

Jennifer Marx

# Dimetallzentren in Proteinen

Quanten- und molekularmechanische  
Rechnungen und nukleare inelastische  
Streuung an carboxylatverbrückten  
FeFe- und MnFe-Zentren in Proteinen



Springer Spektrum

---

# Dimetallzentren in Proteinen

---

Jennifer Marx

# Dimetallzentren in Proteinen

Quanten- und molekularmechanische  
Rechnungen und nukleare inelastische  
Streuung an carboxylatverbrückten  
FeFe- und MnFe-Zentren in Proteinen



**Springer** Spektrum

Jennifer Marx  
FB Physik/AG Biophysik und  
medizinische Physik  
Technische Universität Kaiserslautern  
Kaiserslautern, Deutschland

Dissertation am Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern, 2017  
Erstgutachter: Prof. Dr. Volker Schünemann  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rolf Diller  
Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 23.06.17

D 386

ISBN 978-3-658-20806-6                      ISBN 978-3-658-20807-3 (eBook)  
<https://doi.org/10.1007/978-3-658-20807-3>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2018

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist Teil von Springer Nature  
Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

## Danksagung

Eine Promotion in einem experimentellen Bereich, in dem so viele Disziplinen aufeinander treffen wie im Bereich der Biophysik, ist ein Unterfangen, das alleine nahezu unmöglich wäre. Ich möchte mich daher bei den Personen, die diese Promotion durch ihre Mitarbeit und Hilfe überhaupt erst ermöglicht haben, an dieser Stelle bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Volker Schünemann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die gute Betreuung meiner Arbeit, aber auch für die Möglichkeit, Messungen am Synchrotron in Hamburg und in Grenoble durchführen zu können, bedanken.

Bei Herrn Professor Rolf Diller möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei Herrn Prof. Martin Högbom, Frau Dr. Julia J. Griese und Herrn Vivek Srinivas möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung der Proben sowie Informationen zu diesen bedanken, und dass sie auf meine Fragen zur Proteinfunktion stets mit Rat zur Seite standen.

Bei Herrn Prof. Michael Haumann, Frau Ramona Kositzki, Herrn Peer Schrapers und Herrn Dr. Stefan Mebs möchte ich mich für die vielen Diskussionen zu den Modellen, hilfreichen Anmerkungen und insbesondere für die Daten aus den Messzeiten SC3722 und SC3923 bedanken.

Ein großer Teil dieser Arbeit basiert auf DFT-Simulationen. Für die Einführung in diese möchte ich mich bei Frau Dr. Isabelle Faus, Herrn Dr. Sergej Rackwitz und Herrn Dr. Juliusz Wolny bedanken, die mir zu Beginn stets mit ihren Erfahrungen in diesem Gebiet zur Seite standen. Isabelle war mir auch jahrelang eine gute Kollegin, mit der man sich stets über die Arbeit, aber auch alles Andere im Leben unterhalten konnte.

Für die Hilfe bei dem Python Programm zum Auslesen der Moden möchte ich Herrn Dr. Sakshath Sadashivaiah danken.

Auch Messzeiten am Synchrotron sind nicht alleine durchzuführen. Daher möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexandr Chumakov und Herrn Dr. Rudolf Ruffer sowie bei meinen Kollegen Herrn Hendrik Auerbach, Frau Lena Scherthan und Herrn Kevin Jenni für die Unterstützung bei der Messzeit LS-2422 bedanken. Für die Hilfe und Unterstützung bei der Messzeit I-20110655 am DESY möchte ich Herrn Dr. Hans-Christian Wille und Herrn Dr. Kai Schlage danken. Für die Bereitstellung der BSA-Eisenoxid Nanopartikel möchte ich meinem langjährigen Bürokollegen Herrn Heming Huang danken.

Für eine gute Zusammenarbeit und die zumeist gute Stimmung innerhalb der AG möchte ich außerdem unserer Sekretärin Frau Heike Buchinger, Frau Dr. Annegret Reinhard, Herrn Dr. Thomas O. Bauer, Herrn Dr. Peter Würtz, Frau Dr. Padmalekha Kydala Ganesha, Frau Christina Müller, Herrn Andreas Omlor und Frau Elisa Metzger danken. Für technische Unterstützung möchte ich unserem Techniker Herrn Hahn bedanken.

Ich möchte außerdem meinen Eltern für das sicherlich nicht immer einfache Korrekturlesen meiner Arbeit sowie die Unterstützung vor und während meiner Arbeit danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Experimentelle und theoretische Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
2.1.    Biologische und physikalische Grundlagen .....	5
2.1.1.    Katalyse und Funktion von carboxylatverbrückten Dimetallproteinen .....	5
2.1.2.    Mössbauer-Spektroskopie .....	11
2.1.3.    Nukleare inelastische Streuung .....	20
2.1.4.    Berechnung der partiellen vibronischen Zustandsdichte.....	23
2.2.    Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen .....	24
2.2.1.    Funktionale in der Dichtefunktionaltheorie.....	24
2.2.2.    Basissätze .....	25
2.2.3.    Molekulare Mechanik .....	26
2.2.4.    Kombination von quantenmechanischen und molekularmechanischen Methoden	27
2.2.5.    Simulationen mit Modellen für Proteinumgebungen und wässrige Umgebungen..	28
2.2.6.    Normalmodenanalyse .....	30
2.2.7.    Berechnung von NIS Spektren und der pDOS aus der Schwingungsanalyse .....	31
2.2.8.    Berechnung von Mössbauer Parametern .....	32
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>33</b>
3.1.    Proteinproben .....	33
3.2.    Nukleare inelastische Streuung .....	33
3.3.    Mössbauer-Spektroskopie .....	36
3.4.    Setup der Simulationen mit Gaussian 09 .....	38
3.5.    Erstellen einer expliziten MM-Wasserhülle mit Gromacs .....	42
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>45</b>
4.1.    R2a – Ribonukleotidreduktase aus <i>Escherichia coli</i> .....	45
4.2.    R2c - Ribonukleotidreduktase aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .....	65
4.2.1.    SeR2c mit Mangan-Eisen-Zentrum .....	65
4.2.2.    SeR2c mit Dieisen-Zentrum.....	77
4.3.    R2-artige Oxidase aus <i>Geobacillus kaustophilus</i> .....	95
4.3.1.    GkR2lox mit Mangan-Eisenzentrum.....	95

