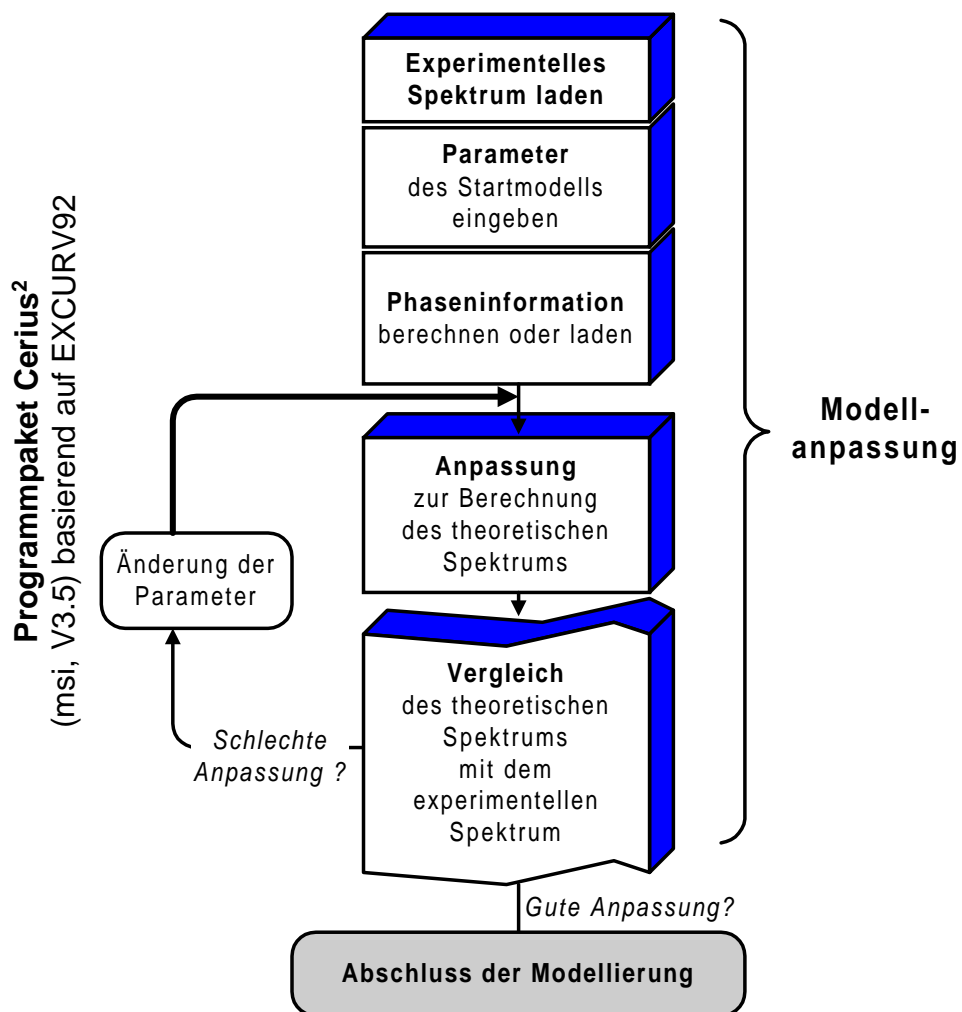
Die Anpassung erfolgte an Fourier-gefilterten Daten. Die experimentellen Daten sind hierzu — sofern in den einzelnen Abschnitten zur Auswertung nicht anders angegeben — im Bereich von 1,0 Å bis 5,0 Å ohne Phasenkorrektur jeweils mit 500 Punkten rücktransformiert worden. Zum Abschluss wurde das erhaltene Modell zur Verifizierung an die gemessenen Originaldaten angelegt und eine letzte Anpassung durchgeführt.

¹⁶⁵Cerius², Version 3.5, Molecular Simulations Inc. (msi), <http://www.msi.com/>. Seit Juni 2001 lautet der Firmenname Accelrys.

¹⁶⁶Vorlage für Abbildung 3.7 aus der Programmanleitung für Cerius².

¹⁶⁷U. von Barth, L. Hedin, *J. Phys.* **1972**, *C 5*, 1629 - 1642.

¹⁶⁸L. Hedin, S. Lundqvist in *Solid State Physics, Vol. 23* (Hrsg.: F. Seitz, D. Turnbull, H. Ehrenreich), Academic Press, New York, **1969**.

Abbildung 3.7: Auswertung von EXAFS-Daten mit Cerius².

Bei allen Verfeinerungsschritten war — im Gegensatz zum Amplitudenreduktionsfaktor AFAC mit dem voreingestellten Wert von 0,8 — die Fermi-Energie E_F immer freigegeben.¹⁶⁹ Die Güte einer Anpassung wird durch den Residualwert (R-Faktor; vgl. Abschnitt 6.3.6.2, S. 169) in Prozent gegeben.

¹⁶⁹Die Fermi-Energie ist ein „Korrekturterm“ für die Kantenlage; ihr Wert sollte nicht grösser als ± 10 eV sein.

3.3 Molmassenbestimmung

3.3.1 Allgemein

Die Molmassen der beiden in dieser Arbeit untersuchten binuklearen Kupferkomplexe $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSTip*, Abschnitt 4.2.3, S. 101) und $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*, Abschnitt 4.2.4, S. 118) wurden mit der dampfdruck-osmometrischen Methode bestimmt.¹⁷⁰ Für die Untersuchung sind beide Komplexe in Toluol gelöst worden. Die gesamte Untersuchung erfolgte in einer BRAUN-Inertgas-Box mit Stickstoff als Inertgas,¹⁷¹ um die luftempfindlichen Substanzen zu schützen.

3.3.2 Messung und Auswertung

Die Messzelle des Dampfdruckosmometers war während der gesamten Untersuchungsreihe konstant auf 50 °C temperiert. Als Standard für die Untersuchung diente Benzil gelöst in Toluol.¹⁷² Zwei Lösungen unterschiedlicher Konzentration (15,6 mmol/l und 27,4 mmol/l) sind von dem Komplex *CuSTip* gemessen worden. Von dem Komplex *CuSi* wurde nur eine Lösung mit einer Konzentration von 22,4 mmol/l untersucht, ein zweiter Ansatz gleicher Konzentration sollte die Messergebnisse verifizieren. Für jeden Messpunkt sind jeweils zehn Messwerte aufgenommen und anschließend gemittelt worden.

In Abbildung 3.8 ist die Auftragung des Messeffektes in Skalenanteilen (Dampfdruckeinheiten) gegen die Konzentration dargestellt. Die beiden Messpunkte des Komplexes *CuSi* liegen aufeinander und annähernd auf der Geraden, die durch den Standard definiert wird.

Die beiden Messwerte für die Lösungen von *CuSTip* in Toluol liegen hingegen geringfügig unterhalb der Standardgeraden (Abbildung 3.8). Die Abweichung ist bei beiden untersuchten Proben annähernd gleich und liegt im Bereich von 5 %. Damit ist die Abweichung von der Standardgeraden zwar eindeutig, das Ergebnis weicht aber nur gering vom Erwartungswert ab und beeinflusst nicht die Eindeutigkeit der Untersuchung.

Aus den Messergebnissen lässt sich schließen, dass sich durch die Lösung der beiden Verbindungen *CuSTip* und *CuSi* in Toluol ihr Molekulargewicht nicht ändert. Beide Komplexe liegen also auch im gelösten Zustand in Toluol als monomere Einheiten vor.

¹⁷⁰T. Meyer, J. Hanss, J. Schneider, G. Henkel, unveröffentlichte Ergebnisse.

¹⁷¹ $[\text{O}_2] < 2 \text{ ppm}$, $[\text{H}_2\text{O}] < 0,1 \text{ ppm}$.

¹⁷²Lösungen verschiedener Konzentration des Standards wurden mit dem Dampfdruckosmometer gemessen. Die Auftragung des Messeffektes gegen die Konzentration ergibt eine sogenannte „Eichkurve“.

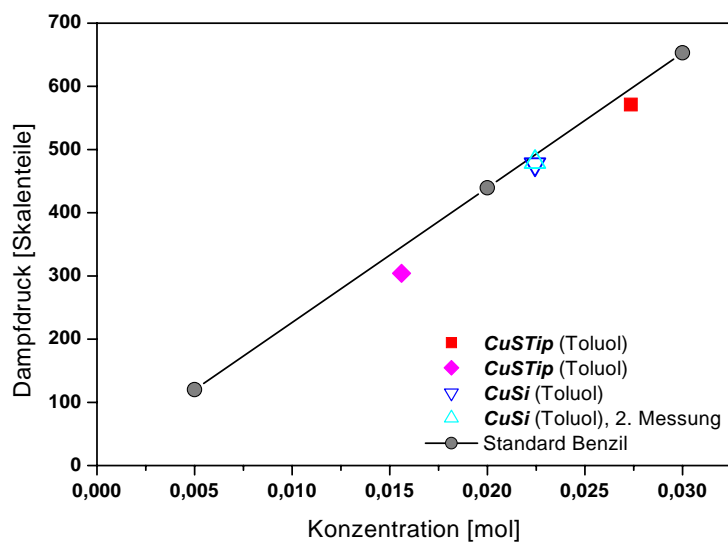


Abbildung 3.8: Dampfdruck-osmometrische Molmassenbestimmung — Messergebnisse für die Komplexe $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSTip*) und $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*) gelöst in Toluol.

Kapitel 4

Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

4.1 EXAFS von Cytochrom-c-Oxidase

4.1.1 Allgemeines

Im Rahmen dieser Arbeit sind neben der nativen ba₃-Oxidase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* in kristalliner Form auch verschiedene Präparationen der gleichen Oxidase an der Cu-K-Kante und an der Fe-K-Kante mit Synchrotronstrahlung untersucht worden.

Tabelle 4.1 (S. 48) enthält eine Aufstellung der untersuchten Proben u. a. mit der Konzentration der Lösungen und der Anzahl der Punkte im Spektrum. Da alle Enzym-Proben der ba₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* kein Zink enthalten und unter zinkfreien Bedingungen nach Standardmethoden^{67,173} präpariert wurden, ist der Messbereich an der Cu-K-Kante (wie auch an der Fe-K-Kante) nicht eingeschränkt.

Aus den publizierten Ergebnissen ist die Umgebung der Absorberatome bei den Cytochrom-c-Oxidase im Wesentlichen bekannt. Anhand dieser Daten konnte ein Grundmodell aufgebaut werden, bei dem die Besetzungszahlen der Schalen fest vorgegeben waren. Für die Debye-Waller-Parameter wurden plausible Startwerte zur Verfeinerung eingesetzt.

Für alle Anpassungen von Cytochrom-c-Oxidase-Daten einer Absorptionskante wurde stets das gleiche Startmodell verwendet. Hierbei erfolgte zunächst eine Anpassung der Beiträge in der direkten Umgebung der Absorberatome ohne Mehrfachstreuwege (*multiple-*

¹⁷³T. Soulimane, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 227, 588 - 595.

Tabelle 4.1: Untersuchte Proben der ba₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus*.

Probe ^{c)}	Absorptionskante	Anzahl der Scans	Verwendete Kanäle	Energiebereich [eV]	Punkte pro Spektrum	Punkte (nach DEPP ^{b)})
nativ	kristallin	19	4, 5, 7 - 13	25 - 1000	952	402
	kristallin	43	2, 4 - 9, 11, 13	20 - 980	1000	442
nativ, cyanidinhibiert	gelöst	25	3, 4, 6, 7, 9, 10	25 - 1000	1030	434
	gelöst	44	2 - 10, 12, 13	15 - 1100	1044	474
nativ, azidinhibiert	gelöst	30	4 - 7, 9, 10	15 - 1000	1027	357
	gelöst	49	2 - 10, 12, 13	15 - 1100	1049	512
reduziert	gelöst	21	4 - 6, 8 - 13	25 - 1000	954	397
	gelöst	65	2, 4 - 9, 11, 13	20 - 1000	1163	411
reduziert, cyanidinhibiert	gelöst	15	4 - 13	25 - 1000	950	337
	gelöst	58	2, 4 - 9, 11, 13	20 - 1000	1155	404
reduziert, azidinhibiert	gelöst	11	2, 4 - 13	25 - 975	943	314
	gelöst	50	5 - 9, 11 - 13	20 - 980	1008	328

^{a)} Die Konzentration der gelösten Proben beträgt ~ 4 mmol/l.

^{b)} DEPP: Data Enhancement Program Package; J. Crippen, Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 1999.

scattering, vgl. Abschnitt 6.3.3, S. 159). Erst danach wurde das Modell u. a. mit den Imidazol- bzw. Porphyrineinheiten vervollständigt und unter Berücksichtigung von *multiple-scattering* (MS) angepasst.

Die Geometrie der Imidazoleinheiten wurde aus den Röntgenstrukturdaten von Übergangsmetall-Imidazol-Komplexen der Cambridge Structural Database¹⁷⁴ (CSD) erhalten und ergibt sich aus der Mittelung der aus der CSD-Recherche erhaltenen Werte (Tabelle 4.2). Für den Aufbau der Imidazoleinheit wurde angenommen, dass der Imidazolring planar aufgebaut ist. Abbildung 4.1 zeigt schematisch die Imidazoleinheit mit der Nummerierung der Schalen gemäß Tabelle 4.2.

Die Winkel Θ und Φ in Tabelle 4.2 beschreiben die Polarkoordinaten eines Rückstreuers. Der Ausgangswert für Θ von 90° steht für ein Atom in der x-y-Ebene, während durch den Winkel Φ das Atom in der x-z-Ebene festgelegt wird. Φ ist definiert als der Winkel, der von dem Rückstreuer 1, dem Absorberatom M und dem Rückstreuer 2 eingeschlossen wird (vgl. Abbildung 4.1). Die weiteren Bezeichnungen in Tabelle 4.2 und allen in dieser Arbeit folgenden Auflistungen von Modellen sind mit ihren Bedeutungen im Anhang 6.1 (S. 149) dargestellt.

Tabelle 4.2: Imidazoleinheit — Aufbau aus dem Ergebnis der CSD-Recherche (Nummerierung der Schalen wie in Abbildung 4.1).

<i>Typ</i>	<i>Schale</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	Θ [°]	Φ [°]
N	1	5/3	1,983	90	0
C	2	5/3	2,965	90	21,06
C	3	5/3	3,031	90	338,90
N	4	5/3	4,116	90	10,03
C	5	5/3	4,159	90	350,88

Analog wurde eine Porphyrineinheit definiert. Zur Verringerung der Anzahl der Parameter bei der Modellierung gilt die Annahme, dass der Porphyrinring aus vier gleichen, planaren Einheiten um das Zentralatom in C₄-Symmetrie angeordnet ist. Für die Cytochrom-c-Oxidase mit zwei Häm-Porphyrinsystemen ergibt sich eine Besetzungszahl *N* von 8/2 (acht Viertelheiten pro zwei Absorberatome). Tabelle 4.3 und Abbildung 4.2 geben das Ergebnis der CSD-Recherche für die Porphyrineinheit wieder.

Das Grundmodell für die Anpassung eines Cu-K-Kanten-Spektrums der ba₃-Oxidase besteht aus zwei Kupfer- und vier Cystein-Schwefelbeiträgen des Cu_A-Zentrums, einem Eisen-

¹⁷⁴CSD: Cambridge Structural Database System, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, United Kingdom, Database V5.20, October 2000 Release, <http://www.ccdc.cam.ac.uk/>.

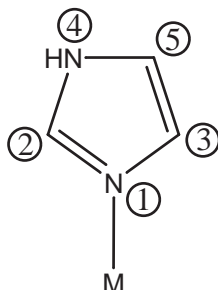


Abbildung 4.1: Imidazoleinheit — Schematische Darstellung einer Einheit (Nummerierung wie in Tabelle 4.2).

Tabelle 4.3: Porphyrineinheit — Aufbau aus dem Ergebnis der CSD-Recherche (Nummerierung der Schalen wie in Abbildung 4.2).

<i>Typ</i>	Schale	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	Θ [°]	Φ [°]
N	1	8/2	2,027	90	0
C	2	8/2	3,024	90	21,20
C	3	8/2	3,057	90	338,81
C	4	8/2	3,436	90	315,18
C	5	8/2	4,246	90	9,88
C	6	8/2	4,275	90	350,16

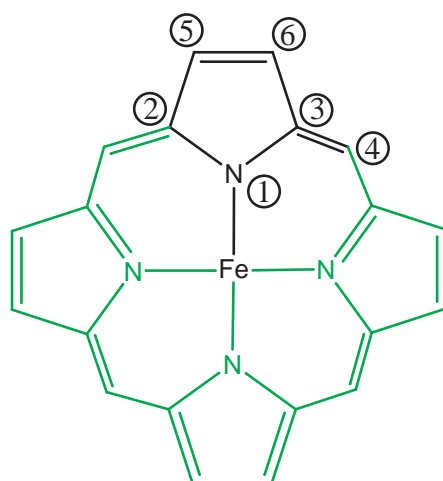


Abbildung 4.2: Porphyrineinheit — Schematische Darstellung einer Einheit (Nummerierung wie in Tabelle 4.3).

beitrag im Abstandsbereich von $\sim 4 \text{ \AA}$ sowie insgesamt fünf Imidazoleinheiten (für Cu_A - und Cu_B -Zentrum zusammen). Die Besetzungszahlen N beziehen sich auf drei Absorberatome Kupfer (Tabelle 4.4).

Die Vervollständigung des Modells durch eine am gemischtvalenten Zentrum gebundene Sauerstoff- oder Inhibitoreinheit erfolgte erst nach der Voranpassung des Startmodells. Die Verbesserung des R-Faktors (Signifikanztest¹⁷⁵) war ausschlaggebend für die Erweiterung des Startmodells um diese zusätzlichen Schalen.

Für die Anpassung eines Fe-K-Kanten-Spektrums der ba_3 -Oxidase wurde ebenfalls von einem Grundmodell ausgegangen. Es besteht, neben zwei Porphyrineinheiten für das Fe_b - und das Fe_{a_3} -Zentrum, aus insgesamt drei Imidazoleinheiten (zwei für das Fe_b -, eine für das Fe_{a_3} -Zentrum) und einer Kupferschale für das Kupferatom des Cu_B -Zentrums im Abstandsbereich von $\sim 4 \text{ \AA}$. Die Besetzungszahlen N beziehen sich insgesamt auf zwei Absorberatome Eisen (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.4: Grundmodell für die ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kante.

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,983	0,003	90	0
C	5/3	2,965	0,007	90	21,06
C	5/3	3,031	0,007	90	338,90
N	5/3	4,116	0,050	90	10,03
C	5/3	4,159	0,050	90	350,88
S	4/3	2,294	0,007	—	—
Cu	2/3	2,423	0,007	—	—
Fe	1/3	3,948	0,005	—	—

Der prinzipielle Aufbau der Einheiten für die gebundenen Moleküle Sauerstoff, Cyanid und Azid wurde ebenfalls aus dem Ergebnis von CSD-Recherchen abgeleitet. Diese Einheiten werden zwischen den beiden Metallatomen des heterobinuklearen Zentrums der Cytochrom-c-Oxidase gebunden sein. Für das Cyanid ergeben sich damit in einer *end-on*-Anbindung zwei Möglichkeiten. Aus chemischer Sicht ist eine Koordination der Art Fe-C-N-Cu gegenüber Fe-N-C-Cu wahrscheinlicher, da Eisen bevorzugt eine Bindung zum Kohlenstoff des Cyanids ausbildet, die stabiler ist als eine Bindung zur härteren Lewis-Base Stickstoff.^{176,177}

¹⁷⁵Von Signifikanz wird bei der EXAFS-Datenanalyse gesprochen, wenn sich durch Einführung einer zusätzlichen Schale eine Verringerung des R-Faktors von mehr als 10 % zeigt.

¹⁷⁶A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 33. Ed., de Gruyter, Berlin, 1985, S. 1143 f.

¹⁷⁷C. E. Mortimer, *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*, 5. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1987, S. 269 f.

Tabelle 4.5: Grundmodell für die ba₃-Oxidase — Fe-K-Kante.

Typ	N	R [Å]	A [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	2,027	0,003	90	0
C	8/2	3,024	0,005	90	21,20
C	8/2	3,057	0,005	90	338,81
C	8/2	3,436	0,010	90	315,18
C	8/2	4,246	0,020	90	9,88
C	8/2	4,275	0,020	90	350,16
N	3/2	1,983	0,003	90	0
C	3/2	2,965	0,007	90	21,06
C	3/2	3,031	0,007	90	338,90
N	3/2	4,116	0,020	90	10,03
C	3/2	4,159	0,020	90	350,88
Cu	1/2	4,053	0,005	—	—

Angepasst wurden die Abstände R und die Debye-Waller-Parameter A sowie die Winkel Φ der einzelnen MS-Einheiten. Die MS-Einheiten sind hierbei zunächst als festgehaltene, starre Einheiten (*rigid units*) angesehen worden. Erst nach Anpassung aller anderen Schalen wurde diese Restriktion aufgehoben und die Abstände, Winkel sowie die Debye-Waller-Parameter der Einheiten frei verfeinert.

Die Debye-Waller-Parameter ähnlicher Rückstreuer — in etwa gleichem Abstand R vom Absorberatom — konnten nur gemeinsam verfeinert werden (*constrained refinement*).¹⁷⁸ Für die Imidazoleinheiten wurden somit die Schalen 2 und 3 sowie 4 und 5 gemeinsam verfeinert (Tabelle 4.2, S. 49), während für die Porphyrineinheiten die Schalen 2 und 3 sowie 5 und 6 aufgrund der hohen Korrelation gekoppelt werden mussten (Tabelle 4.3, S. 50).

Die einzelnen Ergebnisse der jeweiligen Anpassungen sind am Besten in direkter Gegenüberstellung zu diskutieren. Deshalb werden die wichtigsten spektroskopischen Ergebnisse im Abschnitt 4.1.8 (ab S. 84) gemeinsam dargestellt.

¹⁷⁸S. J. Gurman, *J. Synchrotron Rad.* **1995**, 2, 56 - 63.

4.1.2 Die native ba₃-Oxidase in kristalliner Form

4.1.2.1 Allgemein

Die Kristalle der ba₃-Oxidase sind bei 20 K sowohl an der Cu- als auch an der Fe-K-Kante gemessen worden. Abbildung 4.3 zeigt das Aussehen eines Kristalls der ba₃-Oxidase.

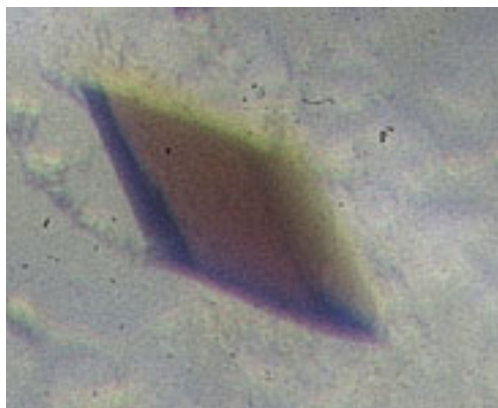


Abbildung 4.3: Ein Kristall der ba₃-Oxidase.

4.1.2.2 Kupfer-K-Kante

Das Cu-K-Kanten-Spektrum der nativen ba₃-Oxidase in kristalliner Form wurde aus 19 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 4, 5 und 7 – 13 (\sum 9). Die extrahierte Feinstruktur umfasst den Energiebereich von 25 – 1000 eV oberhalb der Absorptionskante und besteht aus 952 Datenpunkten. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die experimentelle k³-gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

Im Vergleich zum Cu-K-Kanten-Spektrum der nativen ba₃-Oxidase in gelöster Form¹⁷⁹ (Abbildung 4.5) sind die Peaks der Fourier-Transformierten der kristallinen Form geringfügig schmaler. Ein Unterschied zwischen den Feinstrukturen in der Lage der Nulldurchgänge und Amplituden ist nicht erkennbar.

Der Cu–Cu-Abstand verfeinert stabil auf einen Wert von 2,427 Å und unterscheidet sich damit von dem Ergebnis der gelösten Form nur unwesentlich (0,004 Å). Die Differenz bei den Cystein-Schwefelbeiträgen und dem Eisenbeitrag ist ebenfalls gering. Ein Test auf die Signifikanz des Eisen-Rückstreubeitrags zeigt, dass ohne diesen die Anpassung — sowohl im R-Faktor als auch visuell — signifikant schlechter wird. In Tabelle 4.6 sind

¹⁷⁹J. Groppe, *Dissertation*, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 1999.

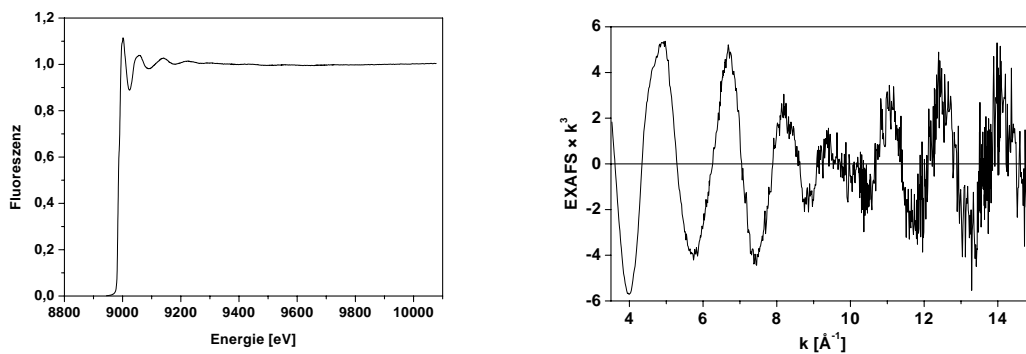


Abbildung 4.4: Native ba₃-Oxidase (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

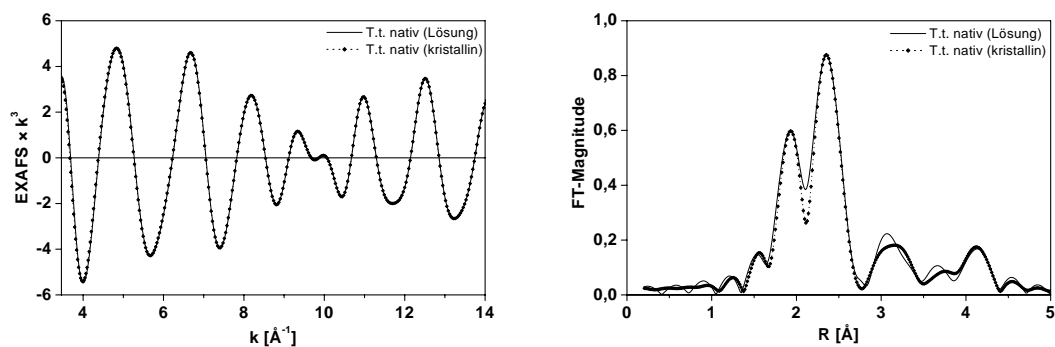


Abbildung 4.5: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der nativen ba₃-Oxidase in kristalliner ($\cdot \cdot \cdot$) und gelöster ($—$) Form.

die EXAFS-Ergebnisse der Cu-K-Kante für die kristalline Form der ba₃-Oxidase enthalten.^{180,181} Abbildung 4.6 zeigt die Fourier-gefilterte, k³-gewichtete Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung.

Tabelle 4.6: Native ba₃-Oxidase (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,29 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,955	0,003	90	0
C	5/3	2,913	0,007	89,97	22,03
C	5/3	3,030	0,007	89,96	339,53
N	5/3	4,075	0,060	90	11,18
C	5/3	4,142	0,060	90	351,84
S	4/3	2,284	0,008	—	—
S_{Met}	1/3	2,322	0,008	—	—
O_{Glu}	1/3	2,720	0,007	—	—
Cu	2/3	2,427	0,012	—	—
Fe	1/3	3,952	0,002	—	—
O	1/3	2,023	0,003	90	0
O	1/3	2,704	0,007	90	29,85

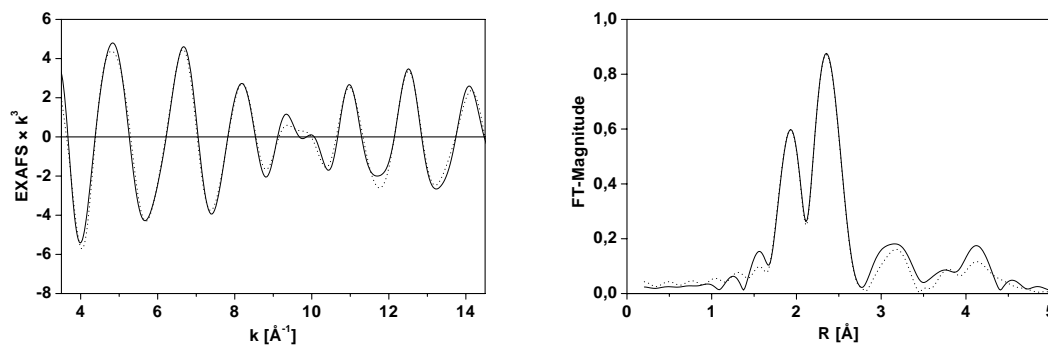


Abbildung 4.6: Native ba₃-Oxidase (kristallin) — Fourier-gefilterte, k³-gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).

Analog zur Auswertung der gelösten Form der Oxidase wurden in das Modell für die kristalline Form zwei weitere Leichtstreuerschalen als dritte MS-Einheit eingeführt. Die Güte

¹⁸⁰T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *HASYLAB Users Meeting*, Posterbeitrag, Hamburg, **2001**.

¹⁸¹T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke und G. Henkel, *Joint Meeting of French and German Biophysicists*, Book of Abstracts, Hünfeld/Fulda, **2001**, 55.

der Anpassung verbesserte sich hierdurch signifikant. Diese dritte MS-Einheit repräsentiert das gebundene Substrat bestehend aus zwei Sauerstoffatomen (O_2 -Einheit). Sie ist der O_2 -Einheit in der Anpassung der gelösten Form in Abstand und Winkel sehr ähnlich. Der Abstand zwischen beiden Sauerstoffrückstreuern dieser Einheit beträgt $\sim 1,38 \text{ \AA}$. Er ist damit um $\sim 0,18 \text{ \AA}$ länger als der Abstand der Sauerstoffatome in einem Sauerstoffmolekül¹⁸² Die weitere Diskussion erfolgt gemeinsam mit den weiteren Ergebnissen in Abschnitt 4.1.8.4.2 (S. 92).

Der R-Faktor konnte durch das Einführen eines weiteren Leichtstreuers bei einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $2,72 \text{ \AA}$ und eines weiteren Schwefelbeitrags im Abstandsbereich von rund $2,32 \text{ \AA}$ noch weiter verbessert werden. Die beiden Besetzungszahlen betragen jeweils $1/3$. Bei diesen zusätzlichen Rückstreuatomen könnte es sich um das Sauerstoffatom des Glutamats und das Schwefelatom des Methionins handeln, deren Existenz bereits in verschiedenen Röntgenstrukturen nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 1.2.6, S. 17).

4.1.2.3 Eisen-K-Kante

Das Fe-K-Kanten-Spektrum der nativen ba_3 -Oxidase in kristalliner Form wurde aus 43 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2, 4 – 9, 11 und 13 ($\sum 9$). Die extrahierete Feinstruktur umfasst den Energiebereich von 20 – 980 eV oberhalb der Absorptionskante und besteht aus 1000 Datenpunkten. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

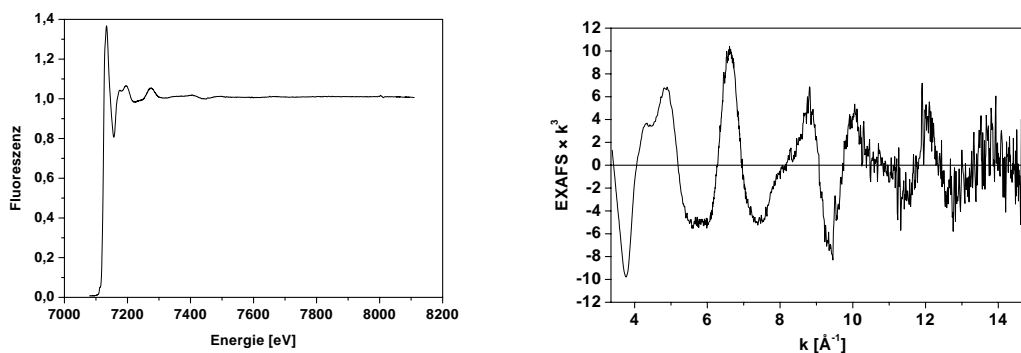


Abbildung 4.7: Native ba_3 -Oxidase (kristallin) — Fe-K-Kanten-Spektrum und k^3 -gewichtete Feinstruktur.

¹⁸²A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 33. Ed., de Gruyter, Berlin, 1985, S. 451.

Auch hier zeigt ein Vergleich des Spektrums mit dem der gelösten Form, dass die Peaks der Fourier-Transformierten für die kristalline Form geringfügig schmaler sind (Abbildung 4.8). Die Unterschiede beruhen in diesem Fall auf der unterschiedlichen Datenqualität und einer geringfügig verschiedenen Datenextraktion.

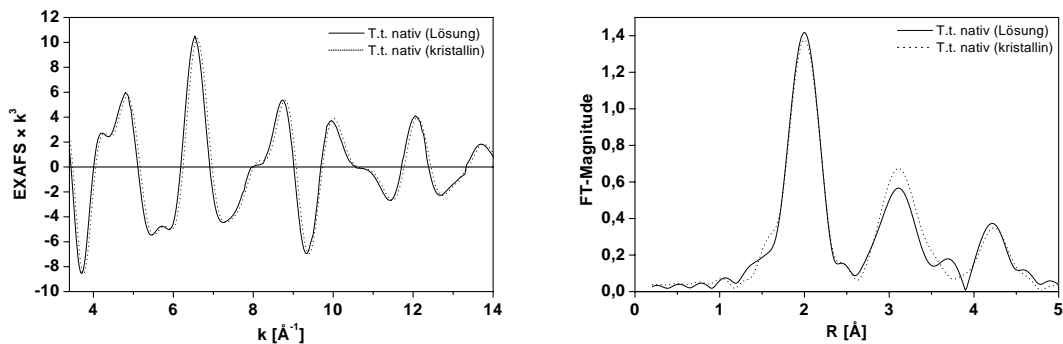


Abbildung 4.8: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der nativen ba_3 -Oxidase in kristalliner (\cdots) und gelöster (—) Form.

Abbildung 4.9 zeigt die k^3 -gewichtete Feinstruktur mit der zugehörigen Fourier-Transformierten zusammen mit der besten Anpassung. In Tabelle 4.7 sind die EXAFS-

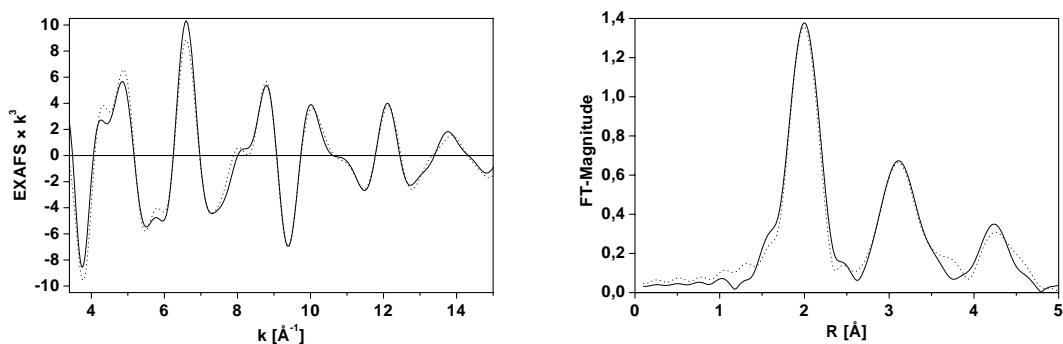


Abbildung 4.9: Native ba_3 -Oxidase (kristallin) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Ergebnisse der Fe-K-Kante für die kristalline Form der ba_3 -Oxidase dargestellt.^{180,181}

Tabelle 4.7: Native ba₃-Oxidase (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 18,35 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	1,994	0,004	90	0
C	8/2	3,038	0,005	90	21,16
C	8/2	3,027	0,005	90	338,68
C	8/2	3,394	0,009	90	314,49
C	8/2	4,256	0,022	90	8,99
C	8/2	4,251	0,022	90	350,53
N	3/2	2,057	0,004	90	0
C	3/2	3,167	0,005	90	16,19
C	3/2	2,936	0,005	90	335,08
N	3/2	4,248	0,022	90	3,95
C	3/2	4,143	0,022	90	345,08
Cu	1/2	4,050	0,005	—	—
O	1/2	1,874	0,004	90	0
O	1/2	2,868	0,005	90	18,90

Der Fe–Cu-Abstand beträgt 4,05 Å. Er ist damit etwa 0,1 Å länger als der Cu–Fe-Beitrag in der EXAFS-Struktur für die Daten der Cu-K-Kante. Der Abstand wird durch die Ergebnisse der gelösten Form bestätigt.

Wie in der Anpassung für die Cu-K-Kanten-Daten verbessert sich die Güte der Anpassung durch die Einführung einer O₂-Einheit in das Modell signifikant. Der Abstand zwischen den beiden Sauerstoffatomen dieser Einheit beträgt $\sim 1,25$ Å. Er unterscheidet sich damit vom O–O-Abstand der O₂-Einheit des Ergebnisses für die Cu-K-Kante um $\sim 0,13$ Å und ist damit um $\sim 0,04$ Å länger als der Abstand in einem Sauerstoffmolekül.¹⁸² Die weitere Diskussion erfolgt gemeinsam mit den weiteren Ergebnissen in Abschnitt 4.1.8.4.2 (S. 92).

4.1.3 Die native, cyanidinhivierte ba₃-Oxidase

4.1.3.1 Inhibierte und nicht-inhibierte Form der nativen ba₃-Oxidase im Vergleich

Die cyanidinhivierte Form der nativen ba₃-Oxidase ist bei 20 K sowohl an der Cu- als auch an der Fe-K-Kante gemessen worden. Die Lösung wurde, wie oben beschrieben, mit dem Inhibitor Cyanid umgesetzt. Ein Vergleich der EXAFS-Spektren des nativen und des nativen, cyanidinhivierten Enzyms lässt einen Unterschied zwischen den beiden Proben

deutlich erkennen (Abbildung 4.10). Das Enzym hat mit dem Inhibitor Cyanid reagiert.¹⁸³

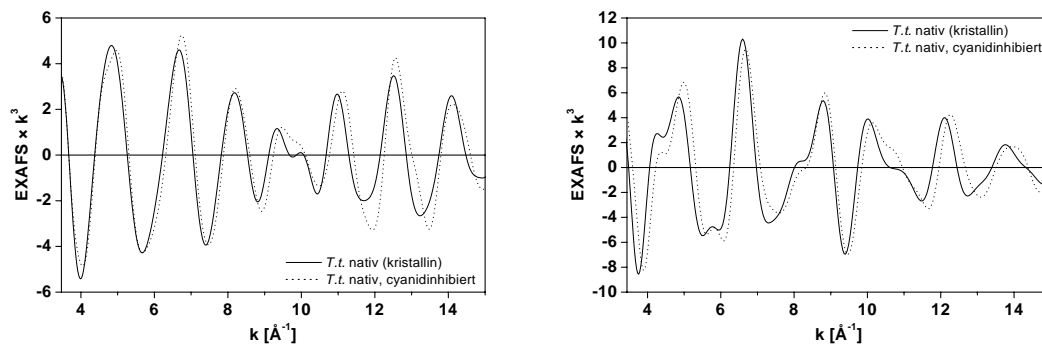


Abbildung 4.10: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der nativen (kristallin, —) und nativen, cyanidinhibierten (\cdots) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.

4.1.3.2 Kupfer-K-Kante

Das Cu-K-Kanten-Spektrum der nativen, cyanidinhibierten ba_3 -Oxidase wurde aus 25 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 3, 4, 6, 7, 9 und 10 ($\sum 6$). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1030 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 25 - 1000 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

Abbildung 4.12 zeigt die k^3 -gewichtete Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung. In Tabelle 4.8 sind die EXAFS-Ergebnisse der Cu-K-Kante für die cyanidinhibierte Form der nativen ba_3 -Oxidase dargestellt.

Sowohl der Cu–Cu-Abstand als auch der Cu–Fe-Abstand sind den entsprechenden Metall–Metall-Abständen der kristallinen Probe sehr ähnlich. Auch die Parameter für die Imidazoleinheit ändern sind kaum gegenüber denen für die nicht-inhibierte Form.

Der Abstand des Cystein-Schwefelatoms vom Absorberatom ist allerdings bei der cyanidinhibierten Form um 0,02 Å kürzer als bei der nicht-inhibierten Oxidase. Die Abweichung

¹⁸³T. Meyer, J. Groppe, J. Schneider, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *Jahresbericht HASYLAB, Annual Report II, Hamburg, 1998*, 67 - 68.

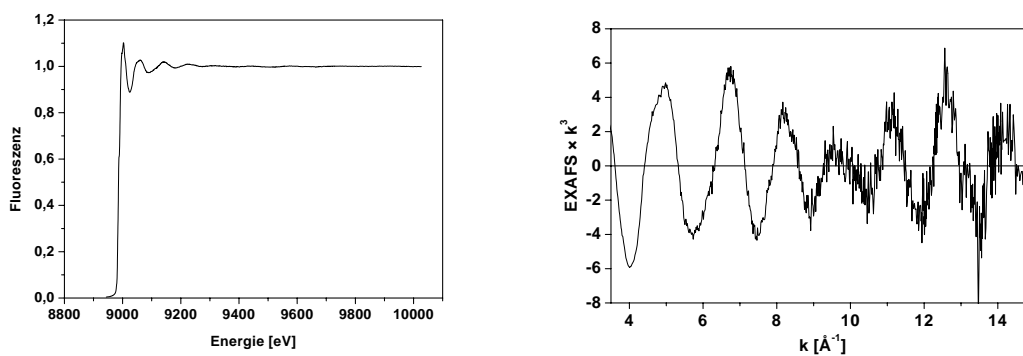


Abbildung 4.11: Native, cyanidinhibierte ba₃-Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k³-gewichtete Feinstruktur (rechts).

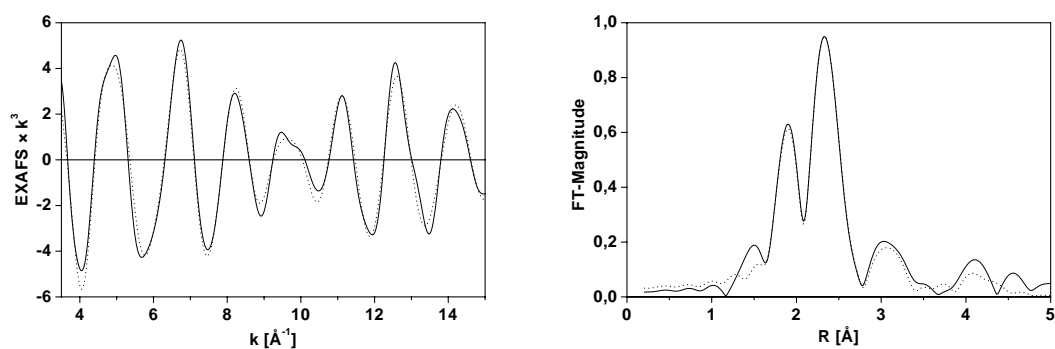


Abbildung 4.12: Native, cyanidinhibierte ba₃-Oxidase — Fourier-gefilterte, k³-gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).

Tabelle 4.8: Native, cyanidinhibierte ba₃-Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 15,89 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,944	0,004	90	0
C	5/3	2,906	0,008	90	21,72
C	5/3	3,000	0,007	90	339,13
N	5/3	4,064	0,060	90	10,90
C	5/3	4,134	0,060	90	351,49
S	4/3	2,260	0,006	—	—
S_{Met}	1/3	2,368	0,004	—	—
O_{Glu}	1/3	2,698	0,004	—	—
Cu	2/3	2,413	0,008	—	—
Fe	1/3	3,929	0,008	—	—
N	1/3	1,974	0,006	90	0
C	1/3	2,873	0,005	89,83	23,20

ist äußerst gering, wird aber – wie im folgenden Abschnitt beschrieben – auch für die azidinhibierte Form erhalten.

Die CN-Einheit verfeinert stabil auf die Abstände vom Absorberatom Kupfer von 1,97 Å und 2,87 Å und einen Winkel Φ von 23,2°. Der Abstand zwischen dem Stickstoff- und dem Kohlenstoffatom der CN-Einheit beträgt rund 1,31 Å. Er ist damit um ~ 0,15 Å länger als die Bindungslänge in einem freien Cyanidion.¹⁸⁴

4.1.3.3 Eisen-K-Kante

Das Fe-K-Kanten-Spektrum der nativen, cyanidinhibierten ba₃-Oxidase wurde aus 44 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2 – 10, 12 und 13 (Σ 11). Die extrahierte Feinstruktur umfasst den Energiebereich von 15 – 1100 eV oberhalb der Absorptionskante und besteht aus 1044 Datenpunkten. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k³-gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.13 dargestellt.¹⁸⁵

Abbildung 4.14 zeigt die k³-gewichtete Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung. In Tabelle 4.9 sind die EXAFS-Ergebnisse der Fe-K-Kante für die cyanidinhibierte Form der nativen ba₃-Oxidase enthalten.

