

# EPR-Spektroskopie ermöglicht Einblicke in die Mechanismen der Hämregulation und der Reaktionskinetik

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
vorgelegt von

**Erik Schubert**

aus  
Bonn

Bonn, November 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Prof. Dr. Olav Schiemann  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Vöhringer

Tag der Promotion: 25.4.2017  
Erscheinungsjahr: 2017

---

## Zusammenfassung

Die für essentielle biologische Prozesse wie Atmung, Gastransport und Katalyse prothetische Gruppe Häm findet nicht nur festgebunden an Proteine Verwendung. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sie durch temporäre Bindung auch regulatorisch auf Prozesse wie Gentranskription wirken kann. Dazu bindet Häm an kurze Aminosäuresequenzen, die sogenannten HRMs. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte mittels EPR-Spektroskopie der Einfluss weiterer potentieller HRMs gezeigt werden. Untersucht wurden kurze Peptide mit potentiellen HRM auf Basis von Cystein, Histidin oder Tyrosin. Die Interaktion zwischen Hämin und Peptid waren in der Regel am stärksten für die cysteinbasierten HRMs, während sie für die histidin- und tyrosinbaiserten HRMs schwächer waren. Eine Vielzahl an Peptiden bildete sowohl fünf- wie sechsfachkoordinierte Hämin-Peptid-Komplexe. Das Verhältnis zwischen beiden Komplexgeometrien variierte abhängig vom Peptid. Die an Peptiden gewonnen Erkenntnisse wurden teilweise auf der Proteinebene weiter untersucht. Dies sollte u. a. zeigen, in wieweit die auf der Peptidebene gewonnen Erkenntnisse sich auf die Proteinebene übertragen lassen. So wurden die zwei Proteine FeoB und GlpF, die die potentiellen HRMs der stark wechselwirkenden Peptide PY5 bzw. PY4 beinhalten, exprimiert und aufgereinigt. Für das Protein FeoB konnte das potentielle HRM (PY5-Sequenz) als Hämbindemotiv nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung mit Hämin war schwach und ortsspezifisch. Für GlpF konnte hingegen keine Bindung von Hämin festgestellt werden. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse, dass Untersuchungen auf Peptidebene ein sinnvolles Werkzeug zur Ermittlung potentieller hämregulierter Proteine sind. In einer kurzen Peptidsequenz ist es weitaus wahrscheinlicher, dass tatsächlich das potentielle HRM für die etwaige Interaktion mit dem Hämin verantwortlich ist.

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der dielektrische Mischresonator ER 4117 MX (BRUKER), der als Konstanter-Fluss-System arbeitet, charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Resonator Reaktionen mit Halbwertszeiten im Bereich von Millibis Submillisekunden quantitativ bei Probenvolumina von 10 mL pro Zeitpunkt und Reaktand verfolgt werden können. Unter Einsatz dieses Aufbaus wurde die Kinetik des Fenton-ähnlichen Systems aus  $\text{TiCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  und Ethanol untersucht, die Geschwindigkeitskonstanten des Initiationschrittes, d. h.  $\text{OH}^\bullet$ -Bildung, und des bimolekularen Zerfalls des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals erfolgreich bestimmt sowie ihre gute Übereinstimmung mit früheren Berichten gezeigt. Der Effekt von Luftsauerstoffoxidation auf das  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal stellte sich als vernachlässigbar heraus. Des Weiteren tragen Reaktionen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Ti}^{3+/4+}$  nur bei höheren Konzentration zum Zerfall des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals bei, womit nur der bimolekulare Zerfall aus Eigenrekombination und Disproportionierung als signifikanter Zerfallsweg bleibt. Im Rahmen dieser Studie wurden durchweg vollständige EPR-Spektren verwendet, um den alleinigen Beitrag der zu untersuchenden chemischen Spezies zum beobachteten kinetischen Phänomen sicherzustellen. Diese Arbeit veranschaulicht die Stärke der EPR-Spektroskopie als direkte und empfindliche Methode in kinetischen Studien.

---

Nach Kalibrierung des RFQ-Aufbaus mit der Reaktion zwischen MetMb und Azid sollte diese Methode verwendet werden, um Informationen über die Kinetik der Bindung zwischen Hämmin und Peptiden bzw. Proteinen zu erhalten. Allerdings zeigte sich auf der Millisekundenzeitskala kein nennenswerter Fortschritt der Hämminbindung. So konnten weder der Mischresonator noch der RFQ-Aufbau für die Untersuchung der Bindungskinetik zwischen Hämmin und Peptiden bzw. Proteinen eingesetzt werden. Dementsprechend wurden in anschließenden Versuchen die Hämmin-Peptid/Protein-Proben von Hand gemischt und gefroren, wobei Reaktionszeitpunkte bis runter zu zehn Sekunden festgehalten werden konnten. Diese Experimente zeigten, dass sich der Bindungsprozess im Bereich von Minuten abspielte und somit nicht mit Methoden untersucht werden kann, deren Beobachtungsfenster auf Millisekunden ausgelegt ist. Für das untersuchte Peptide HB1<sup>syn</sup> und das Protein IL-36  $\alpha$  ergab sich prinzipiell derselbe Ablauf des Hämminbindungsvorgangs. Nach wenigen Minuten bildete sich das Maximum eines sechsfachkoordinierten Hämmin-Komplexes aus. Dieser Komplex zerfiel dann wieder langsam mit zunehmender Zeit. Es konnte gezeigt werden, dass mit der verwendeten Technik eine Möglichkeit besteht, die Hämminbindungskinetik zu untersuchen.



---

## Danksagung

Ich danke Prof. Olav Schiemann für die Möglichkeit einer Promotion in seinem Arbeitskreis. Mein Dank gilt auch den Kollegen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. So führte Nicole Florin die UV-Vis-Messungen an den Proteinen GlpF und FeoB aus und Dr. Gregor Hagelüken übernahm deren Auswertung. Die Expression und Aufreinigung der Proteine GlpF und FeoB wurde von Nicole Florin und Fraser Duthy durchgeführt. Mein Kooperationspartner beim Projekt zur Untersuchung transienter Hämbindung Hans Henning Brewitz vom Pharmazeutischen Institut übernahm die UV-Vis-Messungen der Häm-Peptid-Komplexe. Bei den Arbeiten am Mischresonator und der RFQ-Apparatur standen mir Dr. Yaser NejatyJahromy und Tobias Hett mit Ihrer Hilfe zur Seite. Auch danke ich Dr. Yaser NejatyJahromy, dass er immer wieder für fruchtbare und konstruktive Diskussionen offen war.

Ebenso gilt meiner Familie Dank, da sie mir die Basis für dies alles bereitet haben.

Da bekanntlich in der Kürze die Würze liegt, hoffe ich darüber niemanden, dem mein Dank gebührt vergessen zu haben.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Artikeln bereits veröffentlicht:

- E. Schubert, T. Hett, O. Schiemann, Y. NejatyJahromy, *J. Magn. Reson.* **2016**, 265, 10–15.
- H. H. Brewitz, N. Goradia, E. Schubert, K. Galler, T. Kühl, B. Syllwasschy, J. Popp, U. Neugebauer, G. Hagelueken, O. Schiemann, O. Ohlenschläger, D. Imhof, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2016**, 1860, 1343–1353.
- E. Schubert, N. Florin, F. Duthie, H. H. Brewitz, T. Kühl, D. Imhof, G. Hagelueken, O. Schiemann, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 148, 49–56.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Häminregulatorische Effekte . . . . .	1
1.1.1. Koordination in Metalloproteinen: Aminosäuren und Chelatliganden . .	1
1.1.2. Hämmetabolismus . . . . .	6
1.1.3. Hämproteine: Eine Klasse mit essentiellen biologischen Funktionen für das Leben . . . . .	8
1.1.4. Hämregulation . . . . .	10
1.2. EPR-Spektroskopie . . . . .	17
1.3. Kinetische Untersuchungen an Radikalen mittels EPR-Spektroskopie . . . . .	26
1.4. Motivation . . . . .	29
<b>2. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>31</b>
2.1. Interaktion in Hämin-Peptid-/Protein-Komplexen . . . . .	31
2.1.1. Handhabung von Hämin-Proben in der EPR-Spektroskopie . . . . .	31
2.1.2. Interaktionen in Hämin-Peptid-Komplexen . . . . .	35
2.1.3. Interaktionen in Hämin-Protein-Komplexen . . . . .	47
2.1.4. Puls-EPR Experimente an Hämin-Peptid-/Protein-Komplexen . . . . .	53
2.2. Kinetische Untersuchungen mit EPR-Spektroskopie . . . . .	55
2.2.1. Kalibrierung des Mischresonators und des Spritzenmotors . . . . .	55
2.2.2. Kinetische Untersuchungen der Fenton-ähnlichen Reaktion von Ethanol	63
2.2.3. Kalibrierung des RFQ-Gerätes . . . . .	76
2.2.4. Kinetik der Interaktionen in Hemin-Peptid/Protein-Komplexen . . . . .	83
<b>3. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>91</b>
<b>4. Experimenteller Teil</b>	<b>93</b>
4.1. Interaktionen in Hemin-Peptid/Protein-Komplexen . . . . .	93
4.2. Kinetik der Interaktionen in Hemin-Peptid/Protein-Komplexen . . . . .	93
4.3. Kinetik der TEMPO/Dithionit- und Fenton-ähnlichen Reaktion . . . . .	95
4.3.1. Herstellung der Lösungen . . . . .	95
4.3.2. Bestimmung der Konzentration des organischen Radikals . . . . .	96
<b>A. Anhang</b>	<b>105</b>
A.1. X-Band <i>cw</i> EPR-Spektren der Hämin-Peptid-/Protein-Komplexe . . . . .	105



# Abkürzungsverzeichnis

<b>arb. u.</b>	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
<b><i>cw</i></b>	<i>continious wave</i>
<b>DI</b>	Doppel-Integral
<b>DEER</b>	<i>double electron-electron resonance</i>
<b>EPR</b>	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
<b>ESR</b>	Elektronenspinresonanz
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>HRM</b>	hämregulatorsiches Motiv
<b>HYSCORE</b>	Hyperfine sublevel correlation
<b>M</b>	mol/L
<b><math>I_{p2p}</math></b>	<i>peak-to-peak-Intensität</i>
<b>PELDOR</b>	<i>pulsed electron–electron double resonance</i>
<b>PPIX</b>	Protoporphyrin IX
<b>RFQ</b>	<i>Rapid Freeze Quench</i>
<b>TEMPO</b>	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl



# 1. Einleitung

Häm ist ein biologisches essentielles Molekül, das permanent gebunden an Proteine Aufgaben wie Gas-, Elektronentransport oder Katalyse bewerkstelligt. Dass Häm als prosthetische Gruppe fungiert ist seit langer Zeit etabliert. Neuere Studien deuten allerdings auf eine Wirkung, die über die als festgebundenes katalytisches Zentrum hinausgeht, hin. 2001 wurde am Beispiel des Transkriptionsfaktors Bach-1 entdeckt, dass Häm in höheren Eukaryoten regulatorische Funktionen übernehmen kann.<sup>[1]</sup> Dazu sind kurze Aminosäuresequenzen, die sogenannten hämregulatorischen Motive (HRM), von Nöten, an die Häm temporär binden und dadurch in den jeweiligen Prozess steuernd eingreifen kann. Zur Erforschung der Hämregulation ist es erforderlich, HRMs zu identifizieren und charakterisieren. Dazu bieten sich verschiedene spektroskopische Methoden wie UV-Vis-, Resonanz-Raman-, NMR- und EPR-Spektroskopie an. Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie ist es möglich, Information über das Häm und seine Koordinationssphäre zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode genutzt, um die Interaktion von Hämin mit kurzen Peptiden mit potentiell HRM zu untersuchen. Für geeignete Kandidaten wurde folgend die Untersuchung an den entsprechenden Proteinen, die das potentielle HRM tragen, fortgeführt.

Ebenso kinetische Studien wurden mittels EPR-Spektroskopie an Hämin-Peptid-Komplexen durchgeführt. Die dazu erforderlichen Versuchsaufbauten wurden dazu vorerst mit literaturbekannten Reaktionen kalibriert und auf die Untersuchung der Fenton-ähnlichen Reaktion von Ethanol angewendet.<sup>[2]</sup>

## 1.1. Häminregulatorische Effekte

### 1.1.1. Koordination in Metalloproteinen: Aminosäuren und Chelatliganden

Metallkationen übernehmen im Körper essentielle Aufgaben wie:

- (i) Strukturfunktionen u. a. die Stabilisierung der Doppelhelix-Struktur der DNS durch ein- und zweiwertige Metalle zwecks Verminderung der Abstoßung der negativen Nukleotid-Phosphatgruppen
- (ii) Informationsübertragung z. B. elektrische Impulse in Nerven oder Steuerung der Muskelkontraktion durch  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$
- (iii) Stoffwechselprozesse, die bei physiologischem pH von ca. 7 erst durch die Metallkationen

$Zn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  in hydrolytischen Enzymen möglich werden (Lewis-Säure/Lewis-Base-gestützte Katalyse)

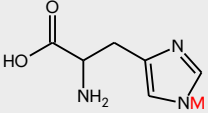
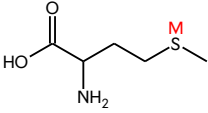
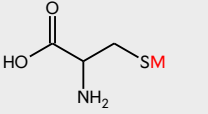
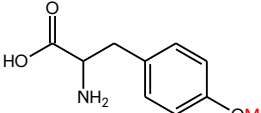
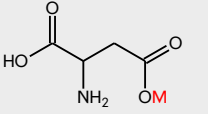
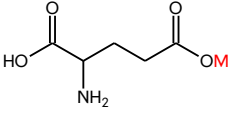
- (iv) den für den Energiehaushalt notwendigen Elektronentransport, der größtenteils über Metallkationen und deren Redoxverhalten bewerkstelligt wird ( $Fe(II)/Fe(III)/Fe(IV)$ ,  $Cu(I)/Cu(II)$ ,  $Mn(II)/Mn(III)/Mn(IV)$  u. w.; unter physiologischen Bedingungen ungewöhnliche Oxidationsstufen kursiv gedruckt)
- (v) Aktivierung und Reaktionen kleiner Moleküle wie Speicherung, Transport und Umwandlung von Sauerstoff (Fe, Cu) sowie reversible Reduktion von  $CO_2$  zu Wasserstoff und Methan (Ni, Fe) und
- (vi) Erzeugung und Stabilisierung von Radikalen (Fe, Cu und Ni)

Im Organismus liegen sie vorwiegend in ihrer kationischen Form vor und benötigen daher elektronenpaarendonierende Liganden wie Peptide bzw. Proteine mit koordinationsfähigen Aminosäuren, makrozyklische Chelatliganden oder Nukleobasen. Proteine mit Metallzentrum, die als Metalloproteine bezeichnet werden, binden ihre Metalle in der Regel durch die Koordination der funktionellen Gruppen aus Aminosäureseitenketten. Das Metall ersetzt dabei ein azides Proton – Selenocystein (21. proteinogene Aminosäure) verhält sich dabei analog zu Cystein – außer im Falle von Methionin, das durch sein neutrales Schwefelatom bindet. Bei Histidin ist die Koordination von Metallen im neutralen sowie deprotoniertem Zustand möglich. Neben der Anbindung durch nur ein negativ geladenes Atom ( $\eta^1$ ) kann bei Glutamat und Aspartat dies auch durch die zwei Carboxylatsauerstoffatome erfolgen ( $\eta^2$ ). Die entsprechenden Aminosäuren und die bevorzugt gebundenen Metalle sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Von nachrangiger Bedeutung sind Aminosäuren, deren Seitenkette nur eine Hydroxy- oder Aminofunktion aufweisen – Serin, Threonin und Lysin – sowie Tryptophan.<sup>[3]</sup>

So wie manche Aminosäuren ein jeweiliges Metallkation bevorzugt binden, gilt dies auch umgekehrt für die Metallkationen. Zweiwertige Metalle wie  $Fe(II)$ ,  $Ni(II)$ ,  $Co(II)$  und  $Mg(II)$  bilden mit vier bis sechs Histidin- ( $His$ ), Glutamat- ( $Glu^-$ ) und Aspartat-Liganden ( $Asp^-$ ) wenig verzerrte oktaedrische Komplexe. Dreiwertiges Eisen weist mit vier bis sechs  $Glu^-$ ,  $Asp^-$ ,  $Tyr^-$  oder  $Cys^-$ -Liganden ebenfalls wenig verzerrte oktaedrische Koordination auf. Zweiwertige Metalle, die von der oktaedrischen Ligation abweichen, sind  $Zn(II)$  und  $Cu(II)$ , die mit drei  $His$ ,  $Cys^-$  oder seltener  $Glu^-$  bzw. vier  $His$  oder seltener  $Cys^-$  verzerrt tetraedrische bzw. quadratisch-planare Komplexgeometrien zeigen. Die verzerrten Geometrien sind auf die Koordination mit unterschiedlichen Aminosäuren sowie die räumliche Struktur im Bindungszentrum des Proteins zurückzuführen. Diese Verzerrung dient der Vorformung des Übergangszustandes für Substrat und Reaktanden. Dieser als entatisch – gespannter – bezeichnete Zustand hebt den Ausgangszustand energetisch an und bringt ihn somit näher an den Übergangszustand. Je geringer der Unterschied zwischen Ausgangs- und Übergangszustand ausfällt, desto schneller läuft die Umsetzung ab.<sup>[3]</sup>

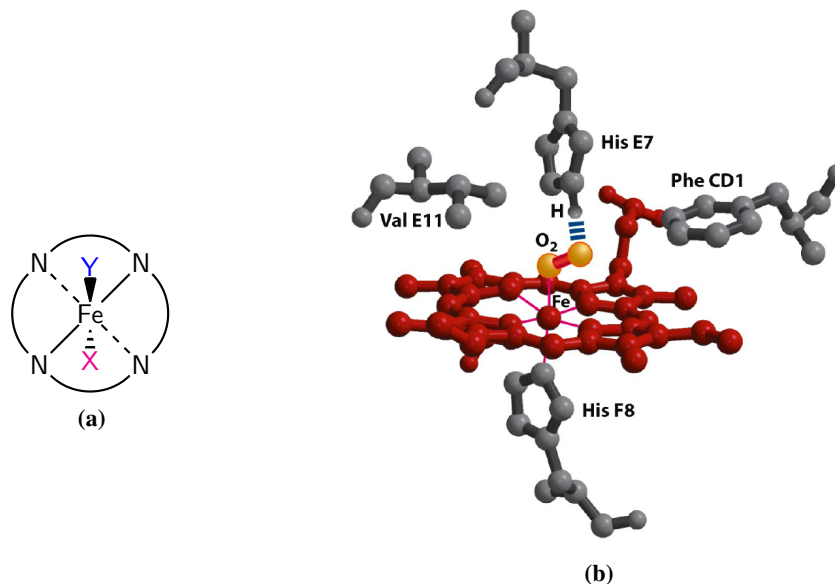


**Tab. 1.1.:** Die wichtigsten Aminosäuren zur Koordination von Metallzentren in Metalloproteinen. Das durch die Aminosäure ligierte Metall ist mit einem roten M dargestellt.

Aminosäure		Metall
Histidin	His H	 Zn(II), Cu(II), Cu(I), Fe(II)
Methionin	Met M	 Fe(II), Fe(III), Cu(I), Cu(II)
Cystein	Cys C	 Zn(II), Cu(II), Cu(I), Fe(III), Fe(II), Mo(IV-VI), Ni(I-III)
Tyrosin	Tyr Y	 Fe(III)
Asparaginsäure	Asp D	 Fe(III), Mn(III), Fe(II), Zn(II), Mg(II), Ca(II)
Glutaminsäure	Glu E	 Fe(III), Mn(III), Fe(II), Zn(II), Mg(II), Ca(II)

Die mit Metallkationen gebildeten Komplexe sind meist koordinativ ungesättigt. Die freie Position dient, im Sinne ihrer katalytischen Funktion, der Bindung des Substrats. Andernfalls kann diese Leerstelle durch ein schwach gebundenes Wassermolekül besetzt sein. Beispiele dafür sind Hämproteine, deren Aufgabe Katalyse, Sauerstofftransport oder -speicherung ist. Dort ist das Eisenzentrum nur durch eine Aminosäure koordiniert und die sechste Koordinationsstelle frei oder mit einem Wassermolekül besetzt. In Unterschied dazu weisen Hämproteine, die Elektronentransferreaktionen ausführen, meist ein sechsfach koordiniertes Eisenzentrum mit zwei Aminosäureliganden auf.<sup>[4]</sup> Im Falle des Methämoglobins oder auch Metmyoglobins – das Präfix Met verweist darauf, dass das Eisenzentrum in seiner oxidierten dreiwertigen Form vorliegt – wird das Fe(III) an seiner fünften Koordinationsstelle durch ein (proximales) Histidin gebunden. Unter Vernachlässigung des Wassers an der sechsten Koordinationsstelle liegt eine Fünffachkoordination des Eisenzentrums vor, die sich zu einer Sechsfachkoordination wandelt, wenn molekularer Sauerstoff bindet und dabei das Wassermolekül verdrängt (Abb. 1.1). Handelt es

sich beim sechsten Liganden um eine starke Base wie Azid ( $\text{N}_3^-$ ), Kohlenstoffmonoxid (CO), Stickstoffmonoxid (NO) oder Cyanid ( $\text{CN}^-$ ) ist die Bindung an das dreiwertige Eisenzentrum so stark, dass kein Sauerstoff mehr aufgenommen werden kann. Für CO ist die Affinität zu Hämoglobin 250- bis 300-mal höher als die von Sauerstoff.<sup>[5-7]</sup> So ist das Hämoglobin bei einer CO-Vergiftung (HbCO – Komplex aus Hämoglobin und CO) nicht mehr in der Lage Sauerstoff aufzunehmen, was bei hohen Konzentrationen zum Tod durch Erstickung führt. Als Gegenmaßnahme wird reiner Sauerstoff unter Normaldruck oder erhöhtem Druck verabreicht.