4.3.2.	<i>Gkr2lox</i> mit umgekehrt metallisiertem Eisen-Manganzentrum .....	105
4.3.3.	<i>Gkr2lox</i> mit Dieisen-Zentrum .....	108
4.3.4.	Einfluss von Isotopenmarkierungen auf die pDOS der <i>Gkr2lox</i> .....	122
4.4.	Simulation von niederfrequenten Proteinmoden in wässriger Umgebung.....	133
4.5.	Mössbauerspektroskopische Charakterisierung der R2 Proteine .....	145
4.5.1.	R2a Ribonukleotidreduktase aus <i>Escherichia Coli</i> .....	145
4.5.2.	R2c Ribonukleotidreduktase aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .....	147
4.5.3.	R2-artige Oxidase aus <i>Geobacillus kaustophilus</i> .....	153
4.5.4.	Berechnung von Mössbauer Parametern .....	157
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>165</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>169</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>177</b>
	<i>EcR2a</i> .....	177
	MnFe-SeR2c .....	179
	FeFe-SeR2c.....	185
	MnFe- <i>Gkr2lox</i> .....	190
	FeFe- <i>Gkr2lox</i> .....	193

## Abstract

One of the most challenging reactions in carbohydrate chemistry is the oxidation of methane to methanol. While this reaction brings technical catalysts to their limits, regarding specificity and yield, nature has found a way to catalyse reactions like these and other, e.g. the reduction in the last step of DNA synthesis, with a high yield and under physiological conditions. Dimetal carboxylate cofactor proteins are a group of proteins that can catalyse these challenging reactions. They carry a carboxylate bridged dimetal core in their catalytic center, and their properties vary with the number and coordination of oxo- and carboxylate- bridges and their metalation. Amongst these proteins is also the ribonucleotide reductase (RNR) R2 group, the enzyme which catalyses the formation of deoxyribonucleotides from ribonucleotides in the synthesis of our genome. This group subdivides in the subgroups Ia, Ib, Ic and R2-like proteins, which differ in metalation of their center and radical generation. The first two groups, Ia and Ib contain a stable tyrosyl-radical, while group Ic appears to start the reaction from the highly oxidised Mn(IV)/Fe(III) center. The groups Ia, Ic and the R2-like have in common that they contain at least one iron in their active center.

Nuclear inelastic scattering (NIS) is a technique able to selectively detect properties of iron containing complexes and proteins, as it uses the Mössbauer transition of  $^{57}\text{Fe}$  to detect the inelastic scattering which arises or extinguishes due to molecular vibrations while the iron core goes to an excited state. To assign these vibrations, normal mode analysis on computational model proteins is done. The method chosen is ONIOM, as it combines the high accuracy of quantum mechanical methods with the convenience of molecular mechanical methods and therefore can include the protein as a whole. In this thesis, spectroscopic differences between the Ia, Ic and R2-like group will be discussed. The protein samples were provided by Dr Julia J. Griese and Vivek Srinivas from the Department of Biochemistry and Biophysics at the University of Stockholm (Sweden). It was shown that their vibrational properties differ depending on the bound metals, and the areas of the partial vibronic density of states (pDOS) which were sensitive to different metalation could be identified. Different metallic occupations of the dimetal center lead to different bridge protonation in one case. For a better comprehension of vibrational properties in the low frequency area, a whole-protein-in-water model was developed, which could reproduce low frequency bands seen in the NIS-spectra for all proteins.

To gain insight into the properties of iron centers in proteins Mössbauer spectroscopy is another valuable tool. It is sensitive to the electron density at the core and the quadrupole moment, as well as magnetic properties that lead to a hyperfine splitting. The number and protonation of the bridges, as well as the type and number of coordinated ligands, and the spin state can be derived for the different R2 types from Mössbauer spectra. The influence of the different bridge types can also be distinguished, which, besides the bridge angles, can lead to a differently strong superexchange. For R2c from *Saccharopolyspora erythrae* (SeR2c) and R2lox from *Geobacillus kaustophilus* (GkR2lox), which differ by one  $\mu$ -oxo-bridge which is replaced by a  $\mu$ -carboxylato-bridge in the latter, it could be observed that the coupling of the manganese iron center of GkR2lox decreases so that at 77 K magnetic splitting is seen, while

for the diiron center of *SeR2c* at 4.2 K in the spectrum with external magnetic field an internal field of 1.1 T could be detected that did not occur for the diiron center *GkR2lox*.

Quantum chemical density functional theory (DFT) calculations make it possible to calculate the electronic field gradient (EFG) of molecules or protein models, helping to relate the experimentally derived quadrupole splitting that is caused by the EFG to a model. By a semi-empirical method, the experimentally obtainable isomer shift can be calculated from the calculated electron density at the core. The isomer shift and quadrupole splitting of the different protein models used for the R2a, R2c and R2lox were also calculated to identify the model with the protonation state which corresponds best to the experimentally obtained spectrum, and explain the spectroscopic differences between the R2 subgroups.

## Zusammenfassung

Eine der schwierigsten Reaktionen in der Kohlenhydratchemie ist die Oxidation von Methan zu Methanol. Während diese Reaktion technische Katalysatoren hinsichtlich Spezifität und Ausbeute an ihre Grenzen bringt, hat die Natur einen Weg gefunden, um Reaktionen wie diese und andere, wie z. B. die Reduktion im letzten Schritt der DNA-Synthese mit einer hohen Ausbeute und unter physiologischen Bedingungen zu katalysieren. Dimetallcarboxylat-Cofaktor-Proteine sind eine Gruppe von Proteinen, die diese anspruchsvollen Reaktionen katalysieren können. Sie tragen einen Carboxylat-verbrückten Dimetallkern in ihrem katalytischen Zentrum und ihre Eigenschaften variieren mit der Anzahl und Koordination von Oxo- und Carboxylatbrücken und ihrer Metallierung. Unter diesen Proteinen ist die Ribonukleotidreduktase (RNR) R2-Gruppe zu finden. Diese Gruppe untergliedert sich in die Untergruppen Ia, Ib, Ic und R2-artigen Proteine, die sich in ihrer Metall- und Radikalbildung unterscheiden. Die ersten beiden Gruppen, Ia und Ib, enthalten ein stabiles Tyrosylradikal, während die Gruppe Ic die Reaktion vermutlich ausgehend vom hoch oxidierten Mn(IV)/Fe(III)-Zentrum startet. Den Gruppen Ia, Ic und den R2-artigen ist gemein, dass sie mindestens ein Eisenatom in ihrem aktiven Zentrum enthalten.

Nukleare inelastische Streuung (NIS) ist eine Technik, die die Eigenschaften von Eisen selektiv detektieren kann, da sie den Mössbauer-Übergang von  $^{57}\text{Fe}$  verwendet. Sie detektiert die inelastische Streuung, die durch An- oder Abregung von molekularen Schwingungen bei einem Mössbauer Übergang entsteht. Um diese Schwingungen zuzuordnen, sind Normalmodenanalysen anhand von berechneten Proteinstrukturen durchgeführt worden. Das ONIOM Verfahren wurde gewählt, da es die hohe Genauigkeit von quantenmechanischen Methoden mit der Einfachheit molekülmechanischer Methoden kombiniert und somit das Protein als Ganzes erfassen kann. In dieser Arbeit werden spektroskopische Unterschiede zwischen der Ia, Ic und der R2-artigen Gruppe diskutiert. Die Proteinproben wurden von Dr. Julia J. Griese und Vivek Srinivas aus der Arbeitsgruppe für Biochemie und Biophysik der Universität Stockholm (Schweden) bereitgestellt. Es zeigte sich, dass sich ihre Schwingungseigenschaften in Abhängigkeit von den gebundenen Metallen unterscheiden und die für die unterschiedliche Metallierung empfindlichen Bereiche der partiellen vibronischen Zustandsdichte (pDOS) von Eisen identifiziert werden konnten. Unterschiedliche metallische Besetzungen des Dimetallzentrums führen in einem Fall zu einer unterschiedlichen Protonierung der Brücke. Um die Schwingungseigenschaften im niederfrequenten Bereich besser zu verstehen, wurde ein Modell des gesamten Proteins in Wasser berechnet, das niederfrequente Banden, die in den NIS-Spektren aller Proteine zu sehen waren, wiedergeben konnte.