¹⁸⁴N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie der Elemente*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1990**, S. 375.

¹⁸⁵T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *Jahresbericht HASYLAB*, Annual Report II, Hamburg, **1999**, 445 - 446.

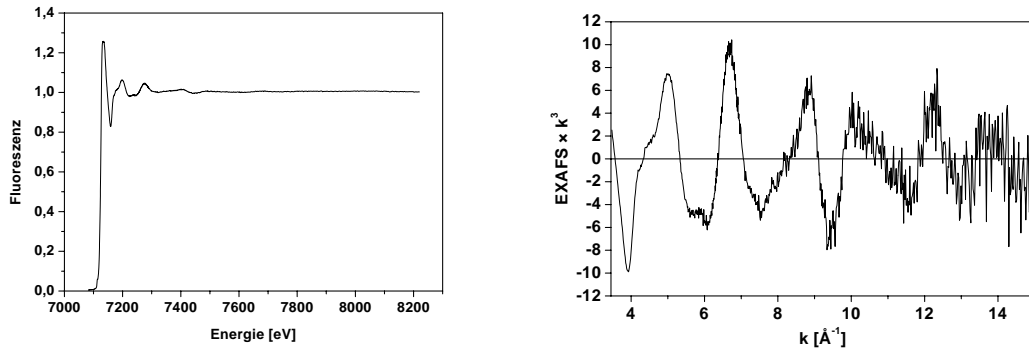


Abbildung 4.13: Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

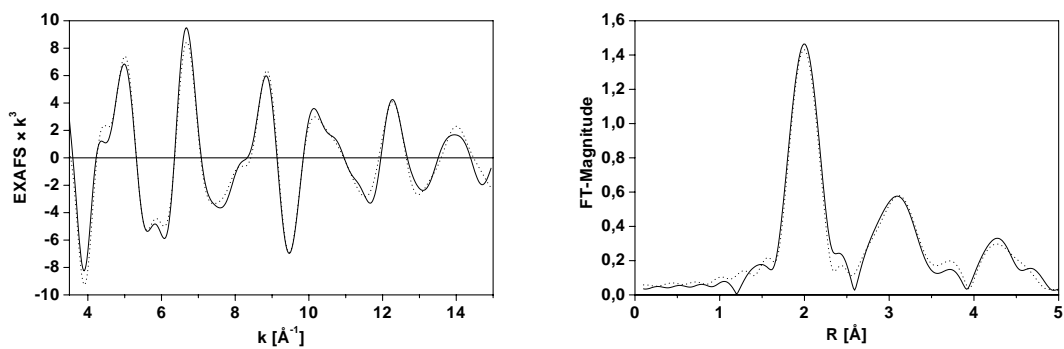


Abbildung 4.14: Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Tabelle 4.9: Native, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS ($R = 17,37\%$).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	1,970	0,004	90	0
C	8/2	3,018	0,009	90	21,67
C	8/2	3,017	0,009	90	338,87
C	8/2	3,400	0,009	90	314,75
C	8/2	4,228	0,023	90	9,54
C	8/2	4,233	0,023	90	350,97
N	3/2	2,039	0,004	90	0
C	3/2	3,118	0,009	90	17,39
C	3/2	2,960	0,009	90	334,98
N	3/2	4,219	0,023	90	5,47
C	3/2	4,149	0,023	90	346,52
Cu	1/2	4,025	0,004	—	—
C	1/2	1,819	0,004	90	0
N	1/2	2,984	0,009	90	15,18

Der Fe–Cu-Abstand beträgt 4,025 Å und ist damit ebenfalls größer als der komplementäre Cu–Fe-Abstand (vgl. Abschnitt 4.1.2.3, S. 56). Die CN-Einheit ist ähnlich gebaut wie in dem Ergebnis für die Cu-K-Kanten-Messung, und der Abstand der beiden Atome dieser Einheit voneinander beträgt 1,32 Å. Allerdings das Kohlenstoffatom dieser 2-Schalen-Einheit an das Eisenatom gebunden. Zusammen mit dem Ergebnis der Cu-K-Kante kann darauf geschlossen werden, dass die CN-Einheit *end-on* zwischen den beiden Metallen des heterobinuklearen Fe_{a3} – Cu_B -Zentrums gebunden sein muss.

4.1.4 Die native, azidinhibierte ba_3 -Oxidase

4.1.4.1 Cyanid- und azidinhibierte Form der nativen ba_3 -Oxidase im Vergleich

Ein Vergleich der EXAFS-Spektren der nativen, cyanidinhibierten und nativen, azidinhibierten Probe lässt einen Unterschied zwischen den beiden inhibierten Enzymen deutlich erkennen (Abbildung 4.15). Das Enzym hat mit dem Inhibitor Azid reagiert.¹⁸³

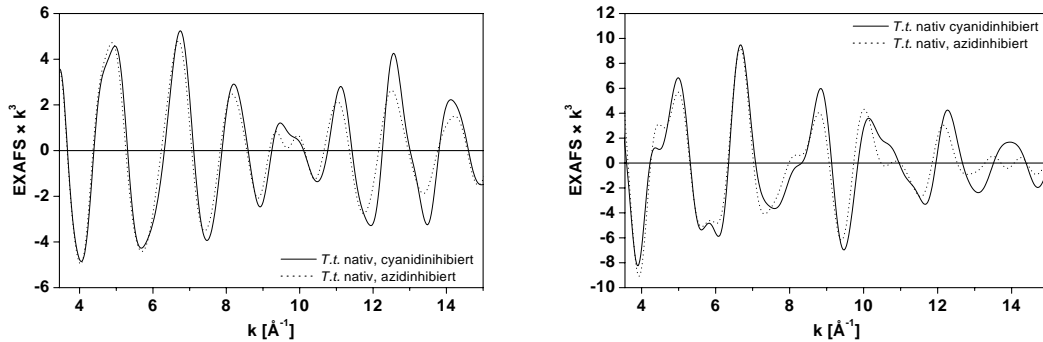


Abbildung 4.15: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der nativen, cyanidinhibierten (—) und nativen, azidinhibierten ba_3 -Oxidase ($\cdot\cdot\cdot$), links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.

4.1.4.2 Kupfer-K-Kante

Das Cu-K-Kanten-Spektrum der nativen, azidinhibierten ba_3 -Oxidase wurde aus 30 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 4 – 7, 9 und 10 (Σ 6). Die extrahierte Feinstruktur umfasst den Energiebereich von 15 – 1000 eV oberhalb der Absorptionskante und besteht aus 1027 Datenpunkten. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

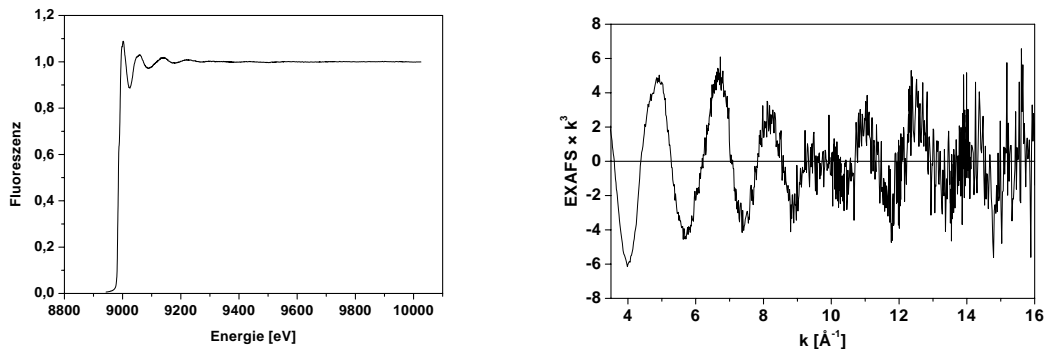


Abbildung 4.16: Native, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

Abbildung 4.17 zeigt die k^3 -gewichtete Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung. In Tabelle 4.10 sind die EXAFS-Ergebnisse der Cu-K-Kante für die azidinhibierte Form der nativen ba_3 -Oxidase dargestellt.

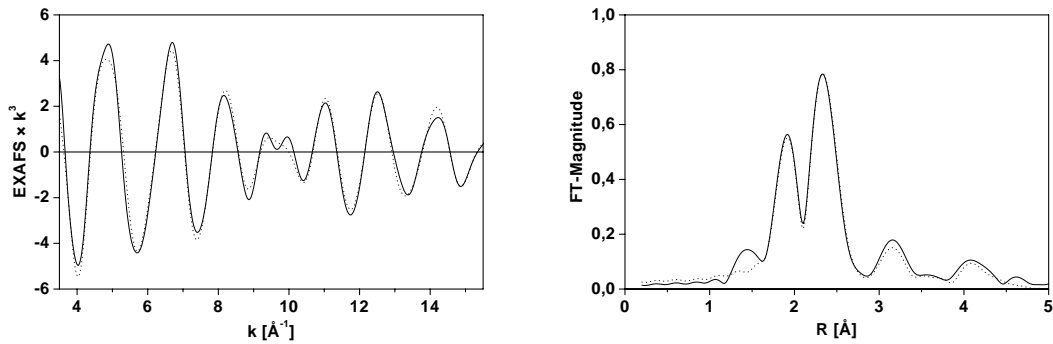


Abbildung 4.17: Native, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Tabelle 4.10: Native, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS ($R = 14,62\%$).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,949	0,003	90	0
C	5/3	2,890	0,009	90	22,32
C	5/3	3,024	0,007	89,99	339,82
N	5/3	4,058	0,060	89,99	11,78
C	5/3	4,147	0,060	89,98	352,39
S	4/3	2,266	0,008	—	—
S_{Met}	1/3	2,375	0,005	—	—
O_{Glu}	1/3	2,675	0,003	—	—
Cu	2/3	2,429	0,009	—	—
Fe	1/3	3,927	0,007	—	—
N	1/3	2,032	0,003	90	0
N	1/3	2,579	0,005	93,34	21,46
N	1/3	3,262	0,005	95,31	37,07

Trotz der Inhibierung des nativen Enzyms ändert sich der Cu–Cu-Abstand gegenüber den anderen Untersuchungsergebnissen der nativen Enzyme nur geringfügig. Der Abstand des Kupferrückstreuatoms vom Absorber beträgt rund 2,43 Å.

Der Abstand der Cystein-Schwefelschale vom Absorber ist wie bei der cyanidinhibierten Form im Vergleich zum nicht-inhibierten Enzym geringfügig kleiner (Abschnitt 4.1.2, S. 53). Die Parameter für die Imidazoleinheit ändern sich kaum gegenüber denen für die nicht-inhibierte Form der ba₃-Oxidase. Die Parameter der eingesetzten N₃-Einheit verfeinern stabil auf die in Tabelle 4.10 angegebenen Werte. Der Abstand zwischen den Stickstoffatomen dieser N₃-Einheit beträgt im Mittel $\sim 1,03$ Å. Er ist damit um ungefähr 0,15 Å kleiner als die Bindungslängen in einem freien Azidion.¹⁸⁶ Die weitere Diskussion erfolgt gemeinsam mit den weiteren Ergebnissen in Abschnitt 4.1.8.4.2 (S. 92).

4.1.4.3 Eisen-K-Kante

Das Fe-K-Kanten-Spektrum der nativen, azidinhibierten ba₃-Oxidase wurde aus 49 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2 – 10, 12 und 13 ($\Sigma 11$). Die Feinstruktur besteht aus 1049 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 - 1100 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k³-gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.18 dargestellt.¹⁸⁵

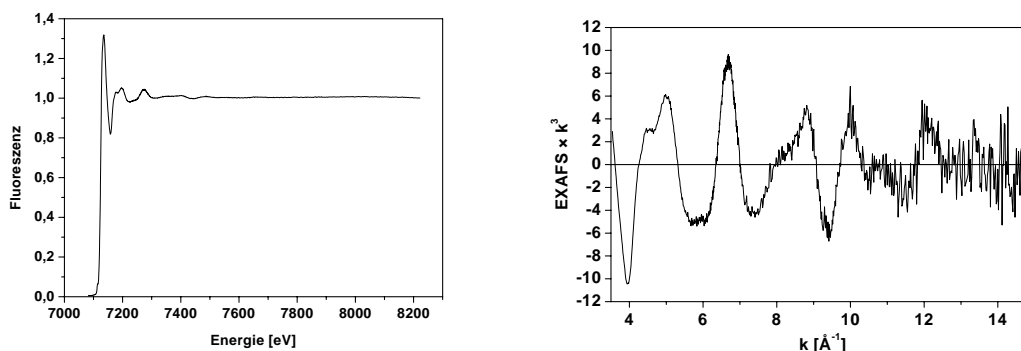


Abbildung 4.18: Native, azidinhibierte ba₃-Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k³-gewichtete Feinstruktur (rechts).

Abbildung 4.19 zeigt die k³-gewichtete Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung. In Tabelle 4.11 sind die EXAFS-

¹⁸⁶A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie, 33. Ed.*, de Gruyter, Berlin, 1985, S. 568.

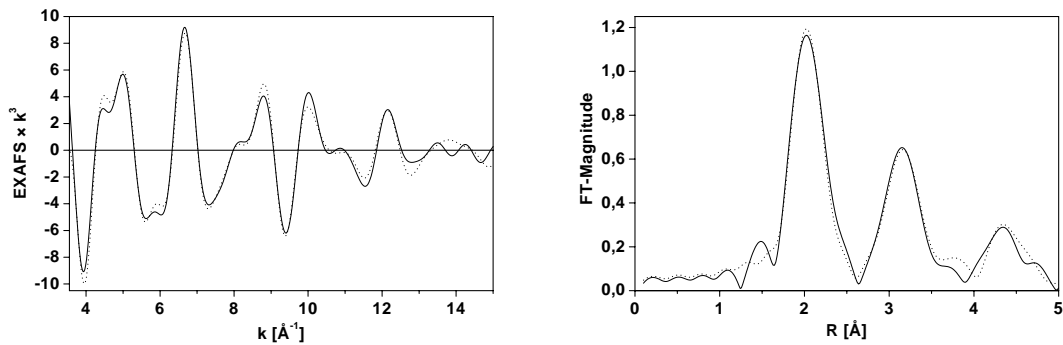


Abbildung 4.19: Native, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Ergebnisse der Fe-K-Kante für die azidinhivierte Form der nativen ba_3 -Oxidase dargestellt.

Der Fe–Cu-Abstand verfeinert auf einen Wert, der um $\sim 0,01 \text{ \AA}$ länger als bei der nicht-inhibierten Form ist. Da sich in diesem Abstandsbereich verschiedene Beiträge überlagern, kann hier nicht von einem prinzipiellen Unterschied gesprochen werden. Die Parameter für die Imidazol- und Porphyrineinheiten ändern sich kaum gegenüber denen der nicht-inhibierten Form der nativen ba_3 -Oxidase.

Die Parameter der eingesetzten N_3 -Einheit verfeinern stabil auf die in Tabelle 4.11 angegebenen Werte. Der Abstand zwischen den Stickstoffatomen dieser N_3 -Einheit beträgt im Mittel $\sim 1,29 \text{ \AA}$. Er ist somit ungefähr $0,1 \text{ \AA}$ größer als die entsprechenden Abstände in einem freien Azidion.¹⁸⁶ Die weitere Diskussion erfolgt gemeinsam mit den weiteren Ergebnissen in Abschnitt 4.1.8.4.2 (S. 92).

Tabelle 4.11: Native, azidinhibierte ba₃-Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 17,46 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	2,010	0,008	90	0
C	8/2	3,022	0,006	90	21,98
C	8/2	3,072	0,006	90	339,72
C	8/2	3,465	0,012	90	316,10
C	8/2	4,258	0,023	90	10,25
C	8/2	4,280	0,023	90	351,86
N	3/2	2,060	0,008	90	0
C	3/2	3,138	0,006	90	17,33
C	3/2	2,984	0,006	90	336,24
N	3/2	4,242	0,023	90	5,54
C	3/2	4,173	0,023	90	346,70
Cu	1/2	4,061	0,009	—	—
N	1/2	1,908	0,008	90	0
N	1/2	2,444	0,003	90	24,60
N	1/2	3,372	0,006	90	48,79

4.1.5 Die reduzierte ba₃-Oxidase

4.1.5.1 Reduzierte und native ba₃-Oxidase im Vergleich

Ein Vergleich der EXAFS-Spektren der reduzierten und der nativen ba₃-Oxidase zeigt, dass zwischen beiden Proben ein Unterschied vorliegt (Abbildung 4.20).¹⁸⁷ Das Enzym muss mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit reagiert haben. Aus der Literatur ist bekannt (vgl. Abschnitt 1.2.6, S. 20), dass bei einer Umsetzung der Cytochrom-c-Oxidase mit Natriumdithionit im Überschuss das Holoenzym quantitativ reduziert wird. Ein Ligandaustausch oder andere größere strukturelle Modifizierungen werden hierbei nicht beobachtet.¹⁸⁸

Die Reduktion des Enzyms führt zu einer Reduktion der Metallzentren. Mit der Änderung der Oxidationsstufe der Metallatome wird für das Cu_A-Zentrum eine Verlängerung des Cu–Cu-Abstands erwartet.

¹⁸⁷T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *Jahresbericht HASYLAB*, Annual Report II, Hamburg, **2000**, 369 - 370.

¹⁸⁸Vgl. A. Harrenga, H. Michel, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274(47), 33296 - 33299.

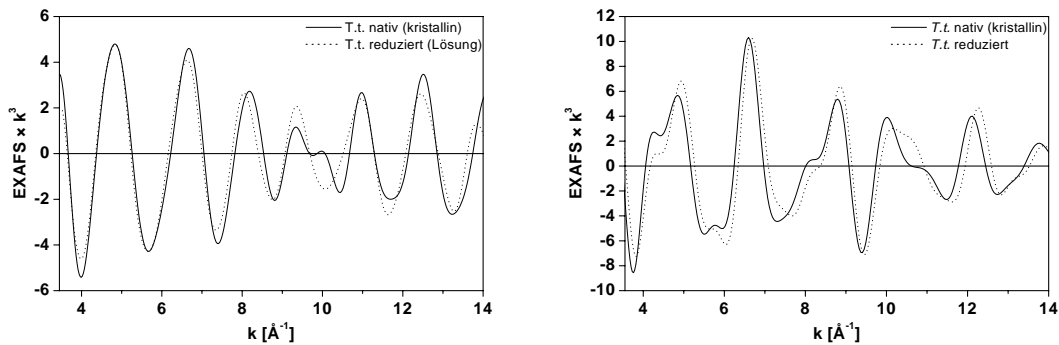


Abbildung 4.20: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen und Fourier-Transformierte der nativen (—) und der reduzierten ($\cdot \cdot \cdot$) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.

4.1.5.2 Kupfer-K-Kante

Das Cu-K-Kanten-Spektrum der reduzierten ba_3 -Oxidase wurde aus 21 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 4 – 6 und 8 – 13 ($\sum 9$). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 954 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 25 – 1000 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

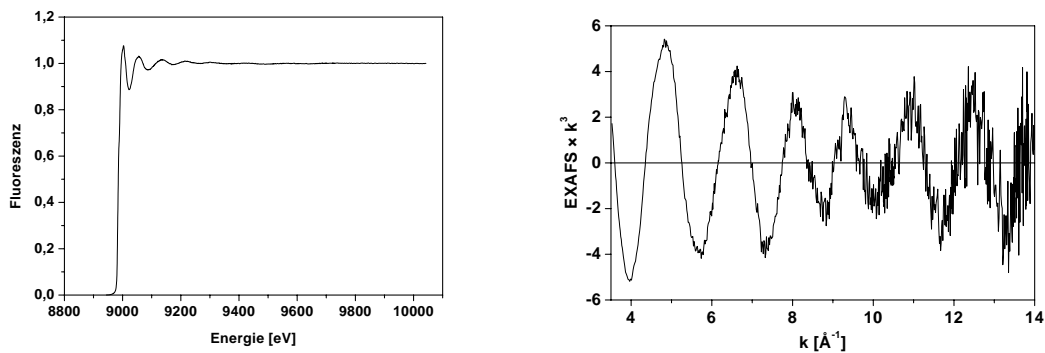


Abbildung 4.21: Reduzierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

In Abbildung 4.22 sind die Feinstruktur und die Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung dargestellt. Tabelle 4.12 enthält die EXAFS-Ergebnisse der Cu-K-Kante für die reduzierte ba_3 -Oxidase.

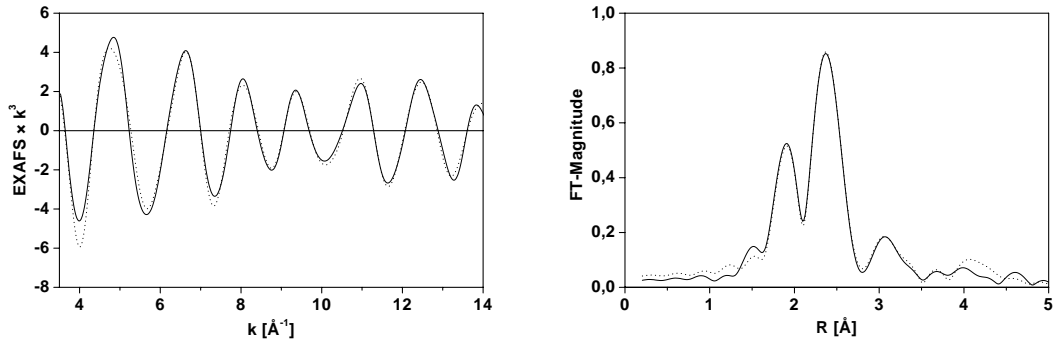


Abbildung 4.22: Reduzierte ba₃-Oxidase — Fourier-gefilterte, k³-gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) mit der besten Anpassung (···).

Tabelle 4.12: Reduzierte ba₃-Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,00 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,953	0,006	90	0
C	5/3	2,889	0,010	90	23,98
C	5/3	3,008	0,008	90	336,75
N	5/3	4,076	0,060	90	6,96
C	5/3	4,158	0,060	90	347,24
S	4/3	2,291	0,007	—	—
S_{Met}	1/3	2,387	0,007	—	—
O_{Glu}	1/3	2,596	0,003	—	—
Cu	2/3	2,456	0,010	—	—
Fe	1/3	3,890	0,006	—	—
O	1/3	1,993	0,006	90	0
O	1/3	2,703	0,003	90	30,06

Der Cu–Cu-Abstand ist gegenüber den nativen Formen der ba₃-Oxidase (vgl. Tabelle 4.6 (S. 55), Tabelle 4.8 (S. 61), Tabelle 4.10 (S. 65)) um etwa 0,03 Å größer.

Die Abstände der Cystein-Schwefelatome vom Absorber ändern sich durch die Reduktion des Enzyms nur geringfügig. Dagegen ist eine Verkürzung des Cu–Fe-Abstandes um $\sim 0,04$ Å gegenüber dem Mittel für die oxidierten Formen zu beobachten.^{187,189,190} Die Parameter der Imidazoleinheiten werden von der Reduktion nur wenig beeinflusst. Während die Abstände zum Absorberatom annähernd gleich bleiben, ändern sich die Winkel Φ geringfügig.

Im Gegensatz zu allen anderen EXAFS-Strukturen ergibt sich hier für den Abstand des zusätzlichen Glutamat-Sauerstoffatoms vom Absorber eine Verkürzung um $\sim 0,1$ Å. Da diese Tendenz bei den inhibierten Formen nicht beobachtet wird, ist es naheliegend, dass diese Schale durch Korrelationen mit anderen Schalen beeinflusst wird.

Auch bei der reduzierten Form wurde das Grundmodell um eine weitere MS-Einheit bestehend aus zwei Leichtstreuern erweitert. Die Güte der Anpassung verbessert sich wie bei der nativen ba₃-Oxidase dadurch wesentlich. Die Einheit ist der O₂-Einheit in der EXAFS-Struktur für das native Enzym sehr ähnlich. Der Abstand zwischen den beiden Sauerstoffatomen dieser Einheit beträgt $\sim 1,40$ Å. Er ist damit um $\sim 0,19$ Å länger als die Bindungslänge in einem Sauerstoffmolekül.¹⁸² Die weitere Diskussion erfolgt gemeinsam mit den weiteren Ergebnissen in Abschnitt 4.1.8.4.2 (S. 92).

4.1.5.3 Eisen-K-Kante

Das Fe-K-Kanten-Spektrum der reduzierten ba₃-Oxidase wurde aus 65 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2, 4 - 9, 11 und 13 (Σ 9). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1163 Datenpunkten und umfasst einen Energiebereich von 20 - 1000 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k³-gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

In Abbildung 4.24 sind die Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte jeweils mit der besten Anpassung dargestellt. Tabelle 4.13 enthält die EXAFS-Ergebnisse der Fe-K-Kante für die reduzierte ba₃-Oxidase.¹⁸⁰

Der Aufbau der Einheiten für die Imidazol- und Porphyrinsysteme ändert sich nur geringfügig. Der Abstand der Leichtstreuernatome der Porphyrineinheit in der ersten Koor-

¹⁸⁹T. Meyer, J. Schneider, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *BIOXAS 2000*, Book of Abstracts, Lure/Paris, **2000**, 30.

¹⁹⁰T. Meyer, J. Schneider, T. Soulimane, G. Buse, G. Henkel, *Proc. Int. Conf. Coord. Chem.* **2000**, *34*, 620.

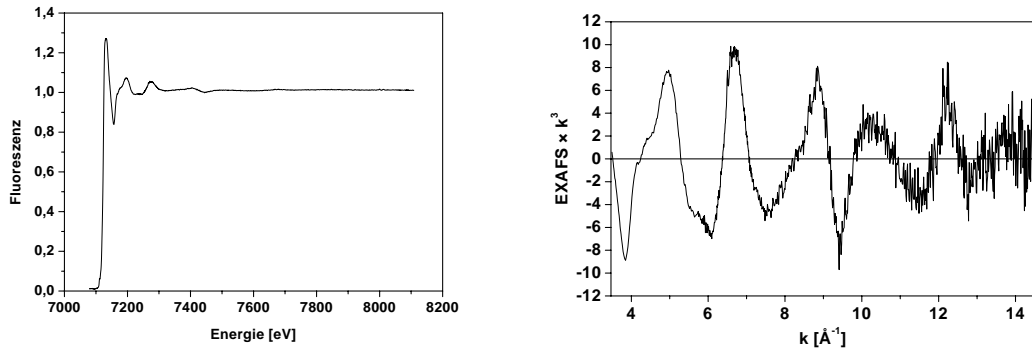


Abbildung 4.23: Reduzierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

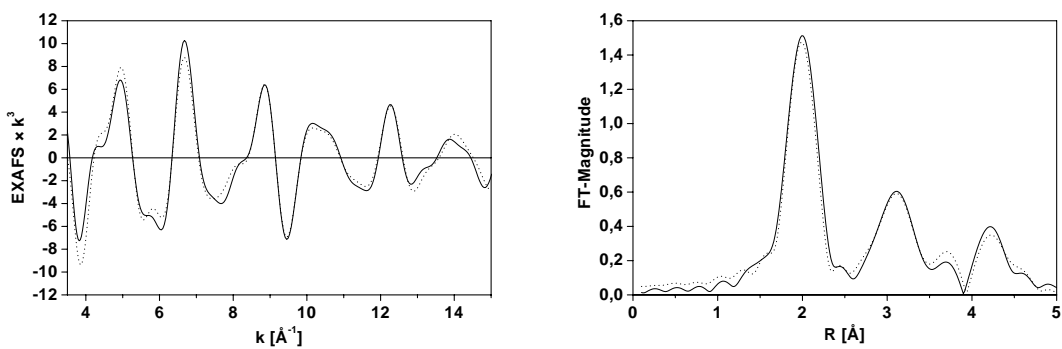


Abbildung 4.24: Reduzierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Tabelle 4.13: Reduzierte ba₃-Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS (R = 20,24 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	1,976	0,004	90	0
C	8/2	3,011	0,005	90	21,61
C	8/2	3,022	0,005	90	338,89
C	8/2	3,402	0,012	90	314,79
C	8/2	4,234	0,027	90	9,49
C	8/2	4,239	0,027	90	350,95
N	3/2	2,021	0,004	90	0
C	3/2	3,138	0,005	90	16,15
C	3/2	2,894	0,005	90	334,57
N	3/2	4,213	0,027	90	3,68
C	3/2	4,103	0,027	90	344,65
Cu	1/2	4,023	0,002	—	—
O	1/2	1,848	0,004	90	0
O	1/2	2,910	0,005	90	15,66

dinationssphäre des Absorberatoms Eisen beträgt 1,976 Å, während das Stickstoffatom der Imidazoleinheit 2,021 Å entfernt ist. Die Abstände der Einheiten vom Absorber unterscheiden sich somit nur geringfügig von denen der besten Anpassung für die nativen Enzyme (vgl. Abschnitte 4.1.2.3 (S. 56), 4.1.3.3 (S. 61) und 4.1.4.3 (S. 66)).

Die Änderung des Abstands von Eisenabsorber und Kupferrückstreuer ist nicht so deutlich wie in der komplementären EXAFS-Struktur der Cu-K-Kante. Verglichen mit der nativen ba₃-Oxidase ist der Fe–Cu-Abstand der reduzierten Form um etwa 0,03 Å kürzer.

Wie in der Anpassung für die Cu-K-Kanten-Daten verbessert sich die Güte der Anpassung durch die Einführung einer O₂-Einheit in das Modell signifikant. Der Abstand zwischen den beiden Sauerstoffatomen dieser Einheit beträgt $\sim 1,24$ Å. Er entspricht damit ungefähr dem Abstand, der als Ergebnis für die native Oxidase erhalten wurde. Der Abstand zwischen den beiden Sauerstoffatomen ist um $\sim 0,03$ Å größer als die Bindungslänge in einem Sauerstoffmolekül.¹⁸²

4.1.6 Die reduzierte, cyanidinhivierte ba_3 -Oxidase

4.1.6.1 Inhibierte und nicht-inhibierte Form der reduzierten ba_3 -Oxidase im Vergleich

Ein Vergleich der Feinstrukturen der Cu- und Fe-K-Kante von der cyanidinhivierten und der nicht-inhibierten Form der reduzierten ba_3 -Oxidase lässt geringfügige Unterschiede in der Phase und den Amplituden erkennen (Abbildung 4.25). Die Unterschiede sind vor

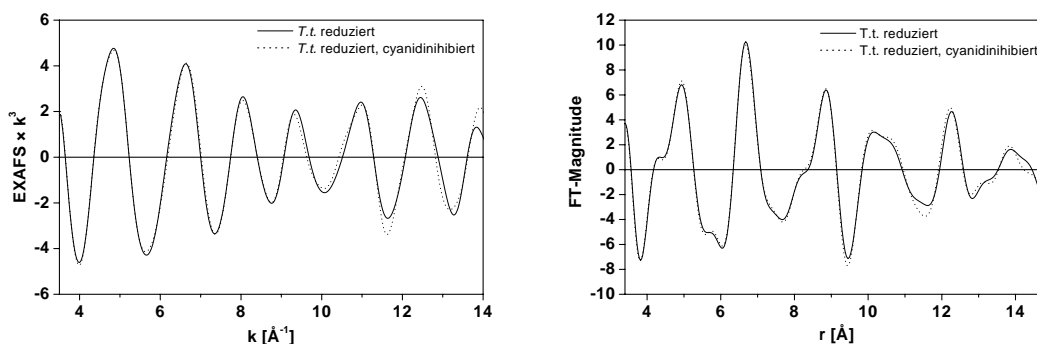


Abbildung 4.25: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der reduzierten, cyanidinhivierten (\cdots) und reduzierten, nicht-inhibierten (—) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kanten-Spektrum, rechts: Fe-K-Kanten-Spektrum.

allen Dingen in den Spektren der Cu-K-Kante erkennbar, da die Beiträge der CN-Einheit gegenüber den Beiträgen der beiden Prophyrin- und den drei Imidazoleinheiten der Fe-K-Kanten-Spektren gering sind. Im Vergleich zu den nativen Formen sind die Unterschiede zwischen den Feinstrukturen der reduzierten Spezies noch geringer. Dies könnte an prinzipiellen Änderungen in den Enzymen liegen, die durch die Reduktion hervorgerufen werden (vgl. Abschnitt 4.1.8.2, S. 84).

Die Güte der Anpassung ist jedoch signifikant schlechter, wenn statt einer CN-Einheit eine O_2 -Einheit an die Daten der cyanidinhivierten Form des reduzierten Enzyms angepasst wird. Aufgrund der guten Datenqualität deuten auch die geringen Unterschiede in Bereichen mit hohem k -Wert darauf hin, dass die beiden Proben verschieden sind. Die reduzierte Oxidase hat mit dem Inhibitor Cyanid reagiert.

4.1.6.2 Kupfer-K-Kante

Das Cu-K-Kanten-Spektrum der reduzierten, cyanidinhibierten ba_3 -Oxidase wurde aus 15 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 4 – 13 (Σ 10). Die Feinstruktur umfasst den Energiebereich von 25 – 1000 eV oberhalb der Absorptionskante und besteht aus 950 Datenpunkten. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.26 dargestellt.

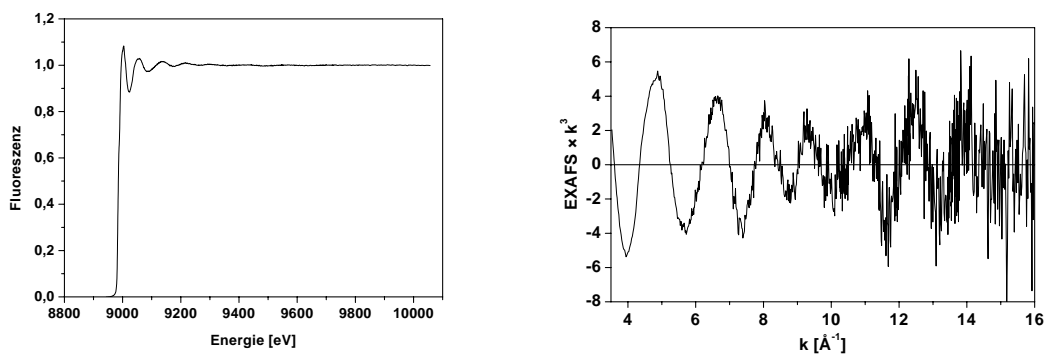


Abbildung 4.26: Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

In Abbildung 4.27 sind die Feinstruktur und die Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung gezeigt. Das Ergebnis der besten Anpassung ist in Tabelle 4.14

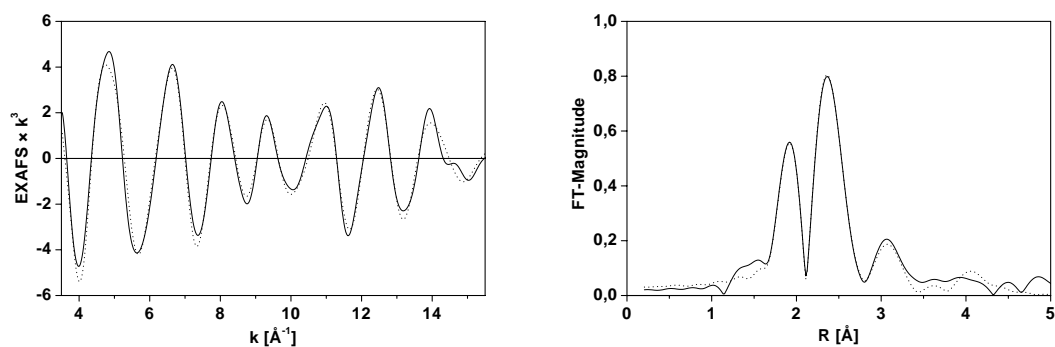


Abbildung 4.27: Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

dargestellt.

Tabelle 4.14: Reduzierte, cyanidinhivierte ba₃-Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 15,51 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,956	0,003	90	0
C	5/3	2,915	0,008	90	21,68
C	5/3	3,010	0,008	90	339,22
N	5/3	4,072	0,061	90	10,93
C	5/3	4,143	0,061	90	351,54
S	4/3	2,294	0,008	—	—
S_{Met}	1/3	2,388	0,008	—	—
O_{Glu}	1/3	2,696	0,004	—	—
Cu	2/3	2,463	0,010	—	—
Fe	1/3	3,888	0,008	—	—
N	1/3	2,050	0,007	90	0
C	1/3	2,727	0,004	93,20	27,38

Der Cu–Cu-Abstand ist mit 2,463 Å länger als in den oxidierten Formen des Enzyms. Ein Unterschied zum Modell der nicht-inhibierten Spezies der reduzierten ba₃-Oxidase zeigt sich lediglich in der Geometrie der Imidazoleinheit. Sowohl die Parameter der Schwefelschalen als auch die der Eisenschale ändern sich kaum.

Die Parameter der eingeführten CN-Einheit verfeinern stabil auf die in Tabelle 4.14 angegebenen Werte. Der Abstand zwischen dem Stickstoff- und dem Kohlenstoffatom dieser Einheit beträgt genau wie für die CN-Einheit der cyanidinhivierten Form der nativen ba₃-Oxidase $\sim 1,31$ Å. Er ist damit um $\sim 0,15$ Å länger als die Bindungslänge in einem freien Cyanidion.¹⁸⁴

4.1.6.3 Eisen-K-Kante

Das Fe-K-Kanten-Spektrum der reduzierten, cyanidinhivierten ba₃-Oxidase wurde aus 58 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2, 4 - 9, 11 und 13 (Σ 9). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1155 Datenpunkten und umfasst einen Energiebereich von 20 - 1000 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k³-gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.28 dargestellt.

Die Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte sind zusammen mit der besten Anpassung in Abbildung 4.29 gezeigt.

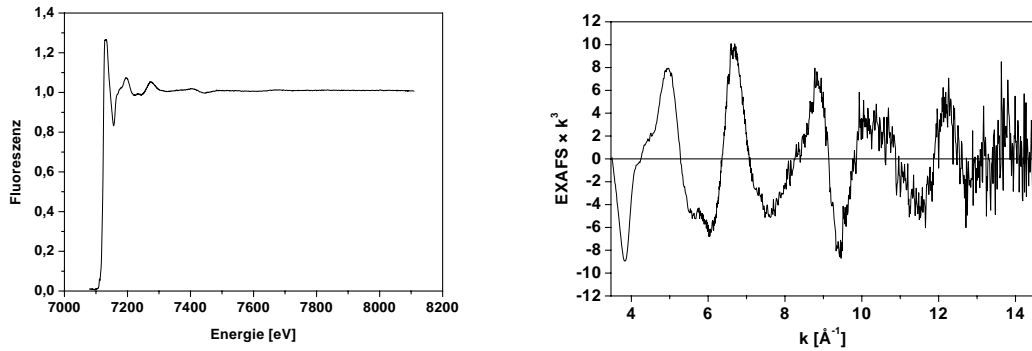


Abbildung 4.28: Reduzierte, cyanidinhivierte ba_3 -Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

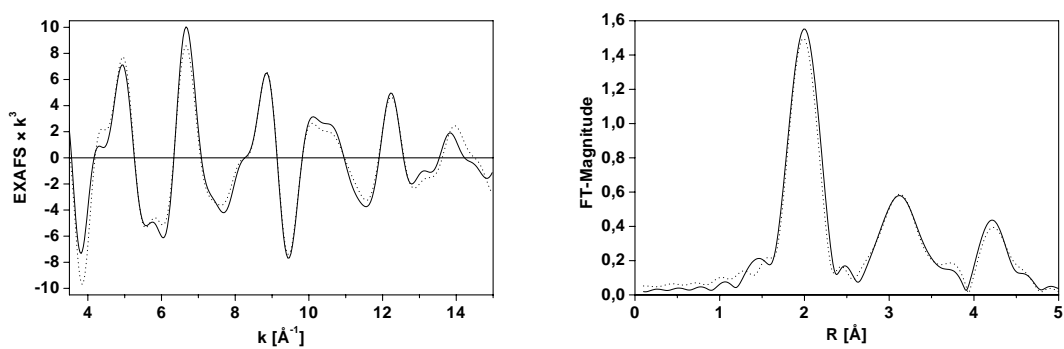


Abbildung 4.29: Reduzierte, cyanidinhivierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Die Werte für den Abstand der Porphyrin- und der Imidazoleinheiten vom Absorber (Tabelle 4.15) liegen im gleichen Bereich wie bei der nicht-inhibierten Form der reduzierten Oxidase (vgl. Tabelle 4.13, S. 73).

Tabelle 4.15: Reduzierte, cyanidinhibierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS ($R = 21,67\%$).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	1,981	0,005	90	0
C	8/2	3,030	0,010	90	21,15
C	8/2	3,013	0,010	90	338,51
C	8/2	3,380	0,009	90	314,22
C	8/2	4,245	0,024	90	8,90
C	8/2	4,238	0,024	90	350,39
N	3/2	2,006	0,005	90	0
C	3/2	3,083	0,010	90	17,75
C	3/2	2,939	0,010	90	335,93
N	3/2	4,186	0,024	90	5,78
C	3/2	4,123	0,024	90	346,69
Cu	1/2	4,036	0,001	—	—
C	1/2	1,875	0,005	90	0
N	1/2	2,982	0,010	90	13,41

Der Fe–Cu-Abstand der cyanidinhibierten Spezies ist mit 4,036 Å geringfügig größer als der Abstand der nicht-inhibierten Spezies der reduzierten Oxidase mit 4,023 Å (vgl. Tabelle 4.13, S. 73). Er liegt jedoch unterhalb des mittleren Wertes für die nativen Formen der ba_3 -Oxidase von 4,045 Å (vgl. Tabelle 4.7 (S. 58), Tabelle 4.9 (S. 63), Tabelle 4.11 (S. 68)).

Die Parameter der eingesetzten CN-Einheit verfeinern stabil auf angegebenen Werte. Der Abstand zwischen den beiden Atomen dieser Einheit beträgt $\sim 1,24$ Å. Er ist damit um $\sim 0,07$ Å kürzer als die Abstände der Ergebnisse für die anderen Untersuchungen und $\sim 0,08$ Å länger als der Bindungsabstand in einem freien Cyanidion.¹⁸⁴

4.1.7 Die reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase

4.1.7.1 Azid- und cyanidinhibierte Form der reduzierten ba_3 -Oxidase im Vergleich

In Abbildung 4.30 sind die Feinstrukturen der beiden inhibierten Formen des reduzierten Enzyms gemeinsam abgebildet. Unterschiede zwischen den beiden Graphen sind insbesondere bei den Cu-K-Kanten-Spektren erkennbar. Die Unterschiede in den Fe-K-

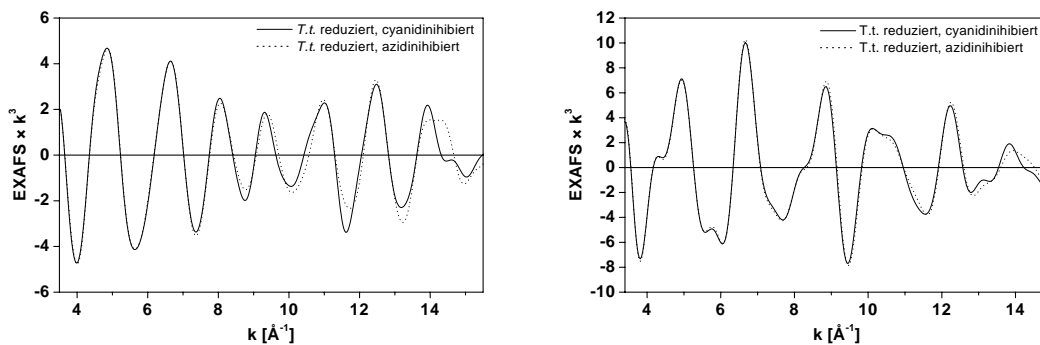


Abbildung 4.30: Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen der cyanid- (—) und azid-inhibierten (\cdots) ba_3 -Oxidase, links: Cu-K-Kante und rechts: Fe-K-Kante.

Kanten-Spektren sind aufgrund der geringen Rückstreubeiträge der kleinen gebundenen MS-Einheiten gegenüber den Porphyrin- und Imidazoleinheiten sehr gering (vgl. Abschnitt 4.1.6.1, S. 74). Die Spektren der nicht-inhibierten Form unterscheiden sich außerdem von dem der azidinhibierten Spezies. Die reduzierte Oxidase hat mit dem Inhibitor Azid reagiert.

4.1.7.2 Kupfer-K-Kante

Das Cu-K-Kanten-Spektrum der reduzierten, azidinhibierten ba_3 -Oxidase wurde aus 11 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2, 4 - 13 ($\sum 11$). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 943 Datenpunkten und umfasst einen Energiebereich von 20 - 975 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.31 dargestellt.

In Abbildung 4.32 sind die Feinstruktur und die Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung dargestellt. Das Ergebnis der Anpassung ist in Tabelle 4.16 gezeigt.