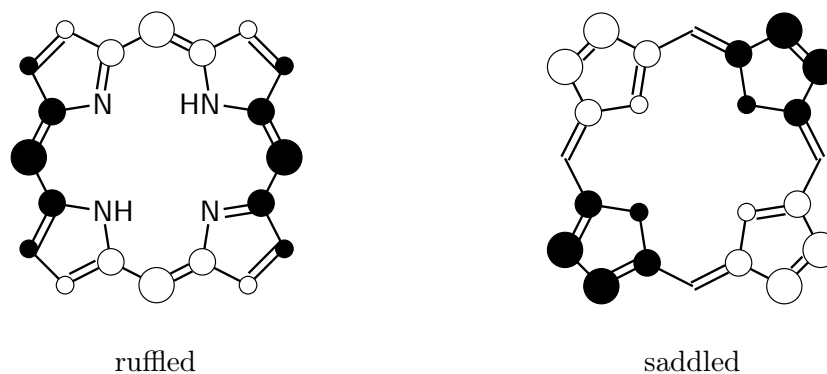


**Abb. 1.1.:** (a) Schematische Darstellung der Eisenkoordinationsverhältnisse im Porphyrin. Die äquatorialen Positionen sind durch die vier Stickstoffatome des Porphyrins besetzt. X und Y symbolisieren den fünften bzw. sechsten Liganden in axialer Position. (b) Koordinationsumgebung des Eisens im Hämoglobin – His F8 und His E7 sind der proximale bzw. distale Histidin-Ligand.<sup>[6]</sup>

Die Anbindung der Metallkationen durch Aminosäurereste ist zwar thermodynamisch stabil (günstige Komplexbildungsgleichgewichte), jedoch nicht kinetisch (geringe Aktivierungsenergie der Dissoziation). Zur kinetischen Stabilisierung sind Chelatliganden wie Tetrapyrrole (vgl. die unten erwähnten Porphyrine) und andere Makrozyklen (u. a. Kronenether und Kryptanden für vornehmlich Alkali- und Erdalkalimetallkationen) erforderlich.<sup>[3]</sup>

Porphyryne sind makrozyklische, nahezu ebene, vierzählige, zweifach negativ geladene Liganden mit 26  $\pi$ -Elektronen. Der einfachste Vertreter, das 21*H*,23*H*-Porphin, entsteht durch Kondensation von je vier Molekülen Formaldehyd und Pyrrol. Dabei sind die vier Pyrrole über drei Methinbrücken verbunden (Tetrapyrrol), die unter Ausbildung einer weiteren Methinbrücke den Ringschluss zum Porphyrin eingehen. Substituierte Porphine werden i. A. als Porphyrine bezeichnet.<sup>[8]</sup> Sowohl die freie Base sowie auch deren Metallkomplexe (22  $\pi$ -Elektronen) gehorchen der Hückel-Regel ( $4n+2$ - $\pi$ -Elektronen). Im großen  $\pi$ -System sind auch Farbigkeit und Stabilität der Porphyrine begründet. Dies spiegelt sich in den Ausdrücken Tetrapyrrol-„Farbstoffe“ oder „Pigmente des Lebens“ wieder. Ihre hohe Stabilität zeigt sich an Funden in Sedimenten,

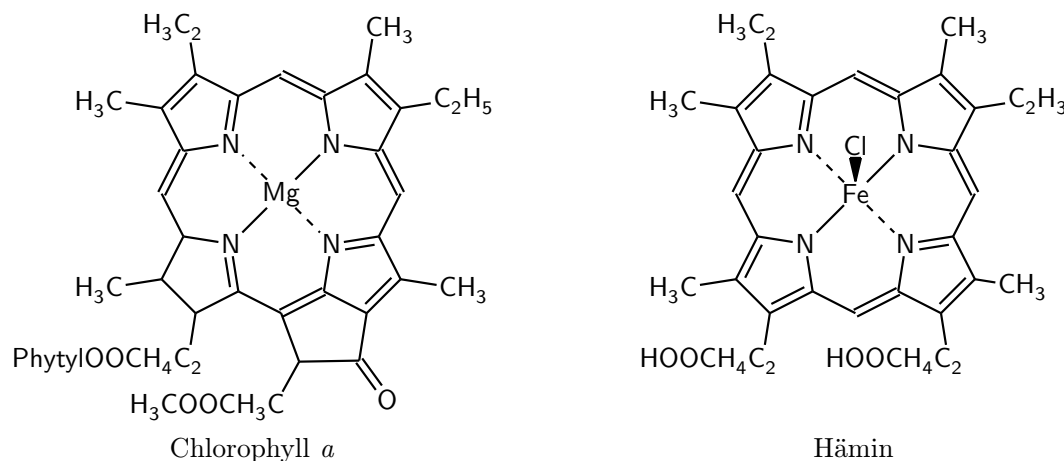
Kohle und Erdölfractionen. Das starre Porphyringerüst ist größenspezifisch in Bezug auf das Metallkation und ermöglicht eine bestmögliche Aufnahme von Ionen mit einem Radius zwischen 60 pm bis 70 pm. Ionen, die diesen Anforderungen genügen wie  $\text{Mg}^{2+}$  (72 pm),  $\text{Ga}^{3+}$  (63 pm),  $\text{Mn}^{3+}$  (ca. 60 pm),  $\text{Co}^{2+}$  (*low-spin* 65 pm) und  $\text{Ni}^{2+}$  (69 pm), befinden sich dann in der Porphyrinebene (*in-plane* Koordination). Sind sie nicht passend, ist eine Position etwas oberhalb der Ringebene (*out-of-plane* Koordination) möglich, wie z. B. bei *high-spin*  $\text{Fe}^{2+}$  (78 pm). Der Mittelwert der Ionenradien der *high-* und *low-spin*-Zustände von  $\text{Fe}^{2+}$  (78 pm bzw. 61 pm) und  $\text{Fe}^{3+}$  (65 pm bzw. 55 pm) liegt mit 65 pm allerdings im Sollbereich. Dies ist von Bedeutung, da manche Hämproteine Redox-Katalyse betreiben, die ein Hin- und Herschalten von Oxidationsstufe und Spinzustand mit sich bringen. Des Weiteren bewirkt die Porphyrin-Koordination eine Abweichung von der Oktaedergeometrie durch tetragonale Verzerrung am Metallkation, mit entsprechenden Folgen für die energetische Lage seiner d-Orbitale. Weiteren Einfluss übt die Struktur des Porphyrinringsystems aus, die neben der ebenen weitere Anordnungen kennt. Die leicht gewölbte (*domed*), sattelförmige (*saddled*), verdrehte/geraffte (*ruffled*), wellen- (*wave*) und propellerartige (*propellerd*) Konformation sind dabei die sechs häufigsten in Hämproteinen gefundenen (Abb. 1.2).<sup>[3,9]</sup>



**Abb. 1.2.:** Darstellung der (links) verdrehten und (rechts) sattelförmigen Deformation des Porphyrinrings. Weiße Kreise repräsentieren Atome oberhalb und schwarze Kreise Atome unterhalb der Porphyrinebene.<sup>[10]</sup>

Es wird bei den Porphyrinringgerüsten zwischen Corrinen, Chlorinen und Porphyrinen unterschieden. Die beiden erstgenannten sind mit Cobalt und Magnesium als Metallzentrum in Vitamin  $\text{B}_{12}$  bzw. Chlorophyll *a* zu finden. Einer der in der Biologie weit verbreitetsten Vertreter ist das Protoporphyrin IX (PPIX), das mit  $\text{Fe(II)}$  Häm *b* bildet (s. Abb. 1.3). Häm *b* findet sich als prosthetische Gruppe in Proteinen, die essentielle Aufgaben wie Gas-, Elektronentransport und Metabolismus (Stoffwechsel) übernehmen. Beispiele sind in Globinen wie Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb) der Transport und die Speicherung von Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), in Katalasen bzw. Peroxidasen die Umsetzung (d. h. Disproportionierung) von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ ) und in Cytochromen der Elektronentransport sowie Energiegewinnung (Cytochrom *c* der Atmungskette). Aufgrund der vielfältigen Prozesse, die Häm ermöglicht, ist es eine Art „Schweizer Taschenmesser“ der Biochemie. Die intensive Farbe der

Häme findet auch Ausdruck im Namen Cytochrom, was Zellfarbstoff bedeutet und sich auf das griechische Wort für Farbe (chroma) zurückführen lässt.



**Abb. 1.3.:** Biologisch essentielle Moleküle für Photosynthese (Chlorophyll *a*) und Zellatmung (Hämin).

Im Häm (engl. *haem* (Br.); *heme* (Am.)) trägt das Eisenzentrum die Oxidationsstufe +2. Im Falle von Fe(III) wird die Komplexverbindung Hämin (engl. *haemin* (Br.); *hemin* (Am.)) genannt.<sup>[11,12]</sup> Diese Unterscheidung kann zu Verwirrungen führen, da mancherorts unter Hämin nur der Fe(III)-Komplex mit axial koordiniertem Chloridligand verstanden wird.<sup>[13]</sup> So handelt es sich bei Hämatin um den Fe(III)-Komplex mit axial koordiniertem Hydroxyliganden.<sup>[14]</sup> In der englischsprachigen Literatur finden sich so auch zur Unterscheidung der Oxidationsstufe des Eisenions die Ausdrücke Fe(II)/*ferrous heme* und Fe(III)/*ferric heme*.

### 1.1.2. Hämmetabolismus

Als Häm werden Komplexverbindungen aus Fe(II) und Protoporphyrin IX bezeichnet. Es ist als prosthetische Gruppe von zentraler Bedeutung für Hämoproteine wie Hämoglobin oder Cytochrome. Die Biosynthese des Häms beginnt in den Mitochondrien mit der Bildung von  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Keto-Adipinsäure aus Glycin und Succinyl-CoA mit Hilfe des Schlüsselenzyms der Hämbiosynthese  $\delta$ -Aminolävulinsäure (ALA)-Synthase und tritt nach anschließender Decarboxylierung als  $\delta$ -Aminolävulinsäure in das Zytoplasma über (Abb. 1.4). Bei nicht höheren Eukaryoten geht die Synthese der Aminolävulinsäure von Glutamat aus.

Aus der  $\delta$ -Aminolävulinsäure entsteht in mehreren Reaktionsschritten Protoporphyrin Typ III, in das das Fe(II) eingebaut wird und damit die Hämbiosynthese abschließt (Abb. 1.5). Im gesunden, nicht pathologischen Zustand wird die Hämsynthese durch allosterische Produkthemmung der  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Synthase-1 reguliert. Häm fungiert so als allosterischer Inhibitor, während Eisen u. a. die Biosynthese der  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Synthase-2 unterdrückt (vgl. Abs. 1.1.3). Dieses Isoenzym (Enzym gleicher Funktion, aber unterschiedlicher Struktur) wird nur in Erythrozyten exprimiert.<sup>[7,9,15]</sup> Allerdings kann Hämin über zwei hämregulatorische Motive (HRM) in der ALAS-Sequenz den Import des ALAS-2-Vorläufers ALAS-E in das Mitochon-

drium inhibieren. Beide HRM enthalten Cystein sowie das CP-Motiv, ein Cystein gefolgt von einem C-terminalen Prolin.<sup>[16]</sup> Auf die regulatorische Funktion von Häm wird genauer in Abschnitt 1.1.4 eingegangen.

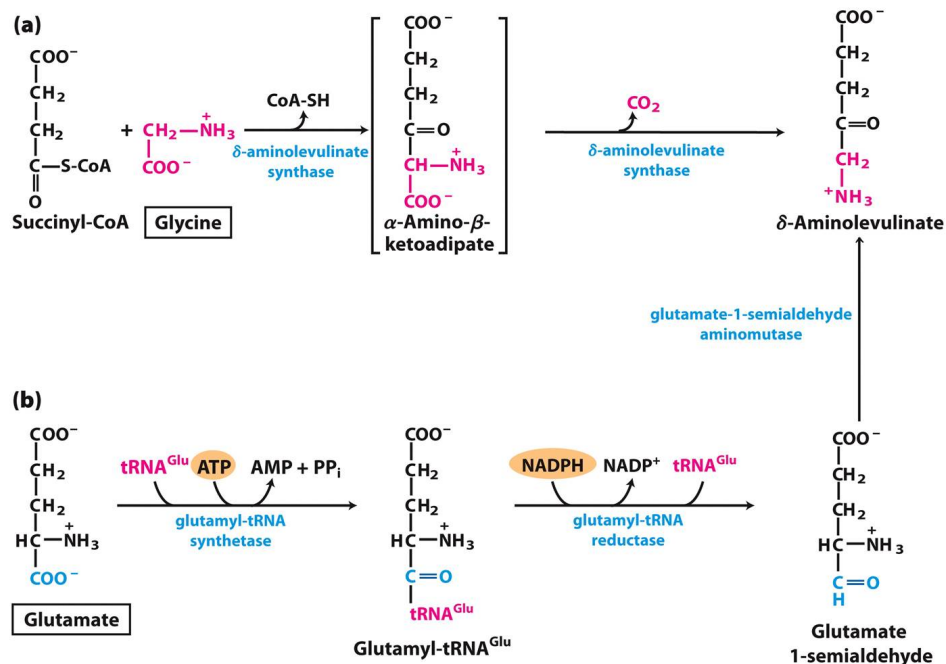


Figure 22-25  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

**Abb. 1.4.:** Biosynthese von δ-Aminolävulinat: (a) In den meisten Tieren und Säugern aus Glycin und Succinyl-CoA und (b) in Pflanzen und Bakterien aus Glutamat.<sup>[6]</sup>

Beim Absterben von Erythrozyten wird Hämoglobin frei, das in einen Häm- und ein Globinanteil gespalten wird. Die Globinketten werden zu Aminosäuren hydrolysiert, die anschließend der Wiederverwendung oder Verstoffwechslung zugeführt werden. Der Katabolismus (Abbau von Stoffwechselprodukten) von Häm verläuft zweistufig. Zuerst baut die Hämoxygenase im endoplasmatischen Retikulum (ER) Häm zu Biliverdin, einem linearen, offenkettigen Tetrapyrrolderivat ab, wobei Fe(II) und CO freierwerden. Das Fe(II) wird anschließend zu Fe(III) oxidiert und dem Ferritin-Eisenspeicher in RES (retikulo-endotheliales System) und Leber zur Wiederverwendung zugeführt. Biliverdin gelangt nach weiteren Abbauschritten in den Darm, wo es Darmbakterien zu Urobilinogen umwandeln, das über das Blut in die Niere gerät und schlussendlich zu Urobilin (gelb des Urins) abgebaut wird. Verbleibendes Urobilinogen wird zu Stercobilin (rot-braun des Fäzes) umgesetzt und mit dem Fäzes ausgeschieden. Ebenso die Schwarz- oder Lilafärbung bei Prellungen kommt durch das Freisetzen von Hämoglobin aus beschädigten Erythrozyten zustande. Mit der Zeit ändert sich die Farbe zu grün von Biliverdin und anschließend zu gelb von Bilirubin.<sup>[5-7]</sup>

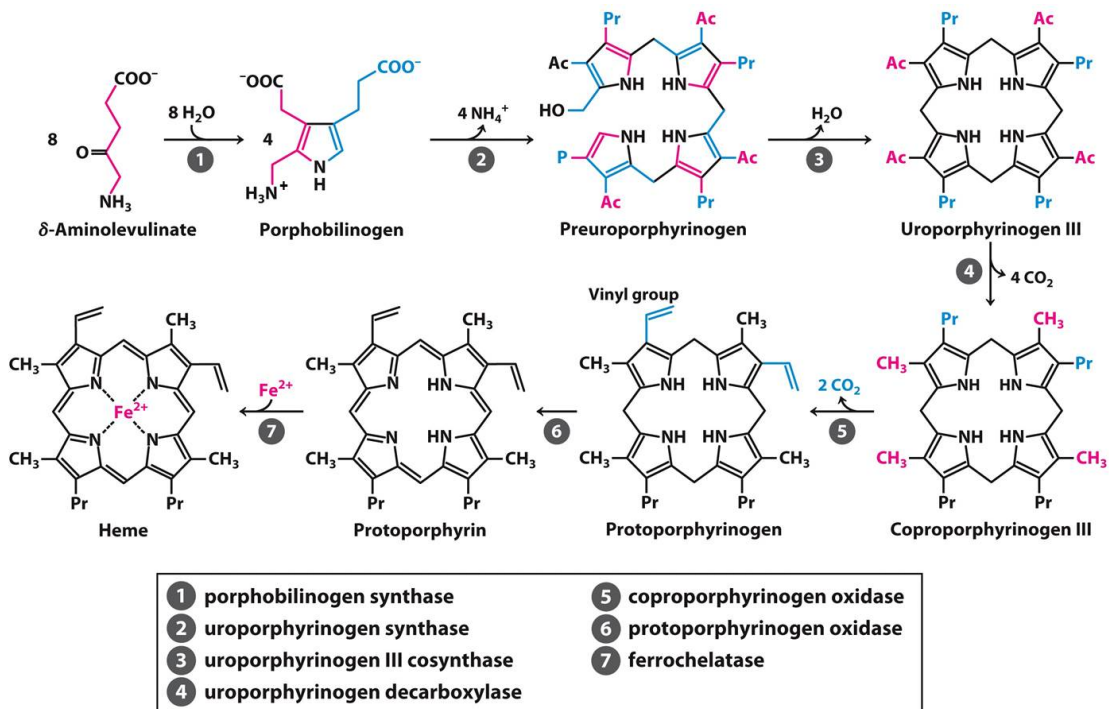


Figure 22-26  
 Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
 © 2013 W. H. Freeman and Company

**Abb. 1.5.:** Biosynthese von Häm aus  $\delta$ -Aminolävulinsäure. Ac = Acetyl ( $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ); Pr = Propionyl ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ). Anmerkung zur Darstellung von Schritt 1: Die positive Ladung an der  $\text{NH}_3$ -Gruppe fehlte im Original.<sup>[6]</sup>

### 1.1.3. Hämproteine: Eine Klasse mit essentiellen biologischen Funktionen für das Leben

Eisen, in Form seiner zwei- und dreiwertigen Kationen, ist ein essentielles Spurenelement, dessen langanhaltender Mangel lebensbedrohlich ist. Der Tagesbedarf liegt bei ca. 10 mg. Im ganzen menschlichen Körper verteilen sich 5 g bis 7 g größtenteils auf die Proteine für Sauerstofftransport/-speicherung Hämoglobin (69%), Myoglobin (9%) sowie die Eisenspeicher Ferritin und Hämosiderin (15%). Mit einem sehr geringen Anteil von jeweils nur 0,1% kommt es in weiteren Enzymen wie Cytochromen (Elektronentransport, Oxygenasen), Peroxidase/Katalase (Katalyse von Redoxvorgängen) und Transferrin (Eisentransport) vor.<sup>[7]</sup> Das beim Abbau dieser Proteine freiwerdende Eisen (25 mg/Tag) verbleibt größtenteils im Körper, so dass sich der Tagesbedarf vor allem aus Blutverlust oder abschilfernde (abschuppende) Haut- und Mukosazellen (Darmschleimhautzellen) ergibt.<sup>[11]</sup> Die Resorption des mit der Nahrung aufgenommenen Eisens (in Europa üblicherweise 10 mg bis 20 mg pro Tag) erfolgt bedarfsabhängig (ca. 5–40%) und größtenteils im Zwölffingerdarm (Duodenum) sowie als  $\text{Fe}^{2+}$  in Form von Häm, aufgrund seiner höheren Löslichkeit gegenüber Nichthäm-Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Täglich werden 1 mg bis 2 mg des Eisens über Abschilferung von Darmepithelzellen (mehr als 50%) und Haut sowie Urin und Schweiß ausgeschieden.<sup>[7,15]</sup> Der Verlust durch Menstruation

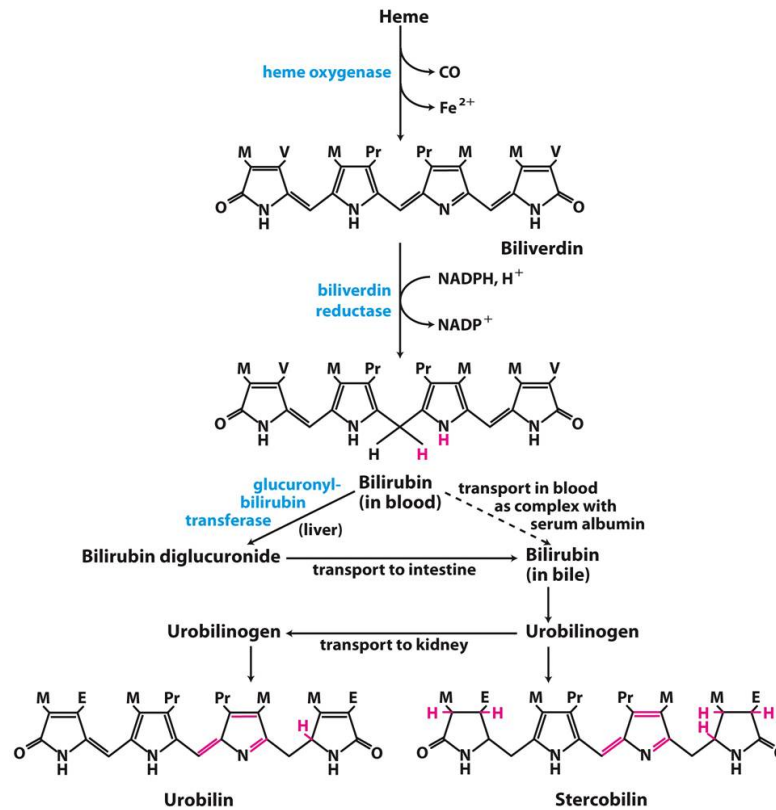


Figure 22-27  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

**Abb. 1.6.:** Schema des Hämabbaus. M = Methyl; V = Vinyl; Pr = Propionyl; E = Ethyl. Die Strukturen sind linear und nicht stereochemisch korrekt dargestellt.<sup>[6]</sup>

beträgt ca. 10 mg bis 15 mg Eisen (0,5 mg Eisen pro mL Blut) und wird durch erhöhte Eiseneresorption kompensiert. Zur Regulation des Eisenhaushalts bedient sich der Organismus eisenregulatorischer Proteine (*iron regulatory proteins*, IRP-1 und IRP-2), die bei niedriger interzellulären Eisenkonzentration an eisenregulatorische Elemente (*iron regulatory elements*, IREs) – nichttranslatierte Bereiche der mRNA – der Transferrinrezeptoren, des Ferritins, des Ferroporins und der  $\delta$ -ALA-Synthase-2 binden und deren Biosynthese beeinflussen. Im Falle der drei Letztgenannten wird die Initiation am Ribosom unterbunden und folglich deren Translation gehemmt. Für die Transferrinrezeptor-mRNA bewirkt die Bindung eisenregulatorischen Proteins eine Stabilisierung und verstärkte Translation. All dies hat eine Steigerung der interzellulären Eisenkonzentration zur Folge.<sup>[7,15]</sup> Hohe Eisenkonzentrationen in der Zelle haben hingegen einen deaktivierenden Effekt auf IRP1 und sorgen für schnellen Abbau von IRP2.<sup>[17]</sup>

Proteine mit Eisen als funktioneller Einheit finden in sich tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Lebensformen und werden in Häm- und Nicht-Hämproteine (Eisen-Schwefel-Cluster) unterteilt.<sup>[18]</sup> Einer der vermutlich bekanntesten Vertreter der ersten Kategorie ist Hämoglobin, das den Hauptbestandteil der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) darstellt, mit seiner Aufgabe den Sauerstoff in den Lungen zu binden und nach Transport über das Blut im Gewebe abzugeben. So bindet der Sauerstoff dann im Falle der Muskelzellen an ein weiteres Hämprotein namens

Myoglobin, das den Sauerstoff speichert. Die Koordination erfolgt über eines der beiden Sauerstoffatome (*end-on*). Die Oxidationsstufe des Eisenkations bleibt so unverändert ( $\text{Fe}^{2+}$ ), so dass nicht von einer Oxidation, sondern Oxygenierung gesprochen wird.<sup>[7]</sup>

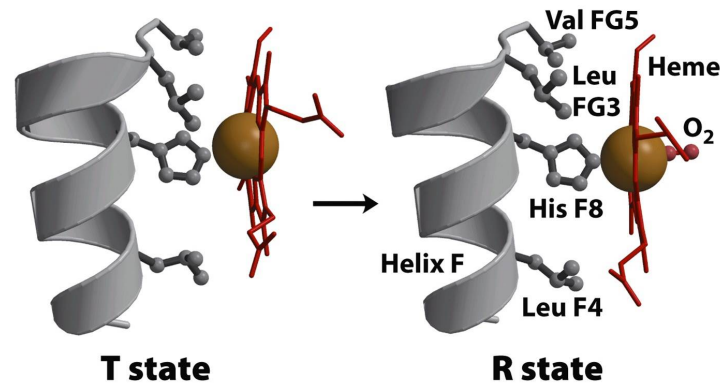


Figure 5-11  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

**Abb. 1.7.:** Strukturelle Änderung des Hämoglobins bei der Sauerstoffaufnahme (Oxygenierung). Die Zustände T (*tension*) und R (*relaxed*) beschreiben die angespannte/weniger aktive bzw. entspannte/aktive Form eines Enzyms.<sup>[6]</sup>

Hämoglobin stellt ein Beispiel für ein homotropes allosterisches Protein dar, da die Sauerstoffaffinität mit zunehmender Sauerstoffbeladung in den verbleibenden Monomereinheiten des Tetramers steigt. Der Begriff allosterisch leitet sich von den griechischen Worten *allos* (anders) und *stereos* (Ort) her – sprich „am anderen Ort“. Beim homotropen allosterischen Effekt bewirkt die Bindung des Substrats an einer Bindungsstelle (Allosterisches Zentrum) eine Veränderung der Proteinkonformation und damit der Affinität weiterer Bindungsstellen im Protein. Die allosterische Konformationsänderung des Hämoglobins wird dadurch hervorgerufen, dass sich das Eisenkation unter Sauerstoffbindung in die Porphyrinebene bewegt und dabei das bindende Histidin der Globinkette mit sich zieht (Abb. 1.7). Umgekehrt hat die kooperative Sauerstoffbindung zur Folge, dass die Sauerstoffabgabe bei zunehmender Desoxygenierung erleichtert wird.