Um Einblick in die elektronischen Eigenschaften von Eisenzentren in Proteinen zu erhalten, ist die Mössbauer-Spektroskopie ein weiteres wertvolles Werkzeug, da sie empfindlich gegenüber dem elektrischen Feldgradienten am Kern ist, sowie gegenüber magnetischen Eigenschaften, die zu einer Hyperfeinfeldaufspaltung führen können. Die Anzahl und Protonierung der Brücken, die Art und Anzahl der koordinierten Liganden, sowie der Spinzustand, lassen sich für die verschiedenen R2-Typen aus den Mössbauer-Spektren ableiten. Ebenso kann der Einfluss der verschiedenen Brückentypen unterschieden werden, die, neben den

Brückenwinkeln, zu unterschiedlich starkem Superaustausch führen können. Die wurde bei der R2c aus *Saccharopolyspora erythrae* (SeR2c) und R2lox aus *Geobacillus kaustophilus* (GkR2lox), die sich darin unterscheiden, dass sich in letzterer anstelle einer  $\mu$ -Oxo-Brücke eine  $\mu$ -Carboxylato-Brücke zwischen den Metallionen befindet, beobachtet. Es zeigte sich, dass sich die Kopplung beim Mangan-Eisen Zentrum der GkR2lox so stark verringert, dass bei 77 K bereits magnetische Aufspaltungen zu sehen sind. Beim Dieisenzentrum der SeR2c bei 4,2 K wurde im Spektrum mit externem Magnetfeld ein internes Feld von 1,1 T detektiert, das beim Dieisen-GkR2lox nicht auftrat.

Durch quantenchemische Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Rechnungen ist es möglich, den elektronischen Feldgradienten (EFG) von Molekülen oder Proteinmodellen zu berechnen und so die experimentell gewonnene Quadrupolaufspaltung, die durch den EFG verursacht wird, einem Modell zuzuordnen. Über ein semiempirisches Verfahren kann auch die experimentell bestimmbare Isomeriewerschiebung aus der berechneten Elektronendichte am Kern berechnet werden. Die Isomeriewerschiebungen und Quadrupolaufspaltungen der verschiedenen in der Arbeit entwickelten Proteinmodelle für R2a, R2c und R2lox wurden ebenfalls berechnet, um das Modell mit dem Protonierungszustand zu identifizieren, das die experimentell erhaltenen Parameter am besten wiedergibt. So können auch die spektroskopischen Unterschiede zwischen den einzelnen R2-Untergruppen erklärt werden.

# 1. Einleitung

Die Herstellung wertvoller Güter durch chemische Reaktionen wird seit Jahrhunderten verfolgt. Während im frühen Mittelalter nach einem Weg gesucht wurde, Gold herzustellen, ist die Chemie heute an anderen Schätzen interessiert, die im Bereich der organischen Chemie zu finden sind: Alternative Kraftstoffe, Antibiotika und Pharmazeutika. Um diese modernen Schätze herzustellen, sind katalytische Wege notwendig, die sowohl kosteneffizient, spezifisch und schnell sind, als auch eine Weiteroxidation oder -reduktion des gewünschten Produkts verhindern. Besonders die Katalyse an Kohlenhydraten zur Herstellung von Biotreibstoffen ist im Zeitalter der erneuerbaren Energien ein wachsender Markt [1], dennoch gibt es bisher nur wenige Katalysatoren, die eine effektive Umwandlung der starken CH-Bindung von Methan, zu einem Flüssigtreibstoff wie Methanol katalysieren können [2, 3, 4]. Trotz der hohen energetischen Barriere bei der Spaltung der C-H Brücke [5], und der leichten Weiteroxidation zu CO<sub>2</sub> [4], zeigt die Natur bereits, dass selbst solche hoch anspruchsvollen Reaktionen unter physiologischen Bedingungen hochselektiv ablaufen können [6]. Die Methan-Monooxygenase ist dabei nur eines von vielen Beispielen für anspruchsvolle, durch Proteine katalysierte Prozesse. In diesem und vielen weiteren Fällen erfolgt die Reaktion dabei an einem Eisen-Zentrum [7].

Mögliche Kandidaten für die Umwandlung von Methan zu Methanol finden sich in der Gruppe der Dimetall-Carboxylatproteine (DMC) [5]. Diese besitzen ein Carboxylat- und  $\mu$ -Oxo-verbrücktes Dimetallzentrum, welches entweder mit Eisen, Mangan, oder heteronuklear mit Eisen und Mangan besetzt ist [8]. Neben dem Metallzentrum ist auch dessen nähere Umgebung dieses für die Reaktion maßgeblich, sowie Wasserstoffbrückenbindungen und Ladungstransfers innerhalb des aktiven Zentrums und der Proteinmatrix [8]. Ein weiteres Beispiel für die Katalyse anspruchsvoller Reaktionen durch DMC-Proteine sind Ribonukleotidreduktasen (RNR), die den letzten Schritt der DNA Synthese katalysieren [9, 10]. Die R2 RNR lassen sich in mehrere Subgruppen unterteilen, von denen einige vor allem in Pathogenen und Extremophilen vorkommen [8].

Einer der ersten und wichtigsten Schritte ist dabei die Spaltung von Wasser oder dimerem Sauerstoff zur Radikalerzeugung [11]. Dies geschieht in Proteinen in vielen Fällen an Übergangsmetallzentren, da diese den Spin-verbotenen Übergang vom Triplett-Zustand des Sauerstoffs in einen Singulett-Zustand durch Änderung ihres eigenen Spin-Zustandes ermöglichen können [10]. Die Spaltung, für die vier Elektronen bereitgestellt werden müssen, wird dabei durch schnelle und langreichweitige Elektronentransporte innerhalb des Proteins unterstützt [12], eine schnelle und gerichtete Weiterleitung der Elektronen ist für die katalytische Aktivität und die Selektivität der Proteine unerlässlich. Um diese Prozesse zu verstehen, und möglicherweise in technischen Katalysatoren nachstellen zu können, ist es unerlässlich, die genaue Umgebung des aktiven Zentrums im Protein zu kennen.