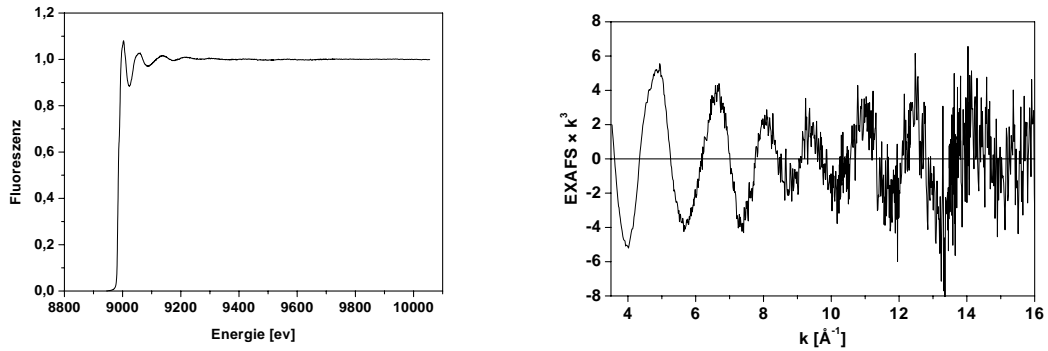


Abbildung 4.31: Reduzierte, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

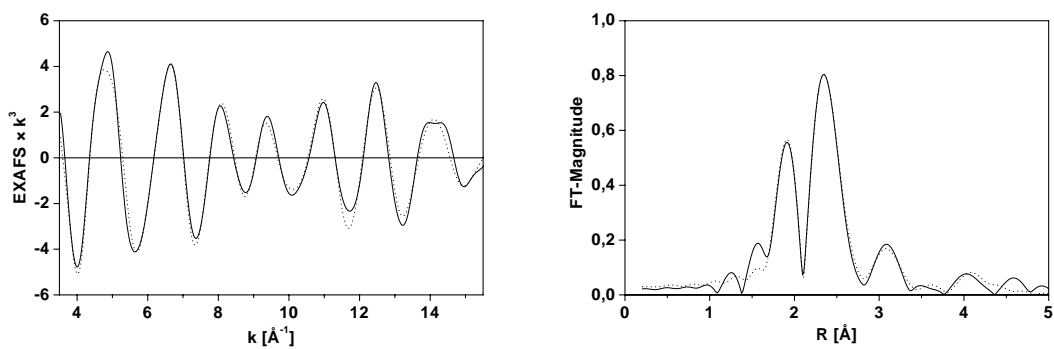


Abbildung 4.32: Reduzierte, azidinhivierte ba_3 -Oxidase — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur der Cu-K-Kante (links) und Fourier-transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Tabelle 4.16: Reduzierte, azidinhibierte ba₃-Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Cu-EXAFS (R = 14,53 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	5/3	1,954	0,002	90	0
C	5/3	2,909	0,008	90	21,86
C	5/3	3,016	0,008	89,99	339,41
N	5/3	4,070	0,061	89,99	11,17
C	5/3	4,146	0,061	89,98	351,80
S	4/3	2,282	0,008	—	—
S_{Met}	1/3	2,398	0,007	—	—
O_{Glu}	1/3	2,693	0,004	—	—
Cu	2/3	2,457	0,009	—	—
Fe	1/3	3,903	0,009	—	—
N	1/3	2,118	0,005	90	0
N	1/3	2,625	0,008	93,28	21,42
N	1/3	3,275	0,003	95,29	37,41

Wie aus dem Ergebnis der besten Anpassung ersichtlich ist, haben sich die Abstände der einzelnen Schalen zum Absorber gegenüber der cyanidinhibierten Form kaum verändert. Für die Imidazoleinheit ergibt sich eine nur geringfügige Änderung ihrer Geometrie. Der Cu–Cu-Abstand ist wie bei der cyanid- und nicht-inhibierten Form der reduzierten Oxidase mit 2,457 Å ebenfalls länger als bei den nativen Spezies.

Der Abstand der N₃-Einheit vom Absorber beträgt $\sim 2,12$ Å. Damit ist diese MS-Einheit fast 0,1 Å weiter vom Absorberatom Kupfer entfernt als in der nativen Oxidase. Der Aufbau der N₃-Einheit ist ebenfalls geringfügig anders. Dennoch ist das Grundprinzip dieser Einheit erhalten geblieben (vgl. Abschnitt 4.1.4, S. 63). Der Abstand der Stickstoffatome voneinander beträgt im Mittel $\sim 1,03$ Å. Er entspricht damit dem Abstand, der für die cyanidinhibierte Form der nativen ba₃-Oxidase gefunden wurde. Ein Vergleich der einzelnen MS-Einheiten erfolgt im Abschnitt 4.1.8.4.2, S. 92.

4.1.7.3 Eisen-K-Kante

Das Fe-K-Kanten-Spektrum der reduzierten, azidinhibierten ba₃-Oxidase wurde aus 50 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 5 – 9 und 11 – 13 (Σ 8). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1008 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 20 – 980 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k³-gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.33 dargestellt.

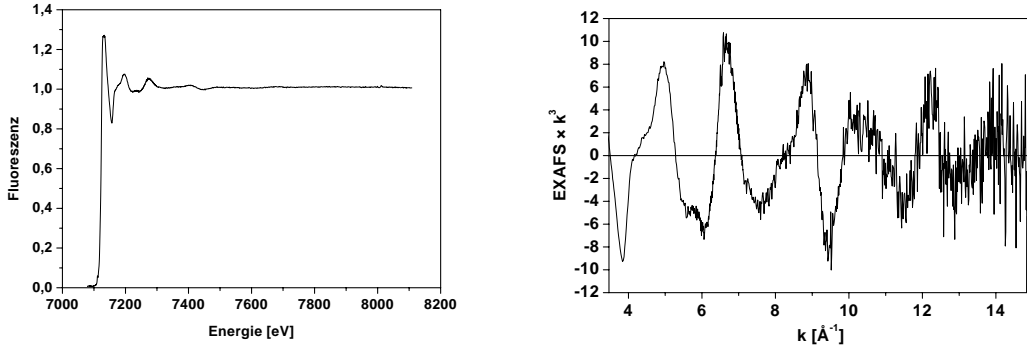


Abbildung 4.33: Reduzierte, azidinhibierte ba₃-Oxidase — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k³-gewichtete Feinstruktur (rechts).

In Abbildung 4.34 ist neben der Feinstruktur auch die Fourier-Transformierte jeweils mit der besten Anpassung gezeigt. Das Ergebnis der Anpassung ist in Tabelle 4.17 dargestellt.

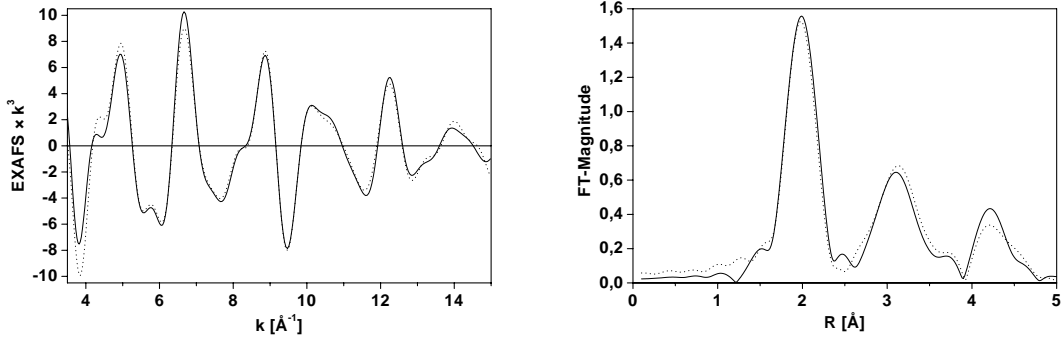


Abbildung 4.34: Reduzierte, azidinhibierte ba₃-Oxidase — Fourier-gefilterte, k³-gewichtete Feinstruktur der Fe-K-Kante (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (···).

Es unterscheidet sich kaum von den beiden Anpassungen für die anderen Formen der reduzierten ba₃-Oxidase.

Im Vergleich zur azidinhibierten Form der nativen ba₃-Oxidase ist die Geometrie der N₃-Einheit unverändert. Sogar die Winkel Φ der 3-Schalen-Einheit sind sich sehr ähnlich, obwohl nach einer Verfeinerung mit starren Einheiten jeweils auch diese Einschränkung zur Kontrolle des Modells aufgehoben wurde. Der Abstand zwischen den Stickstoffatomen der N₃-Einheit beträgt im Mittel $\sim 1,29$ Å. Er ist somit wie bei dem Ergebnis für die azid-

Tabelle 4.17: Reduzierte, azidinhibierte ba_3 -Oxidase — Ergebnis der besten Anpassung an das Fe-EXAFS ($R = 20,08\%$).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
N	8/2	1,971	0,004	90	0
C	8/2	3,013	0,007	90	21,46
C	8/2	3,011	0,007	90	338,67
C	8/2	3,387	0,012	90	314,44
C	8/2	4,231	0,020	90	9,24
C	8/2	4,231	0,020	90	350,68
N	3/2	2,007	0,004	90	0
C	3/2	3,104	0,007	90	17,03
C	3/2	2,913	0,007	90	335,24
N	3/2	4,194	0,020	90	4,80
C	3/2	4,109	0,020	90	345,71
Cu	1/2	4,025	0,001	—	—
N	1/2	1,818	0,004	90	0
N	1/2	2,332	0,004	90	26,18
N	1/2	3,259	0,007	90	51,39

inhibierte Form der nativen ba_3 -Oxidase $\sim 0,1$ Å größer als die Bindungslänge in einem freien Azidion.¹⁸⁶

4.1.8 Interpretation der Ergebnisse

4.1.8.1 Allgemeines

Der prinzipielle Aufbau der aktiven Zentren der Cytochrom-c-Oxidase ist u. a. aus Ergebnissen von Röntgenstrukturanalysen und anderen EXAFS-Strukturen bekannt. Das Ergebnis der Kurvenanpassungsanalyse aller Cu-K-Kanten-Spektren der ba₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* ergibt ein Modell mit fünf Histidin-Rückstreueinheiten, vier Schwefel- und zwei Kupferbeiträgen sowie den Beiträgen für ein Leichtstreuer-, ein Schwefel- und ein Eisenatom. Je nach Derivat des Enzyms wird das Modell durch eine weitere MS-Einheit für das Substrat oder den Inhibitor vervollständigt.

Das Modell für die nicht-inhibierten Formen der ba₃-Oxidase enthält jeweils zwei Leichtstreuer, die zu einer O₂-MS-Einheit kombiniert sind. Der Versuch, nur einen Leichtstreuer im Abstand von rund 2 Å anzupassen, reicht zur adäquaten Beschreibung der Daten nicht aus. Dieses Ergebnis wurde bereits für die gelöste Form der nativen ba₃-Oxidase gefunden.¹⁷⁹

Die Ergebnisse der Fe-K-Kanten-Untersuchungen sind Modelle mit Beiträgen für zwei Porphyrinsysteme, drei Imidazoleinheiten sowie einem Kupferrückstreubeitrag. Auch diese EXAFS-Strukturen enthalten ergänzend die MS-Einheiten für das Substrat bzw. den entsprechenden Inhibitor.

4.1.8.2 Imidazol- und Porphyrineinheiten

Der Vergleich aller Spektren zeigt, dass die Imidazol- und Porphyrineinheiten in ihrer Grundstruktur in allen Modellen erhalten bleiben. Auch die einzelnen Winkel Φ weichen vom Grundmodell nur wenig ab. Lediglich der Abstand der jeweiligen Gesamteinheit vom Absorber ändert sich.

Für die β -ständigen Atome im Imidazol-Fünfring ergeben sich in den EXAFS-Strukturen für die Cu-K-Kante — wie bei den Auswertungen von A. MÜLLER¹⁹¹ und J. GROPE¹⁷⁹ — deutlich erhöhte Debye-Waller-Parameter. Sie liegen in der Größenordnung von 0,060 Å². Der Grund dafür ist, dass die Imidazoleinheit des Modells der Mittelwert aus fünf individuellen Imidazolringsystemen ist.

Das Ergebnis der Anpassung kann durch den Einsatz mehrerer Imidazoleinheiten zur Berücksichtigung der Einzelgeometrien nicht verbessert werden. Durch dieses Vorgehen wird

¹⁹¹A. Müller, *Dissertation*, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 1997.

hauptsächlich die Zahl der anzupassenden Parameter erhöht. Da sich die Beiträge der einzelnen Imidazoleinheiten überschneiden, korrelieren die einzelnen Schalen stark miteinander, so dass keine prägnanteren Aussagen zu erwarten sind. Die Schalen für gleiche Rückstreuatome unterscheiden sich im Abstand vom Absorber außerdem nur so geringfügig, dass vor allen Dingen bei den Daten von Enzymmessungen der Unterschied von weniger als $0,1 \text{ \AA}$ nicht aufzulösen ist.

Auch in den EXAFS-Strukturen für die Fe-K-Kanten sind die Debye-Waller-Parameter der Schalen für die Porphyrin- und Imidazoleinheiten mit einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von 4 \AA sehr groß. Dieses Ergebnis ist ebenfalls auf die verwendeten MS-Einheiten zurückzuführen, in denen beispielsweise die Porphyrineinheit zwei ganze Porphyrinringe repräsentiert. Die Einzelwerte stellen damit die gemittelten Werte für die Rückstreubeiträge aller gleichartigen Systeme dar.

Bei den Fe-K-Kanten-Spektren sind die Beiträge der Porphyrinsysteme und Imidazolringe auch gleichzeitig die Hauptbeiträge im Spektrum. Die Hauptbeiträge im Cu-K-Kanten-Spektrum für die ba_3 -Oxidase bestehen hingegen hauptsächlich aus einzelnen Schalen, die keiner Einheit angehören.

Daher zeigt sich bei den Ergebnissen der Fe-K-Kanten-Untersuchungen die Verwendung von mittleren Geometrien für einzelne Einheiten auch in größeren R-Faktoren. Ein weiterer Grund für den größeren R-Faktor bei den Ergebnissen für das Fe-EXAFS ist die Vernachlässigung von MS-Beiträgen, die zwischen den einzelnen Vierteln einer Porphyrineinheit auftreten.

Im Vergleich zu den besten Anpassungen der Fe-K-Kanten-Spektren der nativen Formen des Enzyms sind die R-Faktoren für die Anpassungen der drei reduzierten Spezies ebenfalls größer (Tabelle 4.18). Der Unterschied beträgt ungefähr drei Prozentpunkte. Da

Tabelle 4.18: Die R-Faktoren der besten Anpassungen an die Fourier-gefilterten Fe-EXAFS.

ba₃-Oxidase	R-Faktor
nativ (kristallin)	18,35 %
nativ cyanidinhibiert	17,37 %
nativ azidinhibiert	17,46 %
reduziert	20,24 %
reduziert cyanidinhibiert	21,67 %
reduziert azidinhibiert	20,08 %

die Hauptbeiträge überwiegend aus den Beiträgen der Imidazol- und Porphyrineinheiten bestehen, liegt es nahe, dass die Modellierung dieser Rückstreubeiträge durch die einge-

setzten Einheiten mit mittleren Geometrien für die reduzierten Spezies der ba_3 -Oxidase nicht adäquat ist.

Daher wurden die MS-Einheiten für das Imidazol und Porphyrin auch als nicht-starre Einheiten freigegeben und die einzelnen Schalenparameter verfeinert. Trotz unterschiedlicher Startbedingungen konnte hierbei allerdings kein einheitliches, chemisch sinnvolles Modell erhalten werden.

Die Analyse der Fourier-Transformierten mit der besten Anpassung für die reduzierten Formen der ba_3 -Oxidase (vgl. die Abbildungen 4.24 (S. 72), 4.29 (S. 77), 4.34 (S. 82)) zeigt, dass die experimentellen Daten durch das Modell im Bereich von 2,3 Å nicht gut beschrieben werden. Für die nativen Formen sind in diesem Bereich die Abweichungen zwischen Theorie und Experiment deutlich geringer (vgl. die Abbildungen 4.9 (S. 57), 4.14 (S. 62), 4.19 (S. 67)).

In Abbildung 4.35 ist neben der üblichen Darstellung der Fourier-Transformierten (Modulus-Anteil) auch der Sinus-Anteil der Fe-K-Kanten-Daten beispielhaft für die reduzierte, nicht-inhibierte Form der ba_3 -Oxidase angegeben (vgl. in Abschnitt 6.3.5 den Absatz auf S. 166 zur Sinus- und Modulusdarstellung). Anhand der Sinusfunktion wird

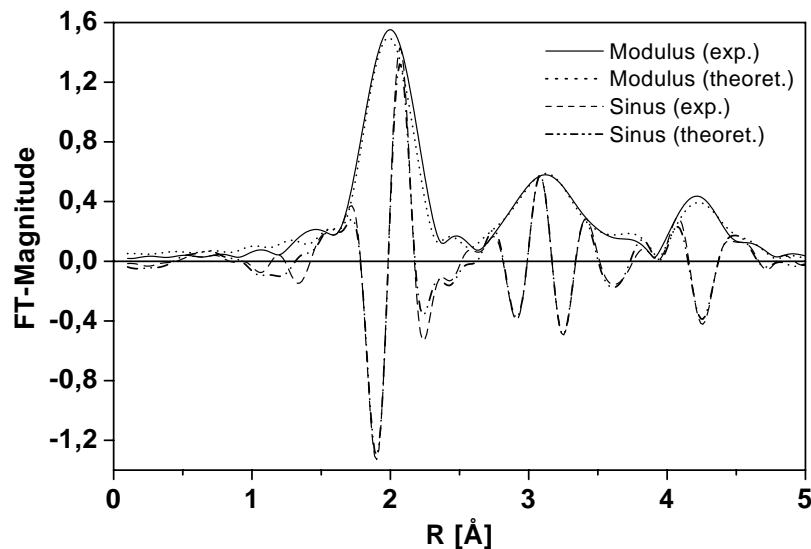


Abbildung 4.35: Fourier-Transformierte der reduzierten ba_3 -Oxidase mit Sinus- und Modulus-Anteil.

besonders deutlich, dass im Abstandsbereich von 2,2 – 2,7 Å die experimentellen Daten nicht gut simuliert werden. Sowohl die Amplitude als auch die Phase des Sinus-Anteils

von Theorie und Experiment stimmen nicht gut überein. Die schlecht angepasste Flanke des ersten Hauptpeaks in der Fourier-Transformierten ist demnach kein Resultat der Schalenanpassung für die erste Koordinationssphäre mit einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 2,0$ Å.

4.1.8.3 Das Cu_A -Zentrum

4.1.8.3.1 Der Cu–Cu-Abstand

In Tabelle 4.19 sind die Ergebnisse der EXAFS-Analysen für den Cu–Cu-Abstand im Cu_A -Zentrum der hier untersuchten ba_3 -Oxidase-Proben aufgelistet. Die Abweichungen zwischen den nativen Derivaten der ba_3 -Oxidase sind sehr gering. Im Mittel beträgt der Cu–Cu-Abstand dieser drei Spezies 2,42 Å.

Das Ergebnis dieser Untersuchung steht damit im Einklang mit der EXAFS-Struktur für das gelöste, native Enzym¹⁷⁹ sowie mit der Röntgenstruktur der ba_3 -Oxidase aus *Thermus thermophilus*.⁶⁹

Tabelle 4.19: Cu_A -Zentrum — Ergebnisse der besten Anpassungen für die Kupfer-rückstreuerchale.

ba ₃ -Oxidase		Cu–Cu	
		R [Å]	A [Å ²]
nativ	(kristallin)	2,427	0,012
nativ	cyanidinhibiert	2,413	0,008
nativ	azidinhibiert	2,429	0,009
reduziert		2,456	0,010
reduziert	cyanidinhibiert	2,463	0,010
reduziert	azidinhibiert	2,457	0,009

Die Reduktion des Enzyms führt zu einer Reduktion der Metallzentren. Aus chemischer Sicht wird bei der Reduktion des Cu_A -Zentrums daher erwartet, dass sich der Abstand zwischen den beiden Kupferatomen vergrößert. Die durchschnittliche Verlängerung des Cu–Cu-Abstands durch die Reduktion der ba_3 -Oxidase beträgt fast 0,04 Å. Die Ergebnisse der einzelnen Modellierungen für das reduzierte Enzym sind sich in Bezug auf diesen Abstand sehr ähnlich (Tabelle 4.19).

Die Übereinstimmungen der einzelnen Modellierungsergebnisse sind ein weiterer Beweis dafür, dass sich die Reduktion der ba_3 -Oxidase auf das gesamte Enzym auswirkt und auch Änderungen im Cu_A -Zentrum hervorruft.

Nach den Ergebnissen von Untersuchungen an homobinuklearen Kupferkomplexen im Rahmen dieser Arbeit wird der Abstand zwischen den beiden Kupferatomen gegenüber den Ergebnissen von Kristallstrukturanalysen dieser Verbindungen um $\sim 0,04 \text{ \AA}$ kürzer bestimmt (vgl. Abschnitt 4.2.6.2, S. 132). Der systematische Unterschied im Cu–Cu-Abstand scheint methodisch bedingt zu sein. Ein Unterschied in der gleichen Größenordnung ist daher auch für den modellierten Cu–Cu-Abstand im Cu_A -Zentrum der hier untersuchten ba_3 -Oxidase anzunehmen.

4.1.8.3.2 Methionin-Schwefel und Glutamat-Sauerstoff

In allen Ergebnissen für die Cu-EXAFS ist eine zusätzliche Schwefelschale für eine Methionin-Schwefel-Donorfunktion bei ungefähr $2,38 \text{ \AA}$ enthalten (Tabelle 4.20). Dieser Beitrag verfeinert jeweils stabil auf seinen Wert und ist signifikant.

Tabelle 4.20: Methionin-Schwefel — Ergebnisse der besten Anpassungen an die Cu-EXAFS.

ba₃-Oxidase	Cu–S_{Met}	
	R [Å]	A [Å²]
nativ (kristallin)	2,322	0,008
nativ cyanidinhibiert	2,368	0,004
nativ azidinhibiert	2,375	0,005
reduziert	2,387	0,007
reduziert cyanidinhibiert	2,388	0,008
reduziert azidinhibiert	2,398	0,007

Ein entsprechender Methionin-Schwefelbeitrag wurde auch für die gelöste Form der nativen ba_3 -Oxidase nicht ausgeschlossen,¹⁷⁹ er war jedoch wahrscheinlich aufgrund der schlechteren Datenqualität nicht signifikant.¹⁷⁵ Der Abstand für einen Methionin-Schwefelrückstreuer verfeinert auf einen Wert von $2,335 \text{ \AA}$ ($A = 0,004 \text{ \AA}^2$). Der deutlich kürzere Abstand des Methionin-Schwefelrückstreuers für die hier untersuchte kristalline ba_3 -Oxidase ist damit nicht auf die Kristallisation zurückzuführen.

Auch in der EXAFS-Struktur der aa_3 -Oxidase aus Rinderherz ist ein Beitrag für einen weiteren S/Cl-Rückstreuer vorhanden.¹⁰⁶ Da Beiträge von Schwefel- und Chlorrückstreuatomen bei der EXAFS-Analyse nicht unterscheidbar sind, wurde aufgrund fehlender Informationen dieser Beitrag als Beitrag eines Chlorids interpretiert, das am heterobinuklearen Zentrum gebunden sein sollte. Eine Analyse der Fe-K-Kanten-Daten für die aa_3 -Oxidase unter Verwendung der hier aufgestellten Grundmodelle und VON BARTH/HEDIN-LUNDQVIST-Phasen führt zu dem Ergebnis, dass ein S/Cl-Beitrag

nicht signifikant ist. Die Analyse der Cu-K-Kanten-Daten für die aa₃-Oxidase mit einer vierfach besetzten Schwefelschale für die Cystein-Schwefelfunktionen ($R = 2,25 \text{ \AA}$, $A = 0,006 \text{ \AA}^2$) und einer einfach besetzten Schwefelschale für die Methionin-Schwefel-Donorfunktion ($R = 2,41 \text{ \AA}$, $A = 0,003 \text{ \AA}^2$) zeigt, dass das Grundmodell für das Cu-EXAFS von A. MÜLLER in Bezug auf die Anzahl der Schwefelrückstreubeiträge im Einklang mit der Struktur für die ba₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* ist.

In der Kristallstruktur der ba₃-Oxidase⁶⁹ ist im Abstand von $2,5 \text{ \AA}$ eines Kupferatoms des Cu_A-Zentrums ein Methionin-Schwefelatom vorhanden. Zwischen der EXAFS-Struktur und Kristallstruktur besteht damit für diesen hier diskutierten Abstand eine Differenz von rund $0,2 \text{ \AA}$. Die beiden Ergebnisse scheinen nicht kompatibel zu sein. Ein Vergleich der Abstände zwischen Kupferatom und den Cystein-Brücken-Schwefel-Funktionen des Cu_A-Zentrums zeigt, dass auch hier in der Kristallstruktur die Abstände länger sind als in EXAFS-Struktur. Aufgrund der Genauigkeit von EXAFS-Strukturen ist als Abstand für das Methionin-Schwefelatom vom Absorberatom Kupfer das Ergebnis der EXAFS-Analyse vorzuziehen.

Die Cu-K-Kanten-Modelle der hier untersuchten ba₃-Oxidase enthalten zusätzlich einen Leichtstreuerbeitrag mit der Absorber-Rückstreuer-Distanz von $2,6 - 2,7 \text{ \AA}$ (Tabelle 4.21). Die Kristallstruktur von SOULIMANE *et al.* enthält in der weiteren Umgebung eines Kupfer-

Tabelle 4.21: Glutamat-Sauerstoff — Ergebnisse der besten Anpassungen an die Cu-EXAFS.

ba ₃ -Oxidase		Cu-O _{Glu}	
		R [Å]	A [Å ²]
nativ	(kristallin)	2,720	0,007
nativ	cyanidinhibiert	2,698	0,004
nativ	azidinhibiert	2,675	0,003
reduziert		2,596	0,003
reduziert	cyanidinhibiert	2,696	0,004
reduziert	azidinhibiert	2,693	0,004

atoms des Cu_A-Zentrums im Abstand von $2,8 \text{ \AA}$ ein Sauerstoffatom, das vom Glutamat Glu151 stammt.⁶⁹ Der Abstand dieses Glutamat-Sauerstoffatoms beträgt nach dem Ergebnis einer Kristallstrukturanalyse von WILLIAMS *et al.*¹⁹² an der löslichen Domäne der ba₃-Oxidase von *Thermus thermophilus* $2,6 \text{ \AA}$ (Auflösung: $1,6 \text{ \AA}$). Damit kann der Leichtstreuerbeitrag der EXAFS-Struktur als Glutamat-Sauerstoff interpretiert werden.

¹⁹²P. A. Williams, N. J. Blackburn, D. Sanders, H. Bellamy, E. A. Stura, J. A. Fee, D. E. McRee, *Nature Struct. Biol.* **1999**, 6, 509 - 516.

Die Abweichung des EXAFS-Ergebnisses für die reduzierte Form der ba_3 -Oxidase von den anderen Ergebnissen ist nicht erklärbar. Sie könnte jedoch auf starken Korrelationen beruhen, die in dieser Art bei den anderen Modellen nicht vorhanden sind.

Sowohl der Glutamat-Sauerstoff- als auch der Methionin-Schwefelbeitrag ist in allen EXAFS-Strukturen für die Cu-EXAFS enthalten. Die Abstände für die beiden Rückstreuer sind für alle Enzymzustände sehr ähnlich und verfeinern stabil auf ihren Wert.

Die Detektion derartiger Beiträge mit der Methode EXAFS ist demnach trotz der komplexen Modelle für die Cytochrom-c-Oxidase möglich. Gegenüber früheren EXAFS-Untersuchungen basiert hier die Auswertung auf Spektren von höherer Qualität, da in den letzten Jahren sowohl die Datenerfassung als auch die Datenauswertung weiterentwickelt wurde (vgl. Abschnitt 3.2.3, S. 33). Dennoch war auch schon bei der Untersuchung der aa_3 -Oxidase aus Rinderherz der Beitrag detektiert worden. Der S/Cl-Beitrag wurde jedoch irrtümlich dem heterobinuklearen Zentrum zugeordnet. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch bei einer schlechteren Spektrenqualität ein derartiger Beitrag detektierbar ist, obwohl sich gerade in diesem Abstandsbereich verschiedene Beiträge im Spektrum überschneiden. Auch der Leichtstreuerbeitrag für ein Carbonyl-Sauerstoffatom des Glutamats kann mit einem Abstand vom Absorberatom Kupfer von 2,6 Å stabil an die aa_3 -Oxidase-Daten angepasst werden.

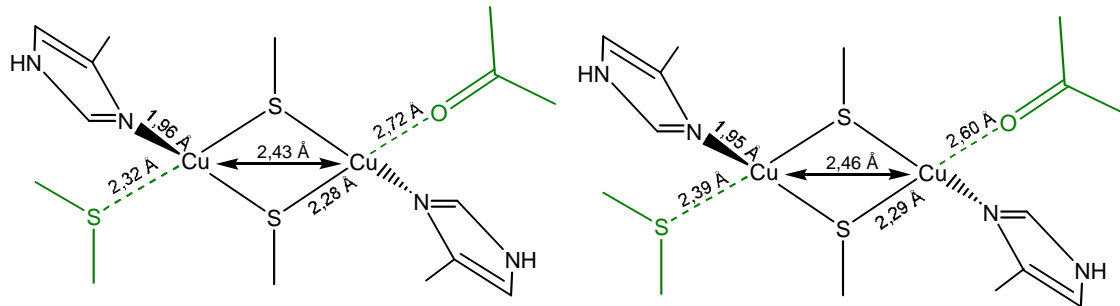
Die Abstände für das Methionin-Schwefel- und das Glutamat-Sauerstoffatom sind mit rund 2,4 und 2,7 Å deutlich länger als die für eine echte Koordination solcher Liganden üblichen Abstände von 2,3 und 2,0 Å. Dies steht mit den Ergebnissen der Untersuchungen von BLACKBURN *et al.* an der Selenomethionin-substituierten ba_3 -Oxidase im Einklang (vgl. Abschnitt 1.2.6, S. 17). Die beiden Rückstreuatome sind somit schwach koordinierende Liganden. Die Koordination der Kupferatome des Cu_A -Zentrums der Cytochrom-c-Oxidase ist als eine (3+1)-Koordination zu beschreiben.

4.1.8.3.3 Strukturmodelle für das Cu_A -Zentrum

Die Ergebnisse für das Cu_A -Zentrum der nativen und reduzierten Formen der ba_3 -Oxidase enthalten alle die gleichen Rückstreuatome. Unterschiede ergeben sich in den Abständen und den Debye-Waller-Parametern, wobei sich die einzelnen nativen und reduzierten Derivate nur geringfügig voneinander unterscheiden.¹⁹³

In Abbildung 4.36 sind daher nur zwei Strukturmodelle beispielhaft angegeben. Die darin enthaltenen Abstände beziehen sich jeweils auf die nicht-inhibierten Spezies der nativen und

¹⁹³T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *HASYLAB Users Meeting*, Posterbeitrag, Hamburg, 2002.



Abbildungung 4.36: Strukturmodelle für das Cu_A -Zentrum. *Links*: native, *rechts*: reduzierte ba_3 -Oxidase.

reduzierten ba_3 -Oxidase.¹⁹⁴ Beide Darstellungen geben die Struktur schematisch wieder und berücksichtigen nicht die absoluten Abstands- und Winkelverhältnisse.

4.1.8.4 Das Fe_{a3} - Cu_B -Zentrum

4.1.8.4.1 Der Fe-Cu-Abstand

Das Modell für die Cu-K-Kanten-EXAFS enthält jeweils einen Rückstreubeitrag für ein Eisenatom bei einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 4 \text{ \AA}$. Durch die Einführung einer Schale für diesen Beitrag in das Modell verbessert sich die Anpassung sowohl im R-Faktor als auch visuell. Der Beitrag ist signifikant. Überlagerungen verschiedener Schalen in diesem Abstandsbereich führen jedoch zu einer weniger überzeugenden Änderung des R-Faktors als erwartet.

Der Eisenbeitrag verfeinert auch ohne die Beiträge der Imidazoleinheit auf den Abstand von rund 4 \AA . Zusammen mit der MS-Einheit für die Imidazolringe wird der Cu-Fe-Abstand stabil angepasst (Tabelle 4.22). Auffällig ist, dass alle Abstände für das Eisenatom bei den nativen Formen der ba_3 -Oxidase oberhalb von $\sim 3,93 \text{ \AA}$ liegen, während für die reduzierten Derivate Abstände zwischen $3,88 \text{ \AA}$ und $3,90 \text{ \AA}$ resultieren. Im Mittel liegt der Unterschied damit bei $0,04 \text{ \AA}$.

Die Ergebnisse für die Fe-K-Kante sind hinsichtlich des Fe-Cu-Abstands für die einzelnen Derivate nicht so übereinstimmend wie die Cu-K-Kanten-Resultate (vgl. Tabelle 4.22). Im Mittel sind die Fe-Cu-Abstände für die reduzierten Formen der ba_3 -Oxidase um rund $0,02 \text{ \AA}$ kürzer.

¹⁹⁴Zum Cu-Cu-Abstand: vgl. Abschnitt 4.1.8.3.1, S. 87.

Tabelle 4.22: $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_B$ -Zentrum — Die Cu–Fe- bzw. Fe–Cu-Abstände der besten Anpassungen an die Cu- bzw. Fe-EXAFS.

ba₃-Oxidase	Cu-K-Kante:		Fe-K-Kante:	
	Cu–Fe		Fe–Cu	
	R [Å]	A [Å²]	R [Å]	A [Å²]
nativ (kristallin)	3,952	0,002	4,050	0,005
nativ cyanidinhibiert	3,929	0,008	4,025	0,004
nativ azidinhibiert	3,927	0,007	4,061	0,009
reduziert	3,890	0,006	4,023	0,002
reduziert cyanidinhibiert	3,888	0,008	4,036	0,001
reduziert azidinhibiert	3,903	0,009	4,025	0,001

Zwischen dem Ergebnis für den Cu–Fe-Abstand des Cu-EXAFS und dem Fe–Cu-Abstand des Fe-EXAFS besteht ausgehend von den entsprechenden Mittelwerten für die Abstände eine Diskrepanz von annähernd 0,12 Å. Vermutlich ist dies auf die Überlappungen verschiedenster Beiträge im Abstandsbereich von ~ 4 Å und die Anpassung zu stark vereinfachter Einheiten für die komplexen MS-Einheiten zurückzuführen.

Unter der Annahme, dass die Ergebnisse für die Metall–Metall-Abstände trotz der Vereinfachungen und Überlagerungen von Beiträgen in diesem Abstandsbereich korrekt angepasst werden, ergibt sich im Mittel für die nativen ba₃-Oxidase ein Metall–Metall-Abstand von rund 4,00 Å und für die reduzierten Oxidase von 3,96 Å. Durch die Reduktion des Enzyms verringert sich damit der Abstand zwischen den beiden Metallatomen des heterobinuklearen Zentrums um den gleichen Betrag, wie sich die Distanz zwischen den beiden Kupferatomen des Cu_A-Zentrums verlängert.

4.1.8.4.2 Bindung des Substrats oder Inhibitors

Die Fe- und Cu-K-Kanten-Ergebnisse erlauben die Entwicklung einer räumlichen Vorstellung für das EXAFS-Modell. Die Kombination der Blickwinkel von beiden Absorberatomen macht es möglich, die gebundenen Substrat- oder Inhibitormoleküle im Raum zwischen dem Eisen- und Kupferatom des $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_B$ -Zentrums festzulegen.

Die geometrische Konstruktion¹⁹⁵ für jedes gebundene Molekül verwendet die Position der beiden Metallatome im Raum als Basis. Der Abstand für diese Fixpunkte ergibt sich aus den EXAFS-Ergebnissen.¹⁹⁶ Aus chemischer Sicht ist weiterhin anzunehmen — und für

¹⁹⁵Die geometrischen Konstruktionen wurden u. a. mit Hilfe des Programms EUKLID DynaGeo (V.2.3c) für Win95/98/NT/2000 von R. Mechling, Offenburg, durchgeführt; <http://www.dynageo.de/>.

¹⁹⁶Für den Abstand der beiden Metallatome ist der Mittelwert verwendet worden, der sich aus dem Ergebnis der Anpassung für die Cu-K- und Fe-K-Kante ergibt.

die Bindung von Cyanid an das aktive Zentrum der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus*¹⁹⁷ ist dies bereits gezeigt worden — dass sich das Stickstoffatom des Histidins am Fe_{a3} -Zentrums, das Eisenatom und das nächstgelegene Atom des gebundenen Inhibitors bzw. des Substrats in einer linearen Anordnung und orthogonal zur Porphyrinebene befinden.

Für das Strukturmodell mit räumlicher Dimension sind die Ergebnisse der Anpassungen verwendet worden. Die einzelnen Ergebnisse für die MS-Einheiten sind in den Tabellen 4.23 und 4.24 aufgelistet.

Tabelle 4.23: Substrat- oder Inhibitormoleküle — Ergebnisse der Anpassungen an die Cu-EXAFS.

ba_3 -Oxidase	Typ	N	R [Å]	A [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
nativ	O	1/3	2,023	0,003	90	0
	O	1/3	2,704	0,007	90	29,85
reduziert	O	1/3	1,993	0,006	90	0
	O	1/3	2,703	0,003	90	30,06
nativ	N	1/3	1,974	0,006	90	0
	C	1/3	2,873	0,005	89,83	23,20
reduziert	N	1/3	2,050	0,007	90	0
	C	1/3	2,727	0,004	93,20	27,38
nativ	N	1/3	2,032	0,003	90	0
	N	1/3	2,579	0,005	93,34	21,46
	N	1/3	3,262	0,005	95,31	37,07
reduziert	N	1/3	2,118	0,005	90	0
	N	1/3	2,625	0,008	93,28	21,42
	N	1/3	3,275	0,003	95,29	37,41

Die einzelnen Atome der Rückstreuungseinheiten müssen sich auf einer Kugeloberfläche mit entsprechendem Abstand vom jeweiligen Absorber befinden. Die geometrische Konstruktion ausgehend von den beiden Metallatomen ergibt dabei Schnittpunkte der unterschiedlichen Konstruktionskugeln, aus denen die Lage der einzelnen Atome bestimmt werden kann.

Der Abstand zwischen den Atomen einer MS-Einheit lässt sich aus dem Winkel Φ und den Abständen der Rückstreuatome vom Absorber berechnen. Die Abstände sind in den jeweiligen Abschnitten angegeben. Obwohl nach der Verfeinerung des Gesamtmodells mit fixierten Einheiten auch diese Einschränkung aufgehoben wurde, sind sich die verschiedenen MS-Einheiten sehr ähnlich. Für den Winkel Φ muss aufgrund der starken Korrelation von Beiträgen des Substrats bzw. Inhibitors mit Beiträgen der Imidazol- und Porphyrinein-

¹⁹⁷Y. Kim, G. T. Babcock, K. K. Surerus, J. A. Fee, R. B. Dyer, W. H. Woodruff, W. A. Oertling, *Biospec.* **1998**, 4, 1 - 15.

Tabelle 4.24: Substrat- oder Inhibitormoleküle — Ergebnisse der Anpassungen an die Fe-EXAFS.

ba ₃ -Oxidase	Typ	N	R [Å]	A [Å ²]	Θ [°]	Φ [°]
nativ	O	1/2	1,874	0,004	90	0
	O	1/2	2,868	0,005	90	18,90
reduziert	O	1/2	1,848	0,004	90	0
	O	1/2	2,910	0,005	90	15,66
nativ	C	1/2	1,819	0,004	90	0
	N	1/2	2,984	0,009	90	15,18
reduziert	C	1/2	1,875	0,005	90	0
	N	1/2	2,982	0,010	90	13,41
nativ	N	1/2	1,908	0,008	90	0
	N	1/2	2,444	0,003	90	24,60
	N	1/2	3,372	0,006	90	48,79
reduziert	N	1/2	1,818	0,004	90	0
	N	1/2	2,332	0,004	90	26,18
	N	1/2	3,259	0,007	90	51,39

heiten eine größere Varianz angenommen werden. Dies gilt insbesondere für die Ergebnisse der Fe-K-Kanten-Messungen.

Die Strukturmodelle für das Fe_{a3}-Cu_B-Zentrum sind in Abschnitt 4.1.8.4.3 (S. 95) dargestellt. Anhand der Abbildungen wird deutlich, dass die gebundenen Einheiten nicht direkt zwischen den beiden Metallatomen des binuklearen Zentrums liegen, sondern sich aufgrund der einzelnen Abstände zwischen den beteiligten Atomen außerhalb der direkten Metall-Metall-Verbindungsline befinden.

Ihre verbrückende Orientierung ist dabei so, dass die mehratomigen Moleküleinheiten *end-on* an die Metallatome gebunden sind — ein Atom dieses Moleküls an das Eisenatom und ein anderes an das Kupferatom.¹⁹³ Auch für die dreiatomige Einheit des Azids, für die die Anzahl der zu berücksichtigenden Parameter größer als in den zweiatomigen Spezies ist, ergibt sich eine *end-on*-Anbindung, wie sie Abbildung 4.39 auf S. 96 dargestellt ist. Dieses Ergebnis steht mit der Untersuchung an der Rinderherz-Oxidase von YOSHIKAWA *et al.* im Einklang,¹⁹⁸ bei der sowohl für den gebundenen Inhibitor „CO“ als auch für das azidinhibierte Derivat der aa₃-Oxidase aus Rinderherz eine derartige Anbindung gefunden wurde. Auch nach Untersuchungen von T. SOULIMANE soll für die ba₃-Oxidase aus *Ther-*

¹⁹³S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, *280*, 1723 - 1729; S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, *30(1)*, 7 - 14; T. Tsukihara, S. Yoshikawa, *Acta Cryst.* **1998**, *A54*, 895 - 904; PDB Id.-Nr.: 2OCC.

mus thermophilus eine *end-on*-Orientierung der gebundenen Moleküle vorliegen,¹⁹⁹ wie sie hier gefunden wurde.

4.1.8.4.3 Strukturmodelle für das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum

Aus den Ergebnissen der Cu-K-Kanten- und Fe-K-Kanten-Messungen lassen sich für die einzelnen Formen der ba_3 -Oxidase Strukturmodelle ableiten (Abbildungen 4.37 bis 4.39). Während die Histidineinheiten und das Porphyrinsystem nur schematisch wiedergegeben sind, wurde versucht, die relative Lage der beiden Metallatome und der Substrat- bzw. Inhibitormoleküle zueinander darzustellen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen sind dabei nur sehr gering. Auffallend ist die gleiche Positionierung der MS-Einheiten im Verhältnis zu den beiden Metallatomen sowohl in den oxidierten als auch reduzierten Spezies.¹⁹³

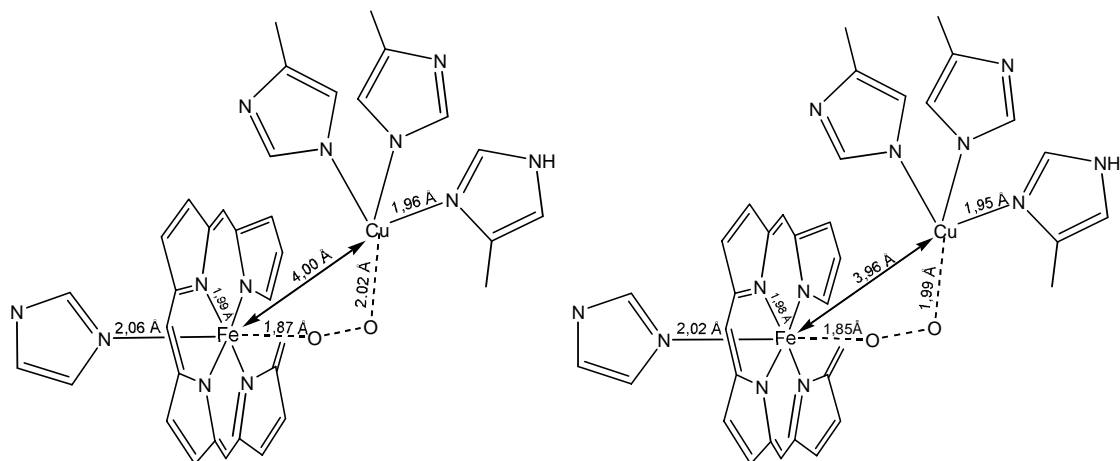


Abbildung 4.37: Strukturmodelle für das Fe_{a_3} - Cu_B -Zentrum. *Links*: native, *rechts*: reduzierte ba_3 -Oxidase.

¹⁹⁹T. Soulimane, *bisher unveröffentlichte Ergebnisse*.

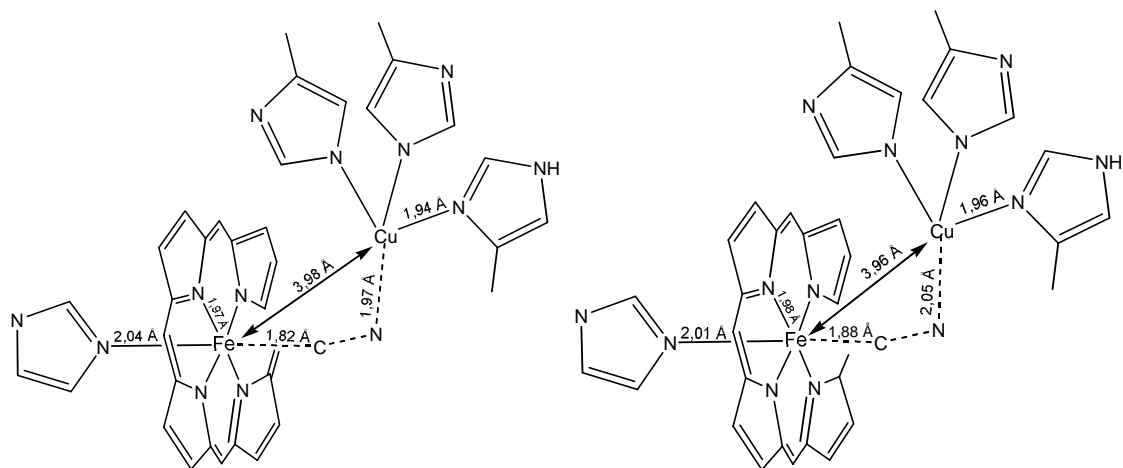


Abbildung 4.38: Strukturmodelle für das $\text{Fe}_{\text{a}3}\text{-Cu}_{\text{B}}$ -Zentrum inhibiert mit Cyanid. *Links:* native, *rechts:* reduzierte ba_3 -Oxidase.