#### 1.1.4. Hämregulation

Eisenporphyrine (Häme) finden sich in der Natur in den meisten Organismen und sind wesentlicher Bestandteil vieler verschiedener biologischer Prozesse wie Elektronentransport,<sup>[19]</sup> Gastransport, Transkriptionsregulation,<sup>[20]</sup> Steuerung der inneren Uhr,<sup>[21]</sup> Chemosensorik,<sup>[22]</sup> mikroRNA-Verarbeitung<sup>[23,24]</sup> und Metabolismus.<sup>[25]</sup> In Proteinen mit diesen Funktionen ist Häm üblicherweise fest als Kofaktor gebunden und stellt einen integralen Bestandteil der Proteinstruktur dar. Das Hämmolekül ist in der Lage Eisen in zwei Oxidationszuständen zu beinhalten ( $\text{Fe(II)}$  und  $\text{Fe(III)}$ ). Wenn die sechste Koordinationsstelle nicht oder nur mit einer schwachen Base besetzt ist, nimmt das Eisenion den *high-spin*-Zustand an ( $S = 2$  für  $\text{Fe(II)}$  und  $S = 5/2$  für  $\text{Fe(III)}$ ), wobei durch Koordination einer starken Base der *low-spin*-Zustand ( $S = 0$  für  $\text{Fe(II)}$  und  $S = 1/2$  für  $\text{Fe(III)}$ ) erreicht wird. Diese Eigenschaft ist grundlegend für die Funktion vieler



zuvor erwähnter Proteine.

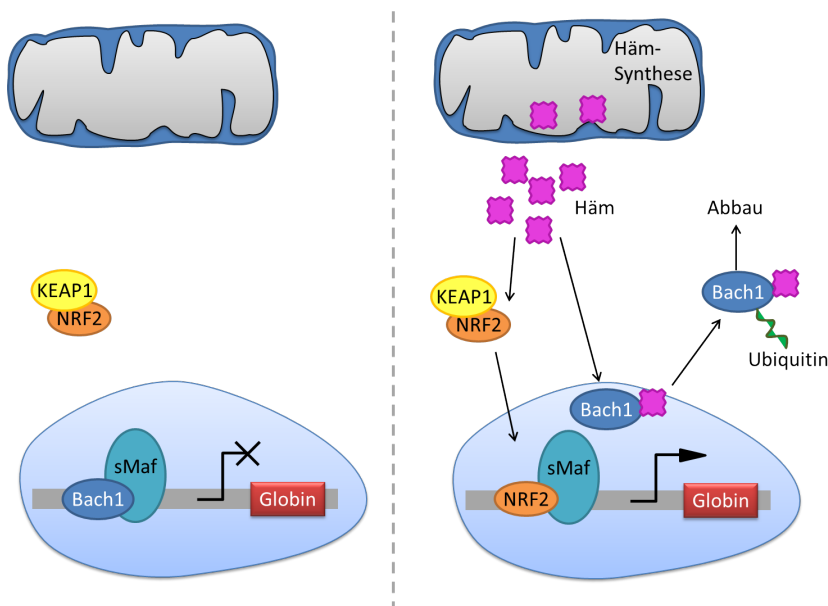
Neuer ist die Erkenntnis, dass Häm, außer fest gebunden als prosthetische Gruppe zu dienen, auch als Signalmolekül durch vorübergehende Bindung an ein Protein dessen Konformation und/oder Funktion regulieren kann. Gut untersuchte Beispiele stellen die hämabhängige Regulation der Öffnung des menschlichen *big potassium* (BK) Kanals Slo1<sup>[26–29]</sup> und der *iron response regulator* (Irr)<sup>[30,31]</sup> dar. Ein weiteres Beispiel ist der Nucleus-Hormon-Rezeptor Rev-erb $\beta$ , wo Häm abhängig von den Redox-Bedingungen entweder fünf- oder sechsfach koordiniert vorliegt.<sup>[32]</sup> Die Hämregulation soll im Folgenden anhand von Beispielen weiter ausgeführt werden.

Häm hat neben seiner Funktion als prosthetische Gruppe in Proteinen und dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress auch regulatorischen Einfluss auf bestimmte Zellfunktionen wie Genexpression. Bei seiner Biosynthese wirkt Häm selbst als Inhibitor auf das notwendige Schlüsselenzym ALAS-1 und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Das beim Hämabbau in geringen Konzentrationen freiwerdende CO wirkt wie NO gefäßerweiternd, wenn auch weniger stark, und zeigt regulatorische Effekte auf Neurotransmission. Bilirubin ist wiederum das in Säugergewebe häufigste Antioxidans. Seine zelltoxische Wirkung (s. Gelbsucht) kommt wahrscheinlich dann zustande, wenn es im Überschuss zum Serum-Albumin vorliegt. Des Weiteren ist die Expression des Gens der Hämoxygenase-1 (HO-1) durch eine Reihe an Faktoren, zu denen das Substrat Häm und oxidativer Stress wie Hitze, UV-Licht und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gehören, stark reguliert. Häm ist zwar Teil vieler lebensnotwendiger Funktionen, stellt in hohen Konzentrationen, aufgrund seiner Fähigkeit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu katalysieren (*reactive oxygen species*, ROS), die zellulären Makromolekülen oxidativen Schaden zufügen können, ein Zellgift dar.<sup>[20]</sup> HO-1 wirkt dem entgegen und stellt sozusagen die Antwort der Zelle auf (oxidativen) Stress dar. Es wandelt das toxische Häm in CO, Biliverdin und dessen Metabolit Bilirubin, die antioxidative und entzündungshemmende *in vivo* Eigenschaften haben, um. Das ebenso freiwerdende Eisen stimuliert die Ferritinbildung, was einen Weg zur Eisenentgiftung darstellt.<sup>[6,14]</sup> Die schützende Wirkung von HO-1 kann sich auch in einer Malariaresistenz äußern. Bei Sichelzellanämie ist die Hämkonzentration gering, was zur Induktion von HO-1 führt, das wiederum den Hämabbau fördert und die Bildung entzündungshemmender und antioxidativer Metabolite nach sich zieht.

Die Regulation des HO-1-Gens ist nur ein prominentes Beispiel. Weiter sind Gene, die für Globine, Enzyme der Hämbiosynthese, Ferroportin, Cytochrome, Myeloperoxidase und den Transferrin-Rezeptor kodieren hämreguliert. Häm kann die Genexpression durch Regulation von Transkription, mRNA-Stabilität, Spleißen, Proteinsynthese und posttranslationaler Modifikation steuern. Meistens – so wohl auch bei HO-1<sup>[20]</sup> – erfolgt dies über „*heme response elements*“ (HREs) und den Säugetier-Transkriptionsrepressor Bach-1. Das DNA-Motiv TGCTGAGTCAT/C wurde als Bindungsstelle identifiziert. Durch Bindung eines Heterodimers aus Bach-1 und einem Protein der Maf-Familie wird die Transkription des Gens unterdrückt. Bindet Häm an Bach-1 ändert sich dessen Konformation mit der Folge, dass sich das Heterodimer von dem entsprechenden DNA-Abschnitt – dem HRE – löst und das Gen zur Expression freigegeben ist. An dieser Stelle

können nun Dimere wie Maf-Maf, Nrf2-Maf oder Nrf2-AP1 binden und die Transkriptionsrate des Gens erhöhen.<sup>[33]</sup> Die Interaktion des Häms erfolgt dabei mit der C-terminalen Domäne von Bach-1, die vier CP-Motive enthält. Die Mutation aller Motive hat einen Verlust der Wechselwirkung zwischen Häm und Bach-1 zur Folge. Nur Eisenporphyrine, aber nicht die „leeren“ Porphyrinliganden alleine, zeigen inhibitorische Wirkung auf das Repressormolekül Bach-1, was zeigt, dass die Interaktion koordinativ, wie mit Histidin-Resten und nicht kovalent wie in Cytochrom *c*, verläuft.

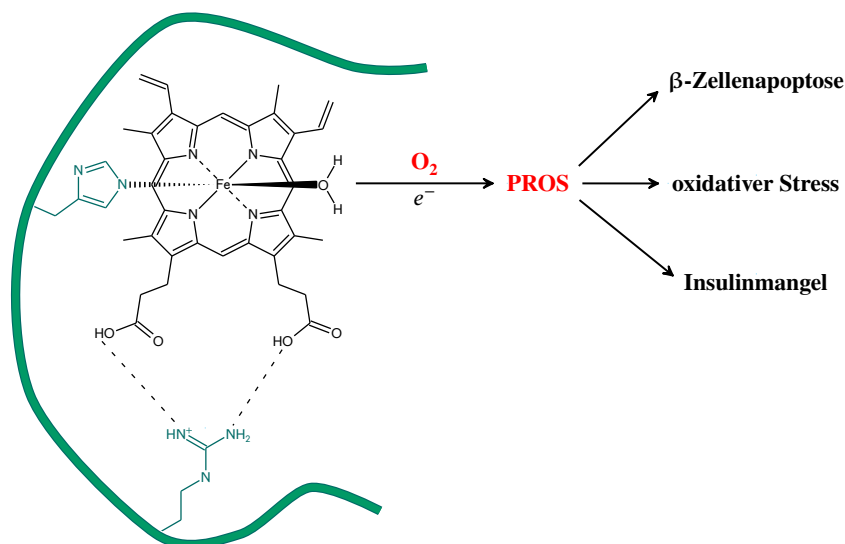
Bach-1 ist das erste Beispiel dafür, dass Genregulation durch Häm auch in höheren Eukaryoten vertreten ist.<sup>[34]</sup> Zuvor war dieser Mechanismus nur für den Transkriptionsfaktor Hap-1 in Hefe bekannt. Beide Transkriptionsfaktoren treten mit Häm über ihre CP-Motive in Interaktion. CP-Motive sind auch verantwortlich für die Hämregulation des Imports des ALAS-2-Vorläufers sowie der ALAS-1 in das Mitochondrium *in vitro*, wobei sich bei *in vivo* Experimenten Unterschiede herausstellten.<sup>[35,36]</sup> Im Falle der ALAS-1 konnte gezeigt werden, dass Hämin den ALAS-1-Import ins Mitochondrium unterdrücken konnte. Durch Mutation des Cysteins gegen Serin im CP-Motiv der ALAS-1 war diese Regulation durch Hämin nicht mehr möglich. Obwohl die ALAS-2 auch HRMs hat, konnte durch Hämin kein Effekt auf den Mitochondrienimport nachgewiesen werden. Dies erklären die Autoren dadurch, dass in Erythrozyten wegen der Hämoglobinsynthese eine hohe Hämkonzentration vorherrscht, die in ihren Studien nicht erreicht wurde. Sie halten es deswegen aber auch für wahrscheinlich, dass ALAS-2 durch Eisen reguliert wird.<sup>[36]</sup>



**Abb. 1.8.:** Hämregulation der Transkription der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globingene in erythroiden Stammzellen. Sobald die Zellen ein spätes Stadium erreicht haben, beginnt die Hämsynthese. Der Transkriptionsrepressor Bach-1 löst sich durch Hämbindung und ermöglicht die Bindung Nrf2, wodurch die Transkription der Globinketten gestartet wird.<sup>[37]</sup>

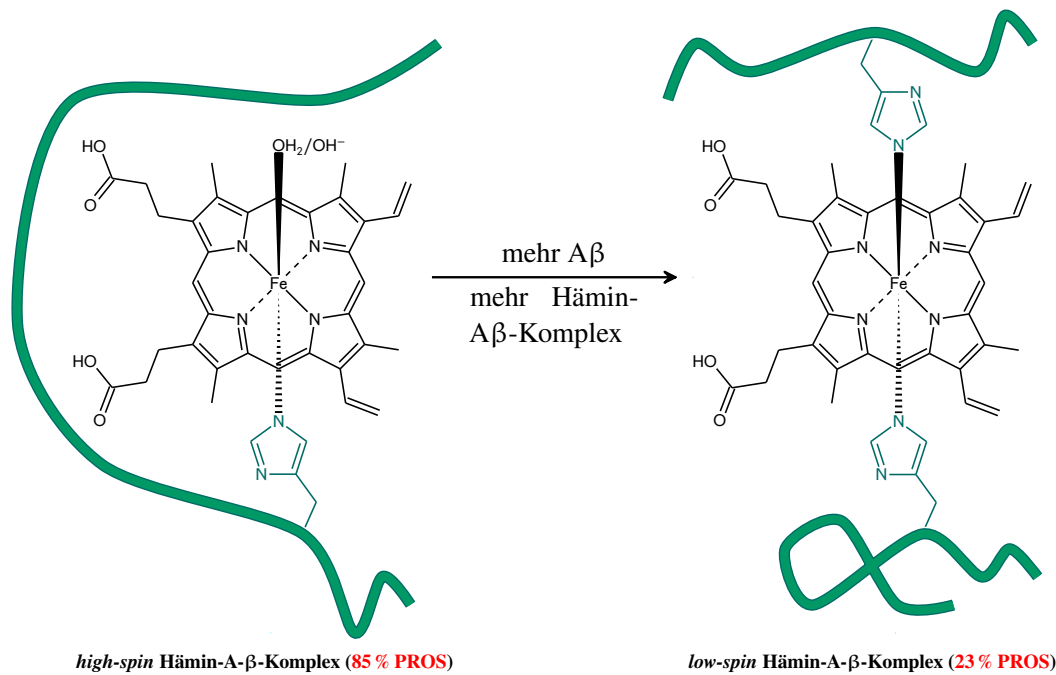
Da Häm notwendig für eine Vielzahl zellulärer Prozesse ist, aber als freies Häm zelltoxisch

wirkt, ist die gründliche Regulation seiner Menge von Nöten. Eine Möglichkeit der Häm-Homöostase (Homöostase – Aufrechterhaltung des Gleichgewichts eines offenen dynamischen Systems) besteht in dessen Abbau über Biliverdin mit Hilfe der HO (s. Abs. 1.1.2).<sup>[38]</sup> Im Gegensatz zu HO-1 hat dessen Isoform HO-2 zwei cystein-prolin-basierte HRM am C-Terminus, weshalb eine Beeinflussung der Proteinaktivität zu erwarten wäre. Dies konnte u. a. für die Transkriptionsfaktoren Bach1, Rev-Erb sowie für das *iron regulatory protein 2* (IRP2), das bakterielle *iron response regulator protein* (Irr) und den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )-Kinase gezeigt werden.<sup>[39]</sup> Im Falle von HO-2 binden die HRM zwar Häm, sind aber nicht direkt am katalytischen Zyklus beteiligt, so dass dieser dem von HO-1 sehr ähnlich ist. Unterschiede in der Geschwindigkeit einzelner Schritte sind auf strukturelle Unterschiede beider Proteine am aktiven Zentrum, das sich am N-Terminus befindet, zurückzuführen.<sup>[40]</sup> Die axiale Koordination des Fe(III) erfolgt darin, wie bei Myoglobin, für HO-1 und die oxidierte Form von HO-2 über Histidin und Wasser im *high-spin*-Zustand oder Histidin und Hydroxid im *low-spin*-Zustand ( $g = [2, 87; 2, 26; 1, 63]$ ) (s. Tab. 2.2). Während das *low-spin*-Signal der oxidierten Form schwach ist, zeigt die reduzierte Spezies ein deutlich intensiveres *low-spin*-Signal ( $g = [2, 41; 2, 26; 1, 91]$ ), in der nun eine Thiolatkoordination vorliegt.



**Abb. 1.9.:** Schematische Darstellung eines Häm-A $\beta$ -Komplexes, der durch die Bildung von PROS oxidativen Stress auf die Zelle ausübt.<sup>[41]</sup>

Die Alzheimer-Krankheit stellt die häufigste Form von Altersdemenz dar.<sup>[41]</sup> Es handelt sich um eine neurodegenerative Krankheit, bei der sich im Neocortex und hippocampalen Regionen des Gehirn Aggregate von Amyloid-Beta-Peptiden (A $\beta$ ) ablagern und teilreduzierte Sauerstoffspezies (*partially reduced oxygen species*, PROS) wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bilden. In AD-befallenen Hirnproben wurden ca. 15-mal höhere Mengen A $\beta$ -Peptid (ca. 31  $\mu$ g/g) als in normalen Proben gefunden. A $\beta$ -Peptide werden von der C-terminalen Region des transmembran Amyloid Vorläufer Proteins (APP) durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sektreasen prozessiert und als 39–42 Aminosäuren kurze Peptide freigesetzt. Diese kurzlebigen Monomere neigen zur baldigen Bildung von Fibrillen, die sich üb-



**Abb. 1.10.:** Schematische Darstellung möglicher Häm-A $\beta$ -Komplexe bei unterschiedlichen Bedingungen. Der *high-spin*-Häm-A $\beta$ -Komplex trägt deutlich stärker zur PROS-Bildung als der entsprechende *low-spin*-Komplex bei.<sup>[40]</sup>

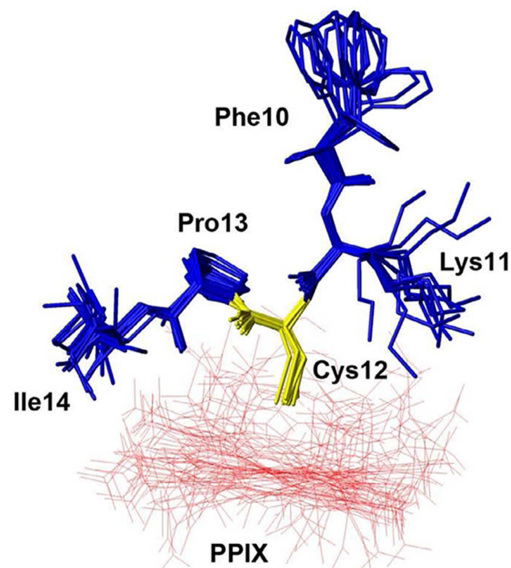
licherweise als Plaques äußern. Eine höhere Konzentration an redoxaktiven Metallen wie Kupfer (0,2  $\mu\text{M}$  bis 1,7  $\mu\text{M}$ ) und Eisen (als regulatorisches Häm; Konzentration ca. 30 nM) sowie deren Auftreten in den Plaques legen ihre Beteiligung bei dieser Krankheit nahe.<sup>[40]</sup> In derselben Hirnregion lagert sich bei Alzheimer-Patienten Häm ab, was auf die Komplexbildung des Häm mit A $\beta$ -Peptiden zurückgeführt wird (s. auch Abs. 2.1). Die Häm-A $\beta$ -Peptid-Komplexe wirken wie Peroxidasen und bilden neurotoxische PROS. Die Komplexbildung entzieht dem Körper Eisen, was wiederum u. a. zu erhöhter Eisenaufnahme und einem Anstieg der stressbezogenen Enzyme oder Proteine wie Hämoxxygenase 1 und Transferrin führt.<sup>[41]</sup> Diese Befunde stützen die Annahme, dass Häm eine Rolle in AD spielt und veranlassten mehrere Forschergruppen, sich dem aktiven Zentrum von Häm-A $\beta$ -Komplexen sowie deren Interaktion mit anderen Biomolekülen zu widmen. Im aktiven Zentrum bindet Häm an einen Histidinrest, was zu einem *high-spin*-Zustand führt, wobei H<sub>2</sub>O/OH<sup>-</sup> als sechster Ligand vermutet wird, der eine Wasserstoffbrücke zu einem Arginin in der zweiten Koordinationssphäre aufbaut. Reduzierte Häm-A $\beta$ -Komplexe können stöchiometrische Mengen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus O<sub>2</sub> bilden, wobei eines der zwei notwendigen Elektronen vom Fe(II) und das andere von einem Tyrosinrest stammt. Dabei erzeugt der wahrscheinlich unter physiologischen Bedingungen gebildete *high-spin*-Komplex bedeutend mehr PROS als ein bei hohen A $\beta$ -Konzentrationen auftretender *low-spin*-Komplex. Die Tyrosinreste können Häm-A $\beta$ -Komplexe verknüpfen, wodurch die Vermutung aufgeworfen wird, dass Hämbindung an A $\beta$  zu Peptidoligomerisierung führen kann. Diese drei für Bindung und Reaktivität bedeutenden Aminosäuren (His13, Arg5 und Tyr10) sind spezifisch für den Menschen, aber fehlen in Nagetieren,

die ihrerseits nicht durch AD betroffen sind. Diese Tatsache ist ein deutlicher Hinweis für die Bedeutung von Häm bei AD.<sup>[40]</sup>

Es bestehen zunehmend Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Hämeisenaufnahme und einem erhöhten Risiko auf Typ 2 Diabetes mellitus (T2Dm).<sup>[41]</sup> T2Dm ist die häufigste chronische Stoffwechselstörung, die sich durch Fehlfunktion der Insulinproduktion und -sekretion der  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse auszeichnet. Proteinaggregation, Amyloidose und Bildung von Fibrillen sind zentrale Prozesse bei Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit und T2Dm. Zusammen mit Insulin wird ein weiteres Hormon namens Amylin oder auch Insel-Amyloid-Peptid (im Verhältnis Amylin/Insulin 1:100), das aus 37 Aminosäuren besteht und das Insulin in seiner Funktion unterstützt, produziert. Allen T2Dm-Patienten sind Amyloidablagerungen gemein, die zur Apoptose der  $\beta$ -Zellen führen. Der Zelltod kann vermutlich auch durch kleinere Oligomere ausgelöst werden, die PROS bilden, die dann ihrerseits mit reduzierten Übergangsmetallen wie  $\text{Fe}^{2+}$  zu Hydroxylradikalen ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) führen. Einige Merkmale im Krankheitsbild von T2Dm wie Eisen-Dyshomöostase, Eisenakkumulation, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress, ähneln sehr stark denen der Alzheimer-Krankheit und werden auf die Komplexierung von Häm mit Amyloid- $\beta$ -Peptiden zurückgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Häm mit dem His18-Rest des menschlichen Insel-Amyloid-Polypeptids einen *high-spin*-Komplex (mit  $\text{H}_2\text{O}$  als sechstem Liganden) bildet. Das His18 ist bedeutend für die Pathologie von T2Dm, da Ratten, ohne diesen His18-Rest kein T2Dm aufweisen.