Um dieses zu untersuchen, muss eine Methode gewählt werden, die zum einen selektiv für das Eisenzentrum ist, und dieses zum anderen nicht bei der Messung zerstört oder z. B. durch Reduktion des aktiven Zentrums verändert.

Ein wichtiges Utensil zur Analyse der Eisenumgebung stellt dabei die Mössbauer-Spektroskopie dar [13, 14]. Diese kernspektroskopische Methode kann Informationen zum Oxidations- und Spinzustand des Eisens im Protein liefern und Rückschlüsse auf die direkte Koordinationsumgebung ermöglichen [15]. So ließ sich mit Hilfe der Mössbauer-Spektroskopie z. B. das Intermediat X der Ribonukleotidreduktase nachweisen [16].

Eine weitere Möglichkeit, die Umgebung von Eisen in Proteinen zu untersuchen, bietet die auf dem Mössbauer-Übergang basierende nukleare inelastische resonante Streuung (NIS) [15]. Sie ermöglicht es, Schwingungsmoden, an denen Eisen beteiligt ist, selektiv zu beobachten [17]. Da diese sowohl für Änderungen der Koordinationsumgebung als auch für unterschiedliche Protonierungen und Liganden sensitiv ist, ist es möglich, aus den Schwingungsspektren Rückschlüsse auf die nähere Umgebung von eisenhaltigen aktiven Zentren zu ziehen. Eine Möglichkeit, diese Informationen aus den Daten zu erhalten, ist über eine Normalmodenanalyse mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT), bei der das Schwingungsspektrum anhand eines Proteinmodells reproduziert werden kann, und die experimentell bestimmten Moden bestimmten Schwingungsgruppen zugeordnet werden können [18]. NIS lieferte u.a. beim aktiven Zentrum der R2c aus *Chlamydia trachomatis* wichtige Informationen zur Verbrückung und Protonierung des aktiven Zentrums [19].

In der folgenden Arbeit sollen die aktiven Zentren der R2 Proteine aus *Escherichia coli*, *Saccharopolyspora erythraea* und *Geobacillus kaustophilus* untersucht werden und auf die schwingungsspektroskopischen Besonderheiten der einzelnen R2 Gruppen eingegangen werden.

Im ersten Teil wird die R2a aus *Escherichia coli* hinsichtlich ihrer Schwingungsspektroskopischen Eigenschaften näher betrachtet. Dabei soll auch auf die Unterschiede eingegangen werden, die sich durch eine Deprotonierung des radikaltragenden Tyrosins und die Unterschiede zwischen den Koordinationen der beiden Eisen bindenden Plätze ergeben.

Im Anschluss daran folgt die Diskussion der vibronischen Eigenschaften der Metallzentren von R2c aus *Saccharopolyspora erythraea*. Diese kann entweder Mangan und Eisen (MnFe-Form), oder zwei Eisen (FeFe-Form) binden [20], es gibt Hinweise darauf, dass die native Hauptform ein Mangan-Eisen-Zentrum trägt, daher wird zunächst auf dieses eingegangen, bevor eine der Diskussion der Eigenschaften mit dem Dieisenzentrum folgt, und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Protonierung der  $\mu$ -Oxo-Brücken.

Der folgende Teil enthält die Ergebnisse der Schwingungsspektroskopischen Untersuchung der R2lox aus *Geobacillus kaustophilus*. Diese ist eng mit den R2c Proteinen verwandt [8], im oxidierten Zustand ist allerdings ein Fettsäureligand gebunden [21], der eine  $\mu$ -Oxo-Brücke durch eine  $\mu$ -carboxylato-Brücke ersetzt. Auch dieses Protein hat in der nativen Form wahrscheinlich ein MnFe Zentrum, kann aber auch zwei Eisen binden [21]. Daher wird auch hier zunächst die MnFe Form diskutiert, bevor die FeFe Form diskutiert wird, um Vergleiche zwischen den beiden Metallierungen zu ziehen. Anhand der FeFe Form wurde auch ein Wasserbox-Modell berechnet, um die in wässrigen Lösungen gelösten Proteine besser im Modell abbilden zu können. Damit soll auch nachvollzogen werden, welche Moden in den Bereichen liegen, in denen für alle fünf gemessenen Proteinproben Banden lagen.

Im vierten Teil werden die Ergebnisse der mössbauerspektroskopischen Untersuchungen, die die Ergebnisse der schwingungsspektroskopischen Untersuchung ergänzen, vorgestellt.

Hier werden die Auswirkungen der Koordinationsumgebungen des Eisens, der Protonierung sowie der Kopplungen zum benachbarten Eisen- bzw. Manganzentrum zunächst anhand der experimentellen Ergebnisse erläutert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Simulationen an den Modellen für die drei Proteine mit den verschiedenen Metallierungen vorgestellt, und im Hinblick auf die aus den anderen Methoden gewonnenen Ergebnisse diskutiert

## 2. Experimentelle und theoretische Grundlagen

Das folgende Kapitel gliedert sich in zwei Teile: die mikrobiologischen Grundlagen und Vorgänge, welche zum Verständnis von Enzymfunktion und dessen chemischem Zustand notwendig sind, sowie anschließend die physikalischen Methoden, die den durchgeführten experimentellen Messungen zugrunde liegen. Als zweiter Teil folgen kurz die Grundlagen, die zum Verständnis der theoretischen Rechnungen mittels der DFT notwendig sind.

### 2.1. Biologische und physikalische Grundlagen

#### 2.1.1. Katalyse und Funktion von carboxylatverbrückten Dimetallproteinen

Enzyme spielen aufgrund ihrer Fähigkeit, spezifische Produkte mit einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen umzusetzen, eine große Rolle im Metabolismus von Organismen. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden sie auch in der Biotechnologie als Katalysatoren eingesetzt. Zu den möglichen zukünftigen Anwendungsgebieten in der Biotechnologie zählen neben der Produktion von z. B. Antibiotika auch die Hydroxylierung von Fettsäuren und anderen Kohlenwasserstoffen, die z. B. zur Nahrungsmittelproduktion und bei der Herstellung von Biotreibstoffen eine entscheidende Rolle spielen. Neben der Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren ist insbesondere auch die Umwandlung von Methan zu Methanol von Interesse, da auf der einen Seite Methan ein hochpotentes Treibhausgas ist, und somit eine Vermeidung des Austritts in die Atmosphäre wünschenswert wäre und auf der anderen Seite Methanol als flüssiger Brennstoff sowohl lagerfähig ist, als auch einen guten Brennwert hat und somit als alternative Energiequelle geeignet wäre. Technische Verfahren, bei denen Methan durch einen Katalysator zu Methanol bzw. einem Methanolderivat umgewandelt wird, erreichen zwar mittlerweile Ausbeuten von über 90 %, da eines der Hauptprobleme, das Unterbinden der Weiteroxidation zu CO<sub>2</sub> [4], gelöst werden konnte. Dennoch benötigen sie zum einen bisher hohe Temperaturen von über 200°C [4], zum anderen erfolgt diese Reaktion in hochkonzentrierter Schwefelsäure und erfordert teure Platinkatalysatoren [3]. Somit ist eine Optimierung dieser Reaktion, wie z. B. bei Temperaturen im Bereich von lebenden Organismen, sowie die Verwendung von Eisenkatalysatoren von großem wirtschaftlichem Interesse. Katalytische Systeme, die Eisen enthalten und die C-H Bindung im Methanol hydroxylieren können, sind zwar bekannt [2, 22], zeigen aber weniger hohe Selektivität für Methan, sowie eine teilweise Über-Oxidation zu CO<sub>2</sub>. Dass eine Umsetzung von Methan zu Methanol unter den genannten Kriterien mit Eisen als Katalysator möglich ist, zeigt die Natur bereits anhand von methanotrophen Bakterien, die eine Enzymgruppe enthalten, welche die Reaktion von Methan zu Methanol katalysieren kann: die Methan-Monooxygenasen (MMOs) [23]. Diese bestehen zumeist aus Komplexen aus mehreren Proteinen [23], die verschiedene Schritte in der Methankatalyse übernehmen. Die Aktivierung von O<sub>2</sub> erfolgt dabei in einem Nicht-Häm Dieisenprotein, der  $\alpha$ -Untereinheit der MMO-Hydroxylase (MMOH) [23]. Diese verwendet zur Aktivierung eine Fe(IV)/Fe(IV) Zwischenstufe, das Intermediat Q