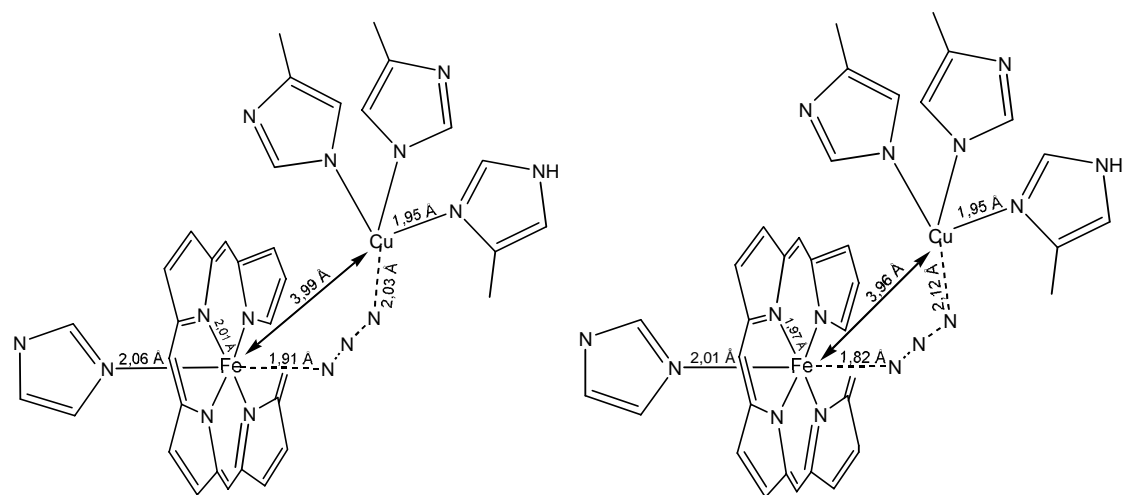


Abbildung 4.39: Strukturmodelle für das $\text{Fe}_{\text{a}3}\text{-Cu}_{\text{B}}$ -Zentrum inhibiert mit Azid. *Links:* native, *rechts:* reduzierte ba_3 -Oxidase.

4.2 EXAFS von Kupferkomplexen

4.2.1 Allgemeines

Die in dieser Arbeit untersuchten Kupferkomplexe sind in Tabelle 4.25 (S. 98) aufgelistet. Neben der Summenformel und der hier verwendeten Kurzbezeichnung enthält die Auflistung Informationen über die Proben und die Messungen.²⁰⁰ Die Molekülstrukturen der Komplexe und spezielle Informationen über die Messungen sind in den einzelnen Abschnitten dargestellt. Die vergleichende Interpretation der Ergebnisse erfolgt für alle Kupferkomplexe in Abschnitt 4.2.6 (ab S. 132).

4.2.2 EXAFS von [CuI(btmgp)]

4.2.2.1 Allgemeines

Der Komplex [CuI(btmgp)] (*CuIbtmgp*) besteht aus einem Kupferatom, das durch den zweizähnigen 1,3-Bis(N,N'-tetramethyl)guanidino-propan-Liganden²⁰¹ (*btmgp*) und ein Iodatombond koordiniert ist. Die Kristallstruktur ist in Abbildung 4.40 dargestellt.

4.2.2.2 Kristalline Form

Kristalle des Komplexes *CuIbtmgp* wurden mit Polyethylen-Pulver unter Inertgasbedingungen verrieben und in einer EXAFS-Küvette schockgefroren.

Die EXAFS-Messung an der Cu-K-Kante erfolgte bei 20 K im Absorptionsmodus. Das Cu-K-Kanten-Spektrum wurde aus vier Scans gemittelt. Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1364 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 – 1100 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.41 dargestellt. Nach Anwendung des Programms DEPP¹⁷⁹ verbleiben 819 Datenpunkte.

Die an das Kupfer koordinierenden Stickstoffatome des *btmgp*-Liganden und das Iodatombond bilden die Beiträge der ersten Koordinationssphäre im EXAFS-Spektrum. Mit der Anpassung dieser beiden Schalen für die drei Rückstreuuatome ist bereits eine gute Simulation der experimentellen Daten möglich. Die Stickstoff- und Iodrückstreuer haben einen Abstand

²⁰⁰Vgl. J. Schneider, *Heteroleptische Kupferkomplexe mit Stickstoff- und Chalkogenliganden*, Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, Shaker, Aachen, **2001**.

²⁰¹S. Pohl, M. Harmjanz, J. Schneider, W. Saak, G. Henkel, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3473 - 3479.

Tabelle 4.25: Untersuchte Kupferkomplexe.

Probe (<i>Kurzbezeichnung in Kursivschrift</i>)	Zustand	Konzentration ^{a)}	Mess- temperatur	Anzahl der Spektren
[CuI(btmgp)] (<i>CuIbtmgp</i>)	kristallin	46,6 mg/ 100 mg PE	20 K	4
[Cu ₂ (STipPh) ₂ (btmgp)] (<i>CuSTip</i>)	kristallin	21,7 mg/ 100 mg PE	20 K	7
	kristallin	21,7 mg/ 100 mg PE	300 K	4
	kristallin	21,7 mg/ 100 mg PE	230 K	1
	kristallin	21,7 mg/ 100 mg PE	150 K	2
	kristallin	21,7 mg/ 100 mg PE	80 K	1
	kristallin	21,7 mg/ 100 mg PE	20 K	1
	gelöst in THF	0,14 mol/l	20 K	4
	gelöst in Toluol	0,14 mol/l	20 K	4
[Cu ₂ (SBtmsPh) ₂ (btmgp)] (<i>CuSi</i>)	kristallin	42,6 mg/ 100 mg PE	20 K	2
	kristallin	42,6 mg/ 100 mg PE	150 K	6
	gelöst in THF	0,33 mol/l	20 K	7
[Cu(STtbPh)btmgp] (<i>CuTT</i>)	gelöst in THF	0,65 mol/l	20 K	4

^{a)} PE: Polyethylen-Pulver, spektralfotometrische Qualität, ALDRICH.

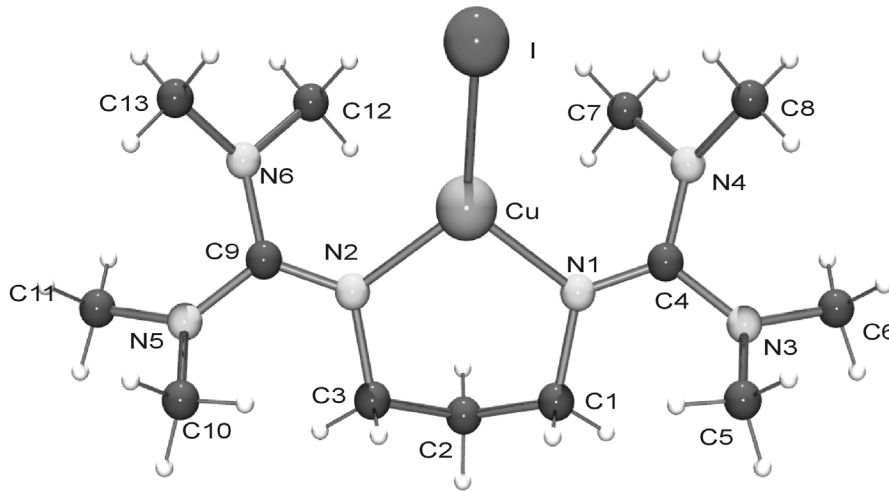
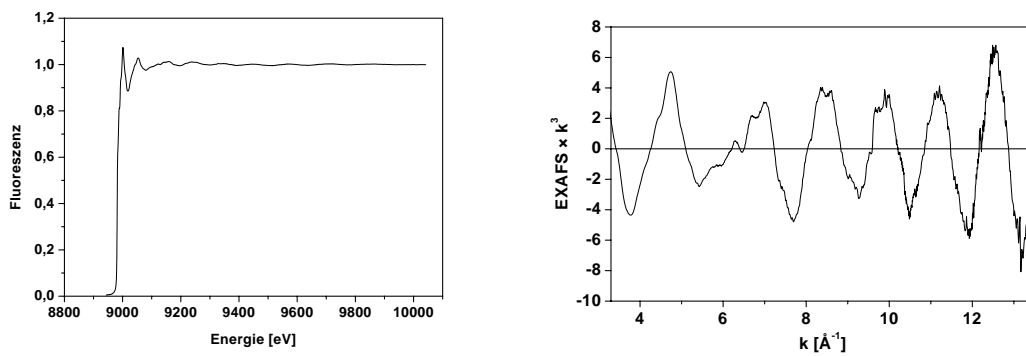


Abbildung 4.40: [CuI(btmgp)] — Kristallstruktur.

Abbildung 4.41: [CuI(btmgp)] — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

vom Absorber von 1,98 Å bzw. 2,49 Å. Sowohl die Phasen als auch die Amplituden der Feinstruktur werden gut simuliert.

Das vollständige Startmodell wurde mit Informationen aus der Kristallstruktur aufgestellt und besteht aus insgesamt sieben Schalen. Gleiche Rückstreuer mit ähnlichem Abstand vom Absorber sind darin zu einer Schale zusammengefasst. Das Ergebnis der besten Anpassung ist in Tabelle 4.26 dargestellt. Die Abbildung 4.42 zeigt die Fourier-gefilterte,

Tabelle 4.26: [CuI(btmgp)] — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 13,66$) und Kristallstrukturdaten (XRD).

Typ	EXAFS			XRD ²⁰⁰
	N	R [Å]	A [Å ²]	R [Å]
N	2,0	1,983	0,005	1,998*
I	1,0	2,489	0,004	2,4777(8)
C	4,0	2,959	0,006	2,934*
C	3,0	3,193	0,005	3,167*
N	2,0	3,330	0,006	3,301*
N	2,0	3,965	0,006	4,144*
C	2,0	4,200	0,008	4,206*

*Wert gemittelt

k^3 -gewichtete Feinstruktur und die zugehörige Fourier-Transformierte zusammen mit der besten Anpassung.

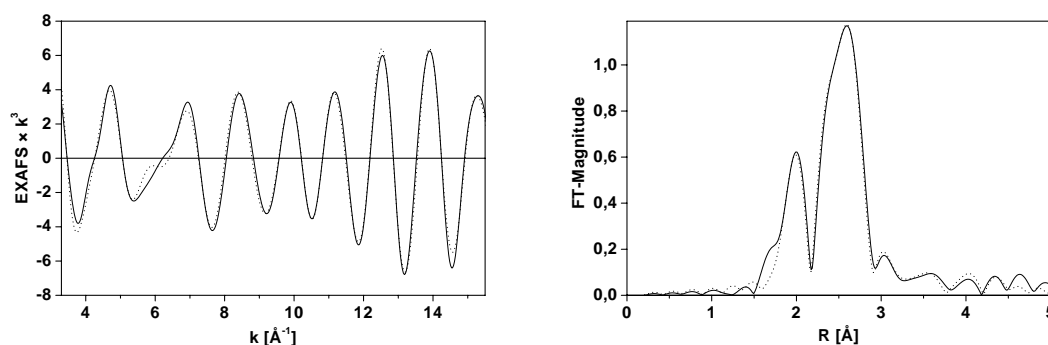


Abbildung 4.42: [CuI(btmgp)] — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Die EXAFS-Struktur enthält die Rückstreuatome bis zu einem Abstand vom Absorber von ungefähr 4,2 Å. Die Debye-Waller-Parameter der einzelnen Schalen besitzen Werte,

die in einem physikalisch sinnvollen Bereich liegen. Die Beiträge der Stickstoff- und die Kohlenstoffrückstreuer mit einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 4 \text{ \AA}$ überlagern sich, so dass es bei der Simulation zu einer gegenseitigen Beeinflussung der zugehörigen Schalen kommt. Der Abstand dieser Stickstoffrückstreuer ist daher gegenüber den gemittelten Abstandswerten aus der Kristallstrukturanalyse um $0,18 \text{ \AA}$ verkürzt und liegt bei $3,97 \text{ \AA}$.

4.2.3 EXAFS von $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$

4.2.3.1 Allgemeines

In dem binuklearen Kupferkomplex $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSTip*) sind die beiden Kupferatome über eine Schwefelfunktion verbrückt (Abbildung 4.43). Ein Kupferatom ist trigonal-planar durch die μ -Schwefelfunktion und zwei Stickstoff-Donorfunktionen des *btmgp*-Liganden koordiniert, während das andere eine verzerrt lineare Anordnung aus μ -Schwefelfunktion und terminalem Schwefelliganden besitzt.

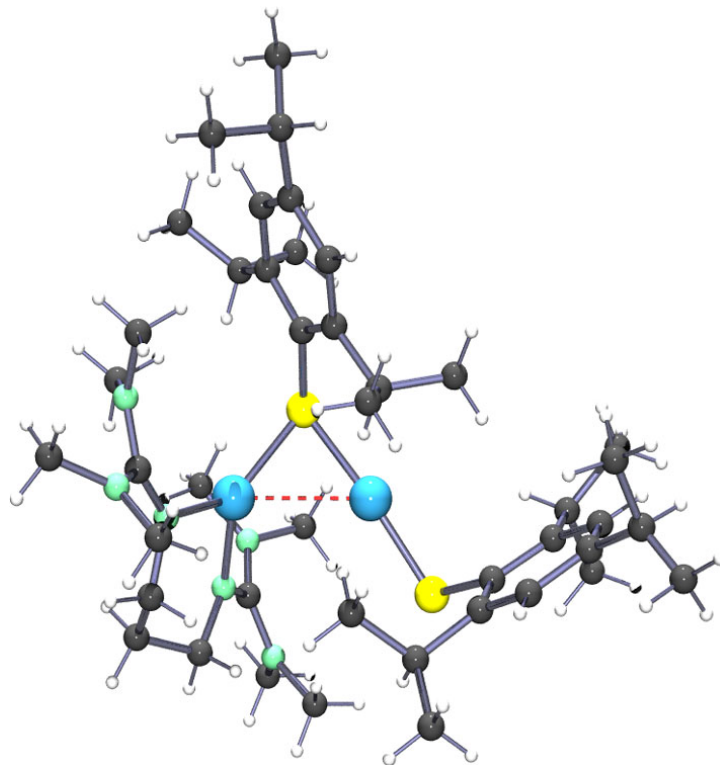


Abbildung 4.43: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ — Kristallstruktur.

Der homobinukleare Komplex leitet sich in Bezug auf seinen Cu_2S_2 -Kern vom Cu_A -Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase durch das Öffnen einer Schwefelbrücke ab. Der asymmetrische Aufbau von *CuSTip* mit einer Schwefelbrückenfunktion und einem terminal gebundenen Schwefelatom ist wahrscheinlich auf einen Festkörpereffekt zurückzuführen. Die Ergebnisse von NMR- und Resonanz-Raman-Untersuchungen weisen hingegen darauf hin, dass der homobinukleare Komplex in Lösung seine Molekülstruktur ändert und symmetrisch vorliegt.

Die Verbindung *CuSTip* ist daher in dieser Arbeit mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie sowohl in kristalliner als auch in gelöster Form untersucht worden. Weiterhin soll sich im kristallinen Komplex der Cu-Cu-Abstand nach den Ergebnissen zweier Kristallstrukturanalysen mit der Temperatur ändern. Kristalle von *CuSTip* wurden deshalb auch bei unterschiedlichen Temperaturen röntgenabsorptionsspektroskopisch untersucht.

4.2.3.2 Kristalline Form — Tieftemperatur

Die kristalline Form des Komplexes $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSTip*) ist im Absorptionsmodus bei 20 K gemessen worden. Der Vergleich aller Spektren untereinander schließt eine Schädigung der Probe während der Messung aus.

Das Cu-K-Kanten-Spektrum wurde aus sieben Scans gemittelt. Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 774 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 – 650 eV oberhalb der Absorptionskante, da eine Störung im Spektrum bei 9660 eV (Zink-K-Kante) vorhanden war. Die Ursache für diese Störung war in den Einzelspektren nicht erkennbar und tritt bei allen hier untersuchten kristallinen Kupferkomplexen auf. Die Störung wird in Abschnitt 4.2.6 ab S. 132 erläutert und diskutiert.

In Abbildung 4.44 sind das gemessene Absorptionsspektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur dargestellt.²⁰² In dem Cu-K-Kanten-Spektrum ist im Kantenbereich das Merkmal für eine Cu^{I} -Spezies angedeutet erkennbar.

Die erste Koordinationssphäre der beiden Absorberatome besteht aus zwei Stickstoffrückstreubeiträgen des an ein Kupferatom koordinierenden *btmgp*-Liganden, zwei Schwefelbeiträgen der verbrückenden Schwefelfunktion, einem Schwefelbeitrag für das terminal gebundene Schwefelatom sowie jeweils einem Kupferrückstreubeitrag pro Absorberatom Kupfer. Im Startmodell werden die beiden Stickstoff- und die drei Schwefelrückstreubeiträge jeweils zu einer Schale zusammengefasst, da sich die Abstände der Rückstreuer vom Absorber kaum unterscheiden. Die Anpassung der Schalen für diese Hauptbeiträge führt

²⁰²T. Meyer, J. Schneider, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *HASYLAB Users Meeting*, Posterbeitrag, Hamburg, 1999.

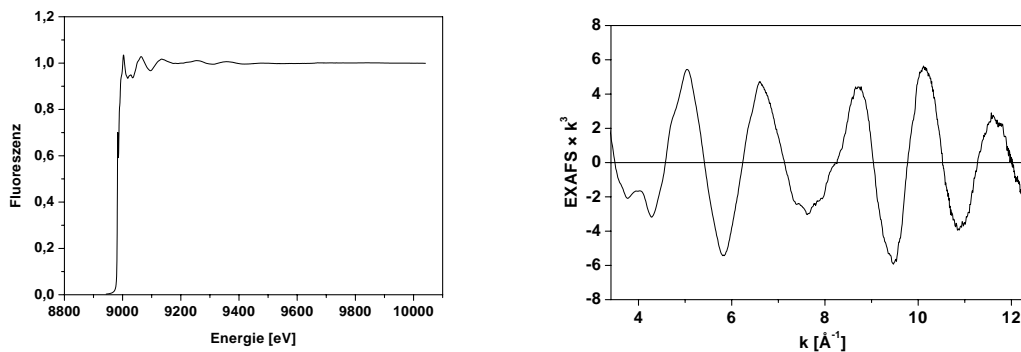


Abbildung 4.44: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

bereits zu einer guten Simulation des Spektrums, in der die Phasen der Feinstruktur gut wiedergegeben werden.

Für die Aufstellung des vollständigen Startmodells sind weitere Informationen aus der Kristallstruktur verwendet worden. Beiträge von gleichen Rückstreuatomen mit ähnlichem Abstand vom Absorber sind auch hier zu gemeinsamen Schalen zusammengefasst worden (Rückstreueinheiten). Das Startmodell besteht aus insgesamt 9 Schalen. Beiträge von Rückstreuern oberhalb eines Absorber-Rückstreuer-Abstands von $3,7 \text{ \AA}$ sind durch Fourier-Filterung aus dem Spektrum entfernt worden.

Das Ergebnis der EXAFS-Analyse ist in Tabelle 4.27 dargestellt,²⁰³ Abbildung 4.45 zeigt die k^3 -gewichtete Feinstruktur sowie die Fourier-Transformierte jeweils mit der besten Anpassung.

Ab einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 3 \text{ \AA}$ kommt es hier zur Überlagerung verschiedener Rückstreubeiträge, so dass die einzelnen Schalen miteinander korreliert sind. Dies führt zu einer Beeinflussung der Abstände und Debye-Waller-Parameter dieser Schalen, die durch die gebildeten Rückstreueinheiten zusätzlich verstärkt wird.

Ein Vergleich der EXAFS-Struktur mit den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse zeigt die Unterschiede in den Abständen für die einzelnen Atome bzw. Atomeinheiten. Während der mittlere Abstand der Schwefelatome vom Absorberatom Kupfer wie in der Kristallstruktur $\sim 2,18 \text{ \AA}$ beträgt, ist der Cu-N-Abstand der EXAFS-Struktur mit $\sim 1,98 \text{ \AA}$ um ungefähr $0,04 \text{ \AA}$ kürzer als der mittlere Cu-N-Abstand in der Kristallstruktur. Der Unterschied für diesen Absorber-Leichtstreuer-Abstand der ersten Koordinationssphäre ist ungewöhnlich

²⁰³G. Henkel, J. Schneider, T. Meyer und B. Lippold, *J. Bioinorg. Chem.* **2001**, *86*, 258.

Tabelle 4.27: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btm gp})]$ (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 8,99\%$) und Kristallstrukturdaten (XRD, Messtemperatur: 150 K).

Typ	EXAFS			XRD ²⁰⁰
	N	R [Å]	A [Å ²]	R [Å]
N	1,0	1,978	0,002	2,018*
S	1,5	2,175	0,005	2,177*
Cu	1,0	2,653	0,007	2,693(1)
N	1,0	3,318	0,003	3,355*
N	0,5	3,696	0,005	3,477(3)
C	2,0	2,976	0,003	2,971*
C	1,5	3,140	0,004	3,124*
C	1,0	3,183	0,010	3,220*
C	1,5	3,358	0,003	3,417*

*Wert gemittelt

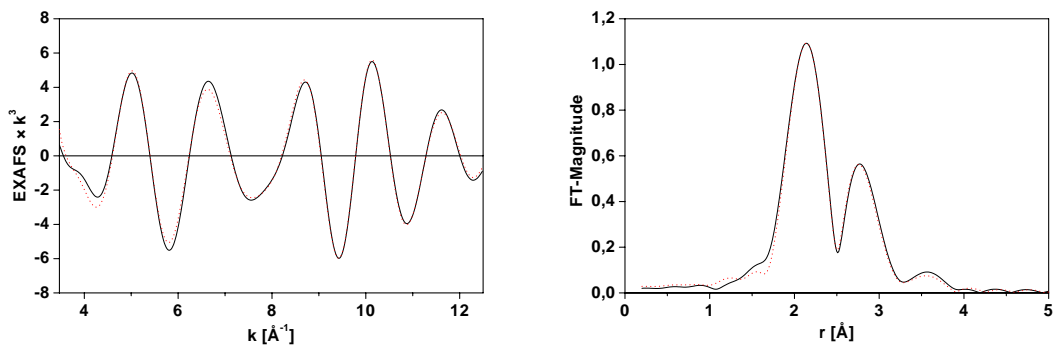


Abbildung 4.45: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btm gp})]$ (kristallin) — k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

groß. Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes *CuSTip* bestätigen das Ergebnis für die tiefe Temperatur.

Der Cu–Cu-Abstand beträgt in der EXAFS-Struktur 2,65 Å. Er ist damit gegenüber dem Ergebnis der Kristallstrukturanalyse für die Messung bei 150 K (2,69 Å) deutlich kürzer. Dieses Resultat wird zusammen mit den weiteren Ergebnissen in Abschnitt 4.2.6 ab S. 132 gemeinsam diskutiert.

4.2.3.3 Kristalline Form — Temperaturreihe

Kristalle des Komplexes $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSTip*) wurden zusätzlich zur Messung bei tiefer Temperatur auch bei höheren Temperaturen röntgenabsorptionsspektroskopisch im Absorptionsmodus untersucht. Dazu wurde eine weitere Probe beginnend bei Raumtemperatur (300 K) stufenweise über 230 K, 150 K und 80 K auf 20 K im Kryostaten der Messapparatur abgekühlt und gemessen. Die Parameter der jeweils extrahierten Feinstruktur sind für die verschiedenen Temperaturen in Tabelle 4.28 dargestellt. In den Spektren ist eine Störung bei 9660 eV (Zn-K-Kante) vorhanden. Diese wird in Abschnitt 4.2.6 (S. 132) erläutert und diskutiert.

Tabelle 4.28: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Parameter der Feinstrukturen für die Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen.

Mess- temperatur	Anzahl der verwendeten Spektren	Energie- bereich ^a [eV]	Anzahl der Daten- punkte
300 K	4	15 – 620	924
230 K	1	15 – 620	924
150 K	2	15 – 620	925
80 K	1	15 – 620	925
20 K	1	15 – 615	892

^a oberhalb der Absorptionskante

Das Signal/Rausch-Verhältnis in den Spektren ist sehr gut. Beispielhaft sind in Abbildung 4.46 die extrahierten k^3 -gewichteten Feinstrukturen für die Messungen bei 300 K und 230 K zum Vergleich abgebildet. Die Feinstruktur für die Messung bei 300 K wurde aus vier Einzelspektren gemittelt. Von der Probe wurden bei dieser Temperatur mehrere Scans aufgenommen, da bei der Vorauswertung an der Beamline für das erste Spektrum

eine Fourier-Transformierte erhalten wurde, die aufgrund der bekannten Tieftemperaturmessdaten nicht erwartet worden war. Die gemessenen Daten wurden durch weitere Scans verifiziert. Auch bei 150 K sind aus den gleichen Gründen zwei Spektren gemessen worden, die beide für die Auswertung verwendet wurden.

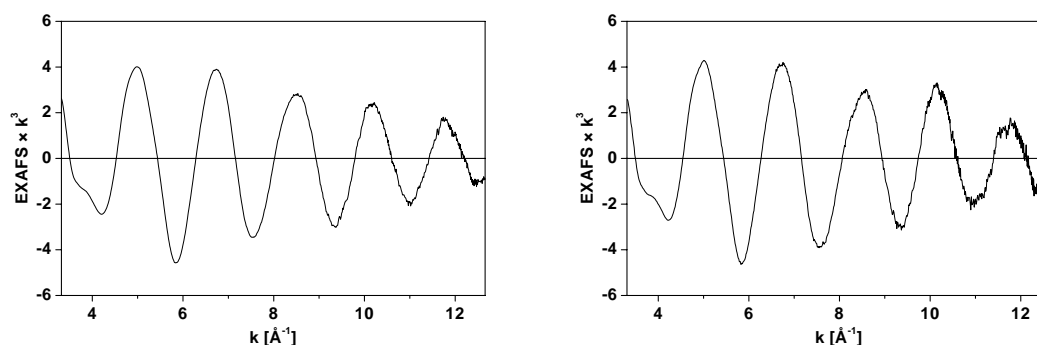


Abbildung 4.46: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — k^3 -gewichtete Feinstrukturen der Messungen bei 300 K (links) und 230 K (rechts).

Ein Vergleich der k^3 -gewichteten Feinstruktur der Messung bei 20 K mit dem vergleichbaren Spektrum für eine andere kristalline Probe von *CuSTip* zeigt keine erkennbaren Unterschiede. Die Probe für die temperaturabhängige Messung hat demnach keine Strahlenschädigung erfahren.

Die Temperaturänderung zeigt sich in der Feinstruktur in einer Verringerung der Amplituden und einer geringfügigen Phasenverschiebung (Abbildung 4.47). Im Co-Plot der zugehörigen Fourier-Transformierten ist die Veränderung mit der Temperaturabnahme sehr deutlich erkennbar. Die Höhe der Peaks im Bereich von $2,0 \text{ \AA}$ und $2,7 \text{ \AA}$ der Fourier-Transformierten nimmt mit steigender Temperatur stark ab. Dies gilt insbesondere für den Peak bei $2,7 \text{ \AA}$, der hauptsächlich durch den Beitrag der Kupferrückstreuer hervorgerufen wird. Eine Ausnahme scheint das Spektrum der 80 K-Messung darzustellen (Abbildung 4.47), bei der das Maximum des ersten Hauptpeaks in der Fourier-Transformierten unterhalb des Peakmaximums der 150 K-Messung liegt. Der Peak der Messung bei 80 K besitzt jedoch eine größere Breite und die Höhe ist deshalb reduziert.

Da zwischen dem hier bei 20 K gemessenen Spektrum und dem Spektrum der Tieftemperaturmessung aus Abschnitt 4.2.3.2 keine Unterschiede erkennbar sind, wird das Ergebnis der Tieftemperaturmessung als Grund- bzw. als Startmodell für die Anpassung verwendet. Rückstreubeiträge oberhalb eines Absorber-Rückstreuer-Abstands von $3,7 \text{ \AA}$ sind durch Fourier-Filterung aus dem Spektrum entfernt worden. Die Ergebnisse der besten Anpas-

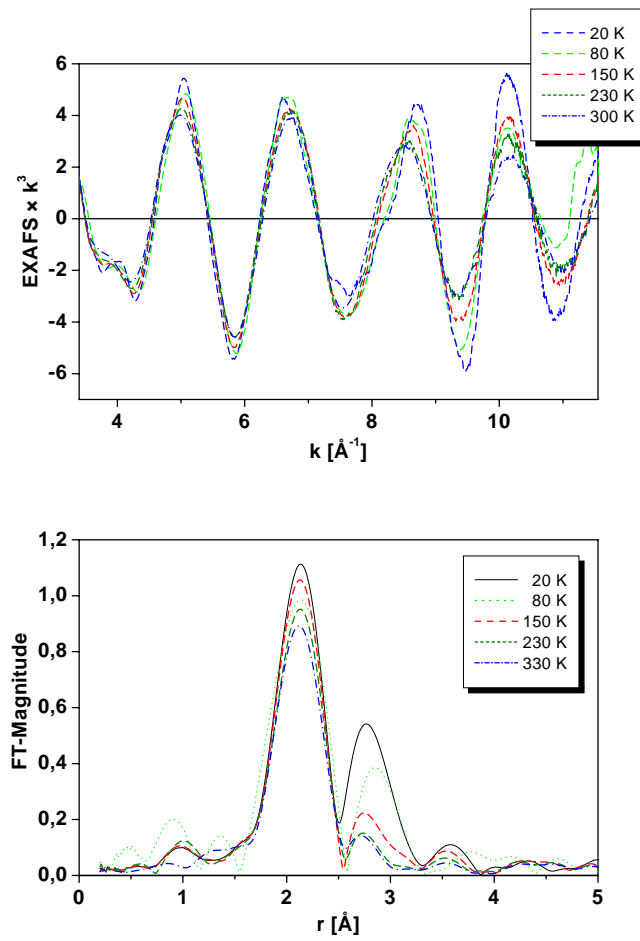


Abbildung 4.47: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen (oben) und Fourier-Transformierte (unten) der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen.

sung für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen sind in Tabelle 4.29 (S. 109) gezeigt. Die k^3 -gewichteten Feinstrukturen und die zugehörigen Fourier-Transformierten sind zusammen mit der besten Anpassung in den Abbildungen 4.48 bis 4.51 dargestellt. Die Darstellung für die Messung bei 20 K ist in Abbildung 4.45 (S. 104) enthalten.

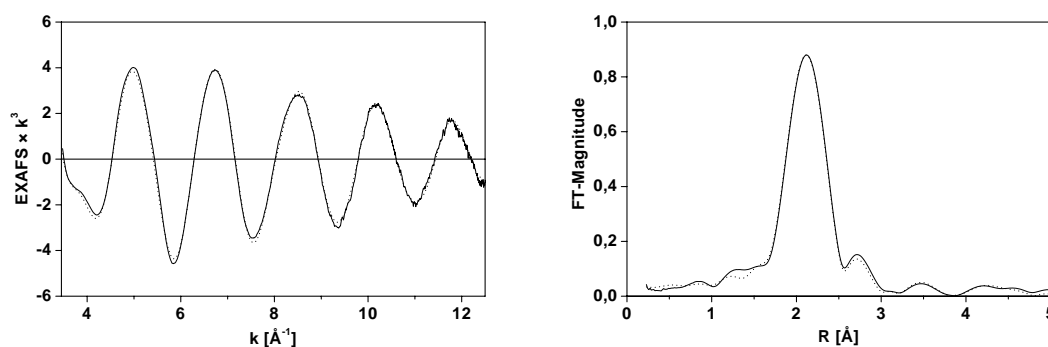


Abbildung 4.48: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin, 300 K) — k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

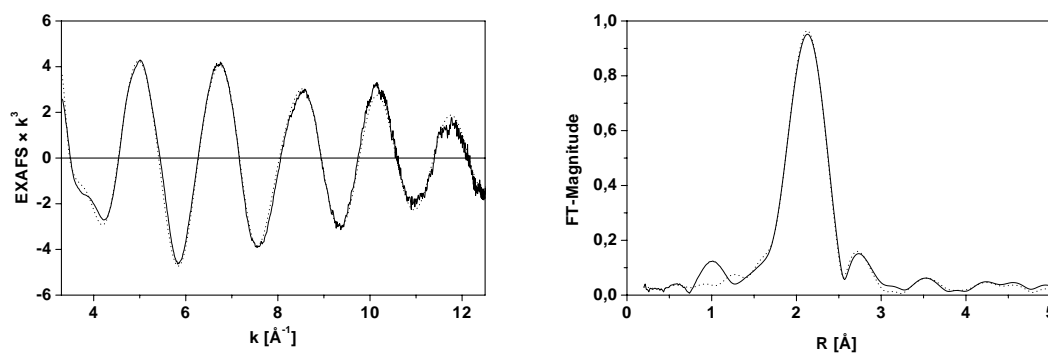


Abbildung 4.49: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin, 230 K) — k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturen zeigen sich im Wesentlichen in den Debye-Waller-Parametern. Mit zunehmender Temperatur werden die Debye-Waller-Parameter größer. Besonders deutlich ist dieser Trend für die Rückstreubeiträge des Kupfers (Tabelle 4.30, S. 110). Die Auftragung der Debye-Waller-Parameter gegen die Temperatur ist in Abbildung 4.52 dargestellt. Bei einer linearen Abhängigkeit dieses Parameters von der Temperatur liegen alle Werte in einem Konfidenzintervall²⁰⁴ von 95 %.

²⁰⁴Konfidenzintervall: Bereich, der mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit die betrachteten Ergebnisse enthält (statistische Fehlerspanne).

Tabelle 4.29: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Ergebnisse für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen.

<i>Typ</i>	<i>N</i>	300 K (R = 10,55 %)		230 K (R = 11,26 %)		150 K (R = 9,73 %)		80 K (R = 13,77 %)		20 K (R = 8,99 %)	
		<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]
N	1,0	1,964	0,009	1,940	0,009	1,944	0,005	1,952	0,001	1,978	0,002
S	1,5	2,161	0,008	2,164	0,006	2,164	0,004	2,174	0,005	2,175	0,005
Cu	1,0	2,649	0,066	2,661	0,050	2,645	0,024	2,650	0,017	2,653	0,007
N	1,0	3,259	0,011	3,259	0,004	3,261	0,003	3,276	0,004	3,318	0,003
N	0,5	3,640	0,008	3,658	0,005	3,674	0,003	3,361	0,003	3,696	0,005
C	2,0	2,956	0,007	2,961	0,002	2,965	0,006	2,972	0,005	2,976	0,003
C	1,5	3,132	0,009	3,136	0,002	3,146	0,005	3,044	0,005	3,140	0,004
C	1,0	3,145	0,009	3,136	0,007	3,130	0,014	3,105	0,012	3,183	0,010
C	1,5	3,387	0,004	3,376	0,002	3,395	0,001	3,267	0,001	3,358	0,003

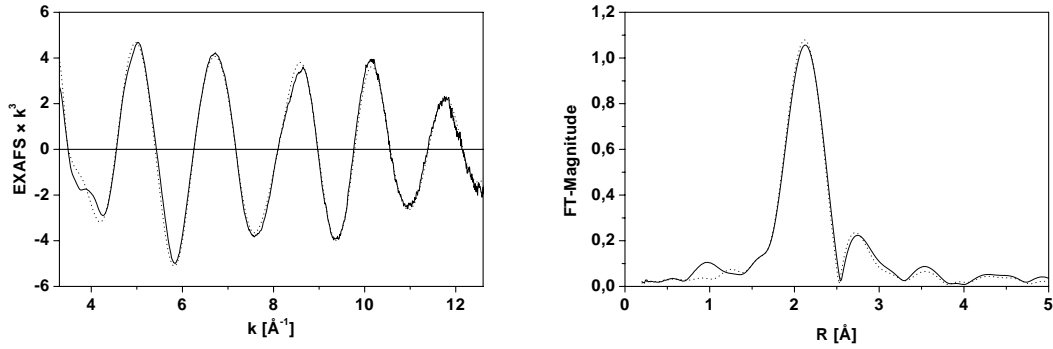


Abbildung 4.50: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin, 150 K) — k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

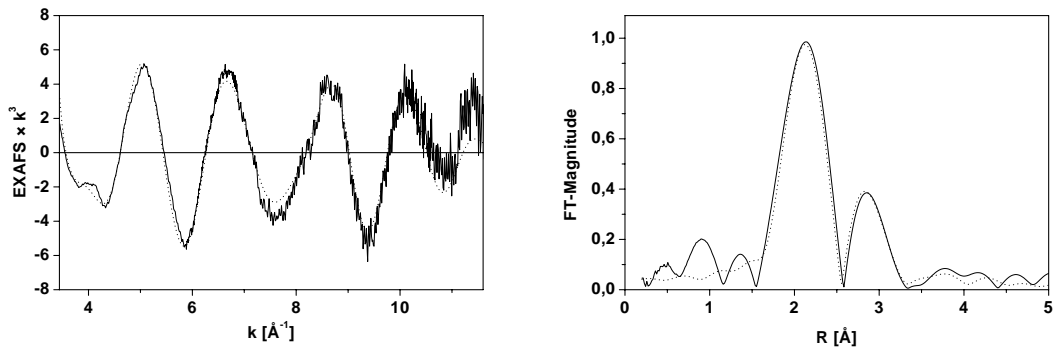


Abbildung 4.51: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin, 80 K) — k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Tabelle 4.30: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Ergebnisse für die Kupferschale für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen.

Mess- temperatur	Cu–Cu	
	R [\AA]	A [\AA^2]
300 K	2,649	0,066
230 K	2,661	0,050
150 K	2,645	0,024
80 K	2,650	0,017
20 K	2,653	0,007

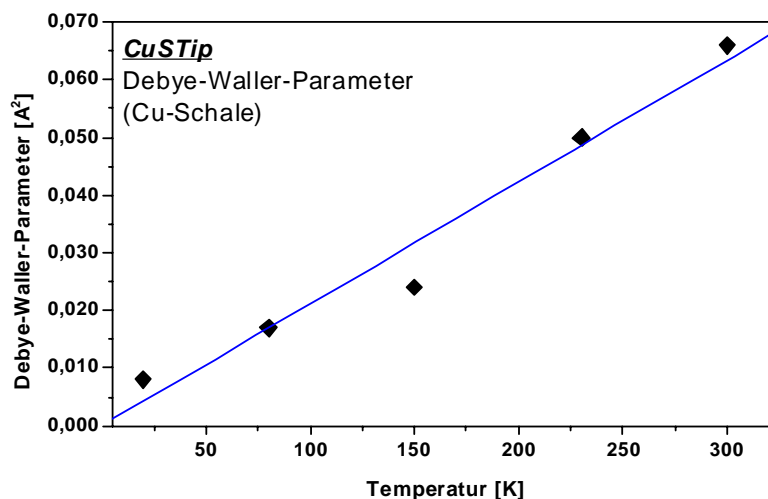


Abbildung 4.52: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Auftragung der Debye-Waller-Parameter der Kupferschale gegen die Temperatur.

Nach der Anpassung des Startmodells an die jeweiligen experimentellen Daten ist auch ein EXAFS-Parameter-Scan²⁰⁵ durchgeführt worden, bei dem der Abstand des Kupferrückstreuatoms im Intervall von 2,5 – 2,8 Å schrittweise verändert und der resultierende R-Faktor errechnet wurde. Das Ergebnis ist als Auftragung des R-Faktors gegen den Abstand des Kupferrückstreuers vom Absorber in Abbildung 4.53 für alle Messungen gemeinsam dargestellt. Für den Abstand des Kupferrückstreuatoms vom Absorber ergibt sich jeweils ein absolutes Minimum, das mit abnehmender Temperatur um so deutlicher hervortritt.

Die beiden Kurven für die Messung bei 230 K und bei 300 K verlaufen sehr flach, und die Minima treten nicht so deutlich hervor wie für die Messungen bei tieferen Temperaturen. Unabhängig von der Temperatur liegen alle Tiefpunkte jedoch ungefähr im gleichen Bereich. Nach dem Ergebnis der EXAFS-Analyse tritt somit keine Änderung des Cu–Cu-Abstands mit der Temperatur auf.

Nach dem Ergebnis zweier Kristallstrukturanalysen hingegen verringert sich der Abstand der beiden Kupferatome mit abnehmender Temperatur von 2,739 Å (Messtemperatur: 300 K) auf 2,693 Å (Messtemperatur: 150 K).²⁰⁰ Wird der Cu–Cu-Abstand im EXAFS-Modell für die Messung bei 300 K auf den Abstandswert von 2,739 Å aus der Kristallstruktur gesetzt und bei der Verfeinerung der übrigen Parameter des Modells festgehalten, so ergibt sich eine geringfügig schlechtere Anpassung, als in Tabelle 4.29 (S. 109) dargestellt. Für die Daten der Messung bei 150 K hingegen führt eine Fixierung des Cu–Cu-Abstandes

²⁰⁵Mit einem EXAFS-Parameter-Scan wird ein zweidimensionaler Schnitt durch den (n+1)-dimensionalen Lösungsraum betrachtet.¹⁷⁹

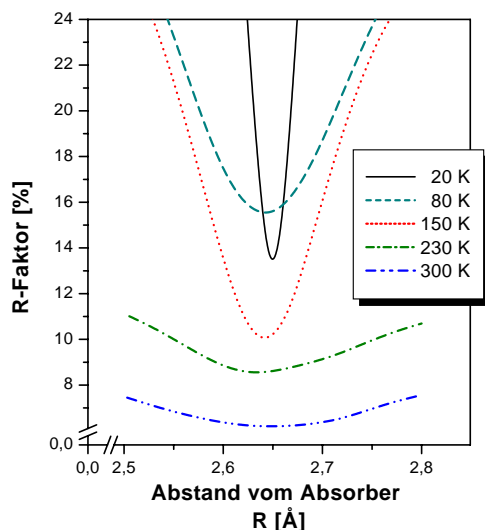


Abbildung 4.53: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Änderung des R-Faktors bei Variation des Cu–Cu-Abstands für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen.

auf 2,693 Å nach dem Ergebnis der korrespondierenden Kristallstrukturanalyse zu einer deutlich schlechteren Anpassung, bei der die Parameter des EXAFS-Modells Werte annehmen, die außerhalb eines physikalisch sinnvollen Bereichs liegen.

Demnach sind die Ergebnisse von EXAFS-Untersuchung und Kristallstrukturanalyse in Bezug auf den Cu–Cu-Abstand nicht konsistent, und es besteht im Vergleich zur Kristallstruktur bei 150 K für den Cu–Cu-Abstand eine Abweichung von 0,04 – 0,05 Å. Auf diesen Unterschied wird in Abschnitt 4.2.6 (S. 132) im Zusammenhang mit den weiteren Ergebnissen eingegangen.

4.2.3.4 Gelöste Form

Die beiden Thiolatfunktionen des kristallinen Komplexes $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (*Cu-STip*) sind nicht äquivalent. Im ^1H -NMR-Spektrum werden daher für diese Protonen zwei Sätze an Signalen erwartet. Da jedoch nur ein Satz an Signalen für die Thiolatfunktionen erhalten wird,^{200,206} deutet dies auf äquivalente Thiolatfunktionen im gelösten Zustand des Komplexes und damit auf das Vorliegen einer anderen Struktur der Verbindung in Lösung hin.^{189,190}

²⁰⁶Messungen in CDCl_3 bei 297 K mit einem DRX 500 Advanced der Fa. BRUKER.

Resonanz-Raman-Messungen, die an der kristallinen und der in CD_2Cl_2 gelösten Substanz durchgeführt wurden,²⁰⁰ zeigen ebenfalls große Unterschiede, die nicht auf einen dynamischen Austausch der Thiolatfunktionen, sondern auf eine Strukturänderung des Komplexes hindeuten.

EXAFS ist die einzige Methode für die Strukturaufklärung von Verbindungen in Lösung, die direkte Aussagen über die Art der Atome und deren Abstand vom Absorberatom ermöglicht. Der Komplex *CuSTip* wurde daher in gelöster Form röntgenabsorptionsspektroskopisch an der Cu-K-Kante bei 20 K im Absorptionsmodus untersucht. Da Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel zusätzlich koordinierende Eigenschaften in Bezug auf den Komplex *CuSTip* besitzen könnte, ist außerdem Toluol als nicht-koordinierendes Lösungsmittel eingesetzt worden. Die Konzentration beider Proben betrug 0,14 mol/l.