Diese Befunde ließen die Frage aufkommen, ob hämbasierte Regulation ein in der Natur weitverbreitetes Phänomen ist.<sup>[27,42]</sup> Als Möglichkeit der Untersuchung dieser Frage wurden verschiedene Peptid-Bibliotheken synthetisiert und auf hämbindende Eigenschaften hin überprüft.<sup>[28,43]</sup> Im Speziellen lieferte eine kombinatorische Peptid-Bibliothek wertvolle Informationen über den Einfluss der koordinierenden Aminosäuren und deren benachbarten Bereiche auf die Hämbindungseigenschaften.<sup>[28]</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in Listen kurzer Sequenzmotive, so genannter hämregulatorischer Motive (*heme regulatory motifs* oder kurz HRMs) zusammengetragen. Die HRMs wurden weiter anhand der Charakteristika ihrer Aminosäuresequenzen unterteilt.<sup>[28,44,45]</sup> Die bis jetzt am besten untersuchte HRM-Klasse enthält das CP-Motiv, d. h. die eisenkoordinierende Aminosäure Cystein C-terminal gefolgt von einem Prolin. Klassisch ist Cystein in Proteinen wie Peroxidasen oder Cytochrom P450 für die feste Anbindung des Häms an das Proteingerüst erforderlich, während Beispiele für hämregulierte Proteine mit cysteinbasiertem HRM weiter oben erwähnt wurden. Kürzlich wurden die Molekülstrukturen verschiedener Peptide mit einem solchen CP-Motiv mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt.<sup>[44,46]</sup> Die Strukturen legten die spezifische Eigenschaft des Prolins offen, die zu einer bestimmten Konformation der Sequenz C-terminal zum Cystein führt, d. h. ein Abknicken in dieser Region lässt den C-Terminus vom Protoporphyrinring wegzeigen (Abb. 1.11). Durch seine exponierte Thiolgruppe wird dem Cystein eine starke Wechselwirkung mit dem Häm ermöglicht. Andere HRMs enthalten die Aminosäuren Tyrosin und Histidin als zentrale koordinierende Aminosäuren. Diese Aminosäuren ermöglichen die permanente Hämbindung in Proteinen wie Katalasen (Tyrosin) sowie Peroxidasen und Hämoglobinen (Histidin). Allerdings sind noch keine Proteine mit histidin-

oder tyrosinbasiertem HRM bekannt.<sup>[28,45]</sup> Durch UV-Vis-Spektroskopie war es möglich Bindungskonstanten der Häm-in-Peptid-Wechselwirkung und Unterklassen für jedes Motiv, die auf Änderungen in der Soret-Region des Häminspektrums beruhen, zu bestimmen.<sup>[28,44–46]</sup> Anhand dieses detaillierten Wissens über HRMs können nun Sequenzdatenbanken nach Proteinen mit HRMs durchsucht und dann mit experimentellen Methoden ermittelt werden, ob ein bestimmtes Protein tatsächlich durch Häm reguliert ist.<sup>[28,44]</sup>



**Abb. 1.11.:** Veranschaulichung der strukturellen Wirkung des Prolins im CP-Motiv des Häm-in-Peptid-Komplexes von TK27.<sup>[44]</sup>

Wie oben erwähnt sind elektronische und magnetische Eigenschaften des Hämeisens wichtige Faktoren für die Funktion vieler gut untersuchter Hämproteine. Dies wirft die Frage auf, ob dies ebenso für die regulatorische Funktion von Häm gilt, d. h. ob ein bestimmtes HRM einen gewissen Spinzustand im Häm-molekül hervorruft. Das Ziel dieses Teils der Arbeit lag in der Untersuchung kleiner Sätze von Peptiden, die aus i) einer kombinatorischen Peptid-Bibliothek (*high throughput screening* - HTS)<sup>[28]</sup> und ii) Proteinen mit bekannten HRM<sup>[28,44–46]</sup> hergeleitet wurden. Peptide, die Häm im HTS gebunden haben, wurden dann mit Proteinsequenzdatenbanken verglichen, um neue potentielle hämregulierte Proteine aufzufinden. X-Band *cw* EPR-Spektroskopie wurde eingesetzt, um Häm-in-Peptid-Wechselwirkungen und den Spinzustand des gebundenen Hämins zu bestimmen. Des Weiteren wurden zwei Proteine mit prognostiziertem HRM, namentlich *Ferrous iron transport protein B* (FeoB)<sup>[47,48]</sup> und *Glycerol uptake facilitator protein* (GlpF)<sup>[49]</sup> exprimiert und aufgereinigt, um mittels EPR- und UV-Vis-Spektroskopie zu untersuchen, ob sie tatsächlich mit Häm wechselwirken.

Die Suche nach sowie Untersuchung von hämregulatorischen Motiven wird in Kapitel 2.1 ausgeführt. Selbst im Falle des wahrscheinlich bekanntesten Vertreters der HRMs, dem CP-Motiv, das erwiesenermaßen eine wichtige Rolle spielt, ist dessen strukturelle Funktion oder physiologische Bedeutung noch unklar.<sup>[39]</sup> Die EPR-Spektroskopie, die in Kapitel 1.2 vorgestellt wird,

stellt dabei eine Möglichkeit dar, diese Prozesse zu untersuchen.

## 1.2. EPR-Spektroskopie

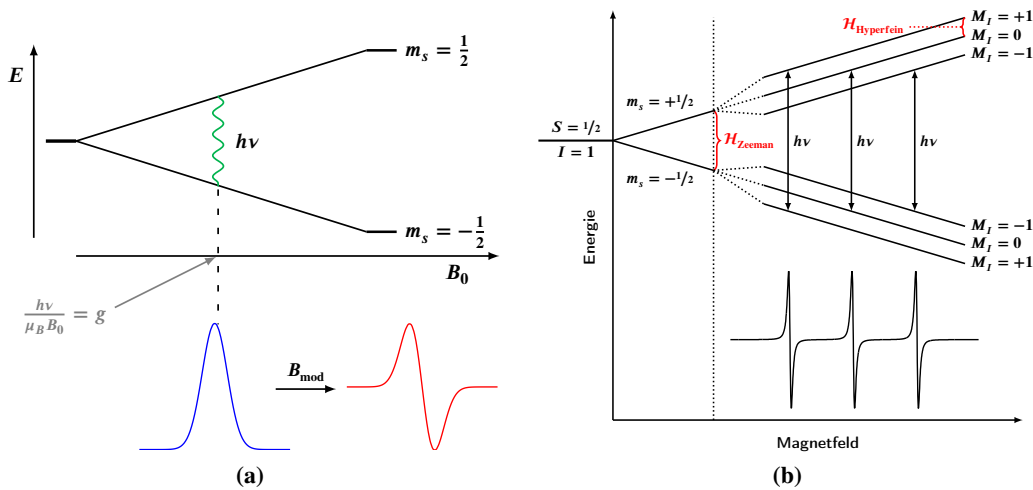
In der Elektronen-Paramagnetischen-Resonanz- (EPR) oder auch Elektronenspinresonanz- (ESR) Spektroskopie werden Probensubstanzen in einem externen Magnetfeld mit Mikrowellen bestrahlt und die Absorption der Probe detektiert. Dabei liefern nur Substanzen mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen ein Signal. Für solche paramagnetischen Proben können folgende Aussagen getroffen werden:

Messparameter	Erkenntnis	
$g$ -Wert und Relaxationszeit	Art der Probe	handelt es sich um ein Übergangsmetall
$g$ -Wert, Hyperfeinkopplungen, Linienform und/oder Linienbreite	Struktur und Umgebung nahe des Elektrons	welche Symmetrie und benachbarten Atome liegen vor
Linienform und/oder Linienbreite	molekulare Bewegungen	wie un-/gehindert ist die Rotation in Lösung

Das Elektron hat einen Eigendrehimpuls, der als Elektronenspin  $s$  bezeichnet wird und den Wert  $1/2$  hat. Dessen Magnetquantenzahl  $m_s$  beschreibt die zwei möglichen Orientierungen, *spin down/up* bzw.  $m_s = \pm 1/2$  ( $m_s = -s, \dots, s$ ). Beide Zustände sind energiegleich, so dass von entarteten Energieniveaus gesprochen wird. In einem externen Magnetfeld wird die Entartung aufgehoben. Die Energieniveaus spalten in  $m_s = -1/2$  und  $m_s = +1/2$  auf. Die Größe der Aufspaltung ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes  $B_0$ . Das magnetische Moment  $\mu$  des Spins ist im energetisch günstigeren Grundzustand  $m_s = -1/2$  parallel und im angeregten Zustand  $m_s = +1/2$  antiparallel zur Ausrichtung des äußeren Magnetfeld (üblicherweise die  $z$ -Richtung;  $B_{0,z}$ ) orientiert.<sup>[50]</sup> Die Wechselwirkung des Elektronenspins – genauer seines magnetischen Moments  $\mu_{e,z}$  ( $E = -\mu_{e,z}B$ ) – mit dem externen Magnetfeld wird als (Elektronen-) Zeeman-Wechselwirkung bezeichnet ( $\hat{H}_{\text{Zeeman}}$ ). Die Energie der Wechselwirkung ist nach  $E = -|\mu B| \cos(\mu, \mathbf{B})$  abhängig vom Winkel zwischen den Vektoren des magnetischen Moments  $\mu$  und des externen Magnetfeldes  $\mathbf{B}$  (Fettdruck kennzeichnet hier Vektoren). Bei paralleler Ausrichtung eines magnetischen Dipols zur der Richtung eines Magnetfeldes ist die Wechselwirkungsenergie minimal (für  $(\mu, \mathbf{B}) = 0$  ist  $E = -|\mu B|$  und für  $\pi$  ist  $E = +|\mu B|$ ).<sup>[51]</sup> Das Besetzungsverhältnis zwischen dem Grund- und angeregtem Zustand wird durch die Boltzmann-Verteilung beschreiben und beträgt 0,999 bei 25 °C.<sup>[52]</sup> Durch Verringerung der Temperatur nimmt die Besetzung des Grundzustands auf Kosten des angeregten Zustandes zu. Niedrigere Temperaturen sowie höhere Magnetfelder erhöhen den Besetzungsunterschied.

In der EPR-Spektroskopie wird der Übergang in den angeregten Zustand mit Hilfe von Mikrowellenstrahlung induziert. Je größer der Besetzungsunterschied ist, desto stärker ist das detektier-

te EPR-Absorptionssignal (s. o.). Bei *continuous wave* (cw) EPR-Spektrometern wird zur Messung eine Mikrowelle mit konstanter Frequenz  $\nu$  eingestrahlt und die Magnetfeldstärke durchgeföhren. Ist die Magnetfeldstärke erreicht, bei der die Energiedifferenz zwischen den Zuständen  $m_s = -1/2$  und  $m_s = +1/2$  der Energie der Mikrowelle entspricht, erfolgt Absorption ( $\Delta E = h\nu$ ; s. Formel (1.2.1); Abb. 1.12a). Das Absorptionssignal wird in der cw EPR-Spektroskopie zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses vor seiner Detektion zusätzlich mit einem zweiten Magnetfeld  $B_{\text{mod}}$  moduliert ( $B_1$  wird i. d. R. für die magnetische Komponente der Mikrowelle verwendet<sup>[51,53]</sup>). Das hat zur Folge, dass das Spektrum als erste Ableitung des Absorptionssignals erhalten wird (Abb. 1.12 und Abb. 1.13a).



**Abb. 1.12.:** Schematische Darstellung zur Entstehung von cw EPR-Spektren. (a) Elektronischer Übergang eines Elektrons im äußeren Magnetfeld  $B_0$ . Das magnetische Moment des Elektronenspins  $\mu_{e,z}$  wechselwirkt mit dem externen Magnetfeld  $B_0$  in dessen Hauptrichtung ( $E = -\mu_{e,z}B_0$  mit  $\mu_{e,z} = -m_s\mu_B g$ ). Die Lage der Energieniveaus ergibt sich nach  $\hat{H}\Psi = E\Psi$  mit  $\hat{H} = \mu_B B_0 g S$  zu  $E = m_s \mu_B B_0 g$  (s. Formel 1.2.3). Durch anschließende Modulation ( $B_{\text{mod}}$ ) des Absorptionssignals, zur Steigerung der Empfindlichkeit, wird das eigentliche EPR-Spektrum erhalten. (b) Änderung des EPR-Spektrums aufgrund der Hyperfeinkopplung  $A$  eines Kerns mit Kernspin  $I = 1$  mit dem freien Elektron. Die durch die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung aufgespaltenen  $m_s$ -Unterniveaus teilen sich in  $2nI + 1$  weitere Linien auf ( $n$ : Anzahl magnetisch äquivalenter Kerne). Die Lage der Energieniveaus ergibt sich nach  $\hat{H}\Psi = E\Psi$  mit  $\hat{H} = \mu_B B_0 g S + S A I$  zu  $E = m_s \mu_B B_0 g + m_s m_I A$ ; d. h. nach steigender Energie  $-\frac{1}{2}\mu_B B_0 g - \frac{1}{2}A, -\frac{1}{2}\mu_B B_0 g, -\frac{1}{2}\mu_B B_0 g + \frac{1}{2}A, \text{etc.}$  (s. Formel 1.2.3). Die Feldpositionen  $B$ , bei denen die EPR-Linien bei konstanter Mikrowellenfrequenz erscheinen, lauten entsprechend  $\frac{h\nu}{\mu_B g} - \frac{A}{\mu_B g}, \frac{h\nu}{\mu_B g}$  und  $\frac{h\nu}{\mu_B g} + \frac{A}{\mu_B g}$ .

Für Systeme mit mehr als einem Elektron wird nicht mehr  $m_s$ , sondern  $M_S$  verwendet ( $M_S = -S, \dots, S$  mit  $S = \sum_i s_i$ ). Die Auswahlregel für den EPR-Übergang ist dann allgemein  $\Delta M_S = \pm 1$ . Wenn diese Bedingung erfüllt ist, gilt der Übergang als erlaubt. Gleichung (1.2.1) gibt die Resonanzbedingung wieder ( $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum;  $\mu_B$ : Bohr'sches Magneton). An-



schaulich wird das für den einfachen Fall in Abbildung 1.12a dargestellt. Ein ungepaartes Elektron ohne Kopplung zu benachbarten Kernen erzeugt eine einzelne EPR-Linie. In diesem Fall ergibt sich aus der Feld-Position des Nulldurchgangs der EPR-Linie der  $g$ -Wert.

$$h\nu = \Delta E = g\mu_B B_0 \quad (1.2.1)$$

Der  $g$ -Wert beträgt für das freie Elektron  $g_e = 2,002\,319$ .<sup>[54,55]</sup> Abweichungen von diesem Wert werden hauptsächlich durch Spin-Bahn-Kopplung hervorgerufen, die aber für das freie Elektron nicht auftritt, da die Nebenquantenzahl  $l = 0$  ist (Feinstrukturwechselwirkung). Ungepaarte Elektronen in Ionen oder Molekülen sind an Atomkerne gebunden, so dass  $l \neq 0$  wird. Das dann auf das ungepaarte Elektron wirkende effektive Magnetfeld ist eine Kombination aus dem externen Magnetfeld und dem inneren Feld der Spin-Bahn-Kopplung. Die Information über die Geometrie des inneren Feldes verbergen sich im  $g$ -Tensor (Formel (1.2.2); Details s. u.).

$$\hat{H}_{\text{Zeeman}} = g_e \mu_B \mathbf{B}_{\text{eff}}^T \cdot \hat{\mathbf{S}} = \mu_B \mathbf{B}^T \cdot \mathbf{g} \cdot \hat{\mathbf{S}} \quad (1.2.2)$$

Der  $g$ -Tensor ist eine wichtige Größe in der EPR-Spektroskopie, da er Informationen über die Symmetrie am Ort des ungepaarten Elektrons enthält. Ist die Elektronendichte in allen drei Raumrichtungen identisch, haben alle drei Diagonalelemente des  $g$ -Tensors denselben Wert,  $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz} = g_{\text{iso}}$  (generell:  $g_{\text{iso}} = 1/3[g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}]$ ). Neben dieser isotropen gibt es zwei anisotrope Konstellationen. Wenn eine Tensorkomponente von den zwei anderen abweicht,  $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$  und  $g_{\parallel} = g_{zz}$ , liegt axiale Symmetrie vor. Sind alle drei Diagonalelemente des  $g$ -Tensors unterschiedlich,  $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$ , wird von orthorhombischer Symmetrie gesprochen (Abb. 1.13a). In flüssigen Lösungen wird auch für nicht isotrope  $g$ -Tensoren nur der  $g_{\text{iso}}$ -Wert gemessen, da die Anisotropie durch die Rotation des Moleküls ausgemittelt wird. Die einzelnen  $g$ -Tensorkomponenten können nur im Kristall oder gefrorener Lösung beobachtet werden. Bei axialen EPR-Spektren ist die senkrechte Komponente  $g_{\perp}$  die deutlich intensivere EPR-Linie, da es sehr viele mögliche Konfigurationen des Spinsystems gibt, in denen das magnetische Moment eine äquatoriale Position einnimmt, aber nur wenige mit einer Ausrichtung parallel zu  $B_{0,z}$ .<sup>[51]</sup>

Das eingangs erwähnte freie Elektron stellt jedoch einen Spezialfall dar. In der Praxis werden hingegen Probensubstanzen untersucht, die ein oder gleich mehrere ungepaarte Elektronen in einem Molekül besitzen. Mehrere ungepaarte Elektronen eines Moleküls können so stark koppeln, dass sich ihre einzelnen Spins zu einem Gesamtspin mit der Spinquantenzahl  $S = \sum_i s_i$  addieren. Da sich der Gesamtspin wie ein Elektronenspin mit größerer Spinquantenzahl verhält, wird vereinfachend vom Elektronenspin  $S$  gesprochen. Wechselwirkungen der Elektronen untereinander haben Feinaufspaltung (bzw. Nullfeldaufspaltung) zur Folge ( $\hat{H}_{\text{Fein}}$ ). Dies gilt es bei der EPR-Spektroskopie von Hämin zu berücksichtigen und wird im Folgenden weiter ausgeführt.