[24]. Die MMOH gehört zur Superfamilie der Ferritin-artigen Proteinen d.h. das Protein ist aus einem metallbindenden Kern mit 4 Helix Bündeln aufgebaut (siehe Abb. 2.1), in dem die Metallzentren über Histidin- und Carboxylatreste koordiniert sind (Abb. 2.6) [8].

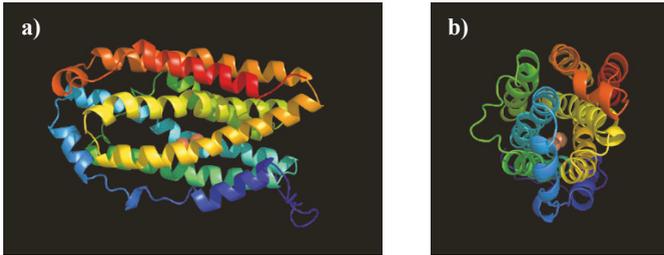


Abb. 2.1: Struktur der  $\alpha$ -Helices von *Gkr2lox* von der Seite (a) und als Draufsicht (b). Man erkennt die vier als *coiled-coil*-Struktur angeordneten Bündel, in deren Mitte sich das aktive Zentrum (hier nur in Form der beiden Eisenatome dargestellt) befindet. Die Abbildungen wurden aus der optimierten 4XB9 Struktur [25] mit PyMOL [26] erstellt.

Zu dieser Gruppe der dimeren carboxylatverbrückten Metalloproteine zählen auch die R2 -Proteine, die zu den RNR der Klasse I gehören. RNR katalysieren die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukletiden, ein wichtiger Schritt in der Synthese der DNA. Sie bestehen aus zwei homodimeren Proteinen, R1 und R2, wobei R1 das aktive Zentrum enthält und die R2 der Radikalerzeugung und Bereitstellung dient [8].

Die Gruppe der R2 Proteine lässt sich in drei Untergruppen aufteilen, von denen sich die dritte in zwei Untergruppen unterteilen lässt: Die Klasse der Ia Proteine (R2a), welche ein stabiles Tyrosylradikal verwendet, die Klasse der 2b Proteine (R2b) und schließlich die dritte Gruppe, zu der die Klasse Ic (R2c) und die R2-artigen ligandenbindenden Oxidasen (R2lox) gehören.

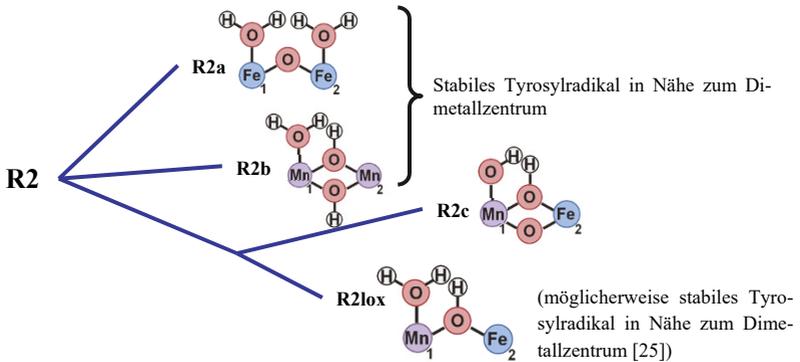


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Unterteilung der R2 Proteine in die Untergruppen, sowie die derzeit [8] postulierte wahrscheinlichste Metallierung und Protonierung der  $\mu$ -Oxo-Brücken und Sauerstoff-Liganden im oxidierten Zustand. Carboxylatbrücken und weitere Liganden sind nicht gezeigt.

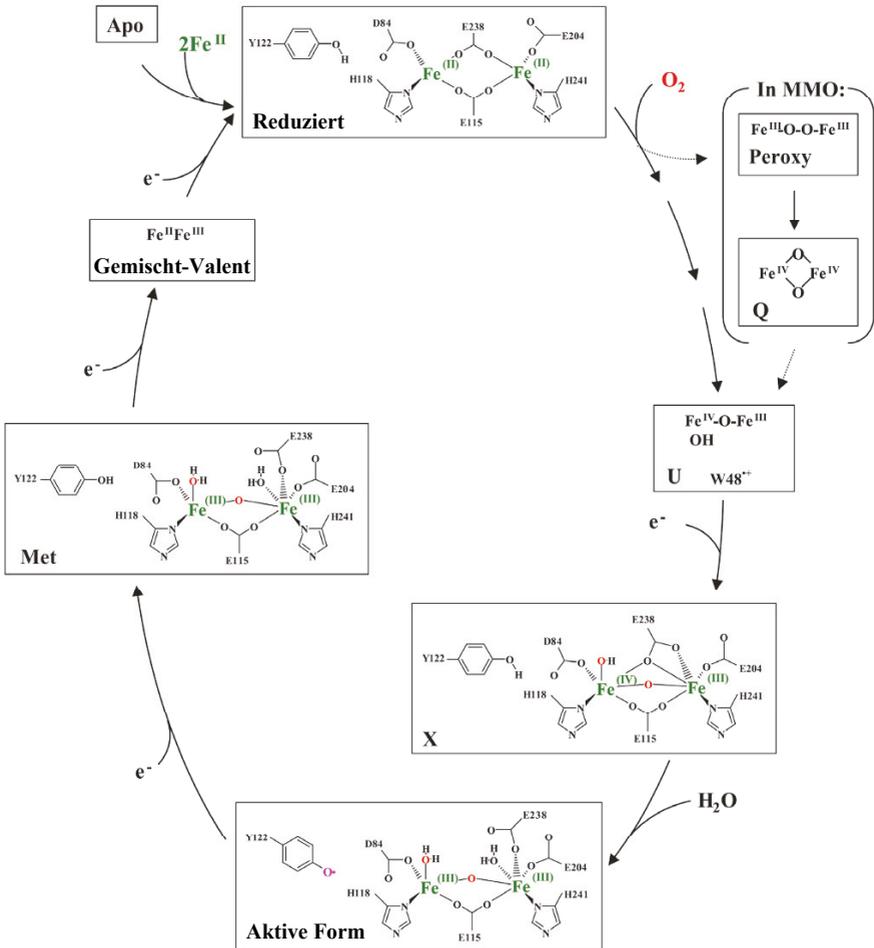


Abb. 2.3: Postulierter Reaktionsmechanismus und Intermediate der *Ecr2a* sowie postulierte Intermediate der MMOH zum Vergleich. Übersetzt aus [10].