Die Spektren wurden jeweils aus vier Scans gemittelt. Die extrahierte Feinstruktur der in THF gelösten Probe besteht aus 971 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 – 1000 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.54 dargestellt.

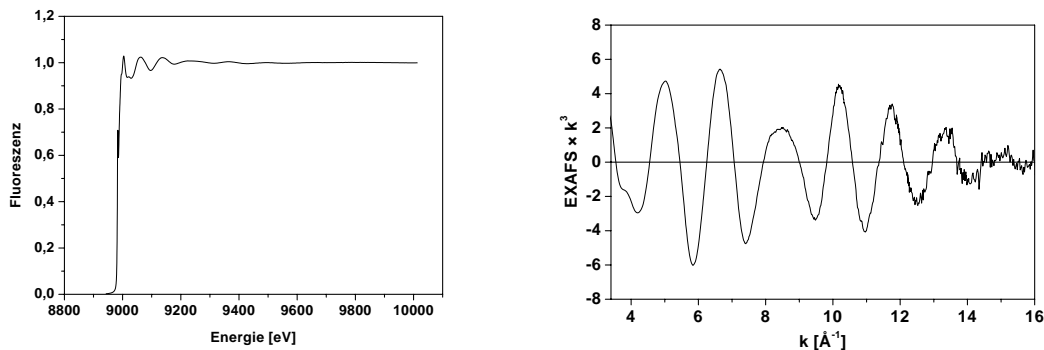


Abbildung 4.54: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst in THF) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

Die extrahierte Feinstruktur der in Toluol gelösten Probe besteht aus 1028 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 – 1100 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.55 dargestellt.

In Abbildung 4.56 ist ein Co-Plot der beiden k^3 -gewichteten Feinstrukturen zusammen mit der k^3 -gewichteten Feinstruktur der kristallinen Form von *CuSTip* gezeigt.^{183,202} Die beiden Feinstrukturen der gelösten Formen von *CuSTip* sind sich in Amplitude und Phase sehr ähnlich, weichen aber von dem Spektrum der kristallinen Form stark ab. Auch in

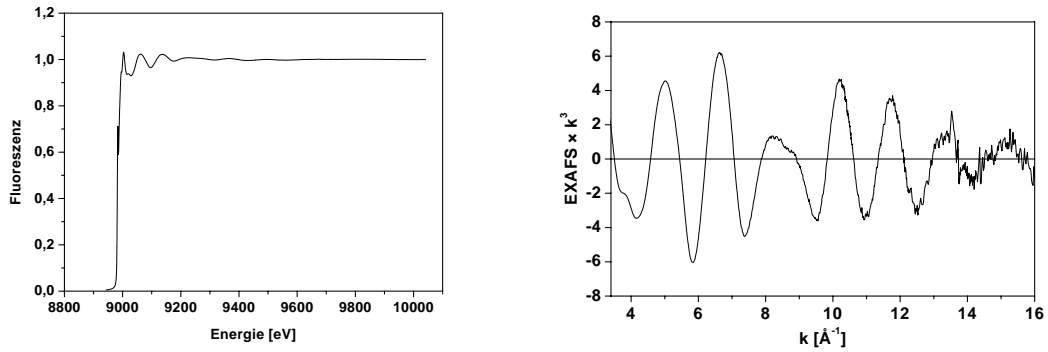


Abbildung 4.55: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst in Toluol) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

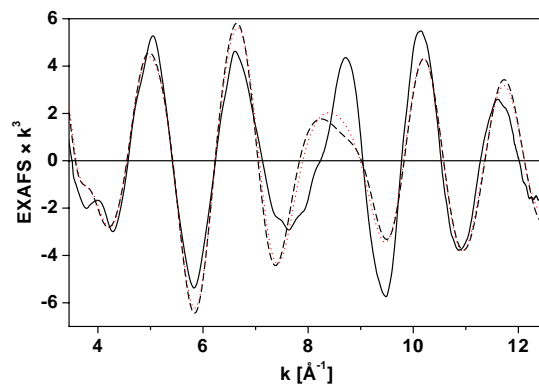


Abbildung 4.56: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen des Komplexes in kristalliner Form (—) und gelöst in Toluol (- -) bzw. THF (···).

der Fourier-Transformierten sind die Unterschiede zwischen dem kristallinen und gelösten Komplex *CuSTip* zu erkennen.

Das Startmodell für die Anpassung der ersten Koordinationssphäre besteht wie für die Anpassung der kristallinen Form des Komplexes jeweils aus einer Stickstoff-, einer Schwefel- und einer Kupferschale. Das Ergebnis für den kristallinen Komplex der Tieftemperaturmessung ist als Vorgabe für die Besetzungszahlen, die Abstände und Debye-Waller-Parameter der einzelnen Schalen verwendet worden.

Nach der Anpassung der Abstände und der Debye-Waller-Parameter zeigt sich, dass das Modell die experimentellen Daten nicht gut simuliert. In der Fourier-Transformierten ist eine große Abweichung im Abstandsbereich von 2,2 Å vorhanden. Bei der Verfeinerung der Besetzungszahl für die eingesetzte Schwefelschale vergrößert sich dieser Parameter auf den Wert zwei. Im Mittel existieren damit pro Absorberatom Kupfer zwei Schwefelbeiträge mit gleichem Abstand vom Absorber. Die Anpassung führt zu einer guten Simulation der Phasen und Amplituden der Feinstruktur.

Das Startmodell wird um weitere Schalen abgeleitet aus der EXAFS-Struktur für die kristalline Form ergänzt. Rückstreubeiträge oberhalb eines Absorber-Rückstreuer-Abstands von 3,7 Å sind auch hier durch Fourier-Filterung aus dem Spektrum entfernt worden. In Tabelle 4.31 ist das Ergebnis der besten Anpassung für die beiden Proben von *CuSTip* in Toluol und THF dargestellt.

Tabelle 4.31: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung für den Komplex gelöst in Toluol (R = 9,52 %) und THF (R = 9,80 %).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	Toluol		THF	
		<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å]	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å]
N	1,0	2,031	0,011	2,031	0,011
S	2,0	2,176	0,007	2,173	0,007
Cu	1,0	2,575	0,009	2,584	0,011
N	1,0	3,270	0,005	3,296	0,005
N	0,5	3,581	0,005	3,511	0,008
C	2,0	3,015	0,002	2,995	0,007
C	1,5	3,192	0,001	3,196	0,006
C	1,0	3,390	0,001	3,396	0,009
C	1,5	3,468	0,015	3,652	0,012

Gegenüber der EXAFS-Struktur der kristallinen Form von *CuSTip* kommt es für die gelöste Verbindung in beiden Fällen zu einer deutlichen Verringerung des Abstands zwischen den beiden Kupferatomen. Der Cu–Cu-Abstand für den Komplex in Lösung ist um rund 0,07 Å

kürzer als für den kristallinen Komplex. Die Cu–N-Abstände sind hingegen in Lösung gegenüber der kristallinen Verbindung um $\sim 0,05$ Å länger.

Die k^3 -gewichteten Feinstrukturen und die zugehörigen Fourier-Transformierten sind zusammen mit der besten Anpassung in den Abbildungen 4.57 und 4.58 dargestellt.

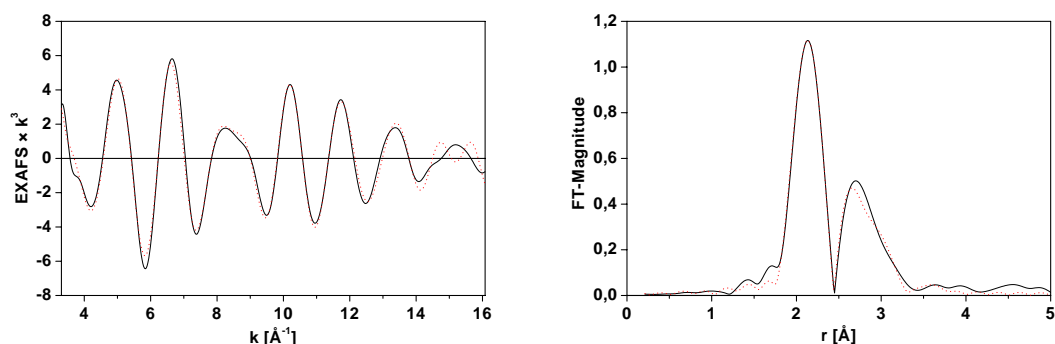


Abbildung 4.57: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst in Toluol) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

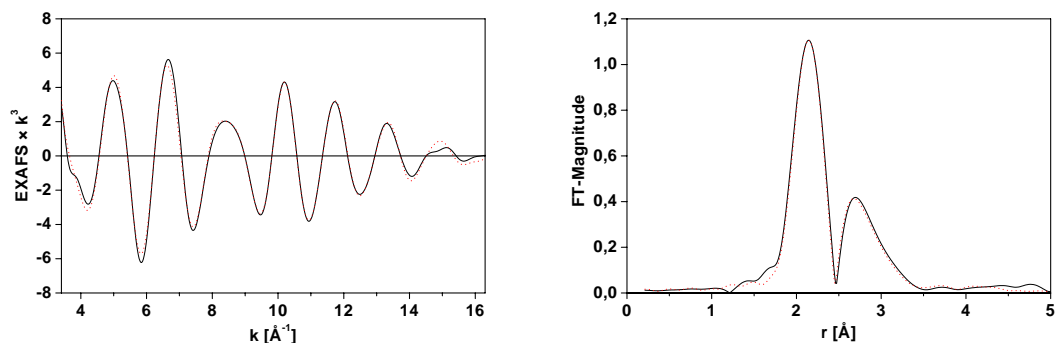


Abbildung 4.58: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst in THF) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Da eine Dimerisierung des Komplexes CuSTip in Lösung aufgrund des Ergebnisses der Molmassenbestimmung (vgl. Abschnitt 3.3, S. 45) ausgeschlossen werden kann, lässt sich für den Komplex in Lösung ein Strukturmodell aufstellen.

Die Erhöhung der Besetzungszahl der Schwefelschale von $3/2$ auf $4/2$ ist mit der Annahme konsistent, dass das im kristallinen Zustand terminal gebundene Schwefelatom in

der gelösten Spezies ebenfalls eine Brückenfunktion besitzt. Beide Kupferatome sind somit über zwei Thiolatschwefel verbrückt, und es bildet sich ein $\text{Cu}-(\mu\text{-S})_2\text{-Cu}$ -Kern aus.^{203,207}

Der *btmgp*-Ligand ist aufgrund seiner Flexibilität in der Lage, bei der Ausbildung der zweiten Thiolatbrücke von einer chelatartigen in eine $\eta_{1,5}$ -verbrückende Anbindung überzugehen. Eine derartige Anbindung des *btmgp*-Liganden ist beispielsweise auch im Komplex $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*) vorhanden (vgl. Abschnitt 4.2.4, S. 118). Im EXAFS lässt sich die Art der Anbindung des *btmgp*-Liganden nicht bestimmen, da die Umgebungen der beiden Kupferatome nicht unterscheidbar sind. Im Mittel ergibt sich für die erste Koordinationssphäre der beiden Absorberatome keine Änderung; in beiden Fällen besteht die erste Koordinationssphäre aus 2/2 Stickstoff- und 4/2 Schwefelrückstreubeiträgen.

Der Übergang in eine zweifach μ -verbrückte Spezies (zwei Thiolatbrückenfunktionen) ist mit der beobachteten Verkürzung des Cu–Cu-Abstands konsistent, und auch die Verlängerung des Cu–N-Abstands ist mit einer $\eta_{1,5}$ -Anbindung des *btmgp*-Liganden vereinbar. Dass ein derartiges Strukturmodell für den Komplex *CuSTip* realistisch ist, wird durch das Ergebnis einer Kraftfeldrechnung (MM2-Rechnung^{208,209}) bestätigt.²⁰⁰ Der *btmgp*-Ligand koordiniert hier an zwei unterschiedliche Kupferatome (Abbildung 4.59). Nach der MM2-Rechnung soll der Abstand zwischen den beiden Kupferatomen 2,6 Å und zwischen Kupfer- und Stickstoffatom jeweils 2,04 Å betragen. Auch diese beiden Absorber-Rückstreuer-Distanzen sind mit dem EXAFS-Ergebnis konsistent.

Unabhängig von der Art der Anbindung des *btmgp*-Liganden kommt es zur Ausbildung eines Cu_2S_2 -Kerns, in dem beide Thiolatfunktionen äquivalent sind. Die weitere Diskussion und Interpretation der Ergebnisse erfolgt in Abschnitt 4.2.6 (S. 132).

²⁰⁷B. Lippold, T. Meyer, J. Schneider und G. Henkel, *BIOXAS 2001*, Book of Abstracts, Siena, **2001**, 13.

²⁰⁸MM2-Rechnung: Molekül-Mechanik-Rechnung oder Kraftfeldrechnung (Version 2). Methode zur Ermittlung u. a. von Struktur und Energiegehalt verschiedener Konformere.

²⁰⁹N. L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127 - 8134; U. Burkert, N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*, Am. Chem. Soc., Washington DC, **1982**.

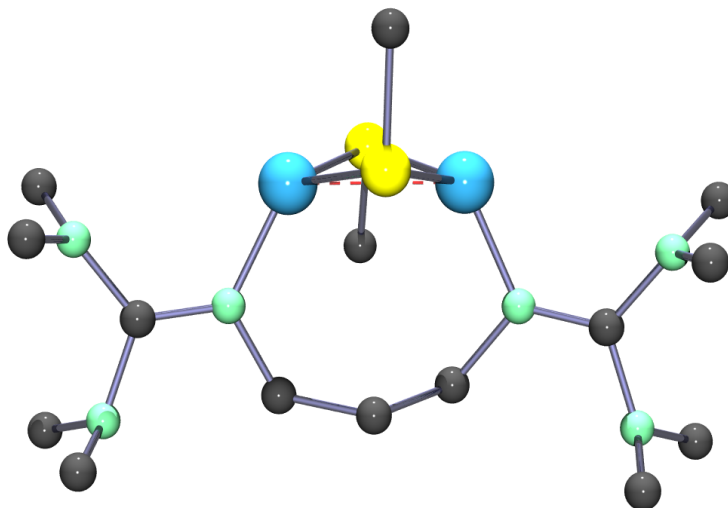


Abbildung 4.59: $[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$ — Strukturmodell basierend auf dem Ergebnis einer MM2-Rechnung.

4.2.4 EXAFS von $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$

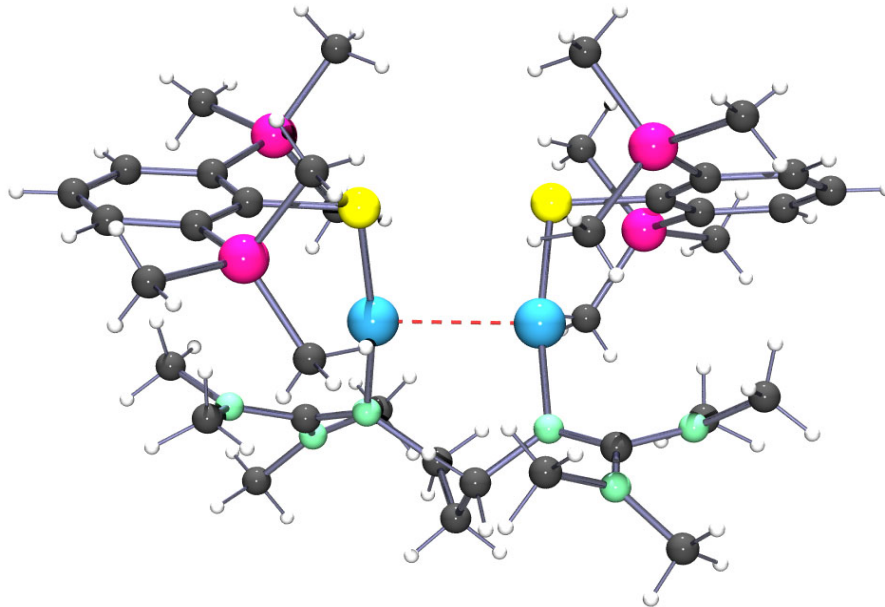
4.2.4.1 Allgemeines

Der Komplex $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*) besteht aus zwei zweifach koordinierten Kupferatomen der Oxidationsstufe +1, die über den Liganden *btmgp* miteinander verknüpft sind. Zwei terminale Schwefel-Donorfunktionen vervollständigen die Koordination. Die Kristallstruktur ist in Abbildung 4.60 dargestellt.

Die kristalline Verbindung besitzt eine C_2 -Achse, die durch die Cu–Cu-Verbindungsline und das Kohlenstoff-Brückenkopfatom des *btmgp*-Liganden verläuft. Der Cu–Cu-Abstand ist mit 2,725 Å wie bei vielen Cu^{I} -Komplexen sehr kurz.

4.2.4.2 Kristalline Form

Kristalle des Komplexes $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*) sind bei 20 K und 150 K röntgenabsorptionsspektroskopisch an der Cu-K-Kante im Absorptionsmodus untersucht worden. Dabei wurde dieselbe Probe nach der Messung bei 150 K im Kryostaten der Messeinrichtung auf 20 K abgekühlt und gemessen. Das Spektrum der Messung bei 20 K wurde aus

Abbildung 4.60: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ — Kristallstruktur.

zwei Scans gemittelt. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses sind bei der Messung bei 150 K weitere Scans aufgenommen worden, so dass die Feinstruktur aus sechs Scans gemittelt werden konnte.

Beide extrahierten Feinstrukturen weisen eine Störung (Sprung) bei ungefähr 9660 eV auf. Die Störung wird in Abschnitt 4.2.6 (S. 132) diskutiert. Die Feinstrukturen umfassen daher den Energiebereich bis etwa 620 eV oberhalb der Absorptionskante und bestehen aus 921 bzw. 932 Datenpunkten. Die Cu-K-Kanten-Spektren und die k^3 -gewichteten Feinstrukturen sind in den Abbildungen 4.61 und 4.62 dargestellt. Sehr deutlich ist im Kantenbereich der Cu-K-Kanten-Spektren das Merkmal für eine Cu^{I} -Spezies zu erkennen.

Die beiden EXAFS-Spektren unterscheiden sich bis $k \approx 10$ nur wenig (Abbildung 4.63). Unterschiede sind hauptsächlich in der Größe der Amplituden vorhanden. In der Fourier-Transformierten verringert sich mit der Messtemperatur insbesondere die Peakhöhe bei einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 2,5 \text{ \AA}$. Diese Beobachtung ist bereits bei der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes *CuSTip* gemacht worden (Abschnitt 4.2.3.3, S. 105).

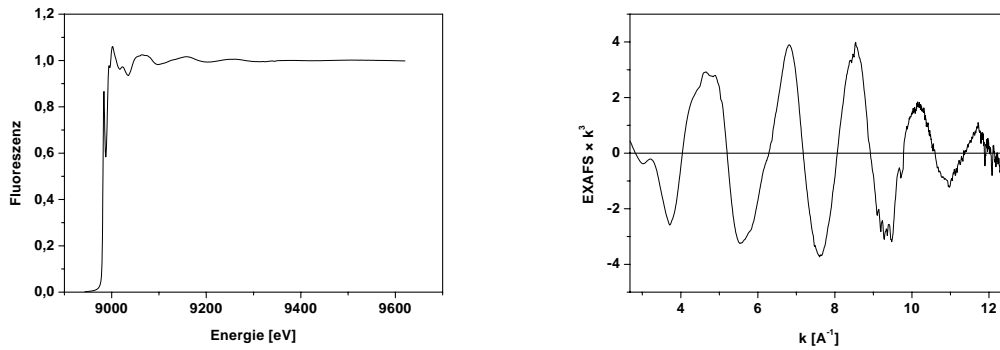


Abbildung 4.61: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts) für die Messung bei 150 K.

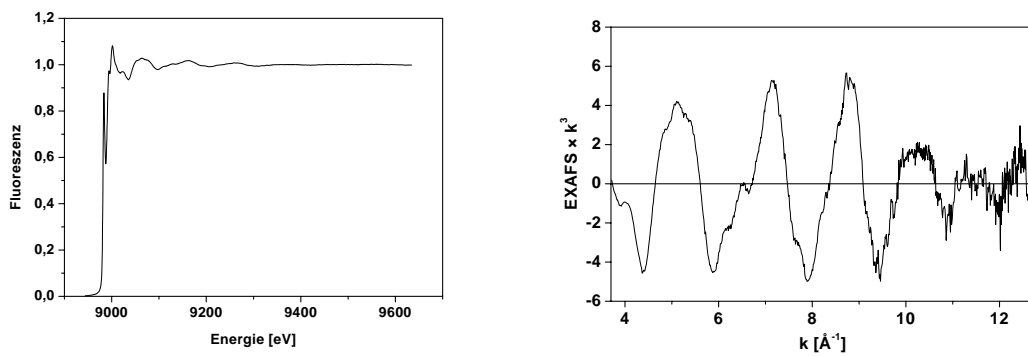


Abbildung 4.62: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts) für die Messung bei 20 K.

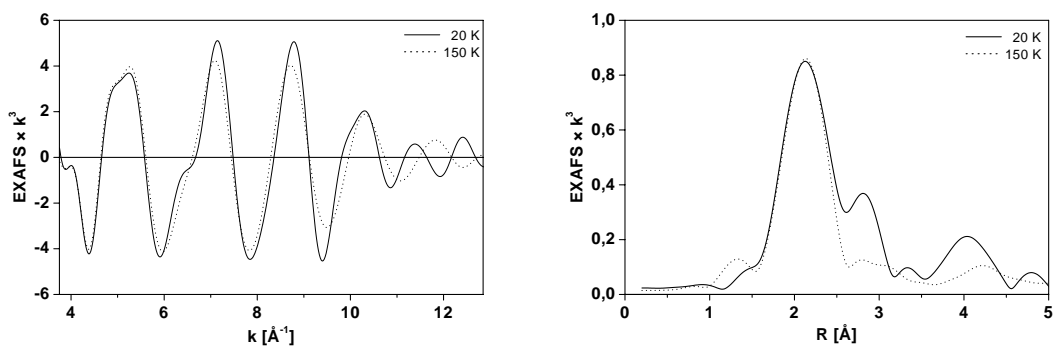


Abbildung 4.63: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen (links) und Fourier-transformierte (rechts) der Messung bei 20 K (—) und 150 K (\cdots).

Das Startmodell für die Anpassung an die Daten beider Messungen enthält die Rückstreubeiträge der an die Absorber gebundenen Stickstoffatome des *btmgp*-Liganden und der Schwefelatome sowie die Kupferrückstreubeiträge.

Die freie Verfeinerung der Schalenparameter führt bei beiden Messungen jeweils zu einem Modell, in dem die Rückstreubeiträge des Stickstoffs und des Schwefels im Verhältnis 1 : 1 stehen. Die Abstände dieser Schalen sind bei beiden Anpassungen annähernd gleich. Die Besetzungszahl der Kupferschale verfeinert in beiden Fällen auf einen Wert um eins, und auch die Abstände dieser Schale liegen für beide Anpassungen im gleichen Bereich. Auffällig ist bei der Anpassung dieser Schale an die Daten der Messung bei 150 K der große Debye-Waller-Parameter, der jedoch aufgrund des Ergebnisses für den Komplex *CuSTip* (Abschnitt 4.2.3.3, S. 105) nicht überrascht.

Die experimentellen Daten werden durch die drei Schalen bereits bis zu einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 3,0 \text{ \AA}$ gut simuliert. Die Schwefel- und die Siliciumatome liefern im Abstandsbereich von $3,5 - 4,0 \text{ \AA}$ große Rückstreubeiträge. Da sich aber diese Beiträge mit Beiträgen von Stickstoff- und Kohlenstoffrückstreuern überlagern, ist zu erwarten, dass es zu Korrelationen unter den Schalen kommt. Der Einfluss wird aufgrund der notwendigen Zusammenfassung von gleichen Rückstreuatomen ähnlichen Abstands zu einer Schale (Rückstreueinheiten) mit mittlerem Abstand weiter verstärkt. Daher sind die Daten im Fenster von $1,0 - 3,8 \text{ \AA}$ Fourier-gefiltert worden. Für den Aufbau des kompletten Startmodells wird das Ergebnis der Kristallstrukturanalyse verwendet. Unter Einbeziehung aller Rückstreuer bis $\sim 3,6 \text{ \AA}$ ergibt sich hieraus ein Modell mit 13 Schalen.

Das Ergebnis der besten Anpassung an die Daten der Messungen bei 20 K und 150 K ist in Tabelle 4.32 (S. 123) enthalten. Die k^3 -gewichteten Feinstrukturen und die zugehörigen Fourier-Transformierten sind zusammen mit der besten Anpassung in Abbildung 4.64 dargestellt.²¹⁰

Die Ergebnisse für die beiden EXAFS-Messungen von *CuSi* weichen nur geringfügig voneinander ab. Die unterschiedliche Messtemperatur zeigt sich hauptsächlich in einer Änderung des Debye-Waller-Parameters der Kupferschale. Der Parameter steigt von $0,009 \text{ \AA}^2$ mit der höheren Temperatur auf mehr als den doppelten Wert an. Der gleiche Trend ist schon bei der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes *CuSTip* beobachtet worden (Abschnitt 4.2.3.3, S. 105).

²¹⁰T. Meyer, J. Schneider, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel, *HASYLAB Users Meeting*, Posterbeitrag, Hamburg, 2000.

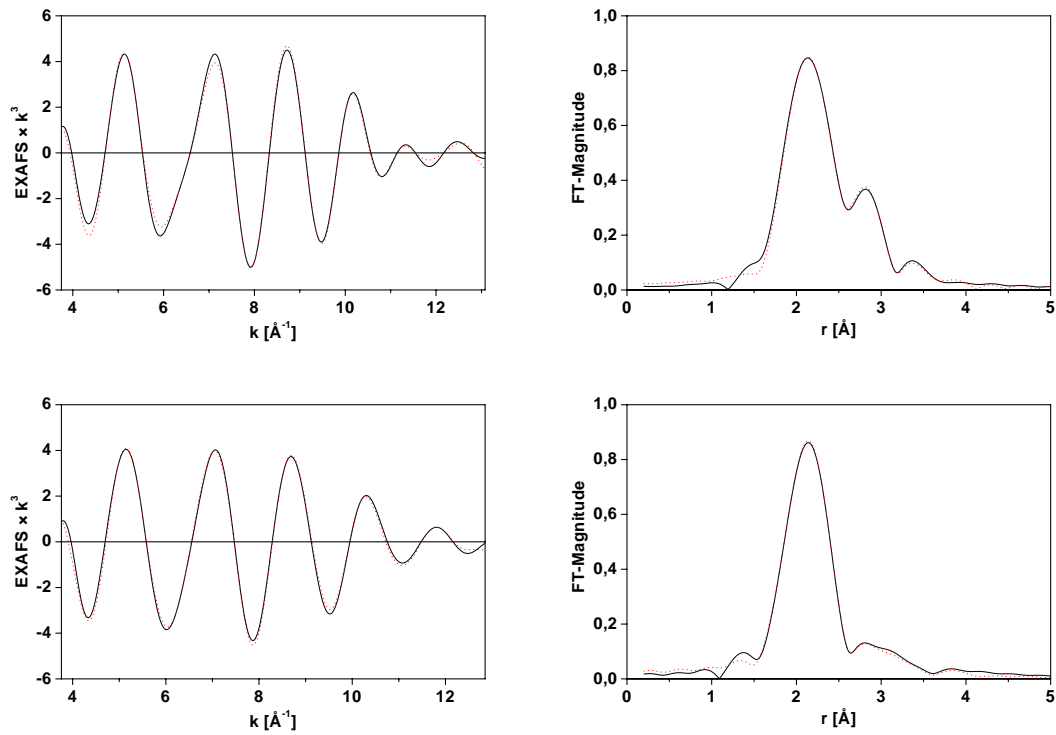


Abbildung 4.64: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots). Oben: 20 K, unten: 150 K.

Tabelle 4.32: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Ergebnis der besten Anpassung für die Messung bei 20 K ($R = 8,96\%$) und bei 150 K ($R = 7,51\%$) sowie Kristallstrukturdaten (XRD).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	EXAFS (20 K)		EXAFS (150 K)		XRD ²⁰⁰ <i>R</i> [Å]
		<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	
N	1,0	1,884	0,001	1,881	0,001	1,906(3)
S	1,0	2,127	0,003	2,131	0,002	2,149(1)
S	1,0	3,497	0,012	3,555	0,009	3,555(1)
Cu	1,0	2,676	0,009	2,689	0,021	2,726(1)
N	1,0	3,128	0,008	3,138	0,011	3,148(3)
N	1,0	3,368	0,008	3,421	0,009	3,507(3)
C	1,0	2,398	0,006	2,393	0,006	2,775(4)
C	1,0	2,889	0,004	2,925	0,009	2,954(4)
C	1,0	3,032	0,004	2,993	0,003	2,967(4)
C	1,0	3,211	0,005	3,211	0,005	3,148(5)
C	1,0	3,248	0,007	3,268	0,007	3,315(5)
C	1,0	3,335	0,003	3,348	0,002	3,338(4)
C	4,0	3,572	0,010	3,605	0,008	3,6743*

*Wert gemittelt

Die Absorber-Rückstreuer-Distanzen für die Hauptbeiträge in der ersten Koordinationssphäre unterscheiden sich nur geringfügig von der Kristallstruktur. In Tabelle 4.33 sind die Ergebnisse für diese Schalen dem Ergebnis der Kristallstrukturanalyse gegenübergestellt.

Tabelle 4.33: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (kristallin) — Ausgewählte Strukturdaten der Kristallstruktur und der EXAFS-Struktur.

	Cu–Cu	Cu–S	Cu–N
Kristallstruktur (150 K)	2,726(1) Å	2,149(1) Å	1,906(3) Å
EXAFS (150 K)	2,689 Å 0,021 Å ²	2,131 Å 0,002 Å ²	1,881 Å 0,001 Å ²
EXAFS (20 K)	2,676 Å 0,009 Å ²	2,127 Å 0,003 Å ²	1,884 Å 0,001 Å ²

Die EXAFS-Ergebnisse für den Cu–N- und den Cu–S-Abstand weichen nur geringfügig voneinander ab. Die Cu–Cu-Abstände unterscheiden sich zwar um $\sim 0,01$ Å, jedoch liegt diese Abweichung in dem Bereich, der bereits bei der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes *CuSTip* beobachtet wurde. Der einzige Parameter, der sich deutlich mit der Temperatur ändert, ist der Debye-Waller-Parameter der Kupferschale. Die Größenordnung

dieser Änderung ist mit dem Ergebnis für den Komplex *CuSTip* (Abschnitt 4.2.3.3, S. 110) vergleichbar.

Die in Tabelle 4.33 aufgeführten Abstände aus den EXAFS-Strukturen sind im Vergleich zu den entsprechenden Abständen der Kristallstruktur um mehr als 0,02 Å kürzer, für den Cu–Cu-Abstand ergibt sich im Mittel eine Verkürzung um $\sim 0,04$ Å gegenüber der Kristallstruktur. Ein Unterschied im Cu–Cu-Abstand wurde auch bei der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes *CuSTip* (Abschnitt 4.2.3.3, S. 105) in der gleichen Größenordnung gefunden.

Die Abweichungen vom Ergebnis der Kristallstrukturanalyse wurden nicht erwartet und sind, da Überlagerungen mit anderen Beiträgen in diesem Bereich kaum vorhanden sind, nicht modellbedingt. Die EXAFS-Strukturen für den kristallinen Komplex *CuSi* weichen nach diesen Ergebnissen allerdings nicht grundsätzlich von der Kristallstruktur ab. In Abschnitt 4.2.6 (S. 132) werden diese Unterschiede zwischen EXAFS-Struktur und Kristallstruktur zusammen mit den weiteren Ergebnissen diskutiert.

4.2.4.3 Gelöste Form

Der Komplex $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*) wurde in THF gelöst und röntgenabsorptionsspektroskopisch bei 20 K im Absorptionsmodus untersucht. Das Cu-K-Kanten-Spektrum wurde aus sieben Scans gemittelt. Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1307 Datenpunkten und umfasst dem Energiebereich von 15 – 1000 eV oberhalb der Absorptionskante.

Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.65 dargestellt. Im Kantenbereich des Cu-K-Kanten-Spektrums ist das Merkmal für eine Cu^{I} -Spezies deutlich erkennbar. Nach Anwendung des Programms DEPP verbleiben 853 Datenpunkte.

Ein Co-Plot der k^3 -gewichteten Feinstrukturen des kristallinen (Messtemperatur: 20 K) und des gelösten Komplexes ist mit den zugehörigen Fourier-Transformierten in Abbildung 4.66 dargestellt. Sowohl die Phasen als auch die Amplituden der beiden Feinstrukturen für den kristallinen und den in THF gelösten Komplex sind sehr unterschiedlich. Die deutlichen Unterschiede weisen drauf hin, dass beim Lösen des Komplexes eine Strukturänderung auftritt.

Das Startmodell ist analog dem für die kristalline Verbindung aufgebaut und enthält die Schalen für die Rückstreubeiträge der an die Absorber gebundenen Stickstoffatome des *btmgp*-Liganden und der Schwefelatome sowie die Rückstreubeiträge der Kupferatome. Die

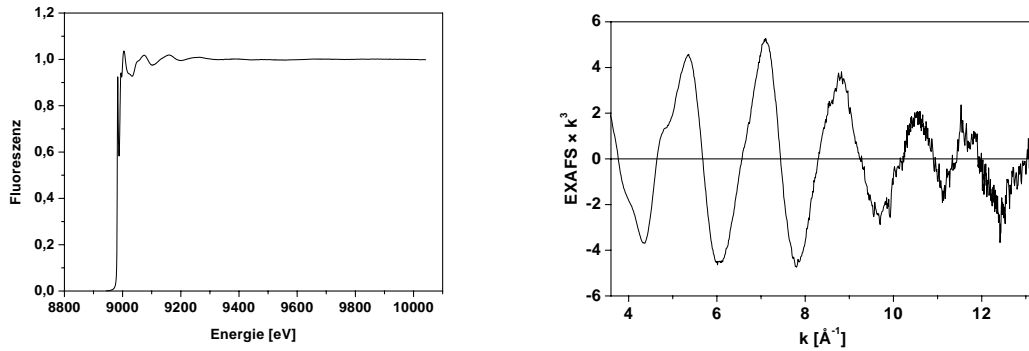


Abbildung 4.65: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

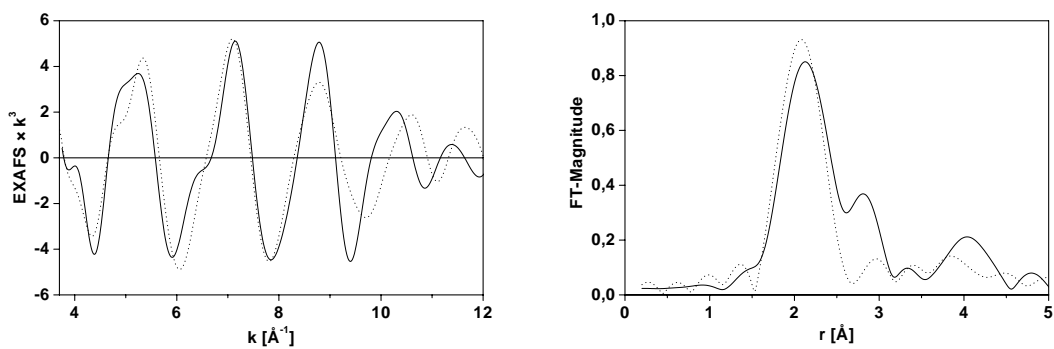


Abbildung 4.66: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen (links) und Fourier-transformierte (rechts) des Komplexes in kristalliner Form (Mess-temperatur: 20 K, —) und gelöst in THF (\cdots).

freie Anpassung aller Schalenparameter führt zu einem Modell, in dem die Rückstreubeiträge des Stickstoffs und des Schwefels von dem EXAFS-Ergebnis für die kristalline Form nicht abweichen. Die Besetzungszahl für die Kupferschale geht jedoch bei der Iteration gegen Null. Ein Kupferrückstreubeitrag ist demnach nicht vorhanden.

Das Fehlen eines Cu–Cu-Beitrags für die in THF gelöste Form deutet darauf hin, dass tatsächlich eine Änderung der Struktur durch die Lösung des Komplexes erfolgt. Aufgrund der sterisch anspruchsvollen Trimethylsilylgruppen wird erwartet, dass es beim Übergang in Lösung zu einem gegenseitigen Ausweichen dieser Gruppen kommt. Hierbei ist formal eine Drehung um die Bindung des Brückenkopfatoms des *btmgp*-Liganden möglich, wie sie in Abbildung 4.67 dargestellt ist.

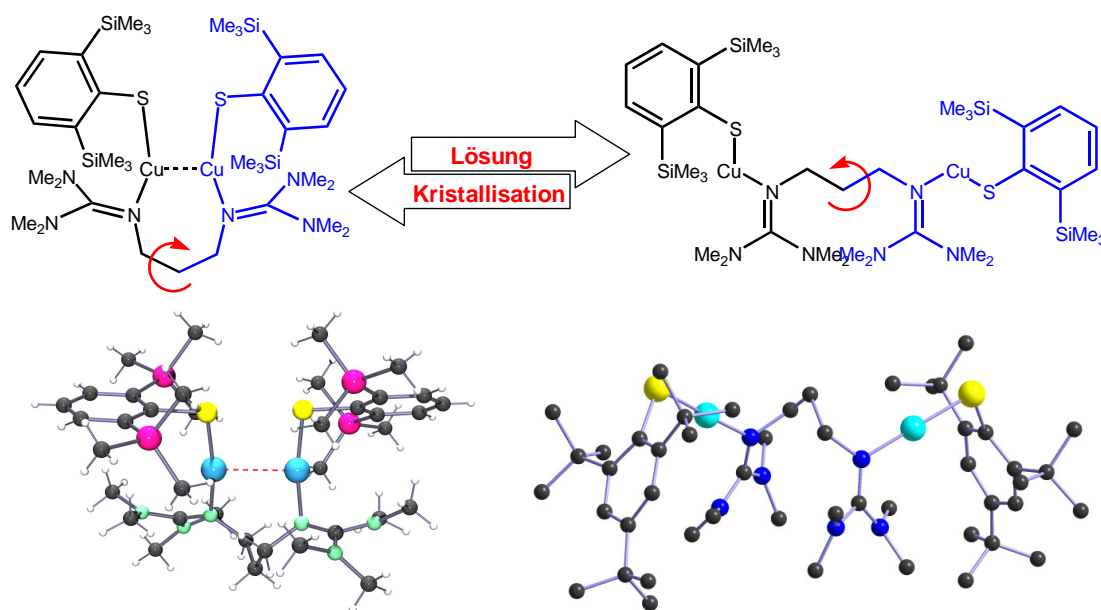


Abbildung 4.67: $[\text{Cu}_2(\text{SBTmsPh})_2(\text{btmgp})]$ — Oben: Vermutete Strukturänderung beim Übergang in den gelösten Zustand. Unten: Kristallstrukturen von $[\text{Cu}_2(\text{SBTmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (*CuSi*, links) und $[\text{Cu}_2(\text{S}\{2,4,6\text{-}(t\text{Bu})_3\text{C}_6\text{H}_2\})_2\text{btmgp}]$ (rechts, ohne H-Atome).

Dies führt zu einer Öffnung des S–Cu/Cu–S-Kerns. Diese Konfiguration ist bereits bei dem Komplex $[\text{Cu}_2(\text{S}\{2,4,6\text{-}(t\text{Bu})_3\text{C}_6\text{H}_2\})_2\text{btmgp}]$ durch Kristallstrukturanalyse²¹¹ gefun-

²¹¹D. Ohlmann, C. M. Marchand, H. Schonberg, H. Grutzmacher, H. Pritzkow, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1996**, *622*, 1349 - 1357.

den worden (Abbildung 4.67). Bei dieser Verbindung sind an den Thiophenolatring drei Tertiärbutylgruppen statt zwei Trimethylsilylgruppen im Komplex *CuSi* gebunden.

Nach dem Ergebnis einer ^1H -NMR-Untersuchung besitzt der Komplex *CuSi* in Lösung ebenfalls äquivalente Thiolatfunktionen, da sich für die chemisch äquivalenten Protonen nur eine Resonanz zeigt.²⁰⁰ Die vermutete Strukturänderung steht somit auch mit diesem Ergebnis im Einklang.

Das Startmodell wurde mit Hilfe des EXAFS-Modells für die kristalline Spezies weiter vervollständigt und besteht aus acht Schalen. Genau wie für die kristalline Form des Komplexes *CuSi* kommt es oberhalb einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von $\sim 3,5 \text{ \AA}$ zu Beitragsüberlagerungen, so dass sich die Schalen gegenseitig beeinflussen. Rückstreubeiträge oberhalb eines Absorber-Rückstreuer-Abstands von $3,8 \text{ \AA}$ sind daher durch Fourier-Filterung aus dem Spektrum entfernt worden. Das Ergebnis der besten Anpassung ist in Tabelle 4.34 wiedergegeben.²¹⁰ Die k^3 -gewichteten Feinstrukturen und die zugehörigen

Tabelle 4.34: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 9,62 \%$).

<i>Typ</i>	<i>N</i>	<i>R</i> [\AA]	<i>A</i> [\AA^2]
N	1,0	1,888	0,001
S	1,0	2,147	0,001
N	1,0	3,189	0,009
C	2,0	2,877	0,009
C	1,0	3,004	0,002
C	1,0	3,132	0,006
C	1,0	3,215	0,004
C	1,5	3,662	0,013

Fourier-Transformierten sind zusammen mit der besten Anpassung in Abbildung 4.68 dargestellt.

Die Stickstoff- und Schwefelatome der ersten Koordinationssphäre befinden sich im gleichen Abstand vom Absorberatom wie bei der hier untersuchten kristallinen Form des Komplexes *CuSi*. Die Abstände für Atome mit größerer Absorber-Rückstreuer-Distanz weichen hingegen stärker von den Abständen für die kristalline Form ab. In Abschnitt 4.2.6.3 (S. 134) wird auf die Strukturänderung beim Lösen des Komplexes *CuSi* weiter eingegangen.

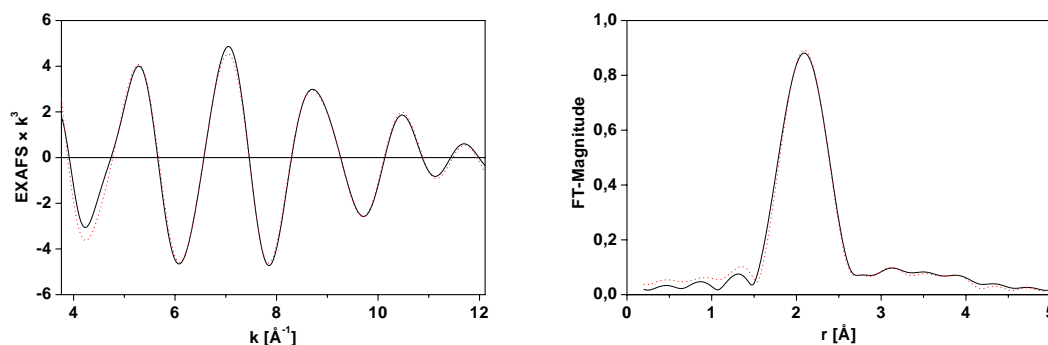


Abbildung 4.68: $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ (gelöst) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

4.2.5 EXAFS von $[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$

4.2.5.1 Allgemeines

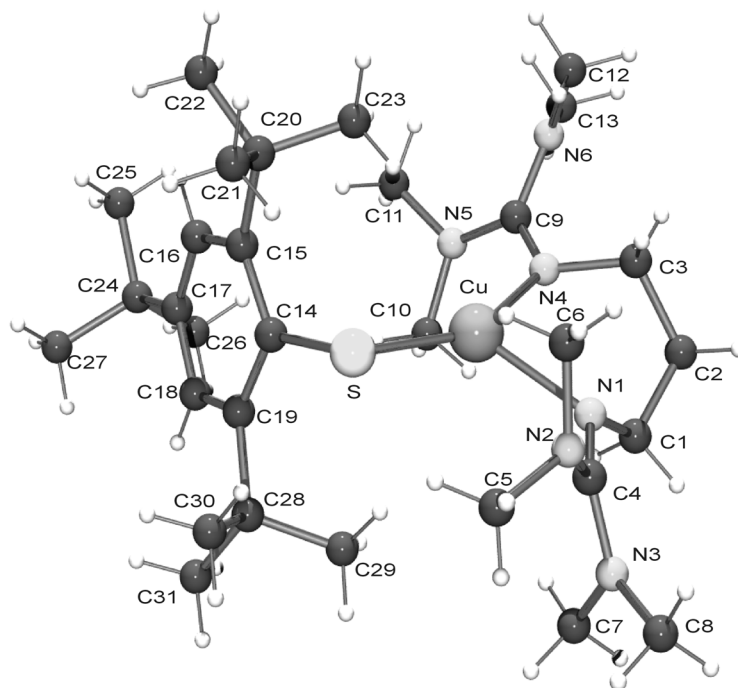
Der Komplex $[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$ (*CuTT*) ist ein neutraler, einkerniger Kupferkomplex.²¹² Das Kupferatom ist in der kristallinen Form des Komplexes verzerrt trigonal durch eine Schwefel- und zwei Stickstofffunktionen koordiniert. Die beiden Cu–N-Abstände und N–Cu–S-Winkel unterscheiden sich deutlich voneinander. Die in Abbildung 4.69 dargestellte Kristallstruktur zeigt eine T-förmige Anordnung.