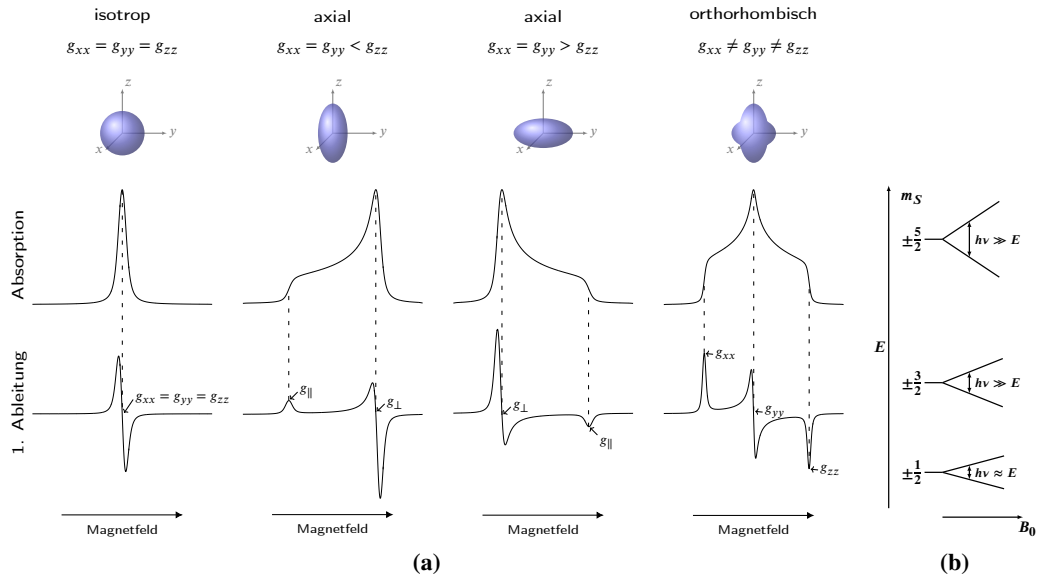
Bei Hämin, das nur eine starke Base als axialen Liganden trägt, handelt es sich um ein Hochspinsystem (*high-spin*). Bei der EPR-spektroskopischen Untersuchung von *high-spin*-Systemen muss die dort auftretende Nullfeldaufspaltung (gebräuchlicher Begriff für die Feinaufspaltung)

berücksichtigt werden (vgl. MetMb: Fe(P)(His)(H<sub>2</sub>O); P: Porphyrin). Die Nullfeldaufspaltung ist die Wechselwirkung mehrerer ungepaarter Elektronen, die auch ohne äußeres Magnetfeld auftritt<sup>[56]</sup> und wird mit dem Feinaufspaltungs-Tensor  $\mathbf{D}$  des Spin-Hamilton-Operators beschrieben (vgl. Formel (1.2.3)). Für MetMb sind die tetragonale Nullfeldaufspaltung  $D = 9,26 \text{ cm}^{-1}$  und die rhombische Nullfeldaufspaltung  $E = 23,15 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ . Der elektronische  $g$ -Tensor mit  $g_z = 2,00$ ,  $g_{x,y} = 1,98$  ist beinahe isotrop und nahe  $g_e$ . Hingegen wird für Hämine im *high-spin*-Zustand typischerweise ein axialer  $g$ -Tensor mit recht großer Anisotropie,  $g_{\perp} \approx 6$  und  $g_{\parallel} \approx 2$ , gemessen. Die Abweichung, ist dadurch begründet, dass die Nullfeldaufspaltung größer als die Anregungsenergie der Mikrowellenstrahlung ist ( $D \gg h\nu$ ) und zu den effektiven  $g$ -Werten für MetMb von  $g_x^{\text{eff}} = 5,87$ ,  $g_y^{\text{eff}} = 5,98$  und  $g_z^{\text{eff}} = g_{\parallel}^{\text{eff}} = 2$  führt.<sup>[57]</sup> Dementsprechend werden die gemessenen  $g$ -Werte auch als effektive  $g$ -Werte  $g^{\text{eff}}$  bezeichnet. Diese Nomenklatur wird allerdings nicht immer streng befolgt. Da im X-, Q- und W-Band ( $\nu \approx 9 \text{ GHz}$ ,  $34 \text{ GHz}$  und  $94 \text{ GHz} \equiv 0,3 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1,1 \text{ cm}^{-1}$  und  $3,1 \text{ cm}^{-1}$ ) die Nullfeldaufspaltung (in der Größenordnung von  $5 \text{ cm}^{-1}$  bis  $10 \text{ cm}^{-1}$ ,<sup>[52]</sup>  $1 \text{ cm}^{-1} = 3 \cdot 10^{10} \text{ Hz} = 30 \text{ GHz}$ ) deutlich größer als die elektronische Zeemanaufspaltung ist ( $\hat{H}_{\text{Fein}} \gg \hat{H}_{\text{Zeeman}}$ ), reicht die Mikrowellenleistung nur für den Übergang von  $m_S = -1/2$  nach  $m_S = +1/2$  aus, wodurch der effektive Spin näherungsweise als  $S^{\text{eff}} = 1/2$  beschrieben werden kann (Abb. 1.13b). Die Paare von  $m_S$ -Energieniveaus werden als Kramer-Dubletts bezeichnet. Wenn  $S = 5/2$  ist, gibt es nach der Spinmultiplizität  $M_S$  ( $M_S = 2S + 1$ ) sechs Unterniveaus  $m_S = \pm 1/2, \pm 3/2, \pm 5/2$ , wobei vom untersten, mittleren und obersten Kramer-Dublett gesprochen wird (Abb. 1.13b). Laut der Auswahlregel  $\Delta M_S = \pm 1$  sollten nur Übergänge im untersten Kramer-Dublett erlaubt sein. Allerdings sind auch nicht erlaubte bzw. verbotene Übergänge möglich. Aufgrund ihrer sehr viel geringeren Übergangswahrscheinlichkeit sind sie aber dementsprechend intensitätsarm. Die Benennung der Energieuntersniveaus mit einer  $m_S$ -Quantenzahl, wie sie in der Praxis verwendet werden, ist nur für den Fall unendlich hoher Magnetfeldstärken gültig. Konkret handelt sich um Linearkombinationen mehrerer Quantenzahlen. Beispielsweise hat ein Spinsystem mit fünf ungepaarten Elektronen u. a.  $m_S = \pm 3/2$ -Niveaus. Ein eigentlich verbotener Übergang von  $m_S = -3/2$  nach  $m_S = +3/2$  wird dadurch möglich, dass diese Niveaus auch zum Teil  $m_S = \pm 1/2$ -Charakter haben.

Wie auch  $g$ - und  $A$ -Tensor kann die Nullfeldaufspaltung anisotrop sein, wobei die einzelnen Elemente allerdings abhängig von einander sind ( $D_x^2 + D_y^2 + D_z^2 = 0$ ) und somit über zwei unabhängige Parameter  $D = 3/2 D_z$  und  $E = 1/2(D_x - D_y)$  ausgedrückt werden können.<sup>[53]</sup> Da die mittlere Energie des elektronischen Grundzustandes nicht durch die Nullfeldaufspaltung verändert werden darf, ist der  $D$ -Tensor spurlos.<sup>[56]</sup> Das Verhältnis aus  $E$  und  $D$  wird als Rhombizität  $\eta = E/D$  bezeichnet ( $0 \leq \eta \leq 1/3$ ). Für axiale Symmetrie sind  $E = 0$  und  $\eta = 0$ , so dass unter Anwendung der Störungstheorie erster Ordnung für das unterste Kramer-Dublett  $m_S = \pm 1/2$  folgende Ausdrücke für die effektiven  $g$ -Werte erhalten werden:

$$g_{\perp} = \left(S + \frac{1}{2}\right) g_{\perp}$$

$$g_{\parallel}^{\text{eff}} = g_{\parallel}$$



**Abb. 1.13.:** (a) Veranschaulichung der möglichen Anisotropien des  $g$ -Tensors und der Effekt auf das  $cw$  EPR-Spektrum. (b) Darstellung der Wirkung großer Nullfeldaufspaltung auf die  $m_S$ -Energieniveaus eines *high-spin* Fe(III)-Systems mit  $S = 5/2$ . Bereits ohne äußeres Magnetfeld sind die  $m_S$ -Niveaus in  $m_S = \pm 1/2, 3/2, 5/2$  aufgespalten. Die Entartung dieser Unterniveaus wird durch das externe Magnetfeld aufgehoben. Nur der  $m_S = \pm 1/2$ -Übergang kann mit bei X-Band-Frequenzen beobachtet werden ( $E_{\text{Zeeman}} \approx 0,3 \text{ cm}^{-1}$ ).

Für höhere Dubletts sind  $g_{\perp}^{\text{eff}} = 0$  und  $g_{\parallel}^{\text{eff}} = (|m_S| + 1/2)g_{\parallel}$ . Ein effektiver  $g$ -Wert von Null ist gleichbedeutend mit einem unendlich großen Magnetfeld. Die  $g$ -Werte hätten einen unendlich weiten Feldabstand, wodurch ihre Intensität Null wäre. Somit sind nur Übergänge im untersten Kramer-Dublett  $m_S = \pm 1/2$  beobachtbar. Für  $S = 5/2$  mit  $g = 2$  folgen  $g_{\perp}^{\text{eff}} = 6$  und  $g_{\parallel}^{\text{eff}} = 2$ , wie es beispielsweise Metmyoglobin der Fall ist.

Für den Fall leichter Rhombizität,  $E \neq 0$ , treten für  $m_S = \pm 1/2$  folgende mit steigendem  $E$  stärker werdende Änderungen auf:  $g_x^{\text{eff}} < g_{\perp}^{\text{eff}}$  sowie  $g_y^{\text{eff}} > g_{\perp}^{\text{eff}}$  und  $g_{\parallel}^{\text{eff}} < g_{\parallel}$ . Für recht kleine Rhombizitäten folgt dann:

$$\begin{aligned} g_x^{\text{eff}} &= \left(S + \frac{1}{2}\right) g_x \left[1 - \frac{4E}{D}\right] \\ g_y^{\text{eff}} &= \left(S + \frac{1}{2}\right) g_y \left[1 + \frac{4E}{D}\right] \\ g_{\parallel}^{\text{eff}} &= g_{\parallel} \end{aligned}$$

Beispiele dafür sind *high-spin* Hämine ( $S = 5/2$ ,  $g \approx 2$ ,  $E/D < 0, 1$ ), deren Übergänge  $g_{\perp}^{\text{eff}} \approx 6 \pm 24E/D$  und  $g_{\parallel}^{\text{eff}} \approx 2$  gehorchen. Wenn  $E/D \approx 1/3$  ist, ergibt sich für das mittlere Kramer-Dublett  $m_S = \pm 3/2$  ein  $g^{\text{eff}}$ -Wert von  $30/7 \approx 4,3$ . Dieses von *high-spin* Fe(III) in rhombischer Umgebung hervorgerufene Signal (aus Hämin ausgefallenes Eisen), hat bereits bei geringen Fe(III)-Konzentrationen eine hohe Intensität, da sich alle seine  $g$ -Werte überlagern.<sup>[53]</sup>

Das  $\text{Fe}^{3+}$  der Hämine kann neben dem *high-spin* Zustand, mit  $g_{\perp} \approx 6$  und  $g_{\parallel} \approx 2$ , auch weitere Spinzustände annehmen. Mittels des  $g$ -Tensors kann auf den Spinzustand und die Koordination des Eisenzentrums geschlossen werden. Bindet das Eisenzentrum im Metmyoglobin Azid, wird das axial koordinierende Wasser verdrängt ( $\text{Fe(P)(His)(H}_2\text{O)} \longrightarrow \text{Fe(P)(His)(N}_3\text{)}$ ), der Spinzustand ändert sich von *high-spin* zu *low-spin* ( $S = 1/2$ ) und der  $g$ -Tensor wird orthorhombisch – für  $\text{MetMb-N}_3$   $g = (2,90; 2,25; 1,88)$ . Abweichung des Wertes für  $g_{\perp}$  von 6 zu kleineren Werten lassen sich durch Beimischung des Spinzustandes mit  $S = 3/2$  erklären.<sup>[58]</sup> Mischungen aus *high-spin*- und intermediärem Spinzustand werden in der englischen Literatur als *admixed spin state* bezeichnet ( $S = 5/2; 3/2$ ). Es handelt sich dabei nicht um ein thermisches Gleichgewicht, sondern eine quantenmechanische Mischung beider Spinzustände, die durch Spin-Bahn-Kopplung von  $S = 5/2$  und  $S = 3/2$  hervorgerufen wird.<sup>[10]</sup> Hohe Anteile von  $S = 3/2$  oder sogar ein reiner intermediärer Spinzustand werden durch Deformationen des Porphyrinliganden sowie sehr schwache axiale Liganden wie  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  oder  $\text{SbF}_6^-$  begünstigt. Die tetragonale Verzerrung des Ligandenfeldes am  $\text{Fe(III)}$  hat eine energetische Absenkung des  $d_{z^2}$ -Orbitals und Anhebung des  $d_{x^2-y^2}$ -Orbitals zur Folge, bis das  $d_{x^2-y^2}$ -Orbital im reinen  $S = 3/2$ -Zustand nicht mehr besetzt wird.<sup>[59]</sup> Der prozentuale Anteil des intermediären Spinzustandes lässt sich über  $(6.0 - g_{\perp}/2) \times 100$  errechnen.<sup>[10]</sup>

Im Folgenden werden einige Beispiele für die Bedeutung der axialen Koordination aufgeführt. In Häm- und Myoglobin ist die Hämgruppe durch das stark koordinierende Imidazol eines Histidins gebunden. Liegt das Eisenzentrum in Häm- oder Myoglobin dreiwertig und im *high-spin*-Zustand vor, ist der sechste Ligand das Sauerstoffatom eines Wassermoleküls.<sup>[60]</sup> Durch Zugabe eines stark koordinierenden sechsten Liganden wie  $\text{CO}$ ,  $\text{CN}$  oder  $\text{N}_3^-$  wechselt das Eisen(III)zentrum in den *low-spin*-Zustand. Im Falle von Neuroglobin konnte ein Auftreten des *high*- sowie *low-spin*-Zustands gefunden werden. Dem *low-spin*-Zustand wurde ein  $\text{His-Fe}^{\text{III}}-\text{His}$ -Komplex und dem *high-spin*-Zustand entweder eine hexakoordinierte Form,  $\text{His-Fe}^{\text{III}}-\text{H}_2\text{O}$ , oder eine pentakoordinierte Form,  $\text{His-Fe}^{\text{III}}$ , zugeordnet.<sup>[61]</sup> Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich für die *high*- und *low-spin*-Formen der Komplexe aus Häm in und Amyloid-Beta-Peptiden, die Mono-Histidin- bzw. Bis(Histidin)-Koordination aufweisen, ähnlich zu den aktiven Zentren in Peroxidasen bzw. Cytochrom *b*.<sup>[40]</sup> Der *high-spin*-Komplex wandelt sich bei hohen Häm-in-A $\beta$ -Konzentrationen oder bei A $\beta$ -Überschuss in den *low-spin*-Komplex um. Durch die Koordination der vier Pyrrolstickstoffatome des Porphyrinrings liegt das Ligandenfeld nahe des Übergangs zwischen *high*- und *low-spin*-Zustand, so dass der Spinzustand am Eisen(III) maßgeblich von der Stärke des fünften und sechsten Liganden abhängt.<sup>[62]</sup> Damit stellt die EPR-Spektroskopie ein geeignetes Instrument dar, um konformationelle Änderungen zu untersuchen.<sup>[60]</sup>

Bis jetzt wurden nur Wechselwirkungen der ungepaarten Elektronen mit dem externen Magnetfeld oder untereinander betrachtet. Wenn zusätzlich Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit benachbarten Kernen eines Kernspins  $I \neq 0$  auftreten (sog. Hyperfeinwechselwirkungen,  $\hat{H}_{\text{Hyperfein}}$ ), muss für einen erlaubten EPR-Übergang neben  $\Delta M_S = \pm 1$  zusätzlich die Auswahlregel  $\Delta M_I = 0$  ( $M_I$ : Magnetquantenzahl des Kernspins,  $M_I = -I, \dots, I$ ) erfüllt sein. Unter Berücksichtigung von Hyperfeinkopplung der Größe  $A$  ändert sich Formel (1.2.1)

zu  $\Delta E = h\nu = g\mu_B B_0 + AM_I$ . Dies ist nur eine Näherung für den Fall, dass  $g \approx g_e$ . Allgemein gültig ist, dass  $\Delta E = h\nu = g\mu_B B_0 + ag_e\mu_B M_I$  (mit  $A = ag_e\mu_B$ ). Die Hyperfeinwechselwirkung lässt die EPR-Linie in  $2nI + 1$ -Linien aufspalten ( $n =$  Anzahl magnetisch äquivalenter Kerne). Ein Beispiel für die Wechselwirkung eines ungepaarten Elektrons zu einem Stickstoff-Kern, wie es bei Nitroxiden der Fall ist, zeigt Abbildung 1.12b.

Ebenso können Wechselwirkungen dieser Atomkerne untereinander oder mit dem externen Magnetfeld Auswirkung auf das Signal des ungepaarten Elektrons haben (Kern-Quadrupol- und Kern-Zeeman-Wechselwirkung;  $\hat{H}_{\text{Kern-Zeeman}}$  und  $\hat{H}_{\text{Kern-Quadrupol}}$ ). Allerdings sind die Kern-Zeeman- und die Kern-Quadrupol-Wechselwirkungen klein verglichen mit der Zeeman-Wechselwirkung und der Nullfeldaufspaltung. Begründet ist das dadurch, dass das magnetische Moment des Elektrons deutlich größer als das des Kerns ist ( $\mu_B/\mu_n = m_p/m_e = 1836$ ;  $m_p =$  Protonenmasse). Dieser Sachverhalt ist auch ursächlich für den Sensitivitätsvorteil der EPR- gegenüber der NMR-Spektroskopie.<sup>[51,63]</sup>

All diesen oben genannten Wechselwirkungen wird bei der Beschreibung der Energie des ungepaarten Elektrons durch die entsprechenden Terme des Spin-Hamilton-Operators Rechnung getragen (Formel 1.2.3). Im Spin-Hamilton-Operator  $\hat{H}$  sind die Wechselwirkungen eines Elektronenspins  $S$  mit  $N$  Kernen des Kernspins  $I \neq 0$ , mit einem Kern- $g$ -Faktor  $g_n$  und einem Kern-Magneton  $\mu_n$  im Magnetfeld  $B_0$  zusammengefasst. Die Anwendung des Spin-Hamilton-Operators auf die Wellenfunktion  $\Psi$  des zu untersuchenden paramagnetischen Systems, liefert die Energie des Systems ( $\hat{H}\Psi = E\Psi$ ).  $\mathbf{B}$ ,  $\mathbf{g}$ ,  $\mathbf{S}$  und  $\mathbf{I}$  sind die Tensoren für Magnetfeld,  $g$ ,  $S$  und  $I$  sowie  $\mathbf{D}$ ,  $\mathbf{A}$  und  $\mathbf{Q}$  die Feinaufspaltungs- (bzw. Nullfeldaufspaltungs-), Hyperfein- und Quadrupol-Tensoren (Zirkumflex kennzeichnet Operatoren und Fettdruck hier Vektoren). Die Verwendung von Punkten in Formel (1.2.3) symbolisiert spezielle Rechenoperationen wie die Multiplikation von Vektoren mit Matrizen. So werden für den Elektronen-Zeeman-Term der  $B$ -Zeilenvektor (hochgestelltes T steht für transponiert; Transponierung des Spalten- zum Zeilenvektor) mit der  $g$ -Matrix und dem  $S$ -Spaltenvektor multipliziert.<sup>[51,53]</sup> Der Spin-Hamilton-Operator vereinfacht sich für den Fall eines freien Elektrons wieder zur oben diskutierten Resonanzbedingung (1.2.1), wenn  $\mathbf{B}$  entlang der  $z$ -Richtung liegt. So kann der allgemeine  $\mathbf{S}$ -Operator (berücksichtigt alle Orientierungen) durch den  $\mathbf{S}_z$ -Operator ersetzt werden, der  $M_S$  als Eigenwerte liefert.

$$\begin{aligned} \hat{H} &= \hat{H}_{\text{Zeeman}} + \hat{H}_{\text{Fein}} + \hat{H}_{\text{Hyperfein}} + \hat{H}_{\text{Kern-Zeeman}} + \hat{H}_{\text{Kern-Quadrupol}} \\ &= \hat{H}_{S,B} + \hat{H}_{S,S} + \hat{H}_{S,I} + \hat{H}_{I,B} + \hat{H}_{I,I} \\ &= \mu_B \mathbf{B}^T \cdot \mathbf{g} \cdot \hat{\mathbf{S}} + \hat{\mathbf{S}}^T \cdot \mathbf{D} \cdot \hat{\mathbf{S}} + \sum_{i=1}^N \left( \hat{\mathbf{S}}^T \cdot \mathbf{A}_i \cdot \hat{\mathbf{I}}_i - \mu_n \mathbf{B}^T \cdot \mathbf{g}_{n_i} \cdot \hat{\mathbf{I}}_i + \hat{\mathbf{I}}_i^T \cdot \mathbf{Q}_i \cdot \hat{\mathbf{I}}_i \right) \end{aligned} \quad (1.2.3)$$

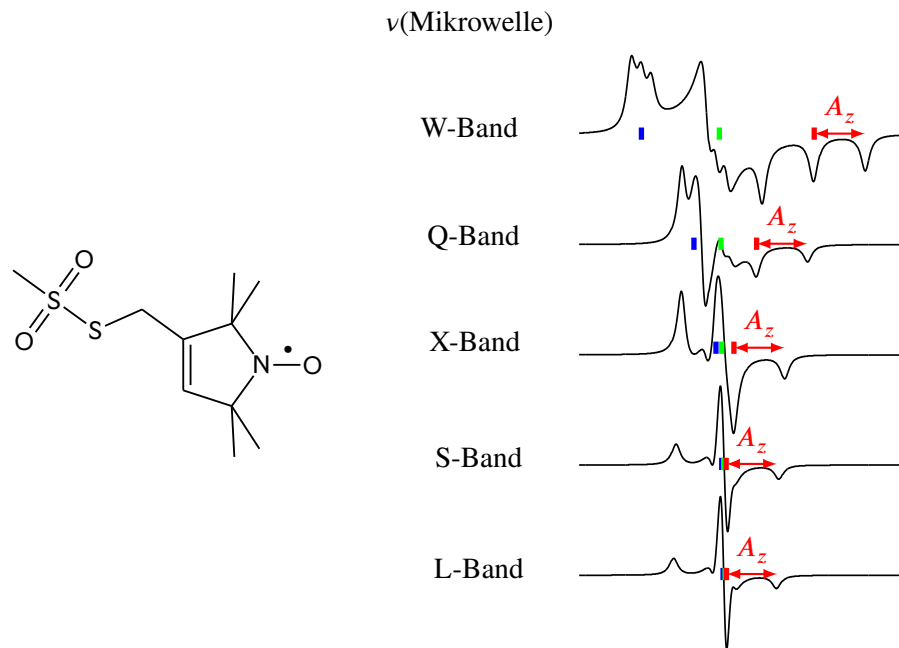
Die Informationen über die einzelnen Wechselwirkungsterme sind in jedem *cw* EPR-Spektrum enthalten, lassen sich aber aufgrund seiner intrinsischen Linienbreite nicht vollständig extrahieren. Mit der Puls-EPR-Spektroskopie, die hier nicht weiter ausgeführt werden soll, wird es durch Pulssequenzen (zeitlich definierte Abfolge kurzer, starker Mikrowellensignale) möglich, ausschließlich einzelne Wechselwirkungen wie Hyperfeinkopplungen zu messen.

Neben der hohen Sensitivität, die Detektion bis hinunter zu nanomolaren Konzentrationen erlaubt, ist eine weitere Besonderheit der EPR-Spektroskopie, dass sie für alles andere außer Signale der ungepaarten Elektronen „blind“ ist. Über das Signal der ungepaarten Elektronen sind u.a. auch Kopplungen zu benachbarten Kernen messbar. Allerdings wird nur das Signal des freien Elektrons detektiert. Auch sehr große Moleküle haben oft nur wenige ungepaarte Elektronen aber entsprechenden viele Kerne, wodurch NMR-Messungen mit steigender Größe des Moleküls sehr zeitaufwendig werden, da wesentlich mehr Signale zu messen sind. Während im Falle der NMR-Spektroskopie dadurch eine Größenbeschränkung des zu messenden Moleküls entsteht, ist dies für die EPR-Spektroskopie nicht der Fall. Dies ist besonders wichtig für biologisch relevante Proben wie Proteine.