Die Proteine der R2a Klasse haben in ihrer nativen Form ein Dieisenzentrum, wobei sich die beiden Eisen hinsichtlich der Koordinationssphäre unterscheiden [27]: *Site 1* ist im oxidierten Zustand 5-fach an die Liganden Aspartat 84, Glutamat 115, Histidin 118, die verbrückende Sauerstoffgruppe und einen terminalen Wasserliganden koordiniert, während *Site 2* 6-fach an drei Glutamat-Reste (Glu 115, Glu 204, Glu 238), sowie an Histidin 241, die verbrückende OH-Gruppe und ein terminales Wasser koordiniert [28]. Eines der am besten bekannten Proteine der R2a Klasse ist die RNR Untereinheit 2 aus *Escherichia coli* (*Ec*). Diese bildet über das Intermediat X, bei dem das Dieisenzentrum als Fe(III)/Fe(IV) vorliegt, ein

Tyrosylradikal in der R2 Einheit. Die Reduktion von  $O_2$  zu Wasser benötigt insgesamt vier Elektronen, anhand des Reaktionsmechanismus der R2a (Abb. 2.3) sieht man jedoch, dass vom Dieisenzentrum nur zwei und vom Tyrosylradikal ein weiteres Elektron bereitgestellt werden [29]. Die R2a Einheit benötigt ein weiteres Elektron, das z. B. von einem externen Reduktanten bereitgestellt werden könnte [10]. Nach dem von Mao et al. postulierten Reaktionsmechanismus [12] wird dann über einen langreichweitigen Elektronentransfer ein Thiylradikal in der R1 Untereinheit erzeugt, das schlussendlich die Reduktion der RNR durchführt [30].

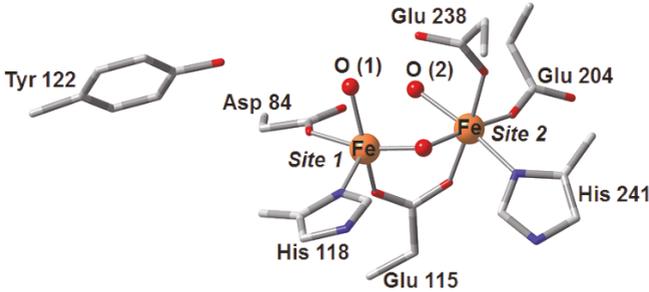


Abb. 2.4: Dimetallzentrum und erste Ligandensphäre sowie Tyrosin 122 der *EcR2a* mit FeFe-Cofaktor.

In vitro kann auch die inaktive Met-Form vorliegen, bei der das Eisenzentrum als Fe(III)/Fe(III) vorliegt, das Tyrosin 122 aber protoniert ist [31]. Diese wird entweder nach einiger Zeit in Lösung oder durch milde Reduktionsmittel gebildet und ist in kristallisiertem oxidiertem R2a die vorherrschende Form [10]. In der aktiven und der Met-Form liegt das Dieisenzentrum von *EcR2a* als antiferromagnetisch gekoppeltes *High-Spin* Fe(III)/Fe(III) Zentrum vor, der Gesamtspin beträgt  $S=0$  [27].

Die R2b Proteine unterscheiden sich von denen der R2a Gruppe zunächst durch ihre Metallierung. Bei diesen wird sehr wahrscheinlich im nativen Protein ein Dimangan-Cofaktor zur Oxidation verwendet, ob dies in allen Proteinen der Klasse 2b der Fall ist, ist noch nicht abschließend geklärt [32]. Auch sie haben ein stabiles Tyrosylradikal. Die Proteine dieser Gruppe lassen sich auch mit Dieisenzentrum rekonstituieren, zeigen dann jedoch nur schwache [32] oder keine Aktivität [33].

Die dritte Gruppe der R2 Proteine kann in R2c Proteine und die R2-artigen Ligandenbindenden-Oxidase Proteine (R2lox) unterteilt werden (Abb. 2.2) [8]. Proteine dieser dritten Gruppe sind häufig in Pathogenen wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis* und *Chlamydia trachomatis* (*Ct*) [34] vertreten, eine mögliche selektive Inhibition dieser Proteine wäre also auch aus pharmazeutischer Sicht interessant. Die in dieser Arbeit untersuchte R2c stammte aus *Saccharopolyspora erythraea*, einem Bakterium, das das Antibiotikum Erythromycin herstellt [35]. Die R2c unterscheiden sich von anderen R2 zum einen dadurch, dass die erste Ligandensphäre aus vier anstatt, wie in anderen R2 Proteinen, aus drei Glutamatresten und einem Aspartatrest besteht [36]. Zum anderen verwendet die native Form der Proteine dieser

Gruppe sehr wahrscheinlich ein heteronukleares MnFe Zentrum [8]. Sie lassen sich auch mit FeFe Zentrum rekonstituieren, zeigen dann allerdings keine Aktivität [37].

Bei den R2c Proteinen fungiert anstelle des in anderen R2 Proteinen als Radikalträger verwendeten Tyrosinrestes wahrscheinlich ein heteronuklearer MnFe-Cofaktor als Radikal-erzeuger und -speicher [36]. Anstelle des radikaltragenden Tyrosins ist in der Kristallstruktur an dieser Stelle ein Phenylalanin zu finden [38]. Ein weiteres Tyrosin befindet sich in der Kristallstruktur des *CtR2c* in der Nähe des His 230, dieses könnte möglicherweise über ein ebenfalls in der Kristallstruktur enthaltenen Wassers [38] einen Elektronentransfer vom oder zum Dimetallzentrum ermöglichen. Im Fall des *CtR2c* wurde durch Mössbauer-Spektroskopie nachgewiesen, dass es sich um ein Mn(IV)/Fe(III) Zentrum handelt, das zu einem System mit Gesamtspin  $S=1$  koppelt [39]. Als wahrscheinlichste Protonierung wird aufgrund von *Extended X-ray absorption fine structure* (EXAFS) [40] und NIS Messungen [19] eine  $\mu$ -Oxo/ $\mu$ -Hydroxo/ $\mu$ -Carboxylato-Verbrückung und ein terminaler OH-Ligand als wahrscheinlichste Protonierung bestimmt.