An das Kupferatom im Komplex *CuTT* sind eine Thiolatfunktion und der *btmgp*-Ligand koordiniert. Und obwohl der Komplex *CuTT* in Bezug auf diese Ligandfunktionen ähnlich den beiden Verbindungen *CuSTip* und *CuSi* aufgebaut ist,²¹³ liegt *CuTT* als einkerniger Komplex vor.

Im Gegensatz zu den beiden zweikernigen Komplexen *CuSTip* und *CuSi* sind bei *CuTT* drei Tertiärbutylgruppen an den Thiophenolatring gebunden. Außerdem beträgt in der einkernigen Spezies *CuTT* das Metall-Ligand-Verhältnis 1 : 3, während in den zweikernigen Kupferkomplexen *CuSTip* und *CuSi* mit einem Metall-Ligand-Verhältnis von 2 : 4 ein Mangel an Donorfunktionen vorliegt. Es ist daher für das Kupferatom im Komplex *CuTT* beim Lösen nicht von einer Erhöhung der Koordinationszahl auszugehen, und es ist nicht zu erwarten, dass sich die Struktur des Komplexes beim Lösen in Hinblick auf eine Dimerisierung ändert.

²¹²S. Pohl, M. Harmjanz, J. Schneider, W. Saak, G. Henkel, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *311*, 106 - 112.

²¹³*CuSTip*: Abschnitt 4.2.3, S. 101; *CuSi*: Abschnitt 4.2.4, S. 118.

Abbildung 4.69: $[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$ — Kristallstruktur.

4.2.5.2 Gelöste Form

Der Komplex $[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$ (*CuTT*) wurde in THF gelöst und röntgenabsorptionsspektroskopisch bei 20 K im Absorptionsmodus untersucht. Das Cu-K-Kanten-Spektrum wurde aus vier Scans gemittelt. Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1338 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 – 1050 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Cu-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.70 dargestellt. Nach Anwendung des Programms DEPP verbleiben 850 Datenpunkte.

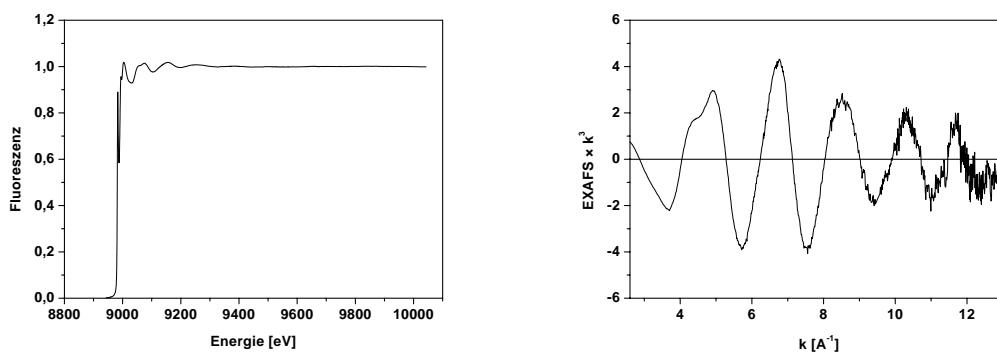


Abbildung 4.70: $[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$ (gelöst) — Cu-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

Das Startmodell für die Anpassung besteht aus drei Schalen. Es enthält die Beiträge von zwei Stickstoffrückstreuatomen und einem Schwefelrückstreuer der ersten Koordinationssphäre.

Die Anpassung der beiden Leichtstreuerschalen und der Schwefelschale führt zu einer guten Simulation der experimentellen Daten, in der auch der Hauptpeak der Fourier-Transformierten gut angepasst wird. Das Verhältnis Leichtstreuer- zu Schwefelbeitrag bleibt bei 2 : 1. Die beiden Abstände der Stickstoffrückstreuer vom Absorber weichen um etwa 0,5 \AA voneinander ab, so dass auch in Lösung die verzerrte trigonale Koordination des Kupfers vorhanden ist.

Das Startmodell wird durch eine Schale für einen Kupferrückstreubeitrag ergänzt, um die Existenz eines Cu–Cu-Beitrags zu überprüfen. Bei der Anpassung der Parameter dieser Schale läuft die Besetzungszahl gegen Null. Die Verbindung *CuTT* liegt demnach auch in Lösung als einkerniger Komplex vor.

Das vollständige Startmodell für die Anpassung enthält Informationen aus der Kristallstruktur. Gleiche Rückstreuer mit ähnlichem Abstand vom Absorber sind hierin zu

Rückstreueinheiten in einer Schale zusammengefasst. Rückstreubeiträge oberhalb eines Absorber-Rückstreuer-Abstands von 3,7 Å sind durch Fourier-Filterung aus dem Spektrum entfernt worden. In Tabelle 4.35 ist das Ergebnis der besten Anpassung dargestellt, und Abbildung 4.71 zeigt das Ergebnis der besten Anpassung an die EXAFS-Daten von *CuTT* gelöst in THF.

Tabelle 4.35: [Cu(STtbPh)btmgp] (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 9,85\%$) und Kristallstrukturdaten (XRD).

Typ	EXAFS			XRD ²⁰⁰
	N	R [Å]	A [Å ²]	R [Å]
N	1,0	1,883	0,001	1,983(2)
N	1,0	2,339	0,006	2,156(1)
S	1,0	2,128	0,004	2,174(1)
N	1,0	3,501	0,001	3,424(2)
N	1,0	3,664	0,004	3,516(2)
C	1,0	2,866	0,001	2,863(2)
C	3,0	2,978	0,012	2,980*

*Wert gemittelt

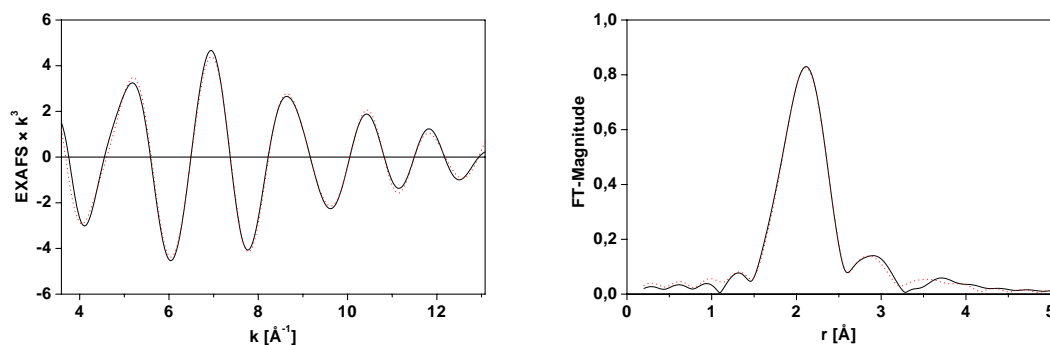


Abbildung 4.71: [Cu(STtbPh)btmgp] (gelöst in THF) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Die Amplituden und Phasen der Feinstruktur werden gut simuliert. Aus der Fourier-Transformierten ist deutlich zu erkennen, dass die Anpassung der Schalen der ersten Koordinationssphäre außerordentlich gut ist. Wie aus den modellierten Abständen für die Rückstreuatome der ersten Koordinationssphäre und den Kristallstrukturergebnissen (Tabelle 4.35) ersichtlich ist, ist der gelöste Komplex *CuTT* stärker verzerrt als die kristalline

Form. Da sich in diesem Abstandsbereich keine weiteren Beiträge mit den beiden Leichtstreuereiträgen und dem Schwefelbeitrag überschneiden, sind die modellierten Parameter dieser Schalen besonders verlässlich.

4.2.6 Interpretation der Ergebnisse

4.2.6.1 Allgemeines

Für alle hier untersuchten Kupferkomplexe kann ausgeschlossen werden, dass die Verbindungen durch die röntgenabsorptionsspektroskopische Untersuchung am Synchrotron Strahlenschädigung erfahren haben.

Die direkte Umgebung der jeweiligen Absorberatome kann aus der Fourier-Transformierten abgeschätzt werden. Bei den untersuchten Komplexen sind die Schalen für die Beiträge der ersten Koordinationssphäre zunächst in freier Verfeinerung der Schalenparameter vorangepasst worden. Sowohl der Abstand als auch die Besetzungszahl werden bei der Anpassung des rudimentären Startmodells sehr gut und eindeutig angepasst.

Das Startmodell ist auf der Basis anderer EXAFS- und Kristallstrukturen vervollständigt worden. Bei ähnlichen Abständen gleicher Rückstreuatome ist die Auflösung in einzelnen Schalen nicht mehr gegeben, und die Rückstreuer in diesem Abstandsbereich wurden zu einer Schale zusammengefasst. Als Abstand ist dann der gemittelte Wert verwendet worden.

Besonders bei größeren Absorber-Rückstreuer-Distanzen kommt es zu Überlagerungen mehrerer Beiträge, so dass im direkten Vergleich zur Kristallstruktur diese Abstandsdifferenzen besonders deutlich werden. Die Unterschiede betragen meist nur bis zu 0,1 Å, so dass die EXAFS-Strukturen mit den Kristallstrukturen der Verbindungen prinzipiell im Einklang stehen.

4.2.6.2 Kristalline Formen der Komplexe

Bei allen EXAFS-Spektren der kristallinen Kupferkomplexe²¹⁴ tritt bei ~ 9660 eV eine Störung im Spektrum auf, die auf die Anwesenheit von Zink zurückzuführen ist.²¹⁵ Da die Komplexe unter zinkfreien Bedingungen synthetisiert wurden und auch das zur Verreibung der Kristalle verwendete Polyethylen nach einer TXRF-Analyse frei von Zink ist

²¹⁴Außer für den Komplex *CuIbtmgp*: hier wurde eine Küvette aus dem gleichen Material wie für die Enzymuntersuchungen verwendet.

²¹⁵Die Zink-K-Kante liegt bei 9659 eV.

(vgl. Abschnitt 3.1.2, S. 29), muss der Beitrag von Zink mit dem Küvettenmaterial zusammenhängen. Tatsächlich wurde im Nachhinein festgestellt, dass das für diese Komplexe verwendete Küvettenmaterial Zink enthält.²¹⁶ Der Synchrotronstrahl muss demnach die Küvette tangiert haben, oder es ist Streustrahlung auf das zinkhaltige Küvettenmaterial gefallen.

Die Daten der kristallinen Kupferkomplexe sind deshalb nur bis zu einer Energie unterhalb der Zink-K-Kante verwendet worden. Diese Einschränkung des Energiebereichs auf k -Werte von $12 - 13 \text{ \AA}^{-1}$ verringert die Auflösung der Messung, hat aber auf die Schalenparameter der Rückstreubeiträge für Atome mit geringer Absorber-Rückstreuer-Distanz keinen Einfluss. Da bei den Modellen außerdem einige Rückstreubeiträge für gleiche Rückstreuer ähnlichen Abstands zusammengefasst werden mussten, macht sich die verringerte Auflösung im Ergebnis kaum bemerkbar.

Mit der Änderung der Temperatur zeigt sich, welche Parameter eines Modells bei der Messung einer Verbindung besonders temperaturabhängig sind. Bei der Untersuchung des Komplexes *CuSTip* bei unterschiedlichen Temperaturen treten die einzigen größeren Änderungen in Debye-Waller-Parametern auf. Mit steigender Temperatur werden die Debye-Waller-Parameter deutlich größer.

Bei einer Temperaturerhöhung nimmt die dynamische Unordnung in einem System zu. Dies führt dazu, dass bei gering besetzten Schalen schließlich die dynamische Unordnung gegenüber der statischen Unordnung dominiert. Daher kommt es mit Erhöhung der Temperatur bei gering besetzten Schalen zu einer Zunahme der Debye-Waller-Parameter. Bei der Untersuchung der binuklearen Kupferkomplexe wird insbesondere der Debye-Waller-Parameter für die Kupferschale mit steigender Temperatur größer. Die Auftragung dieses Parameters gegen die Temperatur zeigt, dass die Abhängigkeit als annähernd linear beschrieben werden kann.

Die Vorgabe eines kleinen Debye-Waller-Parameters für die Kupferschale, der bei den Anpassungen festgehalten wird, wirkt sich nicht auf die anderen Parameter der Schale aus. So ändert sich auch unter dieser Vorgabe der Wert für den Abstand des Kupferrückstreuers nicht.

Der Cu-Cu-Abstand im Molekül *CuSTip* ist bei den Anpassungen für die verschiedenen Temperaturen annähernd gleich. Auch bei der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes *CuSi* ändert sich der Cu-Cu-Abstand nicht. Der Cu-Cu-Abstand im Komplex

²¹⁶Für die gelösten Komplexe sind lösungsmittelresistente Küvetten aus Aluminium verwendet worden. Alle in dieser Arbeit untersuchten Enzymproben wurden in Küvetten gefüllt, deren Material nach Röntgenfluoreszenzanalysen frei von Zink und anderen Metallen (außer Zinn) ist.

CuSi für die Messung bei 150 K ist um 0,01 Å länger als bei der Messung bei 20 K. Ein Unterschied der Cu–Cu-Abstände ist bei der Untersuchung von *CuSTip* in der gleichen Größenordnung vorhanden. Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Messungen zeigen, dass die Werte um einen Mittelwert streuen.

Jedoch sind die mit EXAFS bestimmten Cu–Cu-Abstände der kristallinen Komplexe *CuSTip* und *CuSi* der 150 K-Messungen systematisch um $\sim 0,04$ Å kleiner als in den entsprechenden Kristallstrukturen. Die Abweichungen der Abstände für die Schwefelrückstreuer und die Leichtstreuer der ersten Koordinationssphäre hingegen sind deutlich geringer. Eine Möglichkeit für die Abweichungen im Cu–Cu-Abstand wäre ein Beitrag von Streustrahlung vom Kupfer-Kryostaten der Messeinrichtung. Ein Beitrag in Höhe von ungefähr 10 % reichte in diesem Fall aus, um eine Verringerung des Cu–Cu-Abstandes von 0,04 Å hervorzurufen.²¹⁷ Da alle hier untersuchten Kupferkomplexe im Absorptionsmodus gemessen wurden, ist diese Möglichkeit vom Aufbau des Experiments her ausgeschlossen.²¹⁸ Bei der Messung von reinem Polyethylen, das zur Verreibung der Kristalle verwendet worden ist, wurde ebenfalls keine Kupferabsorptionskante detektiert.

Eine andere Möglichkeit für die vorhandenen Unterschiede zwischen EXAFS-Struktur und Kristallstruktur könnte die Phasen- und Amplitudenberechnung der EXAFS-Analysen betreffen. Die Phasen- und Amplitudenbestimmung basiert hier auf *ab initio*-Berechnungen, die Vereinfachungen und Näherungen enthalten. Die Kupferatome der hier untersuchten binuklearen Komplexe stellen außerdem sowohl Absorber- als auch gleichzeitig Rückstreueratom dar. Die Berechnung der Phasen und Amplituden könnte gerade in diesem speziellen Fall zu der Abstandsdifferenz beitragen. Die Verwendung der älteren X_α -Phasen statt der heute meist verwendeten VON BARTH/HEDIN-LUNDQVIST-Phasen führt in diesem Fall zu noch größeren systematischen Abweichungen in der Größenordnung von $\sim 0,07$ Å. Der systematische Unterschied im Cu–Cu-Abstand scheint daher methodisch bedingt zu sein. Weitere Untersuchungen beispielsweise an homobinuklearen Eisenkomplexen oder heterobinuklearen Kupfer-Eisen-Komplexen können zur Klärung dieser Frage beitragen. Eine Abstandsdifferenz von $\sim 0,04$ Å muss deshalb auch für den Cu–Cu-Abstand der untersuchten Enzyme berücksichtigt werden.

4.2.6.3 Gelöste Formen der Komplexe

Wie für die kristallinen Spezies können die Beiträge der ersten Koordinationssphäre anhand der Fourier-Transformierten abgeschätzt vorgegeben und angepasst werden. Hierdurch

²¹⁷Cu–Cu-Abstand im Metall: 2,56 Å.

²¹⁸lt. Dr. W. Meyer-Klaucke, Betreuer der Beamline D2 des EMBL Hamburg.

konnte bei den untersuchten Kupferkomplexen bereits auf die Struktur geschlossen werden. Ausschlaggebend für den gelösten Komplex *CuSTip* war dabei die Besetzungszahl der Schwefelschale, die sich auf 4/2 erhöht. Da nach dem Ergebnis der Molmassenbestimmung für den Komplex *CuSTip* die Verbindung in Lösung auch als monomere Einheit vorliegt, bildet sich demnach unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel ein Cu-(μ -S)₂-Cu-Kern aus.

Durch diese zweifache Verbrückung der Kupferatome durch die beiden Thiolatfunktionen kommt es zur Verkürzung des Cu-Cu-Abstands um $\sim 0,07$ Å. Der Abstand zwischen den beiden Metallatomen im gelösten Komplex *CuSTip* ist damit deutlich kürzer als in der kristallinen Spezies, jedoch immer noch länger als im Cu_A-Zentrum der ba₃-Oxidase.

Weiterhin kommt es beim Übergang des Kupferkomplexes *CuSTip* in Lösung zu einer Umlagerung, bei der der Ligand *btmgp* von einer Chelatanbindung in eine $\eta_{1,5}$ -verbrückende Anbindung übergeht. Er koordiniert dabei wie im Komplex *CuSi* mit einem Stickstoffatom an das eine Kupferatom und mit dem anderen an das zweite Kupferatom. Diese Umlagerung wie auch die Abstände für die Stickstoff- und Schwefelrückstreuer sowie der Cu-Cu-Abstand werden durch das Ergebnis einer MM2-Rechnung bestätigt.

Der binukleare Komplex *CuSTip* ist in gelöster Form sowohl in Hinblick auf die Anzahl der Donorfunktionen als auch den Oxidationszustand der Kupferatome ein Modell für das Cu_A-Zentrum der vollständig reduzierten Form der Cytochrom-c-Oxidase.^{189,190}

Für den gelösten Komplex *CuSi* geht bei der Anpassung des Startmodells die Besetzungszahl für die eingesetzte Kupferschale gegen Null. Das Modell enthält für den gelösten Komplex *CuSi* keinen Cu-Cu-Beitrag. Zusammen mit dem Ergebnis der Molmassenbestimmung, nach der der Komplex in Lösung ebenfalls als monomere Einheit vorliegt, kann auf eine Strukturänderung geschlossen werden, bei der es zur Öffnung des S-Cu/Cu-S-Kerns kommt. Diese Öffnung kann ein Indiz dafür sein, dass im kristallinen Zustand mögliche d^{10} - d^{10} -Wechselwirkungen schwächer sind als die in Lösung vorhandenen Kräfte.²¹⁰ Die Änderung der räumlichen Anordnung von *CuSi* ist durch die sterisch anspruchsvolleren Trimethylsilylgruppen am Thiophenolatring gegenüber den Isopropylgruppen im Komplex *CuSTip* bedingt.

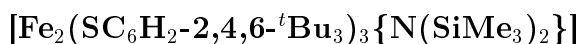
Auch bei der gelösten Verbindung *CuTT* ist kein Kupferrückstreubeitrag detektierbar. Der Komplex ist somit auch in Lösung einkernig. Aus der Anpassung der Schalen für die erste Koordinationssphäre ergibt sich im Vergleich zur kristallinen Form ein stärker verzerrter Aufbau des Moleküls, so dass eine geringfügige Änderung der räumlichen Anordnung resultiert. Eine Dimerisierung mit Ausbildung von Thiolatbrücken analog des Komplexes

CuSTip unterbleibt jedoch aufgrund des in Abschnitt 4.2.5 (S. 128) beschriebenen Unterschieds im Metall-Ligand-Verhältnis.

4.3 Weitere EXAFS-Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der homobinukleare Eisenkomplex $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-2,4,6-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ untersucht, der im Rahmen einer Diplomarbeit synthetisiert worden ist.²¹⁹ Weiterhin sind EXAFS-Daten der Hydrogenase aus dem Organismus *Desulfovibrio vulgaris* Myazaki F ausgewertet worden. Die Hydrogenase ist in ihrer nativen („as isolated“) und reduzierten („activated“) Form an der Ni-K-Kante gemessen worden.²²⁰

4.3.1 EXAFS von



Die Kristallstruktur des homobinuklearen Eisenkomplexes $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-2,4,6-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ (Fe_2NS_3) ist in Abbildung 4.72 dargestellt.²¹⁹ Die beiden Eisenatome sind hierin über eine Schwefel- und eine Stickstofffunktion

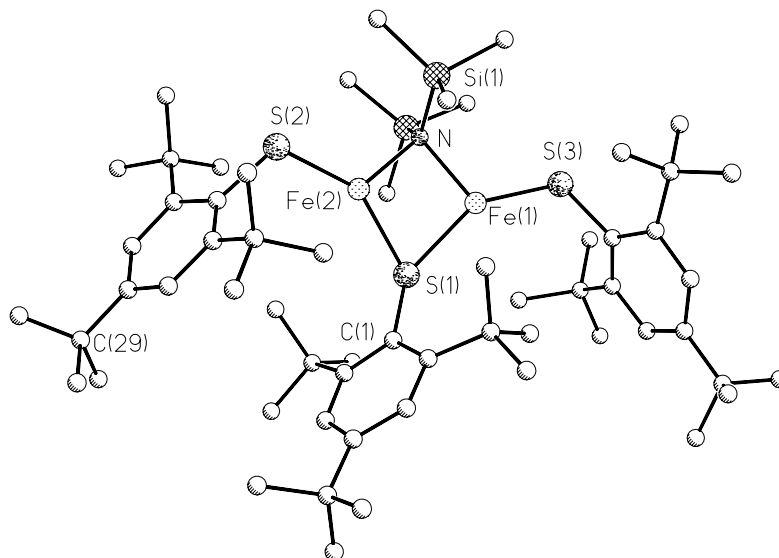


Abbildung 4.72: $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-2,4,6-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ — Kristallstruktur.

μ -verbrückt. Terminal ist an jedes Eisenatom eine weitere Schwefelfunktion koordiniert.

Der Komplex Fe_2NS_3 ist in gelöster Form im Lösungsmittel Toluol röntgenabsorptionsspektroskopisch bei 20 K untersucht worden. Da die Probenkonzentration mit 3,5 mmol/l

²¹⁹J. Urschey, *Diplomarbeit*, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, **1999**.

²²⁰Die Präparation des Enzyms erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Lubitz, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Stiftstr. 34 - 36, 45413 Mülheim an der Ruhr.

sehr gering war, wurde der Komplex im Fluoreszenzmodus gemessen. Das Fe-K-Kanten-Spektrum wurde aus 19 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2 – 13 (Σ 12). Die extrahierte Feinstruktur besteht aus 1018 Datenpunkten und umfasst den Energiebereich von 15 – 975 eV oberhalb der Absorptionskante. Das Fe-K-Kanten-Spektrum und die k^3 -gewichtete Feinstruktur sind in Abbildung 4.73 dargestellt.

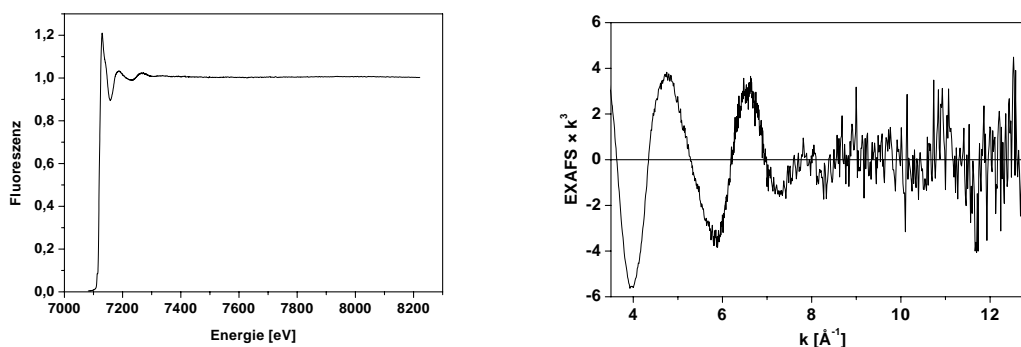


Abbildung 4.73: $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-2,4,6-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ (gelöst) — Fe-K-Kanten-Spektrum (links) und k^3 -gewichtete Feinstruktur (rechts).

Die aus der Fourier-Transformierten abgeschätzte erste Koordinationssphäre der Absorberatome besteht aus zwei Schalen für Rückstreubeiträge von Stickstoff- und Schwefelatomen. Die Verfeinerung der Besetzungszahlen dieser beiden Schalen zeigt, dass die Rückstreubeiträge zueinander im Verhältnis von 1 : 2 stehen. Weiterhin existieren zwei Eisenrückstreubeiträge. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die prinzipielle Struktur beim Lösen des Komplexes in Toluol nicht ändert.

Das Startmodell für die Anpassung wird aus dem Ergebnis der Kristallstrukturanalyse übernommen. Die terminal und verbrückend gebundenen Schwefelatome besitzen unterschiedliche Fe–S-Abstände, so dass zwei Schwefelrückstreuschalen eingesetzt werden. Außerdem werden für die Rückstreubeiträge des Siliziums aufgrund der unterschiedlichen Abstände zu den Absorberatomen zwei Schalen verwendet. Zwei weitere Schalen für Kohlenstoffbeiträge oberhalb einer Absorber-Rückstreuer-Distanz von 3 \AA ergänzen das Modell.

Die experimentellen Daten werden durch das Modell bestehend aus acht Schalen gut simuliert. Die beste Anpassung ist in Abbildung 4.74 dargestellt, in Tabelle 4.36 sind die einzelnen Parameter des Ergebnisses aufgeführt.¹⁸⁵

Eine Gegenüberstellung ausgewählter Abstände der EXAFS- und der Kristallstruktur enthält Tabelle 4.37.

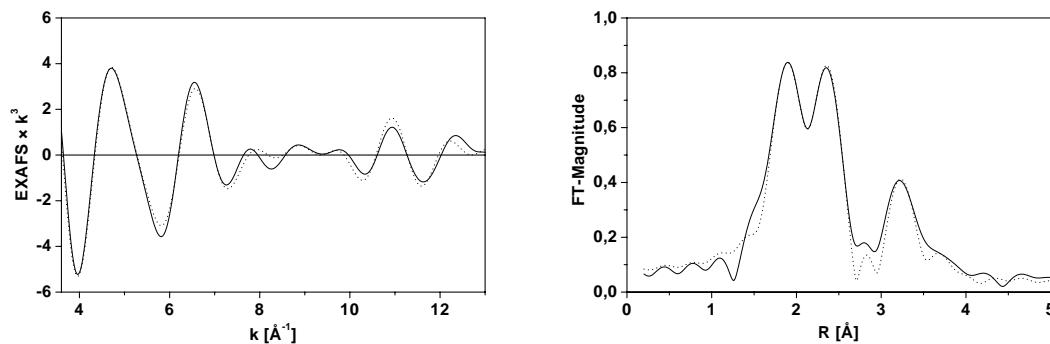


Abbildung 4.74: $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-}2,4,6\text{-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ (gelöst) — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstruktur (links) und Fourier-Transformierte (rechts) zusammen mit der besten Anpassung (\cdots).

Tabelle 4.36: $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-}2,4,6\text{-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ (gelöst) — Ergebnis der besten Anpassung ($R = 15,2\%$).

Typ	N	R [Å]	A [Å ²]
N	1,0	1,913	0,004
S	1,0	2,174	0,009
S	1,0	2,320	0,006
Si	1,0	3,144	0,004
Si	1,0	3,142	0,004
Fe	1,0	3,113	0,005
C	2,5	3,662	0,028
C	2,5	3,969	0,045

Tabelle 4.37: $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\text{-}2,4,6\text{-}^t\text{Bu}_3)_3\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ — Ausgewählte Abstände [Å] und Winkel [°].

R [Å] / ∠ [°]	EXAFS-Struktur (gelöst in Toluol)	Kristallstruktur
Fe–Fe	3,113	2,793(1)
Fe–N	1,913	2,024(3) / 2,015(3)
Fe–S	2,174	2,224(1) / 2,238(1)
Fe–(μ -S)	2,320	2,329(1) / 2,329(1)
Fe–(μ -N)–Fe	109,0	87,51(12)
Fe–(μ -S)–Fe	84,2	73,67(4)
(μ -S)–Fe–(μ -N)	83,4	95,99(9) / 96,23(9)

Die Abstände der terminalen Schwefelliganden sind in Lösung im Vergleich zur Kristallstruktur um etwa 0,06 Å kürzer, während der mittlere Abstand zum μ -Schwefelatom annähernd gleich ist. Der Fe–Fe-Abstand ist hingegen mit 3,11 Å mehr als 0,3 Å länger als im Kristall. Die Unterschiede in den Abständen führen unter der Annahme einer planaren Fe_2SN -Einheit zu einer veränderten Winkelsituation in der gelösten Verbindung gegenüber dem Kristall (vgl. Tabelle 4.37). Bedingt durch die Verlängerung des Fe–Fe-Abstands werden auch der Fe–(μ -N)–Fe-Winkel und der Fe–(μ -S)–Fe-Winkel größer. Die Struktur des Komplexes Fe_2NS_3 ist in der gelösten Form weniger verzerrt als im Kristall. Wechselwirkungen mit dem π -System des Lösungsmittels Toluol können für die Änderungen verantwortlich sein.

4.3.2 EXAFS von der Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F

Hintergrundinformationen zu Hydrogenasen finden sich in der Literatur.^{221,222,223,224}

Abbildung 4.75 zeigt den prinzipiellen Aufbau des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase aus Ergebnissen von Kristallstrukturanalysen zweier Enzyme unterschiedlicher sulfatreduzierender Bakterien.²²⁵

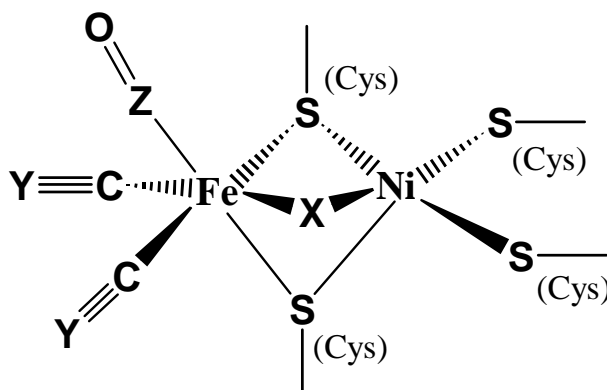


Abbildung 4.75: Das [NiFe]-Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase im „as isolated“-Zustand (*D. vulgaris* Miyazaki F: X = S, Y = O oder N, Z = S; *D. gigas*: X = O, Y = O oder N, Z = C).

Das heterobinukleare [NiFe]-Zentrum enthält zwei Cysteinbrücken und — im „as isolated“-Zustand — eine weitere Brücke (vgl. Abbildung 4.75). Den Ergebnissen von Kristallstrukturanalysen am kristallinen Enzym aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F zufolge handelt es sich dabei um ein Sulfidion, für *D. gigas* hingegen besteht die dritte Brücke aus einer Sauerstofffunktion. Mit der EXAFS-Spektroskopie kann das Enzym in Lösung untersucht werden. Da bei der EXAFS-Analyse Leichtstreuer- und Schwefelrückstreubeiträge vor allem

²²¹a) J. R. Lancaster Jr., *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, VCH, Weinheim, **1988**; b) R. Cammack, *Adv. Inorg. Chem.* **1988**, *32*, 297 - 333; c) R. P. Hausinger, *Biochemistry of Nickel*, Plenum, New York **1993**, und dort zitierte Literatur.

²²²S. P. J. Albracht, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1188*, 167 - 204, und dort zitierte Literatur.

²²³G. Fauque, H. D. Peck Jr., J. J. G. Moura, B. H. Huynh, Y. Berlier, D. V. DerVartanian, M. Teixeira, A. E. Przybyla, P. A. Lespinat, I. Moura, J. LeGall, *FEMS Microbiol. Rev.* **1988**, *54*, 299 - 344.

²²⁴R. Wüschiers, R. Schulz, *Biol. in uns. Zeit* **1998**, 130 - 136.

²²⁵a) A. Volbeda, M.-H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, *373*, 580 - 587; b) A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. de Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12989 - 12996; c) Y. Higuchi, T. Yagi, N. Yasuoka, *Structure* **1997**, *5*, 1671 - 1680.

in der ersten Koordinationssphäre gut unterscheidbar sind, kann über die Anzahl dieser Rückstreubeiträge der ersten Koordinationssphäre des Nickelatoms im aktiven Zentrum des Enzyms aus *D. vulgaris* Miyazaki F auf das Brückenatom geschlossen werden.

Die reduzierte Form der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F entsteht aus der nativen Form durch Reduktion mit Wasserstoff. Sowohl das native (*as isolated*) als auch das reduzierte (*activated*) Enzym sind an der Ni-K-Kante gemessen worden. Das Ni-K-Kanten-Spektrum der nativen Form wurde aus 41 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2, 4 – 13 (Σ 11). Das Ni-K-Kanten-Spektrum der reduzierten Form wurde aus 31 Scans gemittelt. Verwendet wurden die Kanäle 2, 3, 5 – 13 (Σ 11). Beide Feinstrukturen bestehen aus 1211 Datenpunkten. Die EXAFS-Spektren und die zugehörigen Fourier-Transformierten der beiden Formen sind zum Vergleich in Abbildung 4.76 gemeinsam abgebildet.

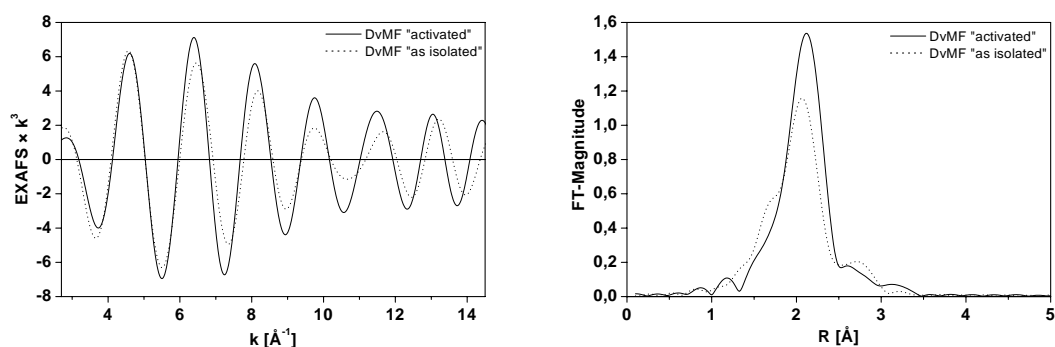


Abbildung 4.76: [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F — Fourier-gefilterte, k^3 -gewichtete Feinstrukturen (links) und Fourier-Transformierte (rechts) der nativen (\cdots) und reduzierten Form ($—$).

Aus dem Ergebnis der XANES-Untersuchungen ergibt sich für das Nickelatom bei beiden Formen eine überwiegend aus Schwefel-Donorfunktionen bestehende oktaedrische Koordination.²²⁶

Verschiedene Modelle mit variierenden Anzahlen an Schalen und Besetzungszahlen wurden an die extrahierten Feinstrukturen angepasst, um vorrangig die Zahl der Schwefelrückstreuer festzustellen. Das Ergebnis der Anpassungen für beide Formen des Enzyms ist in Tabelle 4.38 zusammengefasst.²²⁷

²²⁶A. Müller, M. Köckerling, G. Henkel, A. X. Trautwein (Ed.) in *Bioinorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997, S. 235 ff.

²²⁷Die Ergebnisse wurden im BMBF-Zwischenbericht für das Jahr 2000 dargestellt.

Tabelle 4.38: [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F — Ergebnis der besten Anpassung (nativ: R = 6,18 %, reduziert: R = 8,17 %).

<i>Typ</i>	native Form			reduzierte Form		
	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]	<i>N</i>	<i>R</i> [Å]	<i>A</i> [Å ²]
N/O	1,0	1,87	0,006	—	—	—
S	2,0	2,17	0,005	2,0	2,15	0,003
S	2,0	2,28	0,012	2,0	2,25	0,006
S	1,0	2,70	0,006	2,0	2,70	0,005
Fe	1,0	2,76	0,011	1,0	2,74	0,006

Das Ergebnis für die native Form enthält zwei zweifach besetzte Schwefelschalen mit typischen Ni-S-Bindungslängen für terminal und verbrückend gebundene Schwefelatome sowie einen Schwefelrückstreuer bei dem ungewöhnlich langen Abstand von 2,7 Å. Das Modell für die native Form des Enzyms enthält eine N/O-Donorfunktion, bei der es sich aufgrund der kurzen Bindungslänge nur um einen terminal gebundenen Liganden oder eine μ -Oxo-Brücke handeln kann. Die Struktur für die aktive Form der Hydrogenase enthält hingegen keinen N/O-Leichtstreuer, stattdessen ist ein weiterer Schwefelligand mit langem Ni-S-Abstand vorhanden.

Die Anpassung der Eisenschale in beiden Modellen verlief problematisch. Ein EXAFS-Parameter-Scan²⁰⁵ mit Variation des Eisenrückstreuerabstands zeigte, dass im Bereich von 2,4 Å und 2,7 Å jeweils ein lokales Minimum für einen Eisenrückstreubeitrag vorhanden ist. Die Anpassung der Eisenschale bei einem Abstand im Bereich von 2,7 Å war unter Einbringung eines Schwefelrückstreuers in das Modell im gleichen Abstandsbereich möglich. Dieser Abstand für einen Schwefelliganden ist für Schwefel-Donorfunktionen sehr groß. Allerdings ist für eine andere Hydrogenase bereits ein ähnlich großer Abstand mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse gefunden worden.²²⁸ Bei der EXAFS-Analyse wird durch den Einsatz eines derartigen Schwefelrückstreubeitrags eine gute Simulation dieser Daten erreicht.¹⁶³

Die Ergebnisse sind mit der Kristallstruktur für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F nicht direkt vereinbar. Die native Form der Hydrogenase weist im Vergleich zur Kristallstruktur einen um etwa 0,2 Å kleineren Wert für den Ni-Fe-Abstand auf,²²⁹ und auch die Anzahl der Schwefel-Donorfunktionen ist unterschiedlich.

²²⁸L. DeGioia, P. Fautucci, B. Guigliarelli, P. Bertrand, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2658 – 2662.

²²⁹a) Y. Higuchi, T. Yagi, N. Yasuoka, *Structure* **1997**, *5*, 1671 - 1680. b) Y. Higuchi, H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka, T. Yagi, *Structure* **1999**, *7*, 549 - 556.

Das heute favorisierte Modell für das aktive Zentrum enthält kein Schwefelrückstreuatom im Abstandsbereich von 2,7 Å. Die Effekte im EXAFS können auch durch die Überlagerung von zwei Eisenschalen unterschiedlichen Abstands hervorgerufen werden.²³⁰ Die Auswertung der EXAFS-Daten zum Nachweis einer weiteren Brücke wird in dem bereits angelaufenen Nachfolgeprojekt fortgesetzt.

²³⁰B. Lippold, *unveröffentlichte Ergebnisse*.

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cytochrom-c-Oxidase (ba_3 -Oxidase) aus *Thermus thermophilus* in verschiedenen stationären Zuständen mit Hilfe der EXAFS-Spektroskopie untersucht. Hierzu ist die gelöste Form der nativen ba_3 -Oxidase chemisch inhibiert und reduziert worden.

Die röntgenabsorptionsspektroskopische Untersuchung von Kristallen der nativen ba_3 -Oxidase aus *Thermus thermophilus* führt zu dem Ergebnis, dass die Kristallisation des Enzyms keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur der Metallzentren hat. Die EXAFS-Struktur der gelösten Form des Enzyms konnte somit verifiziert werden, und beide röntgenabsorptionsspektroskopischen Ergebnisse stehen mit der kürzlich publizierten Kristallstruktur im Einklang.

Das Cu_A -Zentrum besteht aus zwei Kupferatomen, die über zwei μ -Schweifelfunktionen verbrückt sind. Terminal ist an jedes Kupferatom jeweils eine Histidengruppe koordiniert. Der Cu–Cu-Abstand ist mit $\sim 2,42 \text{ \AA}$ für die native Form der ba_3 -Oxidase sehr kurz. Durch Einführung einer zusätzlichen Schwefel- und einer Leichtstreuerschale in das Modell ergibt sich für alle Anpassungen an die Cu-K-Kanten-EXAFS der ba_3 -Oxidase eine bessere Simulation der gemessenen Daten. Aus dem Ergebnis der Kristallstruktur lässt sich schliessen, dass es sich hierbei um die Beiträge der Methionin- und Glutamat-Backbone-Liganden des Cu_A -Zentrums handelt. Die Abstände dieser beiden Rückstreuatome vom Absorberatom Kupfer sind deutlich länger als allgemein übliche Abstände für Stickstoff- oder Schwefelatome. Für die beiden Kupferatome des Cu_A -Zentrums resultiert somit eine $(3 + 1)$ -Koordination.

An das Kupferatom des Cu_B -Zentrums der ba_3 -Oxidase koordinieren drei Histidengruppen. Der Abstand dieses Kupferatoms vom Häm-Eisenatom des Fe_{a3} -Zentrums beträgt für die

native Form des Enzyms im Mittel $\sim 4,00$ Å. An diese beiden Atome ist das Substrat bzw. der Inhibitor gebunden. Die beiden Eisenatome im Holoenzym sind jeweils durch ein Porphyrinsystem koordiniert. Die weitere Koordination besteht im Fall des Fe_{a3} aus einer, im Fall des Fe_b aus zwei Histidingruppen.

Die Reduktion des nativen Enzyms mit Natriumdithionit führt zu einer vollständigen Reduktion, die sich auf die Metallzentren auswirkt. Ein Ligandaustausch wird hierbei nicht beobachtet, jedoch ändern sich im Cu_A - und im Fe_{a3} - Cu_B -Zentrum die Abstände der einzelnen Rückstreuatome zum Absorberatom deutlich. Während sich der Cu-Cu-Abstand im Cu_A -Zentrum von $\sim 2,42$ Å auf $\sim 2,46$ Å vergrößert, verkürzt sich die Fe-Cu-Distanz im heterobinuklearen Zentrum der ba_3 -Oxidase um den gleichen Betrag. Die gleichen Ergebnisse werden außerdem für die EXAFS-Modelle der cyanid- und azidinhibierten Derivate des nativen bzw. reduzierten Holoenzym erhalten.

Durch die Kombination der Ergebnisse für die ba_3 -Oxidase aus den Cu-K- und Fe-K-Kanten-Messungen lässt sich die Orientierung der gebundenen Substrat- bzw. Inhibitor-moleküle am Fe_{a3} - Cu_B -Zentrum bestimmen. Substrat und Inhibitoren sind hiernach *end-on* an die beiden Metallatome des heterobinuklearen Zentrums gebunden, wobei ein Atom des gebundenen Moleküls an das eine Metallatom und ein anderes an das zweite Metallatom koordiniert. Alle gebundenen Einheiten liegen außerhalb der direkten Metall-Metall-Verbindungslineie. Der Inhibitor Cyanid ist hierbei so orientiert, dass das Kohlenstoffatom dem Fe_{a3} -Zentrum zugewandt ist.

Mit Hilfe der Methode EXAFS konnten in dieser Arbeit auch verschiedene Modellkomplexe charakterisiert werden. Die EXAFS-Strukturen für die kristallinen Verbindungen stehen mit den Kristallstrukturen meist gut im Einklang. Unterschiede ergeben sich hier hauptsächlich für die Abstände von Rückstreueinheiten, deren Beiträge sich mit anderen Beiträgen im EXAFS-Spektrum überlagern. Temperaturabhängige Untersuchungen verschiedener Komplexe zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit des Debye-Waller-Parameters. Besonders für die Beiträge von Metallrückstreuern vergrößert sich dieser Parameter mit steigender Temperatur.

Der binukleare Kupferkomplex $[\text{Cu}_2(\text{STip})_2(\text{btmgp})]$ wurde sowohl in kristalliner als auch in gelöster Form röntgenabsorptionsspektroskopisch untersucht. Die kristalline Verbindung erfährt durch Lösen eine Umlagerung. In gelöster Form liegt dieser Komplex als monomere Einheit vor und es bildet sich ein Cu_2S_2 -Kern aus. Der Komplex stellt somit in Bezug auf die Oxidationszahl der Kupferatome und die Anzahl der Schwefelbrücken ein synthetisches Analogon für das reduzierte Cu_A -Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase dar. Bei der Lösung des homobinuklearen Komplexes $[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$ kommt es zur Änderung der

Struktur durch die Ausbildung einer kettenförmigen Anordnung, bei der die Möglichkeit von d^{10} - d^{10} -Wechselwirkungen zwischen den beiden Kupferatomen ausgeschlossen ist. Der einkernige Komplex [Cu(STtbPh)btmgp] liegt auch in gelöster Form als monomere Einheit vor, und die Struktur der Verbindung in Lösung ist stärker verzerrt als im Kristall.