Diese Selektivität der EPR-Spektroskopie für ungepaarte Elektronen zeigt sich auch bei der Messung von Metalloproteinen. So ließe sich im Regelfall, senkrechter Detektion –  $z$ -Achse des externen Magnetfeldes senkrecht zur magnetischen Komponente der Mikrowelle ( $B_0 \perp B_1$ ) – von Myoglobin kein *cw* EPR-Spektrum messen, von Metmyoglobin hingegen schon. Allgemein sind Proben mit ganzzahligem Gesamtspin EPR-inaktiv (*epr silent*).<sup>[64]</sup> Myoglobin beinhaltet eine Hämgruppe, dessen  $\text{Fe}^{2+}$  ( $3d^6$ ) mit  $S = 2$  einen ganzzahligen Spin hat, während im Metmyoglobin Hämin mit  $\text{Fe}^{3+}$  einen halbzahligen Spin aufweist ( $3d^5$ ,  $S = 5/2$ ). Ursächlich für die EPR-Inaktivität ist, dass die Energie der Mikrowelle für einen erlaubten EPR-Übergang nicht ausreicht, solange nicht sehr hohe Magnetfelder oder Mikrowellenfrequenzen verwendet werden. Die Hochfeld-/Hochfrequenz-EPR-Spektroskopie wird weiter unten ausgeführt.

Die gängigste zur EPR-Messung verwendete Frequenz liegt im X-Band.<sup>[65]</sup> Darüber hinaus kann es sich zur EPR-Analyse anbieten, zusätzliche Messung bei verschiedenen anderen Frequenzen (*multi frequency* EPR) durchzuführen. Üblicherweise werden für EPR-Spektroskopie L-, S-, X-, Q- und W-Band, mit entsprechenden Frequenzen von ca. 1,1 GHz, 3,0 GHz, 9,7 GHz, 34 GHz und 94 GHz, verwendet. Bei Spektren, die sich aus mehreren Linien zusammensetzen, kann damit ergründet werden, ob ihre Aufspaltung durch Hyperfeinkopplung oder  $g$ -Anisotropie hervorgerufen wird. Der Grund dafür liegt in der Feldabhängigkeit des  $g$ -Tensors ( $g \propto \nu/B_0$ ), während der  $A$ -Tensor feldunabhängig ist. Mit steigender Magnetfeldstärke werden die einzelnen Komponenten des  $g$ -Tensors über einen breiteren Feldbereich verteilt, wodurch die Auflösung steigt. Da dieses Verhalten nicht für den  $A$ -Tensor gilt, bleiben die Größen der Hyperfeinkopplung und damit die Aufspaltung der Linien im Spektrum unverändert (Abb. 1.14).

Unter Hochfeld/Hochfrequenz-EPR-Spektroskopie wird die Anwendung von Magnetfeldstärken oberhalb der üblicher Elektromagneten bzw. Mikrowellenfrequenzen deutlich größer als Q-Band verstanden (3 T bis 15 T und 75 GHz bis 400 GHz).<sup>[65]</sup> Hohe Magnetfeldstärken bzw. Mikrowellenfrequenzen werden in der EPR-Spektroskopie hauptsächlich zur Verbesserung der spektralen Auflösung und der Empfindlichkeit bei kleinem Probenvolumen verwendet. Zusätzlich werden molekulare Bewegungen für kürzere Zeitskalen und große Nullfeld-Feinstrukturaufspaltungen zugänglich. Der letztgenannte Aspekt ist für *high-spin* Fe(III) von Interesse, da es eine große Nullfeldaufspaltung aufweist. Im Falle hoher Mikrowellenfrequenzen zeigt das Spektrum von Hämin folgende Veränderung: Der  $g_{\perp}^{\text{eff}}$ -Wert verkleinert sich und die Linienbreite nimmt



**Abb. 1.14.:** Simulierte Spektren einer typischen Nitroxid-Spinsonde bei verschiedenen Mikrowellenfrequenzen illustriert die Änderung der Auflösung des  $g$ -Tensors. Die blauen, grünen und roten Balken markieren  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$ , die drei Hauptwerte des  $g$ -Tensors. Die Abszissen stellen die Magnetfeldstärken dar; Sie sind verschoben, um alle Spektren in einem Bild darzustellen und den optischen Vergleich zu ermöglichen, haben aber dieselbe Skalierung. Während die  $g$ -Werte mit höherer Frequenz zunehmend aufgelöst werden, bleiben die Hyperfeinaufspaltungen und ihre entsprechende Aufspaltung unverändert. Von den drei Hauptwerten des Hyperfein-Tensors  $A$  ist nur die Größe der  $z$ -Komponente,  $A_z$ , durch einen Pfeil angezeigt (3,8 mT). Die verwendeten Frequenzen entsprechen L-, S-, X-, Q- und W-Mikrowellenbändern.

zu, was beides Folgen des Einflusses der Nullfeldaufspaltung sind.<sup>[52,66]</sup> Die Verteilung eines Spin-Hamilton-Parameters wird in der englischen Literatur als „strain“ bezeichnet, so dass die erwähnte Linienverbreiterung durch  $D$  strain hervorgerufen wird. Dieses Problem kann durch das weitere Erhöhen der Magnetfeldstärke überwunden werden. Hochfeld-EPR-Spektroskopie ist besonders bei halbzahligen *high-spin*-Systemen wie  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  ( $S = 5/2$ ) oder  $\text{Gd}^{3+}$  ( $S = 7/2$ ) von Nutzen, da dort die inhomogene Linienbreite des Übergang von  $m_S = -1/2$  nach  $m_S = +1/2$  von Proben mit ungeordneter Ausrichtung (amorphe Proben wie gefrorene Lösungen oder Pulver; keine Einkristalle) durch Beiträge zweiter Ordnung der Nullfeldaufspaltung bestimmt wird. Deswegen werden bei hinreichend hohen Mikrowellenfrequenzen bzw. Magnetfeldstärken, also wenn  $D \ll h\nu$  ist, auch für solche Proben schmale Linien beobachtet, da die Effekte, die zur Verbreiterung führen, vernachlässigbar werden. Höhere Empfindlichkeit und Auflösung sind die Folge.<sup>[67]</sup> Trotz der großen Bedeutung von Fe(III) und seinen Koordinationsverbindungen für die Biologie wurde darauf Hochfeld-EPR-Spektroskopie verglichen mit herkömmlicher EPR-Spektroskopie recht selten angewendet.<sup>[68]</sup> Wichtige Gründe dafür dürften die höhere Komplexität der Hauptbauteile Magnet, Mikrowellenquelle und Resonator des Spektrometers sein.<sup>[65]</sup>

### 1.3. Kinetische Untersuchungen an Radikalen mittels EPR-Spektroskopie

Radikale zeichnen sich durch das Vorliegen ungepaarter Elektronen, die oft Ursprung ihrer hohen Reaktivität sind, aus. Sie treten als Zwischenstufen in Reaktionen auf. Die EPR-Spektroskopie als Methode zur Detektion von paramagnetischen Zentren ist deshalb zu ihrer Analyse prädestiniert. Ganze Spektren können in Sekunden aufgenommen werden. Bei der Detektion der Intensität eines einzelnen Punktes sinkt die Zeit auf Millisekunden oder weniger ( $10^{-7}$  s).<sup>[51]</sup> Die Methode ist somit hinreichend schnell, dass sie in Verbindung mit entsprechenden Mischern und Flusssystemen auch zur Aufklärung der Struktur und Kinetik dieser Radikale eingesetzt werden kann (s. Abs. 2.2).

Allerdings sind längst nicht alle Verbindungen mit freien Elektronen instabil. Meist handelt es sich bei stabilen Radikalen um Übergangsmetallverbindungen oder Moleküle, in denen das Radikalzentrum sterisch abgeschirmt ist. Zu den erstgenannten Typen zählen die bereits unter Abschnitt 1.1.4 erwähnten Fe(III)Porphyrine. Hingegen sind Nitroxide klassische Vertreter des zweiten Falls, stabilisierter Radikale. Ein wichtiges Anwendungsgebiet von Nitroxiden ist ihre Funktion als Spinsonde (engl. *spin label*) zum Einsatz in der EPR-Spektroskopie. Es gibt neben Nitroxiden auch Spinsonden auf  $Gd^{3+}$ -<sup>[69-71]</sup> oder Kohlenstoffbasis (Trityl),<sup>[72-74]</sup> doch Nitroxide sind am weitverbreitetsten. Zur Strukturaufklärung können Proteine an spezifischen Stellen mit MTSSL, (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanethiosulfonat, markiert werden. Dabei wird von *site-directed spin-labeling*,<sup>[75,76]</sup> also ortsspezifischer Spinmarkierung, gesprochen. Die Anbindung erfolgt dabei über Cysteinreste der Aminosäuresequenz des Proteins.

Durch Spinmarkierung eines Proteins mit MTSSL konnten bereits Informationen über die Kinetik der Rückfaltung eines Proteins erhalten werden.<sup>[77]</sup> Dazu wurde ein Flusssystem verwendet, in dem die Reaktandenlösungen, nachdem sie einen Mischer passiert haben, detektiert werden. Ebenso kann nur die Reaktion eines freien Nitroxids zu einer diamagnetischen Substanz untersucht werden. Dies wird üblicherweise zur Kalibrierung solcher Flusssysteme genutzt.<sup>[35,77,78]</sup> Ist die Zeitauflösung dieser Flusssysteme zu gering bzw. die zu beobachtenden Radikale zu kurzlebig, können diese kurzlebigen Radikale mit Spinfallen (*spin traps*), wie 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO), abgefangen werden. Diese *spin traps* sind Vorläuferverbindungen, die mit Radikalen zu Nitroxiden reagieren, die dann eine entsprechende Stabilität aufweisen. So kann z. B. über das Hyperfeinkopplungsschema des gebildeten Nitroxids auf das Radikal, mit dem die Spinfalle ursprünglich reagiert hatte, zurückgeschlossen werden.<sup>[79,80]</sup> Ein Beispiel für solche kurzlebigen Radikale sind Hydroxylradikale ( $OH^{\bullet}$ ), die in der Reaktion von Fe(II)-Salzen und  $H_2O_2$ , nach ihrem Entdecker Fenton-Reaktion genannt, entstehen.<sup>[81]</sup> Klassisch kommt als Quelle des zweiwertigen Eisens  $FeSO_4$  zum Einsatz, wobei nachfolgende Studien  $Fe(EDTA)_2$  verwendeten. Auch weitere Liganden wie Zitrat, ATP, Pyrophosphat und Oxalat wurden untersucht. Ihr Einfluss auf die Bildungsreaktion der Hydroxylradikale ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe_3^+ + OH^{\bullet} + OH^-$ ) ist der Art, dass ein Ligandenaustausch von Nöten ist, welcher durch zu stark koordinierende Liganden sehr langsam abläuft ( $Fe(CN)_6^{4-}$  und Fe(II) Cytochrom *c*). Die Reaktionskonstan-

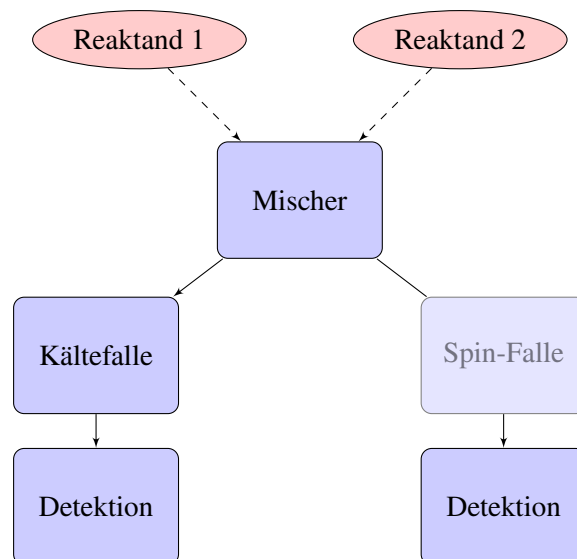


ten reichen dabei von  $75 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  oder den  $\text{Fe(II)}$  Komplex von Aminotris(methylenphosphonsäure).<sup>[82]</sup> Die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin setzt Hyperoxid  $\text{O}_2^{\bullet -}$  frei, welches zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff disproportioniert ( $2 \text{O}_2^{\bullet -} + 2 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 + 2 \text{OH}^-$ ). Das entstehende Wasserstoffperoxid könnte mit der reduzierten, zweiwertigen Form des Eisens im Sinne einer Fenton-Reaktion Hydroxylradikale  $\text{OH}^{\bullet}$  bilden. Ob *in vivo* das Häm oder das daraus freiwerdende Eisen tatsächlich als Fenton-Reagenz aktiv ist, bleibt unklar, da die Faktenlage kontrovers ist.<sup>[14]</sup> Untersuchungen an einem Fenton-ähnlichen System werden im weiteren Verlauf der Arbeit präsentiert (Abs. 2.2.2).

Um die Kinetik der Häminbindung eines Peptides oder Proteins im Rahmen der Erforschung der Hämregulation mit solchen Flussystemen zu untersuchen, wäre es von Nöten, entweder das Häm in oder den Bindungspartner mit einer Spinsonde zu versehen. Andernfalls gäbe es kein zu beobachtendes EPR-Signal in Lösung, da  $\text{Fe(III)}$  so schnell relaxiert, dass es erst bei kryogenen Temperaturen detektiert werden kann. Ansonsten bleibt weiter die Möglichkeit ein sogenanntes System *Rapid Freeze Quench* (RFQ)-System einzusetzen. Dort gelangen die Reaktandenlösungen nach dem Mischen nicht zur Detektion, sondern werden in einem Kältebad schockgefroren. Der Reaktionszeitpunkt wird so konserviert und die Probe kann später im EPR-Spektrometer bei tiefer Temperatur analysiert werden. Auch Studien zur Häminbindungskinetik sind Teil eines späteren Kapitels (Abs. 2.2.4).

Zur Untersuchung kinetischer Prozesse werden üblicherweise Aufbauten verwendet, bei denen die Reaktandenlösungen in einen Mischer befördert und die entstehende Reaktionslösung entweder nach dem Mischprozess direkt zum Ort der Detektion oder an eine Kältefalle, in der die Probe gefroren wird, gelangt. Die gefrorene Probe kann dann zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden (Abb. 1.15). Dieses RFQ genannte Verfahren und die Kalibrierung des RFQ-Gerätes anhand der Ligationsreaktion von MetMb und Azid werden in Absatz 2.2.1 beschrieben. Die davor erwähnte Methode zur Untersuchung kinetischer Prozesse direkt in Lösung kam unter Verwendung eines EPR-Mischresonators zum Einsatz (s. Abs. 2.2.3). Allen Verfahren ist gemein, dass die Reaktionszeiten durch das Ändern der Flussrate der Reaktanden sowie der Wegstrecke zwischen dem Auslass des Mixers und dem Ort der Detektion bzw. der Kältefalle feinjustiert werden. Die Reaktandenlösungen befinden sich üblicherweise in Spritzen, die von einem entsprechenden Motor gefördert werden.

Die verschiedenen Untersuchungsmethoden der Kinetik eines Prozesses mittels EPR-Spektroskopie lassen sich abhängig davon, ob das EPR-Spektrum in Lösung oder im gefrorenen Zustand aufgenommen wird, unterteilen. Für Kinetikuntersuchungen in Lösung sind die Methoden Konstanter-Fluss (*continuous flow*) und Fluss-Stopp (*stopped flow*) zu nennen. Bei der Konstanter-Fluss-Methode werden die Reaktanden mit gleichbleibender Flussrate durch den Mischer und Resonator befördert, so dass ein EPR-Spektrum bei einer der Flussrate entsprechenden Reaktionszeit aufgenommen werden kann. Dabei ist es notwendig für jede zu untersuchende Reaktionszeit die entsprechende Flussrate zu wählen, bei der dann das EPR-Spektrum detektiert werden kann. Dahingegen wird bei der Fluss-Stopp-Methode die gemischte Reaktionslösung durch die Spritzenpumpen nur solange in den Resonator gedrückt bis ein konstantes Si-



**Abb. 1.15.:** Fließschema typischer Systeme zur Untersuchung kinetischer Prozesse in der EPR-Spektroskopie. Die Pfade nach dem Mischer symbolisieren RFQ- (links) bzw. Flussverfahren (rechts).

gnal erhalten wird. Im Anschluss werden die Pumpen gestoppt und zeitgleich der Auslass der Fluss-Stopp-Systems geschlossen. Die so im Resonator gehaltene Lösung reagiert ab, wodurch direkt das gesamte kinetische Profil der Reaktion detektiert wird. Der Vorteil dabei ist ein geringerer Reaktandenverbrauch gegenüber der Konstanter-Fluss-Methode. Allerdings resultiert die Synchronisation des Pumpenstopps und dem Verschluss des Auslasses in einem technisch anspruchsvolleren Aufbau. Des Weiteren muss eine verbleibende Restströmung der Lösung berücksichtigt werden. Diese Restströmung kann die Lösung aus dem EPR-aktiven Bereich des Resonators schieben, was die Signalintensität verringert. Dieser Effekt, der sich mit dem eigentlichen Reaktionsgeschehen überlagert, muss als Geräteprofil im Rahmen der Systemkalibrierung bestimmt werden.

## 1.4. Motivation

Häm ist ein Eisenporphyrin, das sich in den meisten Organismen findet. Essentielle biologische Funktionen wie Atmung oder Redox-Katalyse werden erst durch Häm ermöglicht. Dabei bildet das Häm durch feste Anbindung an das Protein eine Einheit mit dem Protein. Ist Häm nicht permanent fixiert, kann es durch temporäre Bindung an spezifische Aminosäuresequenzen, die sogenannten hämregulatorischen Motive (HRMs), Vorgänge wie Genexpression steuern. Zur Erforschung der regulatorischen Funktion von Häm ist eine Kenntnis der entsprechenden HRMs, die in diesen Prozess involviert sind, erforderlich. Das Durchsuchen von Proteindatenbanken mit entsprechenden Kriterien förderte potentielle HRMs zu Tage. Kurze Peptide, die diese HRMs beinhalten, wurden synthetisiert und untersucht, um darunter mögliche Kandidaten für eine weiterführende Untersuchung auf Proteinebene zu identifizieren. Diese Vorauswahl auf Peptidebene ist notwendig, um die aufwendige Proteinsynthese auf vielversprechende Ziele zu beschränken. Weiter eignen sich kurze Peptide zur Identifizierung von Bindungsmotiven, da die Anzahl möglicher koordinierender Aminosäuren deutlich kleiner ist als in einem Protein. Diverse Analyseverfahren wie UV-Vis-, Resonanz-Raman-, NMR- oder EPR-Spektroskopie kamen zum Einsatz. Die vorliegende Arbeit soll mittels der EPR-Spektroskopie Einblicke in die Interaktion zwischen Hämin und Peptiden bzw. Proteinen mit potentiell HRM geben. Die EPR-Spektroskopie ermöglicht Informationen über den Spinzustand und die Koordinationssphäre des Eisens zu erhalten. Des Weiteren können die Bindungsstärke und -kinetik qualitativ bzw. quantitativ untersucht werden. Für kinetische Untersuchungen eignen sich das RFQ-Gerät und der Mischresonator. Diese Systeme ermöglichen Reaktionszeiten im Bereich von Millisekunden bis Sekunden aufzulösen. Während im RFQ Reaktionszeitpunkte eingefroren werden, ermöglicht der Mischresonator die direkte Beobachtung kinetischer Prozesse in Lösung. Zusammen mit den anderen Untersuchungsverfahren sollte ein möglichst detailliertes Bild über die Interaktion zwischen Hämin und den HRMs entstehen, mit dem Ziel weitere Einblicke in hämregulatorische Mechanismen zu erhalten.



## 2. Ergebnisse und Diskussion

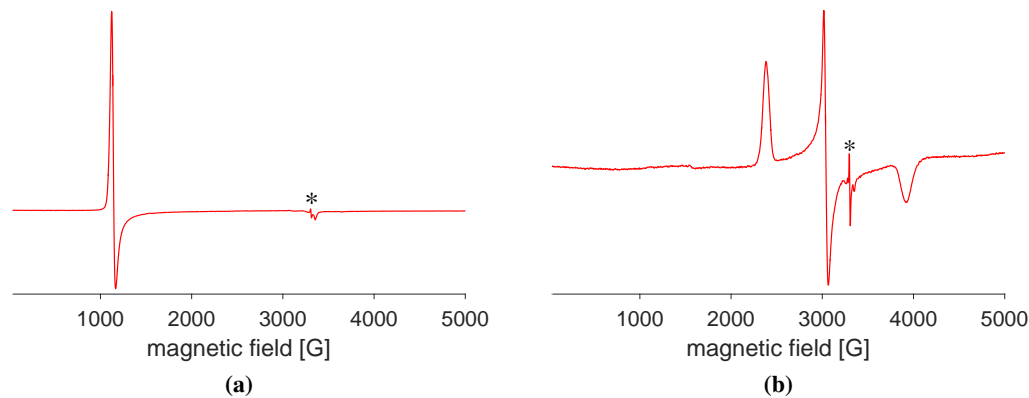
### 2.1. Interaktion in Hämin-Peptid-/Protein-Komplexen

#### 2.1.1. Handhabung von Hämin-Proben in der EPR-Spektroskopie

Beim Erstellen der Hämin-Proben und späterem Vermessen im EPR-Spektrometer waren manche spezifischen Aspekte zu beachten. Charakteristisch für diese Spin-Systeme ist ihre schnelle Relaxationszeit. Bei Raumtemperatur geben Hämin-Proben kein EPR-Signal. Mit der Ausnahme von Mn(II) gilt dies auch für alle anderen biologisch relevanten *high-spin*-Systeme. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  ist bei Raumtemperatur derart kurz und die EPR-Linie dementsprechend so stark verbreitert, dass sie unter die Detektionsgrenze fällt.<sup>[53]</sup> Durch Verringerung der Temperatur wird die Relaxationszeit verlangsamt. Für Hämin-Proben ist es üblich *cw* EPR-Spektren bei Temperaturen von 20 K oder sogar 10 K aufzunehmen. Das macht die Kühlung des Resonators mit flüssigem Helium nötig. Bei diesen Temperaturen liegen die Proben als gefrorene Lösung vor. Diesen Sachverhalt gilt es zu berücksichtigen, wenn Vergleiche mit anderen Spektroskopiemethoden, wie der UV-Vis-Spektroskopie, gezogen werden. Wie bereits weiter oben erwähnt, kann das Fe(III) des Hämins im *high-* oder *low-spin*-Zustand vorliegen. Wenn ein (axialer) Ligand, der beide Spinzustände induzieren kann, am Eisenzentrum bindet, können Mischungen von *high-* und *low-spin*-Zustand auftreten. Der *low-spin*-relaxiert langsamer als der *high-spin*-Zustand. Folglich kann das Verhältnis der Signalintensitäten durch die Temperatur beeinflusst werden. Somit kann bei höheren Temperaturen das Signal des *high-spin*-Zustands schon abgeklungen sein, während der *low-spin*-Zustand noch detektiert wird. Da die UV-Vis-Spektroskopie bei Raumtemperatur arbeitet, ist es möglich, dass mit der UV-Vis-Spektroskopie ein zur EPR-Spektroskopie abweichendes *high/low-spin*-Verhältnis bestimmt wird. Diese Diskrepanzen bedeuten nicht, dass eine von beiden Methoden weniger verlässliche Ergebnisse liefert. Vielmehr ist es eine notwendige Folge der entsprechenden Messbedingungen der jeweiligen Spektroskopieart.