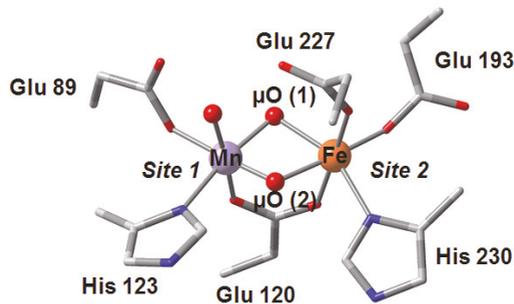


Abb. 2.5: Dimetallzentrum und erste Ligandensphäre der als Modell für die *SeR2c* verwendeten *CrR2c* mit nativem MnFe-Cofaktor.

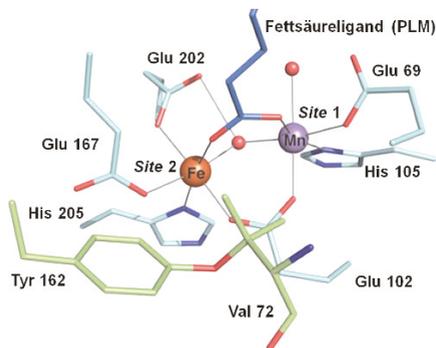


Abb. 2.6: Dimetallzentrum und erste Ligandensphäre sowie Valin-Tyrosin-Querverbindung der *Gkr2lox* mit nativem MnFe-Cofaktor (übersetzt aus [21], PNAS ist nicht für die Fehlerfreiheit der Übersetzung verantwortlich).

Die Untergruppe der R2-artigen Proteine, deren Funktion bisher noch nicht bekannt ist, ist vor allem deswegen interessant, da sie möglicherweise in der Lage ist, anspruchsvolle Zweielektronen-Oxidationen durchzuführen, da im Inneren des Proteins eine Tyrosin-Valin-Querverbindung auftritt, die sehr wahrscheinlich aus einer Zwei-Elektronen-Oxidation hervorgeht [21, 36]. Die in dieser Arbeit untersuchte R2lox stammt aus dem thermophilen Bakterium *Geobacillus kaustophilus* [21].

Das Zentrum von *GkR2lox* besteht im nativen Zustand aus einem heteronuklearen MnFe Zentrum, wobei im Fall von rekonstituierten Proteinkristallen Mangan bevorzugt an *Site 1* bindet, während Eisen beide Positionen besetzen kann [21]. Es ist auch möglich, das Protein als Dieisenprotein zu rekonstruieren, es gibt jedoch keinen Hinweis für ein Dimanganzentrum [21]. Die beiden Metallionen sind im Protein im substratgebundenen Zustand dreifach verbrückt: über eine  $\mu$ -Oxo/ $\mu$ -Hydroxo-Brücke, sowie über die Carboxylatgruppe des Glutamarestes 102 und die Carboxylatgruppe des Liganden. Eine Besonderheit des *GkR2lox* ist eine in der Kristallstruktur gefundene Tyrosin-Valin Querverbindung, die nahe legt, dass eine Zweielektronen-Oxidationen durch *GkR2lox* möglich ist [21]. Im reduzierten Zustand liegt das Protein ebenfalls dreifach verbrückt vor, die dritte Brücke wird vom Glutamat 202 gebildet [25]. Es ergibt sich für beide Metallzentren ein oktaedrisches Ligandenfeld mit jeweils sechsfacher Koordination [21]. Aus Elektronenspinresonanz (EPR) Messungen ist bekannt, dass die beiden Metallzentren im oxidierten, nicht mehr aktiven Protein mit MnFe Cofaktor als antiparallel gekoppelte *High-Spin* Mn(III)/Fe(III) vorliegen und einen Gesamtspin  $S = 1/2$  besitzen [21]. Für das oxidierte Protein mit Dieisenzentrum wurde ebenfalls eine antiferromagnetische Kopplung festgestellt, aus der sich ein Gesamtspin  $S = 0$  ergibt [21]. Die Elektronenkonfigurationen für Mangan und Eisen im 2 bzw. 3-wertigen Valenzzustand im oktaedrischen Ligandenfeld für den Fall einer *High-Spin* Besetzung sind in Abb. 2.7 gezeigt. Für das Dieisen-Zentrum ergibt sich im oxidierten Protein mit Fe(III) im Falle antiferromagnetischer Kopplung somit ein Gesamtspin von  $S = 0$ , für das Mangan-Eisenzentrum im oxidierten Zustand von  $S = 1/2$ .

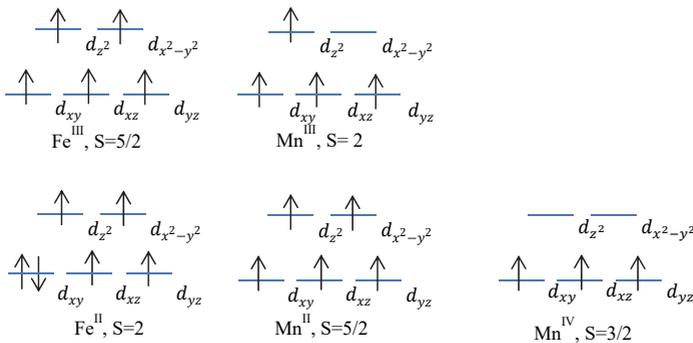


Abb. 2.7: Elektronenkonfiguration von Eisen und Mangan im Valenzzustand 3+ und 2+, sowie Mangan 4+, im oktaedrischen Ligandenfeld in *High-Spin* Konfiguration. Das oktaedrische Ligandenfeld führt durch die Ladungsverteilung entlang der Achsen zu einer Absenkung der Energien der zwischen den Achsen ausgerichteten  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ , und  $d_{yz}$  Orbitale, sowie zu einer Anhebung der Energie der entlang der Ligandenachsen ausgerichteten  $d_{z^2}$ , und  $d_{x^2-y^2}$  Orbitale.

Die R2c und R2lox Gruppe unterscheiden sich außerdem darin voneinander, dass das Zentrum der R2lox Gruppe im oxidierten Zustand über zwei doppelt verbrückende Carboxylatbrücken und eine  $\mu$ -(Hydr)oxo Brücke verbrückt werden, wohingegen es bei den R2c Proteinen zwei  $\mu$ -(Hydr)oxo Brücken und eine doppelt verbrückende  $\mu$ -Carboxylato-Brücke ist. Dies ist insofern interessant, als dass Superaustauschkkräfte, die über  $\mu$ -Oxo-Brücken wirken, stärker sind als solche, die über  $\mu$ -Hydroxo-Brücken [41] oder  $\mu$ -Carboxylato-Brücken [42] vermittelt werden.