In dem binuklearen Eisenkomplex [Fe₂(SC₆H₂-2,4,6-*t*Bu₃)₃{N(SiMe₃)₂}] sind die beiden Eisenatome über ein Stickstoff- und ein Schwefelatom μ -verbrückt. Der Abstand zwischen den beiden Eisenatomen verlängert sich beim Lösen des Komplexes deutlich. Dies führt zu einer veränderten Winkelsituation in der gelösten Verbindung gegenüber dem Kristall, so dass die Struktur des binuklearen Eisenkomplexes in gelöster Form weniger verzerrt ist.

Neben den strukturaufklärenden Untersuchungen konnte in dieser Arbeit ein Beitrag für die Weiterentwicklung der Methode EXAFS geleistet werden. Für die Datenvorauswertung von EXAFS-Daten wurde das System CHAOS entwickelt, mit dem fehlerbehaftete Datensätze besser erkannt und so aus dem Gesamtdatenbestand eliminiert werden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Messstrategie die Qualität von EXAFS-Daten besonders im hohen k -Bereich noch weiter verbessert. Bei dieser Strategie wird die Region eines Spektrums, die weiter von der Absorptionskante entfernt liegt, mit einer höheren Referenzintensität gemessen. Die zur Verfügung stehende Messzeit wird hierdurch gleichzeitig besser ausgenutzt.

Es zeigt sich, dass die Methode der Röntgenabsorptionsspektroskopie ein großes Potential aufweist. Vor allen Dingen für die Strukturaufklärung gelöster Verbindungen und das Aufzeigen geringer Unterschiede zwischen verschiedenen Formen unabhängig vom Aggregatzustand ist die Methode EXAFS von Bedeutung. In Kombination mit chemischen oder elektrochemischen Methoden und Tieftemperaturabfangtechniken wie der *Freeze-Quench*-Technik können hiermit auch Verbindungen untersucht werden, die nur als Intermediate beispielsweise in den katalytischen Zyklen der Enzyme auftreten.

Kapitel 6

Anhang

6.1 Glossar und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
A	Debye-Waller-Parameter, Einheit: Å^2
Å	Ångström, $1 \text{ Å} = 1 \times 10^{-10} \text{ m} = 100 \text{ pm}$
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
<i>btmgp</i>	1,3-Bis(N,N'-tetramethyl)guanidino-propan
SBtmsPh	Bis-(trimethyl-silyl)-thiophenolat
CcO	Cytochrom-c-Oxidase
Channel	Kanal, hier: ein Detektorfeld des Fluoreszenzdetektors
CHAOS	Channel Analyzing and Omitting System
Co-Plot	Gemeinsame Darstellung von z. B. zwei Spektren übereinander
<i>CoSeⁱPr</i>	$[\text{Co}_2(\text{Se}(\text{C}_3\text{H}_7))_5][\text{Me}_4\text{N}]$
<i>CuIbtmgp</i>	$[\text{CuI}(\text{btmgp})]$
<i>CuSi</i>	$[\text{Cu}_2(\text{SBtmsPh})_2(\text{btmgp})]$
<i>CuSTip</i>	$[\text{Cu}_2(\text{STipPh})_2(\text{btmgp})]$
<i>CuTT</i>	$[\text{Cu}(\text{STtbPh})\text{btmgp}]$
<i>D. gigas</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>
<i>D. vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
Da	Dalton ; $1 \text{ Da} = 1 \text{ g/mol}$

Abkürzung	Beschreibung
DESY	D eutsches E lektronen- S ynchrotron
DORIS	D ouble R ing S to r e; Doppelringspeicher (am DESY, Hamburg)
EMBL	E uropean M olecular B iology L aboratory (Hauptsitz in Heidelberg und Aussenstelle mit EXAFS Beamline D2 am HASYLAB (DORIS-Ring), DESY-Gelände, Hamburg)
ESR	E lektronenspinresonanz (auch: EPR — elektronenparamagnetische R esonanz)
eV	E lektronenvolt (1 eV ist die Energie, die ein Elektron bei der Beschleunigung durch 1 Volt Spannung erreicht)
EXAFS	E xtended X -Ray A bsorption F ine S tructure (Hochaufgelöste Röntgenabsorptionsfeinstruktur)
Fe_2NS_3	$[Fe_2(SC_6H_2-2,4,6-tBu_3)_3\{N(SiMe_3)_2\}]$
FT	F ourier- T ransformation
Ferryl	Bezeichnung für Fe^{IV} -Oxo-Spezies, selten auch für Fe^V -Oxo-Spezies
GeV	G iga- E lektronenvolt
h	Stunde
Häm	Fe^{II} -Komplex (ferroheme) oder Fe^{III} -Komplex (ferriheme) des Protoporphyrins (<i>amerik.</i> : heme, <i>brit.</i> : haem)
HASYLAB	H amburg S ynchrotron Radiation L aboratory (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor)
Histidin	α -Amino-(1H-Imidazol)-4-propionsäure; semiessenzielle, an der Bildung von Proteinen beteiligte Aminosäure; Abk.: His
Imidazol	1,3-Diazol; wichtige Stammverbindung der heterozyklischen Stickstoff-Verbindungen
IUB	I nternational U nion of B iochemistry
IUPAC	I nternational U nion of P ure and A pplyed C hemistry
k	Photoelektronen-Wellenvektor
mA	M illiampere
min	M inute
mmol	M illimol
MS	<i>m</i> ultiple- <i>s</i> cattering, Mehrfach-Streuung

Abkürzung	Beschreibung
N	Besetzungszahl einer Schale
Φ	Winkelbezeichnung, hier für den Winkel Absorber–N–Rückstreuer
<i>P. d.</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i> , auch verwendet: <i>P. denitrificans</i>
pm	P ikometer; $1 \text{ pm} = 10^{-9} \text{ m}$
ps	P ikosekunde; $1 \text{ ps} = 10^{-9} \text{ s}$
Porphyrin	Sammelbezeichnung für in der natur weitverbreitete Pigmente, die sich vom Grundkörper Porphin durch Substitution des makrozyklischen Tetrapyrrol-Gerüsts ableiten
R	Abstand, Einheit: Å; $1 \text{ Å} = 100 \text{ pm}$
R	R-Faktor, R esidualwert
Ref.	R eferenz
RFA	R öntgen- F luoreszenz- A nalyse
S.	S eite
Scan	Messdurchgang
SI-Einheit	Maßeinheit basierend auf einer Grundeinheit des S ystème I nternational d'Unités.
Θ	Winkelbezeichnung, planare MS-Einheiten: $\Theta = 90^\circ$
<i>T. t.</i>	<i>Thermus thermophilus</i> , auch verwendet: <i>T. thermophilus</i>
Tab.	T abelle
THF	T etrahydrofuran
TXRF	T otal Reflection X -Ray F luorescence (Totalreflexion-Röntgenfluoreszenz-Analyse)
<i>Typ</i>	Art des Rückstreuers einer Schale
U/min	U mdrehungen pro M inute
<i>Unit</i>	Einheit von mehreren Rückstreuatomen, die eine MS-Einheit bilden
vgl.	v ergleiche
XANES	X -Ray A bsorption Near E dge S tructure
XAS	X -Ray A bsorption S pectroscopy
XRD	X -Ray D iffraction

6.2 Nomenklatur von Enzymen

Enzyme erhielten früher Trivialnamen, die nach einem Vorschlag von EMILE DUCLAUX im Jahr 1898 die einheitliche Endung „-ase“ bekamen. Das neue Nomenklatorsystem der „Commission on Enzymes of the IUB“²³¹ (auch: „Enzyme Commission“) aus dem Jahre 1964 teilt jedem Enzym neben dem Trivialnamen einen systematischen Namen zu, der den Namen des Substrats enthält.²³²

Zusätzlich wurde ein einfaches Codesystem eingeführt, das aus vier durch Punkte getrennte Zahlen besteht. Danach werden Enzyme entsprechend den von ihnen katalysierten Reaktionen in sechs Hauptklassen unterteilt.^{233,234} Innerhalb dieser Hauptklassen wird nach chemischen Kriterien der Substrate oder der Art der katalysierten Reaktionen in Untergruppen und dann wieder in Unter-Untergruppen gegliedert. Die vierte Zahl in dieser Klassifizierung stellt die Seriennummer des Enzyms innerhalb seiner Unter-Untergruppe dar. Die Einteilung wurde durch die „Enzyme Commission“ der IUB festgelegt und das Codesystem trägt daher die Bezeichnung „E.C.-Nummer“.

Das in dieser Arbeit untersuchte Enzym „Cytochrom-c-Oxidase“ trägt hiernach mit der Hauptklasse **1** für Oxidoreduktasen, der Unterklasse **9** für die Häm-Gruppe als Elektronendonator, der Unter-Unterklasse **3** als Akzeptor für Sauerstoff und mit der Seriennummer **1** die Bezeichnung „E. C. 1.9.3.1“.²³⁵

²³¹IUB: International Union of Biochemistry, 1955 gegründeter Dachverband nationaler biochemischer Gesellschaften.

²³²L. Stryer, *Biochemie*, 3. Aufl., Vieweg, Braunschweig, **1985**, S. 200.

²³³M. Linnemann, M. Kühl, *Biochemie für Mediziner*, 4. Aufl., Vieweg, Braunschweig, **1995**, S. 125 f.

²³⁴Das Prinzip von „Schlüssel-und-Schloss“: E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985 - 2993; F. W. Lichtenthaler, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2456 - 2467, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2364 - 2374; D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98 - 104; D. E. Koshland, G. Nemethy, D. Filmer, *Biochem.* **1966**, *5*, 365 - 385; L. Stryer, *Biochemie*, 3. Aufl., Vieweg, Braunschweig, **1985**, S. 85 ff.

²³⁵*Biotechnologie* (Hrsg. D. Schlee, H.-P. Kleber), Teil I, Reihe Wörterbücher der Biologie, Fischer, Jena, **1991**, S. 346 f.

6.3 Grundlagen der Methode EXAFS

In dieser Arbeit wird die hochaufgelöste Röntgenabsorptionsspektroskopie zur Aufklärung der Struktur insbesondere um die Absorberatome Kupfer und Eisen in Enzymen und Modellkomplexen genutzt. Bevor auf die Methode eingegangen wird, soll zuvor die dazu notwendige Strahlung — die Synchrotronstrahlung — kurz erläutert werden.

6.3.1 Erzeugung von Synchrotronstrahlung

Durch HEINRICH HERTZ ist bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt, dass jede beschleunigte elektrische Ladung strahlt. Wird demnach ein geladenes Teilchen (Elektron oder Positron) in einem Beschleunigerring nahezu mit Lichtgeschwindigkeit durch Magnetfelder auf einer Kreisbahn bewegt, so stellt dies eine zum Kreismittelpunkt beschleunigte Ladung dar.

In Bewegungsrichtung der Teilchen tritt dann eine intensive elektromagnetische Strahlung auf, die laserähnlich gebündelt nach vorne gerichtet abstrahlt.²³⁶ Diese Vorwärtsstrahlung heißt Synchrotronstrahlung und umfasst kontinuierlich den gesamten Bereich vom Infrarotlicht bis zur Röntgenstrahlung (Abbildung 6.1).²³⁷

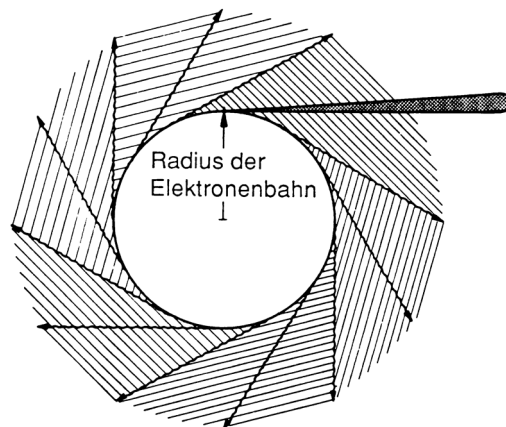


Abbildung 6.1: Erzeugung von Synchrotronstrahlung durch ein auf einer Kreisbahn beschleunigtes geladenes Teilchen.

Die Strahlung ist in der Ebene des Beschleunigerrings linear polarisiert. Die Intensität sowie das Frequenzmaximum hängen von der Geschwindigkeit der Teilchen und der Stärke

²³⁶G. Wolschin, *Spektrum der Wissenschaft* **1998**, 11, S. 30 ff.

²³⁷Abbildung 6.1 und die folgenden drei Abbildungen aus: *HASYLAB - Synchrotronstrahlung* (Hrsg.: DESY-HASYLAB, PR), Hamburg, **1990**.

des Magnetfeldes ab. Eine Erhöhung der Energie der umlaufenden Elektronen erweitert das Spektrum der abgegebenen Synchrotronstrahlung noch weiter in den kurzwelligen Bereich. Diese Strahlung besitzt Wellenlängen, die den interatomaren Abständen in Kristallen entsprechen (Abbildung 6.2).²³⁷

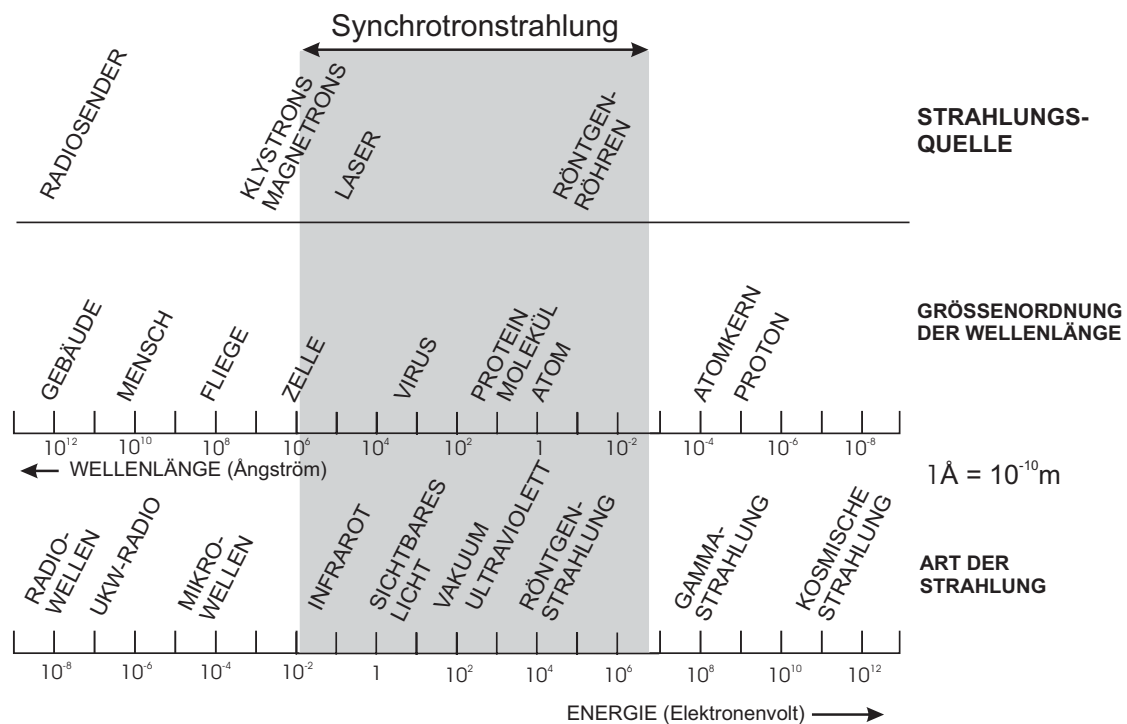


Abbildung 6.2: Energiespektrum der Synchrotronstrahlung.

Ab 1956 konnte die Synchrotronstrahlung für wissenschaftliche Untersuchungen genutzt werden und Ende der 60er Jahre gingen die ersten Forschungseinrichtungen in Hamburg (HASYLAB¹⁴⁹ auf dem DESY-Gelände²³⁸) und Stanford/USA (SSRL²³⁹) in Betrieb.

Heute gibt es weltweit ungefähr 50 Synchrotrons. Statt der früher üblichen einfachen Ablenk-magnete werden heute zusätzlich Parcours von Magneten verwendet. Diese als „Wiggler“ und auch „Undulatoren“ bezeichneten Einheiten von Magneten bestimmter Anordnung zwingen den beschleunigten Teilchen zusätzlich zu ihrer Kreisbahn eine periodi-

²³⁸DESY: Deutsches Elektronensynchrotron; <http://www.desy.de/>.

²³⁹SSRL: Stanford Synchrotron Radiation Laboratory;
<http://www-ssrl.slac.stanford.edu/>.

sche sinusförmige Bahn auf. An jedem Ablenkbogen wird Strahlung abgegeben, die sich zur resultierenden Gesamtstrahlung mit hoher Intensität addiert (Abbildung 6.3).^{237,240}

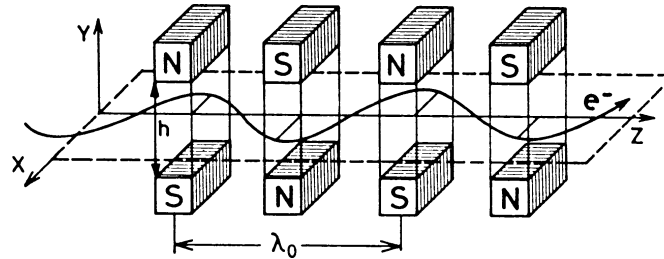


Abbildung 6.3: Flugbahn beschleunigter Teilchen in einem Parcours von Magneten.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist der Speicherring DORIS III auf dem DESY-Gelände in Hamburg genutzt worden. Die beschleunigten Teilchen „durchfliegen“ den Ring in Teilchenpaketen (*Bunches*). Im 5-Bunch-Modus des DORIS-Ringes sind die einzelnen Teilchenpakete ungefähr 192 nsec voneinander getrennt. Während einer Phase (*Run*) nimmt der Strahlstrom des DORIS-Teilchenringes von ungefähr 150 mA auf 75 mA ab, so dass alle 8 bis 10 Stunden eine neue *Injection* von vorbeschleunigten Positronen erfolgt. Weitere Parameter des DORIS-Ringes sind in Abschnitt 6.4 (S. 176) dargestellt.

Synchrotronstrahlung zeichnet sich u. a. durch hohe Leuchtdichte²⁴¹ und Intensität aus. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Strahlungsquellen mit dem Spektrum des DORIS-Ringes in Hamburg hinsichtlich Breite und Leuchtdichte des kontinuierlichen Spektrums ist in Abbildung 6.4 gezeigt.²³⁷

6.3.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)

Mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS: **X**-Ray **A**bsorption **S**pectroscopy) ist es möglich, die lokale Struktur um ein angeregtes Atom aufzuklären. Ein Hauptanwendungsbereich sind Strukturuntersuchungen von Metallzentren in Metalloproteinen, die unabhängig von der Protein-Matrix oder vorhandenem Wasser Informationen über die Nahordnung um ein Absorberatom liefern. Auch die Korrelation zwischen der Struktur

²⁴⁰Der Wirkungsgrad eines Beschleunigers ist abhängig von dem Verhältnis der effektiven Beschleunigungsspannung zur eingespeisten Leistung (vgl. C. Peschke, *Diplomarbeit*, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, 1995.).

²⁴¹Die Leuchtdichte L gibt an, wieviel Energie pro Zeit und Fläche in einen Einheitsraumwinkel ausgestrahlt wird. Sie ist ein Maß für die tatsächliche Stärke einer Lichtquelle pro Flächeneinheit. Falls die Quelle punktförmig ist, ist ihre Leuchtdichte identisch mit der Intensität I_0 der Quelle.

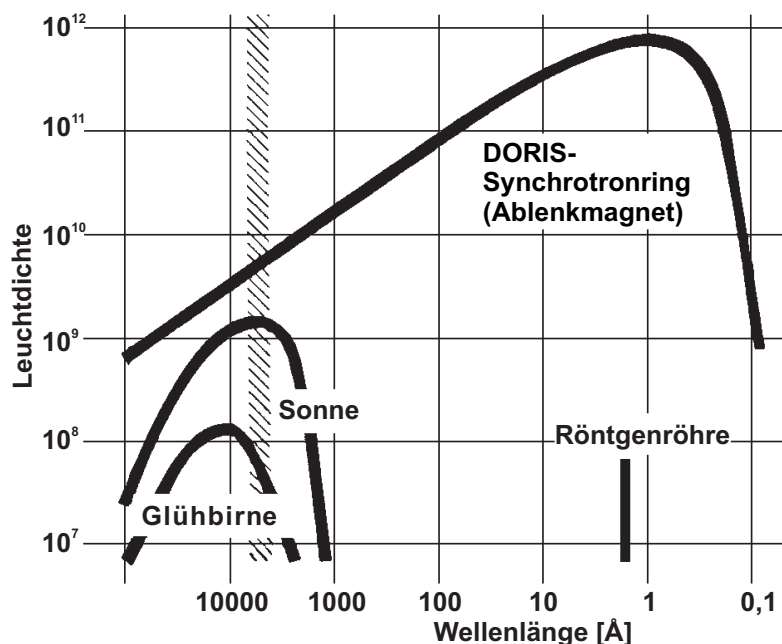


Abbildung 6.4: Vergleich zwischen verschiedenen Strahlungsquellen.

und Funktion von Metallzentren in Metalloproteinen ist mit Hilfe dieser Methode zu klären. Weitere Anwendungsgebiete der XAS sind in einem Artikel von H. BERTAGNOLLI und T. S. ERTEL²⁴² aufgeführt.

Für XAS-Messungen ist über einen großen Spektralbereich gleichmäßig intensive Röntgenstrahlung hoher Intensität notwendig, so dass erst mit der Verfügbarkeit von Synchrotronstrahlungsquellen die Röntgenabsorptionsspektroskopie effektiv genutzt werden konnte. Für XAS-Untersuchungen an Metalloproteinen werden im Allgemeinen Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der K-Absorptionskanten der enthaltenen Metallatome aufgenommen und die beobachteten Feinstrukturen ausgewertet. Für diese Arbeit sind die Bereiche der Fe-K-Absorptionskante (*kurz:* Fe-K-Kante) mit 7112 eV und der Cu-K-Absorptionskante (*kurz:* Cu-K-Kante) mit 8979 eV relevant. Die Lage der K-Kanten wird allerdings durch den Oxidationszustand des Absorberatoms sowie die Natur und Zahl der Liganden geringfügig beeinflusst.^{243,244}

²⁴²H. Bertagnolli, T. S. Ertel, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 15 - 37; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 45 - 66.

²⁴³J. A. Kirby, D. B. Goodin, T. Wydrzynski, A. C. Robertson, M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5537 - 5542.

²⁴⁴S. D. Conradson, B. K. Burgess, W. E. Newton, K. O. Hodgson, J. W. McDonald, J. F. Rubinson, S. F. Gheller, L. E. Mortenson, M. W. W. Adams, P. K. Mascharak, W. A. Armstrong, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7935 - 7940.

XAS-Messungen werden durch den Zustand der Probe (Pulver, Kristalle, Lösung, gefrorene Lösung) nicht limitiert. Sogar amorphe und stark verdünnte Substanzen in unterschiedlichen Lösungsmitteln sowie Gase können mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie charakterisiert werden. Als weitere Vorteile der XAS sind zu nennen:

- Die Umgebung eines Elementes ist ohne Rücksicht auf die physikalischen Eigenschaften der Verbindung charakterisierbar.
- Das Absorberatom ist niemals „silent“, wie es bei Untersuchungen mit ESR- oder anderen spektroskopischen Methoden der Fall sein kann.
- Es ist z. B. möglich, abgefangene Intermediate eines enzymatischen Zyklus zu vermessen oder inhibierte bzw. mit Substrat umgesetzte Proben zu analysieren, ohne dass die Proben kristallisiert werden müssen.

Gerade die Schwierigkeit der Züchtung geeigneter Kristalle für die Kristallstrukturanalyse als auch die Tatsache, dass durch die Kristallisation Strukturen verändert werden können,^{245,246} haben dazu geführt, dass Substanzen immer häufiger in gelöster Form untersucht werden.

Ein Röntgenabsorptionsspektrum teilt sich in zwei Bereiche. Im Bereich der Kante bis etwa 50 eV oberhalb der Absorptionskante wird die XAS als XANES (**X**-Ray **A**bsorption **N**ear **E**dge **S**tructure) bezeichnet.²⁴⁷ Danach nimmt oberhalb der Absorptionskante nach der Theorie des Photoelektrischen Effektes die Absorption ab, und es ist eine sinusartige, stark gedämpfte, periodische Modulation erkennbar. Diese Feinstruktur direkt nach der Absorptionskante von ungefähr 30 eV bis etwa 1000 eV oberhalb der Kante wird als EXAFS (**E**xtended **X**-Ray **A**bsorption **F**ine **S**tructure) bezeichnet.

XANES- und EXAFS-Bereich liefern komplementäre Strukturinformationen. Der XANES-Bereich gibt den Oxidationszustand des Absorberatoms und die Symmetrie wieder, während aus der EXAFS-Region auf die Zahl, den Typ und den Abstand von Liganden und Nachbaratomen zum Absorberatom geschlossen werden kann.²⁴⁸

²⁴⁵W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, 2. Aufl., Teubner, Stuttgart, **1995**, S. 67 f.: „Gerade bei biochemisch aktiven Verbindungen ist es denkbar und in einigen Fällen auch gezeigt worden, dass wesentliche Strukturmerkmale (Konformationen) im Kristall und in Lösung unterschiedlich sein können.“

²⁴⁶M. Schiffer in *Biophysical Techniques in Photosynthesis* (Hrsg.: J. Ames, A. J. Hoff), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1996**, S. 323: Der pH-Wert und auch die Pufferzusammensetzung, die während einer Kristallisation vorliegen, können Unterschiede im Kristall hervorrufen.

²⁴⁷P. Behrens, *Trends Anal. Chem.* **1992**, *11*(6), 237 - 244.

²⁴⁸P. Eisenberger, B. M. Kincaid, *Science* **1978**, *200*, 1441 - 1447.

Die beiden Bereiche XANES und EXAFS überschneiden sich leicht. Eine genaue Abgrenzung zwischen dem ersten XANES-Absorptionspeak und der gedämpften sinusartigen Schwingung des EXAFS ist nicht möglich.

6.3.3 Hochaufgelöste

Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)

Seit den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass oberhalb der Absorptionskante eine Feinstruktur existiert.²⁴⁹ Die physikalische Beschreibung dieses Phänomens erfolgte dann durch R. DEL KRONIG Anfang der 30er Jahre.²⁵⁰ Aber erst mit den Arbeiten von D. E. SAYERS, E. A. STERN und F. W. LYTLE konnte ein enormer Fortschritt bei den experimentellen Untersuchungen mit der hochaufgelösten Röntgenabsorptionsspektroskopie erreicht werden.^{251,252,253,254}

Die Methode EXAFS beruht auf dem Photoeffekt.²⁵⁵ Bei der Absorption eines Röntgenquants mit geeigneter Energie durch das Absorberatom erfolgt die Promotion eines Elektrons aus der K-Schale des angeregten Elementes (1s-Orbital) ins Kontinuum. Dieses erzeugte Photoelektron breitet sich vom Absorberatom in Form einer Kugelwelle (Primärwelle) aus. Die ausgehende Primärwelle wird an benachbarten Atomen (Rückstreuatome, *kurz*: Rückstreuer) als Sekundärwelle zurückgestreut. Die Primärwelle und die Sekundärwelle interferieren, so dass es zu einer Veränderung des Absorptionskoeffizienten aufgrund einer Zunahme der resultierenden Photoelektronenwelle durch konstruktive bzw. einer Abnahme durch destruktive Interferenzen kommt. Dies wird als Einfachstreuung bezeichnet (Abbildung 6.5, links). Oberhalb der Absorptionskante ist daher als Folge dieser Interferenzen eine sinusartige, stark gedämpfte, periodische Schwingung zu beobachten, die als EXAFS bezeichnet wird.

Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7 zeigen schematisch das Zustandekommen der EXAFS-Feinstruktur im Hochenergie-Ausläufer des Absorptionsspektrums. Bei der Energie E_1

²⁴⁹R. Winter, F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1999**.

²⁵⁰R. del Kronig, *Zeit. Phys.* **1931**, *70*, 317 - 323; ders., *Zeit. Phys.* **1932**, *75*, 191 - 210.

²⁵¹D. E. Sayers, E. A. Stern, F. W. Lytle, *Phys. Rev. Lett.* **1971**, *27(18)*, 1204 - 1207.

²⁵²E. A. Stern, *Phys. Rev. B* **1974**, *10(8)*, 3027 - 3037; F. W. Lytle, D. E. Sayers, E. A. Stern, *Phys. Rev. B* **1975**, *11(12)*, 4825 - 4835; E. A. Stern, D. E. Sayers, F. W. Lytle, *Phys. Rev. B* **1975**, *11(12)*, 4836 - 4846.

²⁵³E. A. Stern in *X-ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES* (Hrsg.: D. C. Koningsberger, R. Prins), John Wiley and Sons, New York, **1988**, S. 3 - 51.

²⁵⁴Ein historischer Abriss (präsentiert auf der 10. XAFS-Tagung in Chicago) ist zu finden unter <http://exafscoucleides.com/history/EXAFS-History.html/>.

²⁵⁵Photoeffekt: Allg. Bezeichnung für alle Veränderungen der Materie, die durch die Bestrahlung mit Licht hervorgerufen werden; im engeren Sinne die Erzeugung von freien beweglichen Ladungsträgern durch Absorption von Lichtquanten. [*Römpp Chemie Lexikon* (Fußnote 3)].

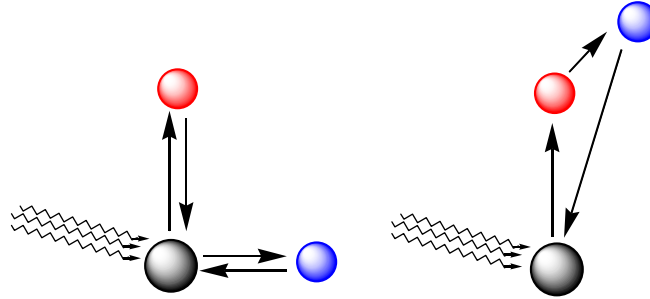


Abbildung 6.5: Einfachstreuung (links) und Mehrfachstreuung (rechts).

sind ausgehende und rückgestreute Welle in Phase (konstruktive Interferenz). Es kommt daher zu einer Zunahme des Absorptionskoeffizienten. Bei der Energie E_2 liegt genau das Gegenteil vor, nämlich destruktive Interferenz.²⁵⁶

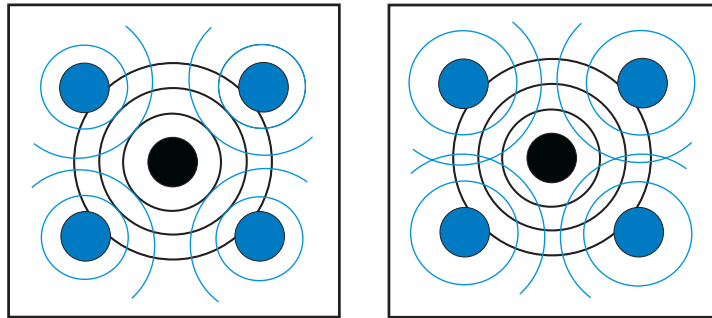


Abbildung 6.6: Konstruktive (links) und destruktive Überlagerung (rechts) von ausgehender und rückgestreuter Photoelektronenwelle.

Durch die Art des rückstreuenden Atoms und seinen Abstand zum Absorberatom wird die Phase der Sekundärwelle definiert. Die Amplitude hängt im Wesentlichen von der Anzahl der Elektronen und dem Abstand des Rückstreuers ab.

Zusätzlich zur beschriebenen Interferenz der Sekundärwelle mit der Primärwelle existiert ein weiterer Effekt, der die EXAFS-Feinstruktur beeinflusst. Liegen die drei Atome A–B–C in einer annähernd linearen Anordnung vor und ist das Atom A der Absorber, so wird die ausgehende Primärwelle von dem Atom B quasi auf das Atom C fokussiert (Abbildung 6.5, rechts).

Dadurch kommt es zu einer Verstärkung des EXAFS-Effektes. Der Beitrag zur EXAFS-Oszillation über Mehrfachstreuung (*multiple scattering*²⁵⁷) ist bei einer exakt linearen

²⁵⁶V. K. Yachandra, M. P. Klein in *Biophysical Techniques in Photosynthesis* (Hrsg.: J. A. Ames, A. J. Hoff), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1996**, S. 337 - 354.

²⁵⁷*multiple scattering*: hier verwendete Abkürzung: MS.

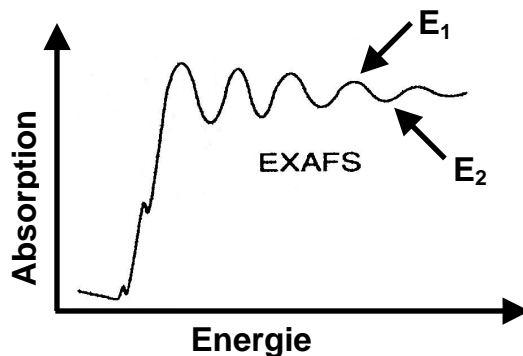


Abbildung 6.7: Röntgenabsorptionsspektrum. E_1 : konstruktive Überlagerung von Wellen, E_2 : destruktive Überlagerung im Bereich der EXAFS-Feinstruktur.

Anordnung ($\angle_{ABC} = 180^\circ$) der dreiatomigen Einheit am größten. Multiple-scattering-Beiträge können bis zu einem Winkel von $\angle_{ABC} \approx 160^\circ$ auftreten.^{258,259}

Die bei der Erzeugung des Photoelektrons entstandene Elektronenlücke wird durch Elektronen aus höheren Energieniveaus aufgefüllt. Die freiwerdende Energie kann u. a. in Form von Fluoreszenzstrahlung oder Auger-Elektronen emittiert werden, wobei die beiden Emissionsprozesse miteinander konkurrieren. Auch diese Folgeprozesse können für die Bestimmung des Absorptionskoeffizienten verwendet werden. Die Detektion der Auger-Elektronen wird insbesondere für die Untersuchung von Oberflächen verwendet, da die mittlere freie Weglänge der emittierten Elektronen gering ist.^{242,260} Bei verdünnten Systemen, in denen die Konzentration an Absorberatomen gering ist, wird die emittierte Fluoreszenzstrahlung²⁶¹ gemessen (Fluoreszenzmodus). Die Messung im Fluoreszenzmodus hat hierbei den Vorteil, dass Untergrundstrahlung unterdrückt und somit die Empfindlichkeit der Methode erhöht wird.²⁶²

Die EXAFS-Modulationen sind die direkte Konsequenz der Wellennatur des Photoelektrons, dessen Wellenlänge durch die DE BROGLIE-Beziehung gegeben ist:

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v} \quad (6.1)$$

²⁵⁸P. Behrens, *Trends Anal. Chem.* **1992**, 11(6), 218 - 222.

²⁵⁹P. A. Lee, J. B. Pendry, *Phys. Rev. B* **1975**, 11(8), 2795 - 2811.

²⁶⁰B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, **1986**, S. 15 ff.

²⁶¹Die Fluoreszenzstrahlung wird senkrecht zum einfallenden Strahl detektiert.

²⁶²B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, **1986**, S. 23.

h ist darin die Plancksche Konstante, m_e die Masse eines Elektrons und v die Geschwindigkeit des Photoelektrons. Die kinetische Energie eines Photoelektrons ist dabei durch Gleichung 6.2 gegeben:

$$(E - E_0) = \frac{1}{2} \cdot m_e \cdot v^2 \quad (6.2)$$

E steht für die Photonenenergie und E_0 für die Ionisationsenergie (Lage der Absorptionskante). Günstiger ist jedoch die Beschreibung der EXAFS-Modulationen als Funktion des Photoelektronen-Wellenvektors k , der mit der Wellenlänge λ in folgender Beziehung steht:

$$k = \frac{2 \cdot \pi}{\lambda} \quad (6.3)$$

Durch Kombination der Gleichungen 6.1 bis 6.3 ergibt sich damit für k :

$$k = \frac{2 \cdot \pi}{h} \cdot m_e \cdot v \quad (6.4)$$

$$\begin{aligned} &= \frac{2 \cdot \pi}{h} \cdot \sqrt{2 \cdot m_e \cdot (E - E_0)} \\ &= \frac{1}{\hbar} \cdot \sqrt{2 \cdot m_e \cdot (E - E_0)} \end{aligned}$$

$$k = \sqrt{\frac{2 \cdot m_e \cdot (E - E_0)}{\hbar^2}} \quad (6.5)$$

Die Energie hat in den Gleichungen die Einheit eV und die Masse eines Elektrons die Einheit kg. Aus der Einheiten-Rechnung (Gleichung 6.6) ergibt sich für k die reziproke SI-Einheit m^{-1} , die in die Einheit \AA^{-1} umgerechnet werden kann.

$$\begin{aligned} [k] &= \sqrt{\frac{\text{kg} \cdot \text{eV}}{\left(\frac{\text{J}}{\text{Hz}}\right)^2}} = \sqrt{\frac{\text{kg} \cdot \text{J}}{(\text{J} \cdot \text{s})^2}} \\ &= \sqrt{\frac{\text{kg}}{\text{J} \cdot \text{s}^2}} = \sqrt{\frac{\text{kg}}{\text{s}^2} \cdot \frac{\text{s}^2}{\text{kg} \cdot \text{m}^2}} = \frac{1}{\text{m}} \end{aligned} \quad (6.6)$$

Die Beschreibung für das EXAFS-Phänomen $\chi(k)$ selbst ist die Differenz zwischen dem gemessenen Absorptionskoeffizienten $\mu(k)$ und dem Absorptionskoeffizienten des freien Atoms $\mu_0(k)$.

Die EXAFS-Feinstruktur $\chi(E)$ kann als relative Änderung des experimentell gemessenen Röntgenabsorptionskoeffizienten μ zum Röntgenabsorptionskoeffizienten μ_0 des freien Atoms in Abhängigkeit von der Energie E beschrieben werden. Bezogen auf den Wellenvektorraum k und normalisiert durch den Beitrag des freien Atoms folgt damit:

$$\chi(k) = \frac{\mu(k) - \mu_0(k)}{\mu_0(k)} \quad (6.7)$$

Für den Fall, dass ein monoatomares Gas in geringer Konzentration vorliegt, kann keine Welle zurückgestreut werden. In diesem Fall ist $\mu(k) = \mu_0(k)$, so dass $\chi(k) = 0$ ist. Es existiert keine Feinstruktur $\chi(E)$.

6.3.4 Die Feinstruktur

Zur Feinstruktur einer Absorptionskurve im EXAFS-Bereich trägt nur die lokale Umgebung des Absorberatoms bis zu einer Entfernung von $\sim 4,5 \text{ \AA}$ bei. Eine Fernordnung in der Probe ist daher nicht erforderlich.

Die EXAFS-Feinstruktur $\chi(k)$ ist insgesamt eine Summe aller Beiträge mit der spezifischen Amplitude und Phase, die beide wiederum von k abhängig sind. Gleichung 6.8 beschreibt $\chi(k)$ als Summe über alle Rückstreuatome j .

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j \cdot |f_j(\pi, k)|}{k \cdot R_{aj}^2} \cdot \sin [2 \cdot k \cdot R_{aj} + \alpha_{aj}(k)] \quad (6.8)$$

Die Feinstruktur $\chi(k)$ ist eine Funktion der Rückstreumplitude $f(\pi, k)$ als Funktion der Ordnungszahl des Rückstreuatoms j , der Zahl N des Rückstreuatoms j und des Abstands R des Rückstreuatoms j vom Absorber a .

Außerdem ist die Feinstruktur $\chi(k)$ durch den Sinus-Term eine Funktion der Phase der Sinuswelle. Der Term $\alpha_{aj}(k)$ bezieht die Phasenverschiebung²⁶³ (Shift) durch das Absorberatom a und durch das Rückstreuelement j mit ein.

²⁶³Phasenverschiebung: *engl.* phase shift; die Phasenverschiebung kennzeichnet den zeitlichen Versatz, den ein Signal gegenüber einem Referenzsignal gleicher Frequenz aufweist.

Um die statische Unschärfe des Ortes aufgrund thermischer Bewegung des Absorbers und des Rückstreuers zu berücksichtigen, wird ein weiterer Term eingeführt, der den Debye-Waller-Parameter σ_{aj} enthält. Der Verlust an Photoelektronen durch inelastische Streuprozesse wird durch die Einführung eines letzten Terms berücksichtigt, in dem λ die mittlere freie Weglänge des Photoelektrons beschreibt:

$$\chi(k) = \frac{\sum_j \frac{N_j \cdot |f_j(\pi, k)|}{k \cdot R_{aj}^2} \cdot \sin [2 \cdot k \cdot R_{aj} + \alpha_{aj}(k)]}{e^{2 \cdot \sigma_{aj}^2 \cdot k^2} \cdot e^{-\frac{2 \cdot R_{aj}}{\lambda}}} \quad (6.9)$$

Der Debye-Waller-Parameter σ_{aj} ist ein Parameter für die statische und dynamische Varianz des Abstandes eines Rückstreuatomes und berücksichtigt damit die „Auslenkung“ (Schwingung) der einzelnen Atome aus ihrer Ruhelage und die statistische Fehlordnung.²⁶⁴

Bei der Auswertung von EXAFS-Daten wird der Parameter $A = 2\sigma_{aj}$ verwendet. Um Verwechslungen mit dem Debye-Waller-Faktor aus der Röntgenstrukturanalyse zu vermeiden, wird der Parameter A in der Röntgenabsorptionsspektroskopie allgemein als Debye-Waller-Parameter bezeichnet.

Der Debye-Waller-Parameter ist mit dem Debye-Waller-Faktor der Röntgenstrukturanalyse direkt vergleichbar. In ihrer Definition liegt allerdings ein Unterschied. Während in der Röntgenstrukturanalyse der Debye-Waller-Faktor die Abweichung der Atome von ihrer mittleren Position beschreibt, ist der Debye-Waller-Parameter in der EXAFS-Spektroskopie ein Maß für die mittlere quadratische Abweichung der interatomaren Absorber-Rückstreuer-Distanz von der mittleren Abstandslänge. Anders definiert, beschreibt der Debye-Waller-Parameter die korrelierte atomare Bewegung mit Verlagerung parallel zur interatomaren Absorber-Rückstreuer-Achse.²⁶⁵

Zur genaueren Beschreibung der einzelnen Terme der EXAFS-Gleichung siehe auch weiterführende Literatur von B. TEO, D. E. SAYERS oder P. BEHRENS.^{258, 266, 267}

²⁶⁴Falls keine Messungen bei verschiedenen Temperaturen vorliegen, sind die Schwingung der einzelnen Atome aus ihrer Ruhelage und die statistische Fehlordnung ununterscheidbar.

²⁶⁵G. E. Brown, G. Calas, G. A. Waychunnas, J. Petiau in *Reviews in Mineralogy*, Vol. 18 (Hrsg.: F. C. Hawthorne, G. E. Brown, G. Calas, G. A. Waychunnas, J. Petiau), Book Crafters Inc., Chelsea, Michigan, **1988**, S. 431 - 512.

²⁶⁶B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, **1986**.

²⁶⁷D. E. Sayers, B. A. Bunker, *Data Analysis*, in *X-ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES* (Hrsg.: D. C. Koningsberger, R. Prins), Wiley, New York, **1988**, S. 211 - 253.

6.3.5 Phasenfunktion und Fourier-Transformation

Aus der EXAFS-Feinstruktur sind mit Kenntnis von Phasen- und Rückstreuamplituden Informationen über die Art, die Anzahl und den Abstand von Rückstreuatomen sowie die Auslenkung der Atome aus ihrer Ruhelage in Form des Debye-Waller-Parameters erhältlich. Die Werte für die Phasenänderung $\alpha_{aj}(k)$ bei der Rückstreuung müssen entweder durch Messung ähnlicher, bekannter Verbindungen experimentell bestimmt oder aber theoretisch berechnet werden.^{268,269}

Für die *ab initio* Berechnung stehen heutzutage verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wobei die Phasenberechnung nach VON BARTH/HEDIN–LUNDQVIST die verbreitetste Methode für die Berechnung mehrerer Koordinationssphären mit Mehrfachstreuung darstellt.^{270,271}

Die EXAFS-Funktion besteht aus der Summe verschiedener Sinuswellen, die sehr stark gedämpft sind. Zur Kompensation dieser Dämpfung wird das EXAFS-Spektrum für Rückstreuatome mit den Ordnungszahlen $Z < 36$ mit k^3 gewichtet ($k \Rightarrow k^3$).²⁷² Aufgrund der sinusartigen Natur der EXAFS-Oszillationen kann mit Hilfe einer Fourier-Transformation²⁷³ die Umwandlung der EXAFS-Funktion im k -Raum in eine Paarverteilungsfunktion (Pseudoradial-Elektronendichte der Umgebung des Absorberatoms) erfolgen. In Abbildung 6.8 ist eine k^3 -gewichtete EXAFS-Funktion und ihre zugehörige Fourier-Transformierte dargestellt.

Das Fourier-transformierte Spektrum enthält Peaks bei — vom Absorberatom aus betrachtet — interatomaren Abständen R' , die vom eigentlichen Abstand R des Rückstreuatoms um α' verschoben sind (Ortsfunktion [Å]). α' ist direkt auf den Phasenshift $\alpha_{aj}(k)$ bezogen. Erst durch eine entsprechende Phasenverschiebung können die systematisch um $0,2 - 0,5 \text{ Å}$ kleineren Werte für die Abstände R in der Fourier-Transformierten korrigiert werden.