Als Referenz-EPR-Spektren für *high-* oder *low-spin*-Zustand dienten u. a. die Lösung von Metmyoglobin ohne weitere Zusätze (Abb. 2.1a) sowie mit Zugabe von Natriumazid (Abb. 2.1b). Unter Zugabe von Natriumazid bildet sich der sechsfachkoordinierte *low-spin*-Komplex des Fe(III). Das für den *high-spin*-Zustand charakteristische axiale EPR-Spektrum mit  $g_{\perp} \approx 6$  und  $g_{\parallel} \approx 2$  ändert seine Form zu einem orthorhombischen EPR-Spektrum mit drei  $g$ -Werten, die bei  $g \approx 2$  auftreten ( $g_{xx} = 2,81$ ,  $g_{yy} = 2,21$  und  $g_{zz} = 1,71$ ).

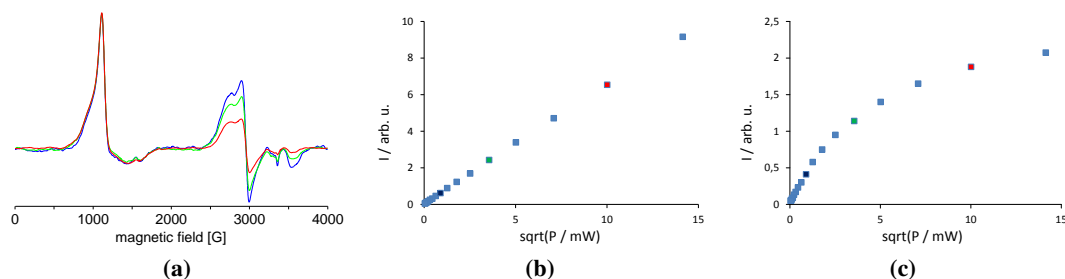
Die sehr schnelle Relaxationszeit der Hämine hatte weitere Einflüsse auf die EPR-Messungen. Der *low-spin*-Zustand des Fe(III) relaxiert langsamer als der *high-spin*-Zustand. Würden die



**Abb. 2.1.:** *cw* X-Band EPR-Spektren von (a) Metmyoglobin und (b) seinem Azido-Komplex als Beispielspektren für *high*- sowie *low-spin*-Zustand des Fe(III) im Häm. Der Stern markiert ein Hintergrundsignal.

Messparameter – im Besonderen die Mikrowellenleistung – für den *high-spin*-Zustand optimiert, würde der *low-spin*-Zustand gesättigt. Das hätte eine verminderte Signalintensität zur Folge. Somit würde der Anteil des *low-spin*-Zustands in einer Probe mit einer Mischung aus *high*- und *low-spin*-Zustand als zu klein bestimmt. Bei solchen Proben wurden EPR-Spektren bei verschiedenen Mikrowellenleistungen aufgenommen (Abb. 2.2a). Selbst mit maximaler Leistung ließ sich der *high-spin*-Zustand nicht sättigen. Dies ist eine Folge seiner sehr schnellen Relaxationszeit. Für optimale Bedingungen unter denen der *low-spin*-Zustand nicht sättigt, war deutlich weniger Leistung erforderlich (1 mW). Die entsprechende Mikrowellenleistung wird mit Hilfe eines sogenannten *power plots* bestimmt. In diesem Leistungsdiagramm (bzw. Sättigungsdiagramm) wird die Intensität der Proben bei verschiedenen Leistungen gemessen (Abb. 2.2b und Abb. 2.2c). Wenn die Intensität gegen die Wurzel der Leistung aufgetragen wird, ergibt sich ein linearer Zusammenhang, solange die Probe nicht sättigt ( $I \propto \sqrt{P}$ , Abb. 2.2b). Der Bereich der Sättigung wird erreicht, wenn die Kurve den linearen Bereich verlässt und abknickt. Somit ist die optimale, höchstmöglich verwendbare Leistung, aus dem Bereich zu wählen der noch linear verläuft. Bei höheren Leistungen können dem Spektrum keine verlässlichen quantitativen Aussagen mehr entnommen werden (Abb. 2.2c).

Die Signale der Hämine weisen recht hohe Linienbreiten auf. Am Beispiel der MetMb-Spektren aus Abbildung 2.1 bedeutet das eine *peak-to-peak*-Linienbreite von 42 G für das  $g_{\perp}$ -Signal im MetMb und 44 G für das  $g_{yy}$ -Signal des MetMb-N<sub>3</sub>-Komplexes. Das ermöglicht in Verbindung mit der hohen Relaxationsrate ( $T_1^{-1}$ ) weitere Parameter wie die Modulationsamplitude auf einen recht hohen Wert wie 5 G und die Zeitkonstante und Konvertierungszeit auf recht kurze Werte wie ca. 20 ms einzustellen (s. Abs. 4.1). Durch Erhöhung der Sensitivität sowie der eingestrahelten Leistung pro Zeit kann ein stärkeres Signal der Probe detektiert werden. Das ist auch besonders wegen der oftmals geringen Konzentrationen von biologisch relevanten Proben von Bedeutung. Einerseits ist die Herstellung von Peptiden und Proteinen oft nur in geringen Mengen möglich. Andererseits stellen hohe Konzentrationen des Hämins aufgrund seiner geringen Löslichkeit in



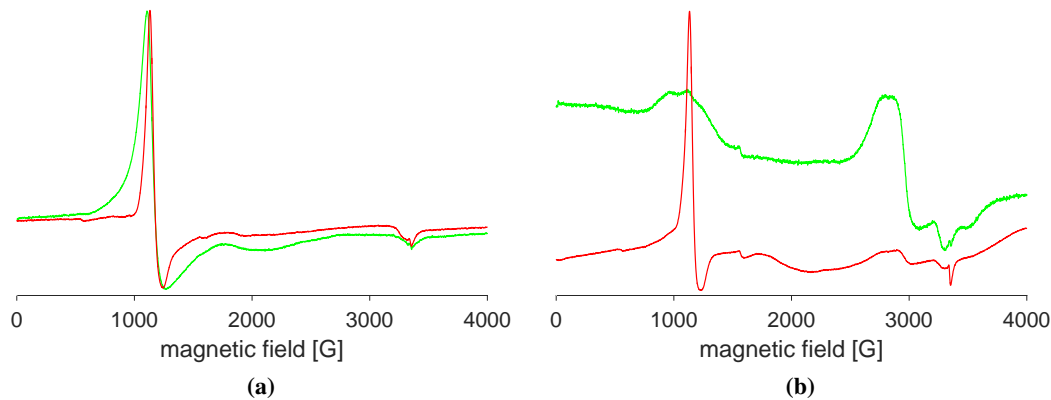
**Abb. 2.2.:** *cw* X-Band EPR-Spektren von (a) Komplex HB1 (rot: 100,2 mW; grün: 10,02 mW; blau: 1,002 mW, 5 Aufnahmen) und die entsprechenden *power plots* bei (b)  $g \approx 6,00$  und (c)  $g \approx 2,30$ .

neutraler Lösung ein Problem dar.

Zum Erstellen einer Häm-in-Lösung wird das Häm-in im Basischen gelöst. Die entstehende Lösung ist fast schwarz, da Häm-in einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten hat ( $\epsilon_{388 \text{ nm}} = 0,033 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \equiv 3,3 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  oder  $\epsilon_{398 \text{ nm}} \approx 12 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ <sup>[83]</sup>). Es lässt sich nicht mit bloßem Auge erkennen, ob alles Häm-in in Lösung gegangen ist. Im Weiteren wird durch die Zugabe von Pufferlösung verdünnt und der pH-Wert neutralisiert. Die Konzentration dieser verdünnten Häm-in-Lösung ist stets photometrisch zu kontrollieren. Häm-in kann bei neutralem pH-Wert allerdings nur auf eine maximale Konzentration von ca. 600  $\mu\text{M}$  gebracht werden. Im Falle der Peptide, die lyophilisiert (gefriergetrocknet) waren, konnte mit dem verwendeten Protokoll eine finale Konzentration der Häm-in-Peptid-Proben von 300  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Im Falle der Proteine wurde die Häm-in-Lösung mit einem entsprechenden Anteil der Proteinlösung gemischt. So sind in der Praxis nur recht moderate Konzentrationen von Fe(III), dem eigentlich zu detektieren Spin-System möglich. MetMb hingegen kann ohne weiteres millimolare Konzentration in seinen Lösungen aufweisen, wodurch ein deutlich intensiveres Signal detektierbar ist.

Beim Einfrieren von wässrigen Proben bilden sich Eiskristalle. Es liegen Bereiche vor, in denen die Moleküle eine enge, geordnete Struktur aufweisen. Diese Vorzugsrichtungen vergrößern die Wahrscheinlichkeit von Spin-Gitter-Relaxationspfaden und verkürzen die damit verbundene longitudinale Relaxationszeit  $T_1$ . Um die Relaxationszeit der Häm-in-Proben zu verlängern, wurde dem Phosphatpuffer Ethylenglykol zugesetzt, so dass das Ethylenglykol einen Anteil von 40 % ausmachte. Ethylenglykol ist ein Glasbildner, der beim Einfrieren wässriger Lösungen das Entstehen von Eiskristallen verhindert. Die so erhaltene gefrorene Lösung ist amorph, d. h. ohne kristalline Bereiche. In Abbildung 2.3a sind die *cw* X-Band EPR-Spektren der freien Häm-in-Lösung in Phosphatpuffer sowie Phosphatpuffer mit Zusatz von 40 % Ethylenglykol dargestellt. Die EPR-Linie für die Probe mit Ethylenglykolzusatz ist deutlich schmaler. Generell wird die Linienform durch Lorentz- und Gaußkurven beschrieben, wobei der Gaußanteil auf nicht aufgelöste Hyperfeinwechselwirkungen zurückzuführen ist. Üblicherweise liegt der Linienform eine Mischung aus Lorentz- und Gaußanteil zugrunde (Voigt).<sup>[84]</sup> Je höher die Temperatur ist, desto breiter die Lorentz-Verteilung. Die Breite der Lorentzlinie ist proportional zur reziproken Relaxationsrate

( $\Gamma_{\text{Lorentz}} \propto 1/\tau$ ). Bei der Beschreibung der EPR-Linie wird die Lorentz-Linienform als homogene und die Gauß-Linienform als die inhomogene Linienform bezeichnet. Inhomogen meint dabei, dass nicht alle Moleküle einer Probe dieselbe Konformation haben. Jedes Molekül zeigt kleinere strukturelle Abweichungen von der Gesamtheit. Diesem Sachverhalt wird mit der inhomogenen Linienform Rechnung getragen. Bei der Beschreibung der EPR-Linie mit Lorentz- und Gaußform wird also die strukturelle Verteilung aller Moleküle einer Probe durch die Gaußform wiedergegeben. Mit sinkender Temperatur wird die homogene Verteilung zunehmend schmaler und die Linienform entsprechend mehr und mehr durch die Gaußform ausgedrückt.<sup>[53]</sup>



**Abb. 2.3.:** *cw* X-Band EPR-Spektren in Phosphatpuffer (grün) und mit Zusatz 40 % Ethylenglykol (rot) für (a) die freie Häm-inlösung und (b) Komplex PY4.

Dementsprechend ist die Linienverbreiterung in der reinen Phosphatpuffer-Probe einerseits auf ihre schnellere Relaxationszeit zurückzuführen, da eine kürzere Relaxationszeit in einer größeren Linienbreite resultiert. Andererseits entstehen ohne Ethylenglykollzugabe, aufgrund der Bildung kristalliner Bereiche, verschiedene strukturell geordnete Segmente. Die Spektren dieser unterschiedlichen Anordnungen überlagern sich und führen zu einer verbreiterten Linie. Das Verlängern der Relaxationszeit war besonders im Hinblick auf nachfolgende Puls-EPR-Messungen von Bedeutung. Allerdings stellte sich im Rahmen der zuvor durchgeführten *cw* EPR-Untersuchungen heraus, dass die Spektren mit und ohne Zusatz von Ethylenglykol sich nicht nur in der Linienbreite unterschieden. Ebenso wurden unterschiedliche Verhältnisse von *high-* zu *low-spin*-Zustand bestimmt. Ferner war der Anteil des ungebundenen Hämins im Falle von Proben mit Ethylenglykollzusatz höher (Abb. 2.3b). Dies würde selbst bei einer qualitativen Einschätzung der Häm-inbindungsstärke der Peptide zu dramatischen Verfälschungen führen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden in der Erstellung der *cw* EPR-Proben auf den Zusatz von Ethylenglykol verzichtet. Des Weiteren wurde darüber eine bessere Vergleichbarkeit zu den anderen spektroskopischen Methoden, die keinen Ethylenglykollzusatz verwenden, erreicht. Darüber hinaus ist Ethylenglykol zellfremd und durch sein Wegfallen in den Proben konnten Bedingungen, die näher an der Zellphysiologie sind, geschaffen werden.



## 2.1.2. Interaktionen in Häm-in-Peptid-Komplexen

### Auswahl der Peptidsequenzen

Auf einer früheren Untersuchung aufbauend wurden einzelne Peptide (Tab. 2.1) für die EPR-Studien ausgewählt.<sup>[28,44–46]</sup> Konkret waren es 15 cystein- und je elf histidin- und tyrosinbasierte Peptide. Die Mehrheit der ausgewählten Peptide waren Nonapeptide, außer den 23mer Peptiden TK27 und TK29. In den einzelnen Peptidklassen (cystein-, histidin- und tyrosinbasiert) waren die entsprechenden klassenspezifischen Aminosäuren stets in der Mitte der Sequenz. Diesem Sachverhalt liegt die Annahme zugrunde, dass die zentrale Position sterisch begünstigt für eine Koordination mit dem Häm-in ist. Eine Ausnahme stellt TK11 dar, das das Peptid eines möglicherweise hämregulierten Proteins ist und ein Histidin in zentraler Position trägt. Es hat verglichen zu allen anderen cysteinbasierten Peptiden ein zum N-Terminus hin verschobenes Cystein. Bei TK27 handelt es sich um einen Sequenzausschnitt der Dipeptidyl-Peptidase 8 (DP8)<sup>[44]</sup> mit 23 Aminosäuren und wurde bereits in früheren Studien als starker Häm-binder erkannt. Jede Peptidklasse enthält eine Sequenz in der die zentrale koordinierende Aminosäure je vier Alaninreste zu jeder Seite trägt (für Cys-, His- und Tyr-Klasse sind das TK23, TK3 und TK18). Diese Peptide wurden als Kontrollen erstellt, um die Häm-bindungscharakteristika der koordinierenden Aminosäure alleine zu testen. Peptid AW4 ist mit TK23, bis auf ein Prolin in Position +1 relativ zum Cystein, identisch und galt als zusätzliche Kontrolle, die Häm-bindung zeigen sollte. Das CP-Motiv (s. Abs. 1.1.2 und 1.1.4) findet sich auch in den Peptiden APS2, TK27, PY5 und APS3 wieder. In mehreren biologischen Systemen wurde gezeigt, dass dieses CP-Motiv essentiell für die Koordination von Häm-in ist.<sup>[27,42,44]</sup> Die Peptide AW5 und PY4 enthalten ein invertiertes CP-Motiv. In jeder Klasse gibt es Vertreter, die neben der zentralen klassentypischen Aminosäure eine oder mehrere weitere koordinierende Aminosäuren tragen. Das sind für die Cysteinklasse TK16 (+ Tyr), HB8 (+ 2 Tyr), APS2 (+ Tyr), APS3 (+ His), PY4 (+ His + Cys) und HB1 (+ His); für die Histidinklasse HB51 (+ His), TK13 (+ Tyr), HB17 (+ His), HB20 (+ His + 2 Tyr), HB49 (+ Tyr + His) und TK7 (+ 2 His + 2 Tyr) und für die Tyrosinklasse TK15 (+ Tyr), TK14 (+ Tyr), NS6 (+ 2 His + Tyr) und TK29 (+ His). In allen Fällen war es das Ziel den Einfluss der angrenzenden Sequenz auf die Bindungseigenschaften zu untersuchen.

### EPR-basierte Bindungsstudien der Peptide

Um einen Einblick in die Bindungsmodi der verschiedenen Peptide zu erhalten, wurde *cw* X-Band EPR-Spektroskopie verwendet. Mit dieser Technik können Information über die Geometrie um das Eisen(III)ion und seinen Spinzustand sowie qualitative Information über die Bindungsstärke des Peptids erhalten werden.

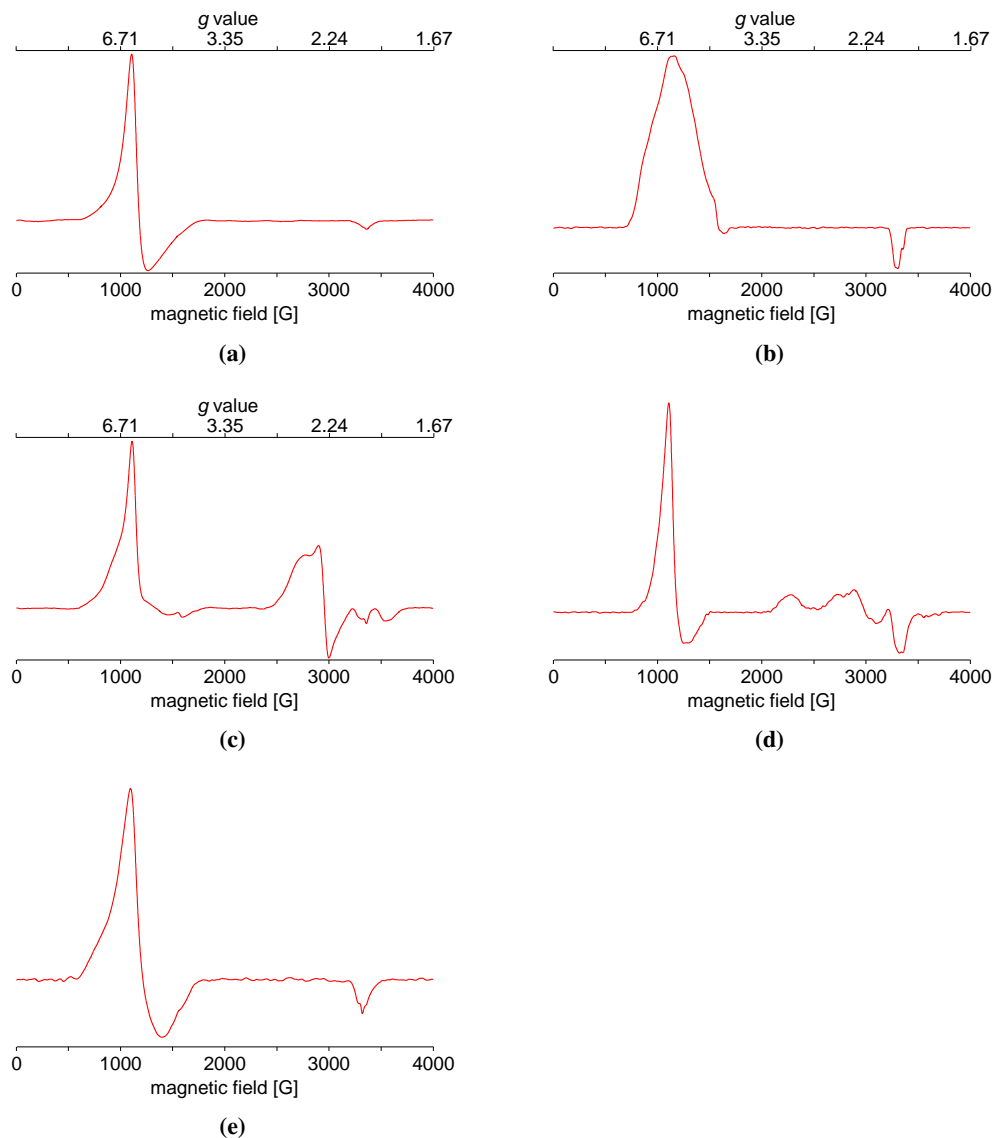
Das Eisenzentrum in Hämproteinen kann eine Vielzahl an Oxidations- und Spinzuständen einnehmen.<sup>[60]</sup> Das Fe(II) des Häm-in ist im *high-* und *low-spin*-Zustand EPR-inaktiv (EPR *silent*), d. h. dass es keine EPR-Spektren zeigt, solange nicht sehr hohe Mikrowellenfrequenzen und/oder Magnetfelder verwendet werden (s. Abs. 1.2). Eisen(II) im *high-spin* Zustand ( $S = 2$ ) hat vgl. mit dem *low-spin*-Zustand ( $S = 0$ ) zwar ungepaarte Elektronen, fällt aber mit seinem ganzzahl-

gen Spin unter die Nicht-Kramers-Zentren (*non-Kramers center*).<sup>[85]</sup> Deren Nullfeldaufspaltung (*zero field splitting*) ist allerdings so groß (für *high-spin* Fe(II)  $5\text{ cm}^{-1}$  bis  $20\text{ cm}^{-1}$ ), dass bei den üblicherweise verwendeten X-Bandfrequenzen ( $h\nu \approx 0,3\text{ cm}^{-1}$ ) keine EPR-Übergänge beobachtet werden können. Erlaubte EPR-Übergänge finden erst bei hohen Frequenzen und/oder Magnetfeldern statt. Aus diesem Grund sind Studien von *high-spin* Fe(II)-Systemen rar.<sup>[86]</sup> Alternativ können Resonatoren zum Einsatz kommen, die im Parallelmodus arbeiten. Dabei sind Mikrowellenmagnetfeld und statisches Magnetfeld parallel angeordnet. Dadurch ändert sich die Auswahlregel von üblicherweise  $\Delta m_s = \pm 1$  im senkrechten Modus zu  $\Delta m_s = 0$ .<sup>[87]</sup> Dementsprechend wurden die EPR-Untersuchungen nicht an Häm ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sondern Hämin ( $\text{Fe}^{3+}$ ) durchgeführt.