### 2.1.2. Mössbauer-Spektroskopie

Bei der nach Rudolf Mössbauer benannten Mössbauer-Spektroskopie nutzt man den Doppler Effekt, um Energieunterschiede, die durch die Einwirkung von Hyperfeinwechselwirkungen auf einen rückstoßfrei absorbierenden Kern entstehen, zu detektieren. Die dabei messbaren Unterschiede liegen im Bereich von 0,096-96 neV ( $\cong 0,02$ -20 mms<sup>-1</sup>) [15]. Im Folgenden werden die Vorgänge, die zur Entstehung eines Mössbauer-Spektrums führen, beispielhaft für <sup>57</sup>Fe beschrieben, da sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Messungen an diesem Mössbauer-Isotop erfolgten.

Die Mössbauer-Spektroskopie am Eisenisotop <sup>57</sup>Fe basiert auf einem Kernübergang vom I = 1/2 Zustand zum angeregten I = 3/2 Zustand [15]. Die beobachtete Absorption ist dabei der Sonderfall der rückstoßfreien Absorption, bei der der absorbierende Kern selbst kein Phonon erzeugt (Nullphononenprozess) und die Rückstoßenergie vollständig an das umliegende Kristallgitter abgibt [13]. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von rückstoßfreier Absorption wird durch den Lamb-Mössbauer Faktor angegeben und ist temperaturabhängig. Dies liegt daran, dass bei zunehmender Temperatur die Wahrscheinlichkeit für die Besetzung von phononischen Zuständen ansteigt, und die Wahrscheinlichkeit für rückstoßfreie Absorption abnimmt. Der Lamb-Mössbauer Faktor lässt sich im Debye Modell temperaturabhängig schreiben als [14]

$$f_{LM} = e^{\frac{-3E_R}{2k_B\theta_D}} \left( 1 + 4 \left( \frac{T}{\theta_D} \right)^2 \int_0^{\theta_D/T} \frac{x}{e^x - 1} dx \right) \quad (2.1)$$

wobei  $E_R = \frac{E_\gamma^2}{2Mc^2}$  die Rückstoßenergie des freien Atoms ist,  $k_B$  der Boltzmann Faktor und  $\theta_D$  die Debye-Temperatur welche ein Maß für die Bindungsstärke zwischen dem Mössbauer-Kern und dem umgebenden Kristallgitter ist [15], und T die Temperatur.

Als Quelle dient <sup>57</sup>Co, welches zunächst durch Elektroneneinfang zu <sup>57</sup>Fe im angeregten I = 5/2 Zustand übergeht. Dieses emittiert beim Übergang in den I = 3/2 Zustand ein Quant der Energie 122,06 keV und beim Übergang vom I = 3/2 in den I = 1/2 Grundzustand ein Quant der Energie 14,41 keV, welches vom <sup>57</sup>Fe absorbiert werden, und somit für spektroskopische Absorptionsmessungen an Proben, die diesen Kern enthalten, verwendet werden kann [15]. Die Energie eines emittierten  $\gamma$ -Quants der Quelle lässt sich also als Übergangsenergie  $E_s$  eines Kerns der Quelle darstellen [15]:

$$E_S = E_0 - [(\delta E)_e - (\delta E)_g]_{Source} = E_0 + \frac{2\pi}{3} Z e^2 |\Psi(0)|_S^2 (R_e^2 - R_g^2) \quad (2.2)$$

Dabei ist  $E_0$  die Übergangsenergie eines Kernes ohne chemische Umgebung,  $(\delta E)_e$  die Energie in angeregten Zuständen und  $(\delta E)_g$  die Energie im Grundzustand [15].  $|\Psi(0)|_S^2$  ist die Elektronendichte des Quellenmaterial,  $R_e$  ist der Radius des Kernes im angeregten Zustand und  $R_g$  der im Grundzustand.  $Z$  gibt die Kernladungszahl an und  $e$  ist die Elementarladung.

Für den Absorber ergibt sich analog:

$$E_A = E_0 - [(\delta E)_e - (\delta E)_g]_{Absorber} = E_0 + \frac{2\pi}{3} Z e^2 |\Psi(0)|_A^2 (R_e^2 - R_g^2) \quad (2.3)$$

Wobei  $|\Psi(0)|_A^2$  die Elektronenladungsdichte des Absorbermaterial ist. Ist die chemische Umgebung des zerfallenden  $^{57}\text{Co}$  Kernes und des absorbierenden  $^{57}\text{Fe}$  Kernes gleich, so ergibt sich eine Absorptionslinie im Spektrumsursprung die aufgrund der Lebenszeit des  $I = 3/2$  Zustands ( $1,43 \cdot 10^{-7}\text{s}$  [15]) eine minimale theoretische Linienbreite von  $0,19 \text{ mms}^{-1}$  hat. Die Energieauflösung von Mössbauer-Spektren wird für gewöhnlich in der Einheit  $\text{mms}^{-1}$  (Doppler Geschwindigkeit) angegeben. Diese erhält man durch Kalibration gegen eine bekannte Probe. In den meisten Fällen wird dazu  $\alpha$ -Eisen-Folie verwendet. Dabei entspricht  $1 \text{ mms}^{-1}$   $4,8075 \cdot 10^{-8} \text{ eV}$  [7]. In der Mössbauer-Spektroskopie ist es jedoch üblich, die Angabe von  $\text{mms}^{-1}$  nicht mehr in eV umzurechnen, sondern direkt die Geschwindigkeit, mit der die Quelle ausgelenkt wurde, anzugeben. Trotz der ungewöhnlichen Angabe handelt es sich dabei also um eine Energiedifferenz.

### Isomerieverschiebung

Unterscheidet sich die Elektronendichte am Kern des absorbierenden Eisens von der am Kern des Emitters, so ergibt sich eine Verschiebung der Absorptionslinie, die Isomerieverschiebung. Diese lässt sich beschreiben als

$$\delta = E_A - E_S = \frac{2\pi}{3} Z e^2 \{ |\Psi(0)|_A^2 - |\Psi(0)|_S^2 \} (R_e^2 - R_g^2) \quad (2.4)$$

und ist, da die Eigenschaften der Quelle konstant bleiben, vor allem von der Elektronendichte  $|\Psi(0)|_A^2$  am Kern des Absorbers abhängig. Die Isomerieverschiebung gibt unter anderem Aufschluss über den Oxidationszustand, aber auch über die Koordinationssphäre des Eisens und dessen Spinzustand. Typische Isomerieverschiebungsbereiche für verschiedene Oxidations- und Spinzustände sind in Abb. 2.8 gezeigt.

Da mit zunehmender Temperatur auch die Gitterbewegung und somit auch die Bewegung der Absorberatome zunimmt, steigt auch deren mittlere quadratische Geschwindigkeit relativ zum konstant bei Raumtemperatur verbleibenden  $^{57}\text{Co}$  Emitter. Dadurch entsteht durch relativistische Energieverschiebungen ein Doppler Effekt zweiter Ordnung, der zu einer Erniedri-