Aus dem phasenkorrigierten Spektrum können dann die Abstände R visuell abgeschätzt werden. Bei diesem Vorgehen ist aber Vorsicht geboten, da sich durch Interferenzeffekte nicht nur eine Summation der Beiträge in der Ortsfunktion ergeben kann, sondern auch

²⁶⁸J. J. Rehr, J. M. de Leon, S. I. Zabinsky, R. C. Albers, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5135 - 5140.

²⁶⁹A. G. McKale, B. W. Veal, A. P. Paulikas, S. K. Chan, G. S. Knapp, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3763 - 3768.

²⁷⁰M. Vaarkamp, I. Dring, R. J. Oldman, E. A. Stern, D. C. Koningsberger, *Phys. Rev.* **1994**, *B50(11)*, 7872 - 7883.

²⁷¹D. C. Koningsberger, B. L. Mojet, G. E. v. Dorssen, D. E. Ramaker, *Top. Catalys.* **2000**, *10*, 143 - 155.

²⁷²B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, **1986**, S. 121.

²⁷³Fourier-Transformation: Zerlegung von Funktionen in Summen sinusförmiger Funktionen; nach Jean-Baptiste-Joseph Fourier (1768 - 1830); R. N. Bracewell, *Spektrum der Wissenschaft* **1989**, *8*, 90 - 99.

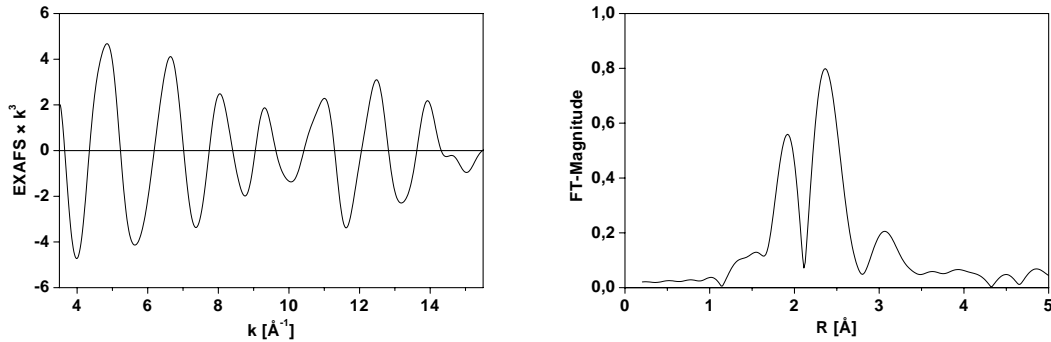


Abbildung 6.8: Die k^3 -gewichtete EXAFS-Finstruktur (links) und ihre zugehörige Fourier-Transformierte (rechts).

Auslöschungen von Rückstreubeiträgen in der EXAFS-Finstruktur auftreten können. Derartige Auslöschungen führen auch in der Ortsfunktion zu einer Abnahme der Amplitude des entsprechenden Peaks bis zu seinem vollständigen Verschwinden.

Die Anpassung eines Peaks in der Ortsfunktion durch Simulationsrechnungen erfolgt zum einen über eine Variation des Abstandes R einer geeigneten Rückstreuerschale mit bestimmter Besetzungszahl N und zum anderen über den Debye-Waller-Parameter A . Je eingeschränkter der gesamte Messbereich ist, desto breiter sind die Peaks in der Ortsfunktion.

Die Phase eines bestimmten Elementes spielt allerdings bei der Anpassung eines Modells an die Finstruktur eine entscheidende Rolle, so dass (auch wenn augenscheinlich eine Auflösung von Peaks in der Fourier-Transformation nicht mehr möglich erscheint) eine eindeutige Lösung gefunden werden kann.

Die Fourier-Transformation stellt eine Umwandlung der EXAFS-Funktion im komplexen Zahlenraum dar. Die erhaltene Funktion z setzt sich daher aus einem Real- (\Re) und einem Imaginärteil (\Im) zusammen:

$$z = \Re + i \cdot \Im \quad \text{mit } i = \sqrt{-1} \quad (6.10)$$

Der Absolutbetrag bzw. der Modulus (Mod) der Fourier-Transformation ist die Einhüllende, die durch die EULER'sche Formel definiert ist:

$$Mod = |z| = \sqrt{\Re^2 + \Im^2} \quad (6.11)$$

Der Modulus Mod wird hauptsächlich durch die Zahl der Rückstreuatome (Besetzungszahl N) und den Debye-Waller-Parameter A bestimmt.²⁷¹ Üblicherweise wird die Fourier-Transformierte als Modulus angegeben (vgl. Abbildung 6.8).

Die komplexe Zahl z kann jedoch auch über ihre Polarkoordinaten festgelegt werden:

$$z = Mod(\cos \varphi + i \cdot \sin \varphi) \quad (6.12)$$

In dieser Schreibweise wird deutlich, dass der Imaginärteil \Im auch als der Sinus der Phase φ zu beschreiben ist. Die Darstellung des Sinusanteils der Fourier-Transformierten ist bei der Analyse von EXAFS-Daten sehr hilfreich. In dieser Ansicht kann besonders gut beurteilt werden, wie präzise die Anpassung an die experimentellen Daten ist und in welchem Bereich Abweichungen vorhanden sind (vgl. Abbildung 4.35, S. 86).

Der umgekehrte Weg einer Fourier-Transformation ist die Rücktransformation einer nicht-phasenkorrigierten Ortsfunktion in den k -Raum. Sie wird zur Isolation einzelner Beiträge eines bestimmten Abstandsbereiches genutzt und als Fourier-Filterung bezeichnet.

Mit dieser Methode können einzelne Abschnitte unabhängig vom übrigen Teil des Spektrums ausgewertet werden. Die Isolationstechnik funktioniert gut, wenn die Rückstreuatome ausreichend separiert voneinander vorliegen, d. h. mit einem Unterschied im radialen Abstand vom Absorber von $\sim 1 \text{ \AA}$.

Im Bereich von Mehrfachstreuereffekten, die schon ab $\sim 3 \text{ \AA}$ Abstand vom Absorberatom auftreten können, ist eine Trennung von den Einfachstreuereffekten nicht mehr möglich.

Bei Anwendung der Fourier-Filterung zur Isolation einzelner Beiträge ist zu beachten, dass das Intervall zur Fourier-Filterung, das so genannte „Fenster“ der Rücktransformation, nicht zu eng gewählt wird.²⁷⁴ Ansonsten kann ein Teil des gewünschten Beitrags abgeschnitten werden. Dies führt zu einem Fehler in der Anpassung dieses Beitrags und kann die Interpretation sogar unmöglich machen.

Wendet man die Fourier-Filterung auf den gesamten Datenbereich an, ohne Einzelbeiträge zu isolieren, so erhält man ein EXAFS-Spektrum, das praktisch frei von störendem Untergrund (langwellig) und Rauschen (kurzwellig) ist. Die Qualität des Spektrums ist damit

²⁷⁴Als Fenstergrößen R_{min} und R_{max} sind die Werte einzusetzen, die bei Anzeige der Fourier-Transformation die Grenzen eines Beitrags beschreiben. Das Programm EXCURVE filtert die Daten ohne Rücksicht auf die Anzeige von Phasenkalkulation oder k^3 -Wichtung mit den angegebenen Grenzen.

nicht höher als die des Rohspektrums,²⁷⁵ erlaubt aber durch diese Art der Filterung eine schnellere und leichtere Anpassung des Modells an die EXAFS-Feinstruktur $\chi(k)$.

Die Methode nimmt allerdings keine Rücksicht auf die unterschiedliche Verteilung des Rauschens im Spektrum. In einem k^3 -gewichteten Spektrum ist das Rauschen bei hohem k wesentlich stärker als bei niedrigem k -Wert. Eine dynamisch-adaptive Bearbeitung eines Spektrums, die die variierende Verteilung des Rauschens im Spektrum berücksichtigt, ist mit dem Programm DEPP²⁷⁶ möglich. Je nach Rauschpegel wird eine Anzahl von benachbarten Punkten im Spektrum durch Mittelung zu einem neuen Datenpunkt zusammengefasst. Hierbei wird nur so weit zusammengefasst, dass die Punktdichte bei großem k und geringer Datenqualität nicht zu weit verringert wird.

6.3.6 Analyse von EXAFS-Daten

6.3.6.1 Vorauswertung

Bei der Aufnahme der Messdaten werden die Daten elektronisch gespeichert. Die nachfolgenden Schritte bei der Analyse von EXAFS-Daten sind mittlerweile standardisiert und können in die Bereiche Datenreduktion, Datenextraktion, Modellierung und Anpassung (Iteration, das „Fitten“) unterteilt werden. Im Einzelnen werden folgende Schritte durchlaufen:

1. Korrektur des sogenannten Spektrometer-Shifts
(Kalibrierung der Energieskala)
2. Datensichtung: Visuelle Prüfung der Daten und Entfernung von abweichenden Datensätzen
3. *Deglitching* der Daten: Entfernung von einzelnen Messpunkten im Spektrum, die eindeutig nicht zur Feinstruktur gehören
4. Entfernung des Untergrunds unterhalb und oberhalb der Absorptionskante
5. Normalisierung des Spektrums auf einen Kantenhub von eins

²⁷⁵„A spectrum contains a specific amount of information, and it is not possible to get out of the spectrum refinement more information than the spectrum contains“ [aus: F. C. Hawthorne, G. A. Waychunas in *Reviews in Mineralogy and Geology, Vol 18: Spectrum Fitting Methods*, Book Crafters Inc., Chelsea, Michigan, 1988, S. 77.]

²⁷⁶DEPP: *D ata E nhancement P rogram P ackage* von J. Groppe; J. Groppe, *Dissertation*, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 1999.

6. Extraktion des EXAFS-Signals $\chi(k)$
7. Dynamisch-adaptive Glättung des Spektrums mit dem Programm DEPP (vgl. Abschnitt 6.3.5)
8. Fourier-Transformation von $\chi(k)$ zur Erzeugung einer Pseudoradial-Elektronendichte-Funktion
(Transformation vom Frequenzraum in den Abstandsraum)
9. Inverse Fourier-Transformation der Pseudoradial-Elektronendichte-Funktion zur Isolation eines EXAFS-Beitrags und eventuell Fourier-Filterung des gesamten Spektrums (vgl. Abschnitt 6.3.5, S. 164)
10. Berechnung von Amplituden und Phasen für das jeweilige Absorber-Rückstreuer-Paar
11. Modellierung und Iteration der Parameter²⁷⁷ des Modells nach einem mathematischen Algorithmus (z. B. *Least-Squares*) zur Bestimmung eines analytischen EXAFS-Ausdruckes für die Beschreibung der gemessenen EXAFS-Funktion

Die Schritte 1 – 3 dienen der Vorselektion und der Reduktion der Daten. Die Schritte 4 – 6 sind zur Extraktion der EXAFS-Daten notwendig. Diese Vorauswertung wird in der vorliegenden Arbeit mit dem Programmpaket EXPROG¹⁶¹ durchgeführt, das auf die EXAFS-Beamline des EMBL¹⁵⁰ in Hamburg angepasst ist (siehe dazu die Abschnitte 3.2.4 (S. 35) und 3.2.6 (S. 41)).

Die Auswertung von Daten wird durch die Schritte 7 – 11 beschrieben. Dies umfasst sowohl die Vorbereitung inklusive der Aufstellung eines Modells (Modellierung) als auch die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten.

6.3.6.2 Auswertung

Die Auswertung von EXAFS-Daten gliedert sich in die Bereiche Modellierung und Anpassung. Bei der Modellierung wird ein Startmodell aufgestellt, das in der nachfolgenden iterativen Anpassung an die experimentellen Daten angepasst wird.

In die Modellierung fließen Informationen über die Absorptionskante, an der gemessen wurde, oder die Ergebnisse von Röntgenstrukturanalysen, anderer Spektroskopien und Sequenzanalysen ein (Abbildung 6.9).

²⁷⁷Ein Modell enthält u. a. die Parameter Besetzungszahl N einer Schale, Abstand R des Rückstreuatoms vom Absorberatom und den Debye-Waller-Parameter A .

Atome oder Atomgruppen in der lokalen Umgebung des Absorberatoms werden hierbei im Startmodell in Form von einzelnen Schalen berücksichtigt. Jede Schale enthält Angaben über die Art, die Anzahl und den Abstand der Rückstreueinheit vom Absorberatom sowie den Debye-Waller-Parameter, der abgeschätzt vorgegeben wird.

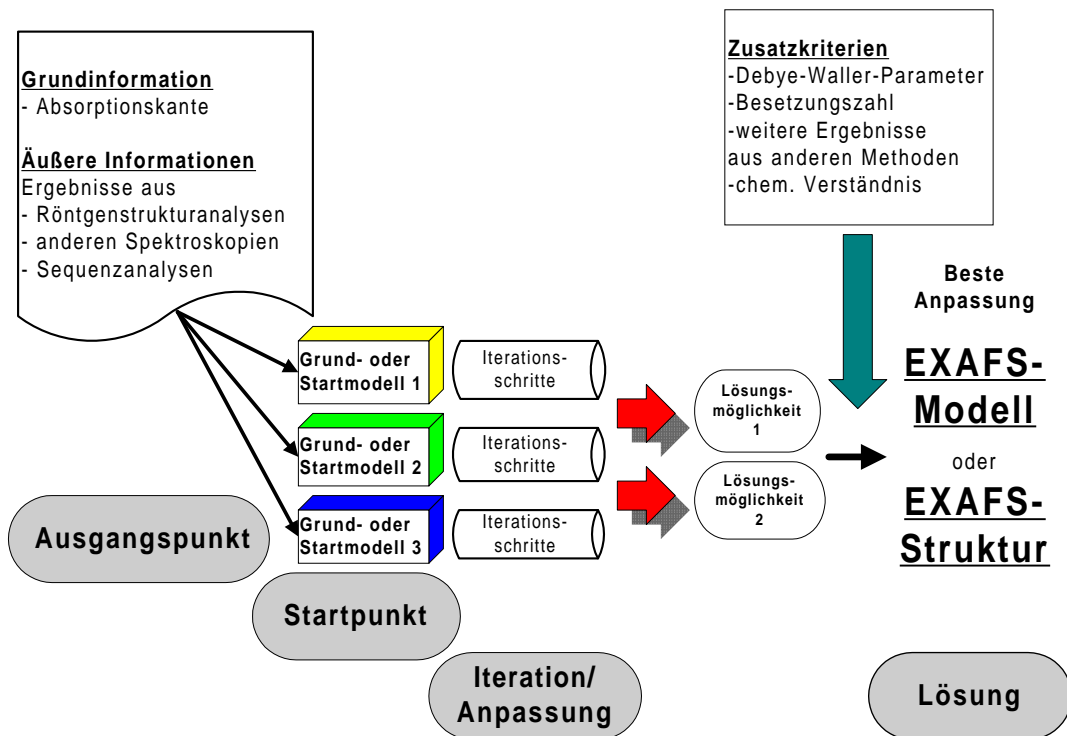


Abbildung 6.9: Auswertung von EXAFS-Daten.

Das aufgestellte Startmodell ist der Startpunkt einer Anpassung. Sind mehrere Möglichkeiten für die lokale Umgebung des Absorberatoms denkbar, existieren entsprechend unterschiedliche Grund- oder Startmodelle. Auf dieser Basis wird eine Kurve an die gemessene Funktion angepasst. Dabei kann die Anpassung sowohl im k -Raum als auch im R -Raum durchgeführt werden.²⁷¹ Einzelne Parameter eines Startmodells werden während der Verfeinerung (Iteration) festgehalten oder freigegeben. So nähert man sich schrittweise einer besseren Anpassung an die experimentellen Daten. Das Resultat dieser Anpassung ist die berechnete Funktion.

Ein Modell kann sehr umfangreich sein und eine beliebig große Zahl an Schalen aufweisen. Es ist jedoch bei der Anpassung eines derartigen Modells zu bedenken, dass die Freigabe einer zu großen Anzahl an Modellparametern bei der Iteration zur Unterbestimmung der

Anpassung führt. Deshalb sollte die Zahl der freigegebenen Parameter bei einer Verfeinerung begrenzt sein.

Die maximale Anzahl der freigegebenen Parameter n_{frei} ist sowohl von dem Intervall des betrachteten Radius R (z. B. bei einer Fourier-Filterung) als auch der Weite des Messbereichs oberhalb der Absorptionskante (k -Raum) abhängig. Die Anzahl n_{frei} der maximal möglichen freien Parameter kann mit der folgenden Formel abgeschätzt werden:²⁷⁸

$$n_{frei} \approx 2 \cdot \frac{(R_{max} - R_{min}) \cdot (k_{max} - k_{min})}{\pi} \quad (6.13)$$

Einen ersten Anhaltspunkt zur Güte des angepassten Modells gibt der zur Röntgenstrukturanalyse analoge Residualwert R (R-Faktor). Er wird in Prozent angegeben.²⁷⁹

$$R = \sum_{i=1}^N \frac{k_i^3 \left| \chi^{exp}(k_i) - \chi^{calc}(k_i) \right|}{\sum_{j=1}^N k_j^3 \left| \chi_j^{exp}(k_j) \right|} \cdot 100 \% \quad (6.14)$$

Bei verschiedenen Lösungsmöglichkeiten, die eine ähnlich gute Anpassung an die experimentellen Daten darstellen, müssen weitere Informationen herangezogen werden (vgl. Abbildung 6.9, S. 169). Das Ergebnis der Kurvenanpassungsanalyse stellt die beste Lösung (beste Anpassung) dar und wird als „EXAFS-Struktur“ (häufig auch nur als Struktur) bezeichnet.

6.3.7 Auswertungsprogramme

Für die Anpassung von Modellen an EXAFS-Feinstrukturen sind verschiedene Programme erhältlich. Im Folgenden soll eine Auswahl kurz mit ihren speziellen Eigenschaften vorgestellt werden.

Die erhältlichen Auswertungsprogramme unterscheiden sich hauptsächlich durch das verwendete Betriebssystem und die grafische Darstellung. Inhaltlich werden von den meisten Programmen die gleichen theoretischen Grundlagen verwendet. Etabliert haben sich hierbei die Berechnungen mit Phasen nach VON BARTH/HEDIN-LUNDQVIST.

Die beiden bekanntesten Programme sind EXCURVE und FEFF, wobei EXCURVE in Europa am verbreitetsten ist. EXCURVE ist eine Entwicklung aus dem DARESBURY

²⁷⁸B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, **1986**, S. 132.

²⁷⁹Im Gegensatz zum Fit-Index ist der R-Faktor u. a. unabhängig von der Anzahl der Datenpunkte im Spektrum.

LABORATORY (England) und läuft unter dem Betriebssystem UNIX. Es ist heute in der Version EXCURV98 erhältlich. Entwickelt wurde das Programm von N. BINSTED und S. GURMAN und basiert auf der Curved-Wave-Theorie. Seit der Version von 1992 (EXCURV92) sind Berechnungen der Potentiale und Phasen nach VON BARTH/ HEDIN-LUNDQVIST möglich. Alle Anpassungen werden im k -Raum durchgeführt.

Das Programm FEFFIT von M. NEWVILLE von der University of Washington (USA) hat hauptsächlich lokale Bedeutung für die Modellierung von EXAFS-Daten erlangt. FEFFIT passt die theoretisch berechneten Daten des Programms FEFF an experimentelle XAS-Spektren an. Beide Programme haben (wie EXCURVE) Kommandozeilen-basierte Benutzeroberflächen und laufen u. a. unter dem Betriebssystem UNIX. IFEFFIT ist die neue Entwicklung von M. NEWVILLE, das als interaktive Software zur XAS-Analyse das Programm FEFFIT mit einer grafischen Ausgabe von XAS-Daten kombiniert.²⁸⁰ Ein Vergleich von EXCURVE und FEFFIT findet sich bei KONINGSBERGER *et al.*,²⁷⁰ wobei EXCURVE nur in der Version von 1990 getestet wurde, in dem noch X_α -Phasen verwendet werden. Gerade die Benutzung dieser Phasen hat gezeigt, dass das Ergebnis der Datenanalyse von der Realität weiter abweicht als bei der Verwendung der VON BARTH/-HEDIN-LUNDQVIST-Phasen.

Die Software XDAP²⁸¹ von den Autoren M. VAARKAMP, H. LINDERS und D. KONINGSBERGER aus den Niederlanden enthält Module für die Datenreduktion und für die Auswertung von Spektren.²⁸² Sie läuft u. a. unter den Betriebssystemen MICROSOFT WINDOWS, MacOS und UNIX. Das Programmpaket basiert auf einer grafischen Benutzeroberfläche, so dass die Parametereingabe übersichtlich gestaltet ist. Die unterschiedlichen Datenformate von verschiedenen Synchrotronstrahlungsexperimenten und auch Fluoreszenzdaten von einem Multi-Element-Detektor können eingelesen werden. Mit XDAP ist die Datenanalyse sowohl im k - als auch im R -Raum möglich, wobei für jede Variable ein Intervall mit festen Grenzwerten für die Verfeinerung definiert werden kann. Die Zahl der Streuwege im Modell ist auf neun Einfach- oder Mehrfach-Streuwege limitiert.

GNXAS ist ein Modellierungs- und Anpassungsprogramm aus Italien, das unter dem Betriebssystem LINUX läuft. Der Hauptautor des FORTRAN-77-Codes ist A. FILIPPONI von der Università dell' Aquila. Hier wird als Anpassungsalgorithmus das *Simplex*-

²⁸⁰Vgl. <http://cars9.uchicago.edu/ifeffit/>.

²⁸¹XDAP: XAFS Data Analysis Programm; <http://www.xsi.nl/>.

²⁸²M. Vaarkamp, I. Dring, R. J. Oldman, E. A. Stern, D. C. Koningsberger, *Phys. Rev.* **1994**, *B50*, 7872 - 7883; M. Vaarkamp, J. C. Linders, D. C. Koningsberger, *Phys. B* **1995**, *208/209*, 159 - 160; M. Vaarkamp, *Catalys. Today* **1998**, *39*, 271 - 279.

Verfahren²⁸³ nach NELDER/MEAD²⁸⁴ verwendet, während alle anderen vorgestellten Programme das *Least-Squares*-Verfahren nach LEVENBERG/MARQUARDT²⁸⁵ benutzen. Die Datenanpassung erfolgt bei GNXAS im Abstandsraum (R -Raum) und nicht im k -Raum. Für die Benutzung dieser Software sind — im Vergleich zu den oben genannten Programmen — wesentlich mehr aufwendige Setup-Einstellungen schon für einfache Modellierungsschritte erforderlich, so dass für höhermolekulare und komplizierte Verbindungen mit großen MS-Einheiten der Anwender vor immense praktische Probleme gestellt wird. Ein weiterer Nachteil von GNXAS ist neben der benutzerunfreundlichen Oberfläche die Tatsache, dass — so der Autor des Programms — Fehler in den Eingabeparametern oft vom Programm selbst nicht erkannt werden. Dies führt laut dem Autor dazu, dass für die Bedienung des Programms vom Nutzer fundierte Kenntnisse über den theoretischen Hintergrund der EXAFS-Spektroskopie verlangt werden, um Trivialfehler oder Fehlkalkulationen auszuschließen.²⁸⁶

Das Programm WinXAS²⁸⁷ von T. RESSLER aus Berlin besitzt hingegen eine grafische Benutzeroberfläche und läuft unter dem Betriebssystem MS-WINDOWS. Damit bietet es, gegenüber der Kommandozeilen-Software, dem unerfahrenen Nutzer den Vorteil einer einfachen und vor allen Dingen übersichtlichen Bedienung. Alle Programmschritte, vom Laden der Daten bis zur visualisierten Ausgabe, erfolgen in einer einzigen Programmumgebung. Die parallele Analyse mehrerer Spektren, wie sie z. B. bei zeitaufgelösten Spektren vorhanden sind, ist genau wie in den anderen bisher vorgestellten Programmen zusätzlich möglich. WinXAS greift auf die von FEFF generierten theoretischen Phasen- und Amplitudeninformationen zurück. Der Anspruch von WinXAS ist aber nach Aussage des Autors nicht der Ersatz anderer Programme, sondern die Ergänzung für eine schnelle Datenanalyse an der Beamline. Für umfassende *multiple-scattering*-Rechnungen mit theoretischen Phasen- und Amplitudeninformationen wird jedoch zusätzliche Software benötigt, die diese Art der Datenanalyse unterstützen.

Cerius² mit dem Modul EXAFS der Firma msi¹⁶⁵ bietet eine grafische Oberfläche für das Programm EXCURVE und basiert auf dem Programmcode EXCURV92. Cerius² ermöglicht dem Nutzer durch die übersichtlich gestaltete Oberfläche einen schnellen Einstieg

²⁸³Das Simplex-Verfahren benötigt normalerweise wesentlich mehr Iterationsschritte bis zur Konvergenz als andere Routinen. Außerdem ist es möglich, dass die Simplex-Routine bei der ersten Konvergenz nur in ein lokales Minimum gelaufen ist. Deshalb ist es angebracht, die Iteration zu wiederholen, um sicher sein zu können, das absolute Minimum gefunden zu haben.

²⁸⁴J. A. Nelder, R. Mead, *Comp. J.* **1965**, 7, 308 - 313.

²⁸⁵K. Levenberg, *Qty. Appl. Math.* **1944**, 2, 164 - 168; D. W. Marquardt, *SIAM J.* **1963**, 11, 431 - 441; P. R. Bevington, D. K. Robinson, *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, 2. Aufl., McGraw-Hill Text, New York, **1992**.

²⁸⁶<http://www.aquila.infn.it/gnxas>; <http://gnxas.unicam.it/>.

²⁸⁷<http://www.winxas.de/>.

in die Analyse von EXAFS-Daten. Schalenmodelle sind schnell aufgebaut, und während der einzelnen Iterationsschritte einer Anpassung können die Änderungen in der Anpassung, sowohl im k -Raum als auch im R -Raum, direkt verfolgt werden. Die Definition von Mehrfach-Streuwegen ist einfach und durch simple Aktivierung über einen Mausklick können einzelne Parameter des Modells verfeinert werden. Dem erfahrenen Anwender ist so viel Freiheit in und mit dem Programm gelassen worden, dass die Oberfläche oder einzelne Funktionen über Kommandozeilen neu konfiguriert werden können. Ein Update des EXAFS-Moduls (mit der neuen Programmversion von EXCURVE) soll erst Ende des Jahres 2002 und dann unter der Softwarepaketbezeichnung *Materials Studio* erhältlich sein.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Programmversionen EXCURV92 und EXCURV98 soll nach Angabe des Autors N. BINSTED in der Möglichkeit der Simultananalyse mehrerer Spektren liegen. Änderungen der Phasenberechnung ziehen nur sehr geringe bis keine Unterschiede im Ergebnis nach sich.

Deutlich interessanter in der Version EXCURV98 ist die Funktion des „*full cluster multiple scattering*“. Dabei werden nicht nur die Mehrfachstreuwege in einer MS-Einheit berechnet, sondern alle Mehrfachstreuwege berücksichtigt — inklusive der Wege über das Zentralatom. Diese Art der Berechnung von Mehrfachstreuwegen könnte vor allem für die Modellierung von ebenen Porphyrinsystemen nützlich sein, in denen das Zentralatom genau in der Ebene des Porphyrinrings liegt.²⁸⁸ *Multiple-scattering*-Beiträge dieser Art liegen dann im Abstandsbereich vom Absorberatom von ungefähr 4 Å und nehmen um so stärker ab, je weiter die Lage des Zentralatoms außerhalb der Porphyrinebene lokalisiert ist.

Im Fall des Eisen-Porphyrinsystems der ba₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* soll das zentrale Eisenatom in dieser Ebene liegen, so dass in diesen Spektren bei dem doppelten Abstand des Fe-N_{Porphyrin}-Abstands ein weiterer Beitrag im Spektrum vorhanden sein sollte.⁶⁹ Bei den Auswertungen in dieser Arbeit blieb ein solcher Beitrag unberücksichtigt und könnte daher im Bereich von etwa 4 Å zu einem geringfügigen systematischen Fehler der modellierten Abstände oder Debye-Waller-Parameter führen.

EXCURV98 verfügt zusätzlich über eine Aminosäuredatenbank, in der Grundstrukturen von Aminosäuren für die Benutzung in EXCURVE vordefiniert sind. Eine solche Datenbank ist in Cerius² schon ansatzweise vorhanden und kann durch eigene Modelle erweitert werden. Das Programm Cerius² ist für die Auswertung von EXAFS-Daten komplexer

²⁸⁸ Ionen mit dem Radius von ca. 60 – 70 pm passen am Besten in das „Loch“ der Tetrapyrrol-Makrozyklen. Ein high-spin Fe^{III} könnte in einer derartigen *in-plane*-Struktur vorliegen, während ein high-spin Fe^{II} zu groß sein soll (*out-of-plane*-Struktur). Vgl. W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart, 1995, S. 29.

Systeme auch durch seine Übersichtlichkeit und Darstellung der verschiedenen Graphen insgesamt gut geeignet. Für die Modellierung der Daten in dieser Arbeit wurde deshalb Cerius² in der Version 3.5 verwendet.

6.3.8 Vorteile und Grenzen von EXAFS

In dieser Arbeit werden sowohl Daten von Enzympräparationen als auch von kleineren metallhaltigen Komplexen mit der Methode EXAFS untersucht. Die Grenzen der Methode werden hierbei teilweise erreicht und u. a. in den Abschnitten zur Interpretation der Ergebnisse dargestellt.

Allgemein bietet EXAFS gegenüber anderen strukturaufklärenden Methoden vor allen Dingen bei der Untersuchung von makromolekularen Systemen Vorteile. Einkristalle oder eine Fernordnung in der Probe sind für röntgenabsorptionsspektroskopische Untersuchungen nicht notwendig.

Unabhängig vom Aggregat- und Gesamtzustand²⁸⁹ der Probe ist eine Aufklärung der Struktur in der lokalen Umgebung eines spezifischen Absorberatoms möglich. Ist die Konzentration der zu untersuchenden Substanz nicht zu klein, so spielt diese eine untergeordnete Rolle, da sie in Grenzen durch eine längere Messzeit und optimierte Messstrategien (vgl. Abschnitt 3.2.3, S. 33) kompensiert werden kann.

Vorteilhaft ist auch, dass die Umgebung verschiedener Metallatome unabhängig voneinander untersucht werden kann. Umgebendes Protein oder Wasser stören dabei nicht. Allerdings kann ein enthaltener Absorber unter Umständen den Messbereich an einer anderen Kante einschränken, so dass dadurch die Auflösung begrenzt ist. Beispielhaft sei hier die Limitierung von Cu-K-Kanten-Messungen durch die Zn-K-Kante, die nur ca. 680 eV oberhalb der Cu-K-Kante liegt, genannt. Der Messbereich und damit die Auflösung einer Cu-Kanten-Messung wird durch die Anwesenheit von Zink in der Probe verringert.

Andernfalls können bis zu einem Abstandsbereich von 4,5 – 5 Å vom Absorberatom hohe Genauigkeiten im Abstand bis zu 0,01 Å erreicht werden. Die Ergebnisse liefern außer bei Untersuchungen mit *multiple-scattering* — im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse — nur ein eindimensionales Bild der Struktur.

Im EXAFS-Ergebnis drückt sich die Varianz eines Systems in der Größe der Debye-Waller-Parameter aus. Gelöste Substanzen werden daher meist bei tiefen Temperaturen im Bereich von 20 K gemessen, um die dynamische Varianz²⁹⁰ im System zu verringern. Durch

²⁸⁹Die Probe sollte über eine homogene und bekannte Zusammensetzung verfügen.

²⁹⁰vgl. dazu den Absatz auf S. 163 in Abschnitt 6.3.4.

das Schockgefrieren von Lösungen wird die Auskristallisation der Verbindung kinetisch gehemmt. Auf diese Weise ist es möglich, die Zustände, wie sie bei Raumtemperatur vorliegen, in der Probe zu fixieren (gefrorene Lösungen). Daraus resultieren auch bei Tieftemperaturmessungen relativ hohe Debye-Waller-Parameter.

Die mit EXAFS berechneten Koordinationszahlen können in Abhängigkeit von der Güte der Daten und des Modells Fehler in der Größenordnung von bis zu 20 % aufweisen. Aus diesem Nachteil kann schon eine Grenze der Methode EXAFS abgeleitet werden. Daher sind Informationen aus Ergebnissen anderer Methoden teilweise notwendig, um ein EXAFS-Modell aufbauen zu können oder um zwischen verschiedenen Lösungsmöglichkeiten zu entscheiden.

Eine weitere Grenze der Methode wird erreicht, wenn mehrere Absorberatome mit ähnlicher Umgebung in der Probe vorhanden sind. Für die gleichen Rückstreuer im ähnlichen Abstandsbereich vom Absorber werden dann nur Mittelwerte für die Abstände bestimmt. Außerdem sind im Periodensystem benachbarte Elemente aufgrund ähnlicher Phaseninformationen prinzipiell nicht unterscheidbar. Beispiele hierfür sind die Paare N/O und S/Cl. Sauerstoff- und Stickstoffrückstreuer werden daher zusammenfassend als Leichtstreuer (N/O) bezeichnet.

EXAFS ist jedoch die einzige Methode, die die Analyse von Strukturen in Lösung zulässt und direkte Strukturinformationen liefert. Erfahrung und Weiterentwicklungen der Methode sowie der Rechnerkapazitäten definieren die Grenzen der Methode neu und zeigen weitere Möglichkeiten für den Einsatz der hochaufgelösten Röntgenabsorptionsspektroskopie.

6.4 DORIS-III-Ring am HASYLAB in Hamburg

Synchrotronstrahlung bei DORIS III / HASYLAB	
Energiebereich der Positronen	3 – 5,3 GeV
Positronen-Strahlstrom	150 – 70 mA
Umlauflänge	289,2 m
Teilchenpakete (<i>Bunches</i>)	1, 2 und 5 Bunches
Lichtblitze (im 5 Bunch-Mode)	150 ps lang, im Abstand von 191 ps
Separation der Bunches	192 ns
Teilchen pro Bunch	$1,81 \times 10^{11}$
Umlauffrequenz	7,5 MV
Magnetfeld der Ablenkmagnete	1,2182 T
Zeit zwischen zwei Füllungen	8 – 10 h

6.5 EMBL-EXAFS-Messstand am HASYLAB in Hamburg

Parameter des EMBL-EXAFS-Messstandes D2 am HASYLAB	
Strahlungsquelle	Ablenkmagnet am Speicherring DORIS III (Positronen-Energie: 4,5 GeV)
Monochromator	Si(111)-Doppel-Kristall-Monochromator, Unterdrückung von harmonischen Schwingungen durch Detuning
Spiegel	toroidal, 4 Segmente, 1,8 m gesamte Länge, goldbeschichtet
Strahlgröße auf der Probe	5,0 mm × 1,5 mm
Energiebereich	5,0 keV bis 30,0 keV (bis 21,0 keV: fokussiert)
Detektoren	2 mit Gas befüllbare Ionisationskammern, 13-Element-Germanium-Detektor (CANBERRA)
Kryostat	2-Stufen Kühlung, $T_{\min} = 17$ K, Helium Austauschgas
Energiekalibration	statischer Si(220)-Kristall mit Detektoren (Szintillatoren) zur Aufnahme der Braggreflexe, Präzision $\sim 0,1$ eV

6.6 Das Programmpaket EXPROG

Ein Rohdaten-File von der EMBL EXAFS-Beamline D2 in Hamburg besteht jeweils aus zwei zueinandergehörenden Dateien, die als „header-Datei“ ($e??000.[Datum]$)²⁹¹ und „Binärdaten-Datei“ ($e??001.bin$) bezeichnet werden. Die „?“ im Dateinamen stehen hier für ein variables Zeichen.

Die *header*-Dateien enthalten neben einer Zeile für die Beschreibung der Daten Informationen darüber, wie die Binärdaten gelesen werden müssen. Mit Hilfe einer Batch-Datei können alle Programme des Programmpakets EXPROG¹⁶¹ zur Bearbeitung der EXAFS-Daten der Reihe nach automatisch aufgerufen werden. In der nachfolgenden Tabelle ist eine Auswahl der Programme des EXPROG-Programmpakets aufgelistet. Bis zum Programm *remove* sind sie in der Reihenfolge ihrer Verwendung bei der Datenvorauswertung und -extraktion angegeben.

PROGRAMM	EINGABE	AUSGABE	FUNKTION
redup.exe	$e??000.924$ $e??001.bin$	$i??000.ext$ $i??001.ext$	Umwandlung der experimentellen Daten-Files in das „Standard File Format“ für die weitere Datenbewertung
corrdea.exe	$i??000.ext$ $i??001.ext$	$j??000.ext$ $j??001.ext$	Korrektur der Totzeit (Correction Deadtime)
absgen.exe	$i??000.ext$ $i??001.ext$ absgen.par	$x??000.ext$ $x??001.ext$ absgen??.log	Generierung der Absorptionsdaten, Umwandlung der Abszisseneinheit „Motorschritte“ in „Energie“
flugen.exe	$i??000.ext$ $i??001.ext$ flugen.par	$r??000.ext$ $r??001.ext$ flugen??.log	Generierung der Fluoreszenzdaten für eine Zahl von Channels, Umwandlung der Abszisseneinheit „Motorschritte“ in „Energie“
locref.exe	$r??000.ext$ $r??001.ext$ culp.dat culn.dat	res??.dat	Auffinden der Reflexionen in den Kalibrationskanälen entweder durch automatisches oder manuelles Anpassen einer Gaußkurve an das Profil.

²⁹¹Das Format der Extension $[Datum]$ umfasst drei Stellen. Eine Stelle für die Zahl des Monats im Jahr (für die Monate Oktober (10), November (11) und Dezember (12) werden die Zeichen a, b und c) und zwei Stellen für den Tag. Beispiel: am 06. Dezember gemessene Daten erhalten die Extension „c06“.

PROGRAMM	EINGABE	AUSGABE	FUNKTION
rotax.exe	res??.dat	rot??.dat	Rotation des Kalibrators zur Verfeinerung der Winkel α und β
calen.exe	r??000.ext r??001.ext rot??.dat calen.par	r??000.ext r??001.ext calen??.log	„Calibrate Energy“: Energiekalibration für Fluoreszenz- oder Absorptionsdaten über eine Sinus-Funktion
offen.exe	r??000.ext r??001.ext rot??.dat offen.par	r??000.ext r??001.ext offen??.log	„Offset Energy“: Energiekalibration über eine lineare Funktion
mulel.exe	r??000.ext r??001.ext	r??000.sum r??001.sum	Summation der einzelnen Spektren der Detektorkanäle
average.exe	r??000.sum bzw. *.* r??001.sum bzw. *.* files.mas (Master-File)	r??000.axt r??001.axt	Mittelung von Absorptions-, Fluoreszenz-, Kanten- oder EXAFS-Daten; im Master-File werden die Parameter für die zu verwendenden Daten angegeben
normal.exe	normal.par	n??000.ext n??001.ext	Normieren des Kantenhubs
remove.exe	x??000.ext x??001.ext remove.par	f??000.ext f??001.ext remo??00.log	Entfernen des langwelligen Untergrunds und Extraktion der Feinstruktur
convert.exe	f??000.ext f??001.ext	w??000.ext w??001.ext	Wichtung des Spektrums beispielsweise mit k^3
degdat.exe	(Alle Spektrenarten)	*.dxt	Entfernung von einzelnen Messpunkten (DeGlitchData)
explo.exe	(Alle Spektrenarten)	(* .dat)	Anzeige von Spektren
multex.exe	files.mas (Master-File)		Co-Plot von bis zu 16 Spektren; im Master-File werden die Parameter für die zu verwendenden Daten angegeben
motor.exe	[Energiewert]	[Motorschrittzahl]	Umrechnung von Energiewerten in Monochromator-Motorschrittzahlen

PROGRAMM	EINGABE	AUSGABE	FUNKTION
tom.exe	[Motor- schrittzahl]	[Energiewert]	Umrechnung von der Monochromator-Motorschrittzahl in Energiewerte

Lebenslauf

THOMAS MEYER

Geburtsdatum/-ort 24.09.1970 in Bremen

Schulausbildung

1977 – 1981 Grundschule Trupermoor, Lilienthal (Nds.)
1981 – 1983 Orientierungsstufe Falkenberg, Lilienthal
1983 – 1990 Gymnasium Lilienthal, Lilienthal
05/1990 Abitur

Zivildienst

09/1990 – 11/1991 Kath. Kirchengemeinde Lilienthal

Studium

ab 10/1991 Chemie- und Mathematikstudium
mit Wahlpflichtfach Technische Chemie
(Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg)

03/1998 Diplom Chemie
Die Elektrochemische Darstellung von Sorbit
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. H. Hamann,
Angewandte Physikalische Chemie

seit 05/1998 Dissertation
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Henkel
(Gerhard-Mercator-Universität Duisburg)

Beruf

seit 05/1998 Wissenschaftlicher Angestellter
(Gerhard-Mercator-Universität Duisburg)

Veröffentlichungen und Posterbeiträge

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen und Posterbeiträge entstanden:

R. Kließ, T. Meyer, R. Hauptmann, J. Schneider, G. Henkel

Kein Leben ohne Bioanorganische Chemie

Forum Forschung **1998**, Gerhard-Mercator- Universität, Duisburg, 58.

T. Meyer, J. Groppe, J. Schneider, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel

XAFS Investigations of Bacterial Cytochrome-c Oxidase from *Thermus thermophilus* and a Copper containing Complex as a Model for the Cu_A Center

Jahresbericht HASYLAB, Annual Report II, Hamburg, **1998**, 67 - 68.

T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel

XAFS Investigations of Inhibited Bacterial Cytochrome-c Oxidase from *Thermus thermophilus* and an Iron-Sulphur Complex as a New Example for Structural Differences between Solution and Crystalline State

Jahresbericht HASYLAB, Annual Report II, Hamburg, **1999**, 445 - 446.

T. Meyer, J. Schneider, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel

EXAFS Investigations on a Model Complex for the Cu_A Site of Cytochrome-c Oxidase - Differences between the Crystalline State and the Solution

HASYLAB Users Meeting, Posterbeitrag, Hamburg, **1999**.

T. Meyer, J. Schneider, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel

EXAFS Investigations on Copper Complexes -

In Search for d^{10} - d^{10} Interactions in Binuclear Copper Complexes

HASYLAB Users Meeting, Posterbeitrag, Hamburg, **2000**.

T. Meyer, J. Schneider, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel

Structural Changes in Bacterial Cytochrome-c Oxidase Induced by Chemical Reduction and a Structural Investigation of a Model Complex for the Reduced

Cu_A Site

BIOXAS 2000, Book of Abstracts, Lure/Paris, **2000**, 30.

T. Meyer, J. Schneider, T. Soulimane, G. Buse, G. Henkel

EXAFS Investigations of Fully Reduced Cytochrome-c Oxidase and the Spectroscopic Characterization of a Synthetic Analogue of the Reduced Cu_A Center

Proc. Int. Conf. Coord. Chem. **2000**, *34*, 620.

S. Ameerunisha, J. Schneider, T. Meyer, P.S. Zacharias, E. Bill, G. Henkel

Synthesis and structural characterization of Fe(II) and Cu(I) complexes of a new tetrafunctional N-donor ligand with dodecahedral and tetrahedral binding domains

J. Chem. Soc. Chem. Commun. **2000**, *21*, 2155 - 2156.

- T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel
Structural Changes in Bacterial Cytochrome-c Oxidase from
Thermus thermophilus Induced by Chemical Reduction
Jahresbericht HASYLAB, Annual Report II, Hamburg, **2000**, 369 - 370.
- T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel
The Structure of the Metal Coordination Sites of the Native Bacterial
Cytochrome-c Oxidase Derived from EXAFS Spectroscopy
HASYLAB Users Meeting, Posterbeitrag, Hamburg, **2001**.
- T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel
The Metal Coordination Sites of the Cytochrome-c Oxidase from
Thermus thermophilus in the Crystalline State and in Solution:
A Comparative EXAFS Study
Joint Meeting of French and German Biophysicists, Book of Abstracts, Hünfeld/Fulda, **2001**, 55.
- G. Henkel, J. Schneider, T. Meyer, B. Lippold
Binuclear Copper(I) Complexes of Composition $[\text{Cu}_2(\text{SR})_2(\text{NR}')_2]$:
Structural Diversity and Relation to the Cu_A Site of Cytochrome-c Oxidase
J. Bioinorg. Chem. **2001**, 86, 258.
- B. Lippold, T. Meyer, J. Schneider, G. Henkel
The EXAFS Structure of $[\text{Cu}_2(\text{SC}_6\text{H}_2\{\text{C}_3\text{H}_7\}_3)_2(\{\text{Me}_2\text{N}\}\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NC}\{\text{NMe}_2\})]$ in Solution:
A Novel Model System for the Cu_A Site of Cytochrome-c Oxidases
BIOXAS 2001, Book of Abstracts, Siena, **2001**, 13.
- T. Meyer, T. Soulimane, G. Buse, W. Meyer-Klaucke, G. Henkel
Cytochrome-c Oxidase – Substrate and Inhibitor Binding
HASYLAB Users Meeting, Posterbeitrag, Hamburg, **2002**.