Fe(III) liegt im freien Hämin pentakoordiniert von den vier Stickstoffatomen des Porphyrinrings und einem Chloridliganden vor. Dies führt zu einem axialen EPR-Spektrum mit einem intensivem Signal für  $g_{\perp}$  bei  $\approx 6$  und einem schwachen Signal für  $g_{\parallel}$  bei  $\approx 2$  (Abb. 2.4a). Das ist charakteristisch für pentakoordiniertes dreiwertiges Eisen im *high-spin*-Zustand ( $S = 5/2$ ).<sup>[57,88]</sup> Bei Änderung der Koordinationssymmetrie des Komplexes von Penta- zu Hexakoordination, nimmt das Fe(III)-Ion den *low-spin*-Zustand ein ( $S = 1/2$ ), verbunden mit drei Signalen um  $g \approx 2$ , wenn der fünfte und sechste Ligand stark koordinierend sind.<sup>[30,89]</sup> Ist der sechste Ligand nur schwach koordinierend, bleibt der *high-spin*-Zustand erhalten. Bei sehr schwach koordinierenden Liganden und/oder besonderen Verzerrungen des Porphyringerüsts können auch gemischte (*admixed*,  $S = 5/2; 3/2$ ) oder intermediäre ( $S = 3/2$ ) Spinzustände hervorgerufen werden (s. Abs. 1.2). Da die Abweichungen vom reinen *high-spin*-Zustand, wenn überhaupt, nur sehr gering ausfielen, wurden diese Fälle bei der Kategorisierung der Hämin-Peptid/Protein-Proben nicht berücksichtigt.

Verglichen mit dem Spektrum des freien Hämins führte die Bindung der Peptide an das Hämin zu zweierlei Änderungen: Entweder das intensive  $g_{\perp}$ -Signal bei ca. 6 verbreitert sich oder starke Signale um  $g \approx 2$  treten zum Vorschein. Bei beiden prinzipiellen Änderungen nimmt die Intensität des relativ scharfen und intensiven Signals des freien Hämins bei  $g \approx 6$  ab. Beispiele für beide Fälle sind in Abbildung 2.4 zu sehen, während alle weiteren Spektren in Abb. 2.5–2.7 dargestellt sind (für Originaldaten s. Anh. A.1). Spektren, die eine Verbreiterung des Signals bei  $g \approx 6$  zeigen (Abb. 2.4b und e), werden konformationell heterogenen aber fünffach koordinierten Hämin-Peptid-Komplexen mit einem Spinzustand von  $S = 5/2$  zugeordnet. Die Heterogenität könnte durch die flexiblen Bindungsmodi der Hämin-Peptid-Komplexe hervorgerufen werden.<sup>[89]</sup> Fälle bei denen die Spektren Signale um  $g \approx 2$  aufweisen, wurden hexakoordinierten *low-spin*-Hämin-Peptid-Komplexen zugewiesen ( $S = 1/2$ ). Für einige der Komplexe wurden beide spektrale Änderungen beobachtet, was auf eine Koexistenz beider Hämin-Peptid-Geometrien, Penta- und Hexakoordination, und Spinzustände schließen lässt (Abb. 2.4c). Eine Verbreiterung des  $g_{\perp}$ -Signals zeigten die Komplexe TK23, APS6, AW4, TK27, PY5 und HB2 der Cysteinklasse sowie TK18, TK15, HB41, HB42, TK14, HB31, HB21, HB24 und HB28 der Tyrosinklasse.<sup>[62,89,90]</sup> In der Tyrosinklasse gab es mit NS6 und TK29 nur zwei Vertreter, die neben der Verbreiterung bei  $g \approx 6$  auch Signale um  $g \approx 2$  aufwiesen, was auf das gleichzeiti-

ge Vorliegen von penta- und hexakoordinierten Komplexen hindeutet. Die Histidinklasse führt mit TK13, NS4, HB12, HB20, HB49 und TK7 sechs Vertreter, die beide Spinzustände zeigen und mit HB51, TK12, NS1 und HB17 vier, die nur den *low-spin*-Zustand aufweisen. Dass bei histidinbasierten Peptiden eine Tendenz zur Hexakoordination besteht, ist nicht verwunderlich, da es sich bei Histidin um eine starke Base handelt. Dahingegen wiesen nur die tyrosinbasierten Peptide mit stärkerer Hämbindung auch Hexakoordination auf. Die restlichen Vertreter der Tyrosinklasse zeigen Pentakoordination.



**Abb. 2.4.:** cw X-Band EPR-Spektren von: (a) Freiem Häm ( $\nu = 9,3879$  GHz;  $g_{\perp} = 5,68$ ). (b) Häm-in-Peptid-Komplex PY5 ( $\nu = 9,3906$  GHz;  $g_{\perp} = 5,85$ ). (c) Häm-in-Peptid-Komplex HB1 ( $\nu = 9,3918$  GHz;  $g_{\perp} = 6,01$ ;  $g(\parallel s) = 2,43$ ;  $2,27$ ;  $1,90$ ). (d) Häm-in-Peptid-Komplex TK7 ( $\nu = 9,3884$  GHz;  $g_{\perp} = 5,64$ ;  $g(\parallel s) = 2,94$ ;  $2,25$ ;  $1,86$ ). (e) Häm-in-Peptid-Komplex TK14 ( $\nu = 9,3899$  GHz;  $g_{\perp} = 5,51$ ). Über den Spektren (a)–(c) ist zur Orientierung eine  $g$ -Wertskala eingefügt.

**Tab. 2.1.:** Aminosäuresequenzen der untersuchten cystein-, histidin und tyrosinbasierten Peptide.

Name <sup>a</sup>	Sequenz <sup>b</sup>									EPR <sup>c</sup>	UV-Vis <sup>d</sup>	Ursprung <sup>e</sup>
<i>Cysteinbasierte Peptide</i>												
TK23	A	A	A	A	C	A	A	A	A	schwach (hs)	n.b.	Kontrolle
TK16	R	D	Q	Y	C	S	P	T	K	schwach (hs/l <sub>s</sub> 1:3)	schwach	HTS
HB6	Q	K	G	V	C	Q	N	T	G	schwach (hs/l <sub>s</sub> 5:1)	interm	HTS
TK11	D	I	C	V	H	L	N	R	K	interm (hs/l <sub>s</sub> 1:1)	interm	hEAG1 (H. sapiens)
TK20	Q	F	S	Q	C	R	I	B	N	interm (hs/l <sub>s</sub> 5:1)	interm	HTS
APS6	S	E	G	G	C	P	L	I	L	interm/stark (hs)	interm	IL-36 α (H. sapiens)
AW4	A	A	A	A	C	P	A	A	A	stark (hs)	interm	Kontrolle
HB8	K	Q	K	K	C	Y	K	A	Y	stark (hs/l <sub>s</sub> 10:1)	interm	HTS
APS2	D	E	S	A	C	P	Y	V	M	stark (hs/l <sub>s</sub> 12:1)	interm	HRI (H. sapiens)
TK27 <sup>f</sup>	S	D	F	K	C	P	I	K	E	stark (hs)	interm/stark	DP8 (H. sapiens)
PY5	A	R	L	G	C	P	V	I	P	stark (hs)	interm/stark	FeoB (E. coli)
APS3	T	P	I	L	C	P	F	H	L	stark (hs/l <sub>s</sub> 5:1)	interm/stark	IRP2 (H. sapiens)
AW5	S	S	I	P	C	L	H	Y	K	stark (hs/l <sub>s</sub> 3:2)	interm/stark	DGCR8 (H. sapiens)
PY4	R	H	L	P	C	D	I	C	V	stark (hs/l <sub>s</sub> 1:2)	stark	GlpF (E. coli)
HB1	H	E	L	V	C	A	A	S	T	interm (hs/l <sub>s</sub> 1:3)	stark	Dps (P. gingivalis)
HB2	A	I	R	R	C	S	T	F	Q	interm (hs)	stark	STC1 (H. sapiens)
<i>Histidinbasierte Peptide</i>												
TK3	A	A	A	A	H	A	A	A	A	n. b.	n. b.	Kontrolle
HB51	H	R	K	E	H	F	E	A	F	schwach (l <sub>s</sub> )	bindet	Cat (E. coli)
TK12	V	F	K	E	H	P	A	F	R	n.b./schwach (l <sub>s</sub> )	bindet	hEAG1 (H. sapiens)
TK13	Y	N	E	H	H	W	H	B	A	interm (hs/l <sub>s</sub> 1:3)	bindet	HTS
NS1	F	K	E	A	H	K	N	V	R	n. b./schwach (l <sub>s</sub> )	bindet	IsdI (S. aureus)
NS4	T	V	E	I	H	D	L	F	F	schwach (hs/l <sub>s</sub> )	bindet	HrtR (L. lactis)
HB12	L	I	N	Q	H	A	T	S	F	schwach (hs/l <sub>s</sub> )	bindet	HTS
HB17	B	V	Q	L	H	K	H	S	G	n. b./schwach (l <sub>s</sub> )	interm	HTS
HB20	A	A	H	Y	H	T	Y	E	R	interm (hs/l <sub>s</sub> 2:1)	stark	HTS
HB49	F	K	Q	Y	H	H	E	L	I	interm (hs/l <sub>s</sub> 1:3)	stark	HlyC (E. coli)
TK7	H	H	Q	Y	H	T	Y	E	R	interm (hs/l <sub>s</sub> 1:3)	stark	HTS
<i>Tyrosinbasierte Peptide</i>												
TK18	A	A	A	A	Y	A	A	A	A	n.b./schwach (hs)	n.b.	Kontrolle
TK15	F	L	E	N	Y	L	Y	E	R	schwach (hs)	bindet	HTS
HB41	I	T	S	I	Y	N	G	A	Q	n.b./schwach (hs)	bindet	ChaN (C. jejuni)
HB42	L	R	A	V	Y	E	K	D	A	n.b./schwach (hs)	bindet	HTHP (S. pomeroyi)
TK14	W	Y	A	A	Y	T	K	P	S	interm (hs)	bindet	HTS
HB31	H	A	D	T	Y	F	G	W	R	schwach (hs)	bindet	HTS
HB21	W	E	L	D	Y	F	Q	W	K	schwach (hs)	bindet	HTS
HB24	D	N	F	R	Y	B	I	P	N	schwach (hs)	bindet	HTS
HB28	G	F	G	T	Y	S	W	H	E	schwach (hs)	schwach	HTS
NS6	K	P	F	K	Y	D	H	H	Y	interm/stark (hs/l <sub>s</sub> 1:10)	interm	isdC (S. aureus)
TK29 <sup>g</sup>	H	V	L	Y	Y	P	Q	K	P	interm/stark (hs/l <sub>s</sub> 1:5)	interm/stark	RPB2 (H. sapiens)

<sup>a</sup>Abkürzungen der Aminosäuresequenzen, die im Text verwendet werden.

<sup>b</sup>Sequenz des Peptides mit potentiell koordinierenden Aminosäuren unterstrichen. B – Norleucin

<sup>c</sup>Qualitative Einordnung der Bindungseigenschaften basierend auf den EPR-Ergebnissen und ihre Spin-Zustände (l<sub>s</sub> = low-spin, hs = high-spin)

<sup>d</sup>Qualitative Einordnung der Bindungseigenschaften basierend auf den UV-Vis-Ergebnissen.<sup>[28,44–46]</sup>

<sup>e</sup>Ursprung der Peptidsequenz: HTS – high throughput screening, hEAG1 – Human ether à-gogo K(+) channel 1, IL-36 α – Interleukin-36 α, HRI – Heme-regulated eIF2α kinase (HRI), DP8 – dipeptidyl peptidase 8, FeoB – ferrous iron import protein B, IRP2 – iron regulatory protein 2, DGCR8 – DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, GlpF – glycerol uptake facilitator protein F, Dps – DNA-binding protein from starved cells, STC1 – Stanniocalcin-1, Cat – chloramphenicol acetyltransferase, hEAG1 – human ether-à-go-go potassium channel 1, IsdI – iron-regulated surface determinant protein I, HrtR – heme-regulated transporter regulator, HlyC – Hemolysin-activating lysine-acyltransferase, ChaN – Campylobacter heme acquisition protein N, HTHP – hexameric tyrosine-coordinated heme protein, isdC – iron-regulated surface determinant protein C, RPB2 – DNA-directed RNA polymerase II subunit.

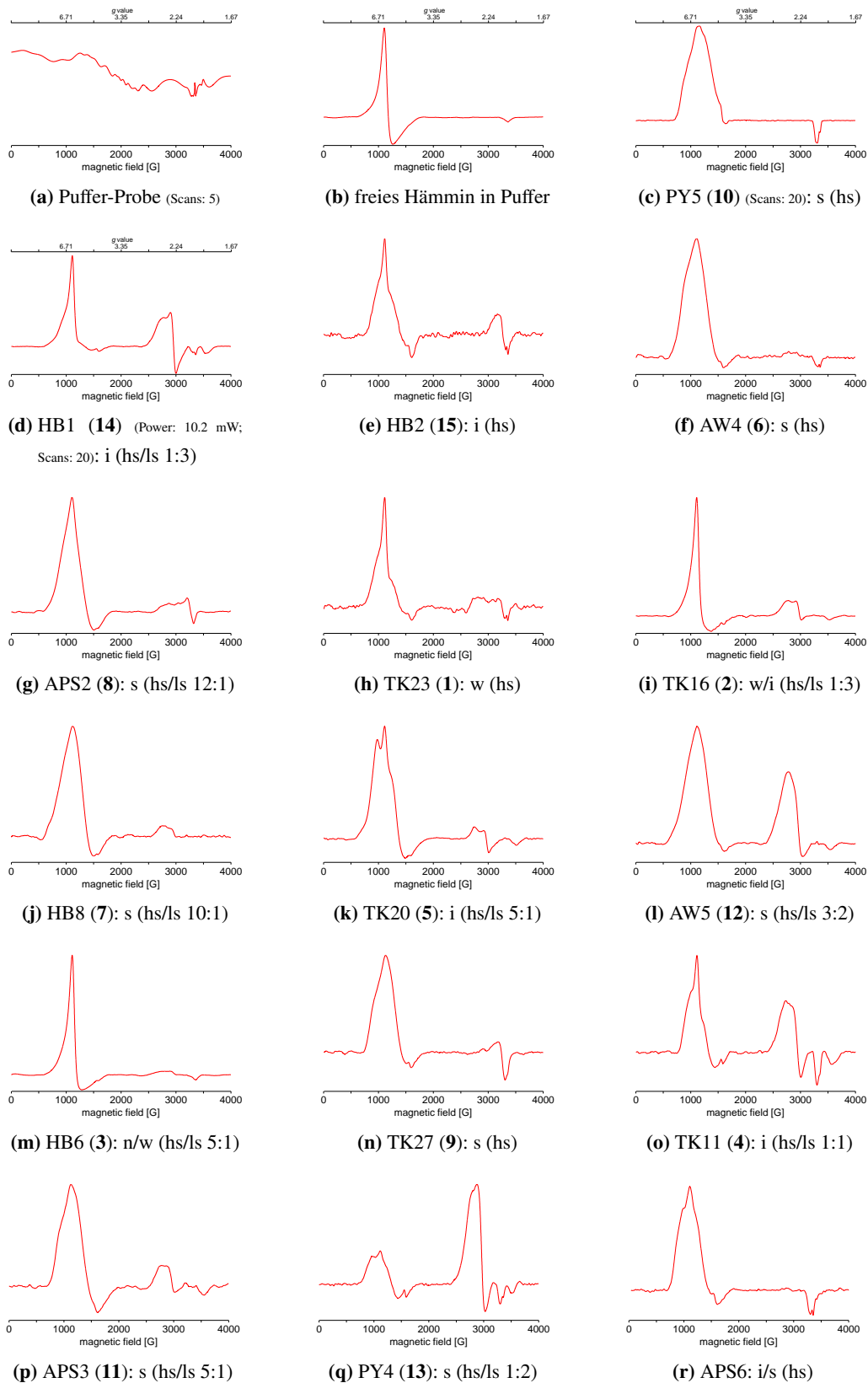
<sup>f</sup>Die vollständige Sequenz lautet SGGLPAPSDFKCPKPIKEEIAITSG.<sup>[35]</sup>

<sup>g</sup>Die vollständige Sequenz lautet VRMDTLAHVLYYPQKPLVTTRSM.

In Abhängigkeit des relativen Verhältnisses der Signalintensitäten von freiem zu gebundenem Hämin, wurde die Hämbindung der Peptide qualitativ als schwach (hauptsächlich freies Hämin; Cys: TK23, TK16, HB6; His: HB51, TK12, NS1, NS4, HB12, HB17; Tyr: TK18, TK15, HB41, HB42, TK14, HB31, HB21, HB24, HB28), intermediär (in etwa vergleichbare Intensitäten freien und gebundenen Hämins; Cys: TK11, TK20, HB1, HB2; His: TK13, HB20, HB49, TK7; Tyr: NS6, TK29) und stark (hauptsächlich gebundenes Hämin; Cys: AW4, HB8, APS2, TK27, PY5, APS3, AW5, PY4) klassifiziert. In dieser Einordnung ist das unterschiedliche Sättigungs-/Relaxationsverhalten von *high*- und *low-spin*-Zustand vernachlässigbar. Die Anzahl der schwach bindenden Peptide steigt von der Cystein- über die Histidin- zur Tyrosinklasse hin an und beläuft sich auf drei, sechs und acht Beispiele in der jeweiligen Klasse. Während in der Cysteinklasse die meisten Peptide starke Hämbinder sind, führen die Histidin- und Tyrosinklasse keine starken Binder, sondern in der Mehrzahl schwache Binder. Den Ergebnissen zufolge nimmt die Bindungsstärke von der Cystein- über die Histidin- hin zur Tyrosinklasse ab. Auch in der Literatur wird von Tyrosin als schwacher Ligand für Fe(III) berichtet.<sup>[58]</sup> Da gerade schwache Wechselwirkungen und damit verbunden wenig intensive Signale bei  $g \approx 6$  leicht durch das intensive Signal des freien Hämins verdeckt werden können, sollten die Interpretationen dieser schwachen Binder in Bezug auf den Anteil des gebundenen pentakoordinierten Hämins mit Vorsicht genossen werden. Dementsprechend könnte die Aussage, dass in der Histidinklasse Hexakoordination bevorzugt auftritt, auch zu einem bevorzugten Auftreten von Mischungen aus Penta- und Hexakoordination geändert werden.

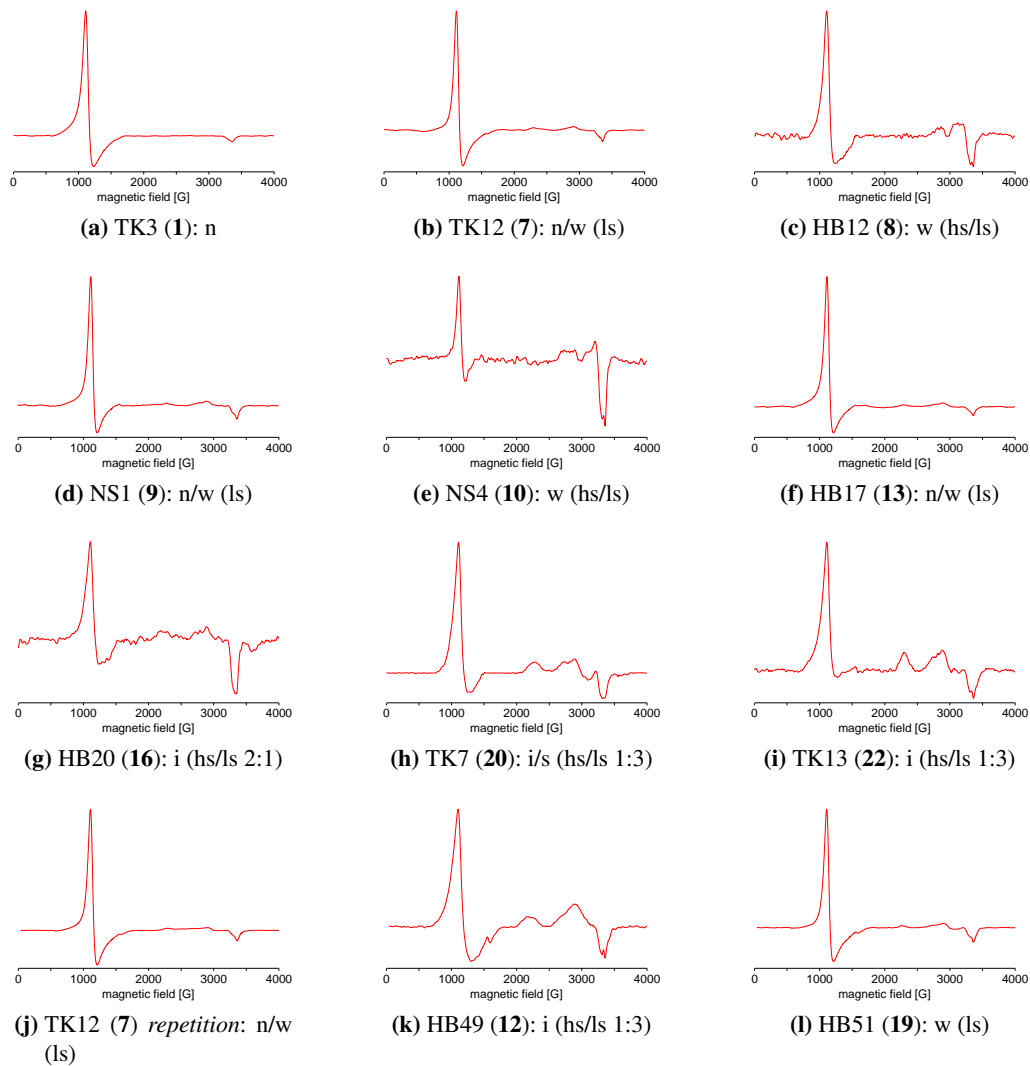
Die Bindungseigenschaften der Peptide wurden auch mit UV-Vis- und Resonanz-Raman-Spektroskopie untersucht.<sup>[28,44–46]</sup> Die Verhältnisse von *high*- zu *low-spin*-Zustand, die mittels der EPR-Spektroskopie ermittelt werden, können von anderen Methoden abweichen, da dieses Verhältnis temperaturabhängig ist.<sup>[58]</sup> Während die EPR-Ergebnisse bei kryogenen Temperaturen (10 K) erlangt werden, finden die UV-Vis-Messungen bei Raumtemperatur statt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und dass die Grenzen zwischen den Gruppen schwacher, intermediären und starker Binder fließend sind, stimmen die Ergebnisse der verschiedenen spektroskopischen Methoden in einem hohen Maße überein.

Das deutlichste Ergebnis der EPR-Studie ist, dass im Falle der Cysteinklasse intermediäre und schwache Binder weder ein CP- noch ein PC-Motiv aufweisen. Im Umkehrschluss scheint die Anwesenheit eines CP- oder PC-Motivs in der Aminosäuresequenz des Peptids ausreichend zu sein, um starke Hämbindungseigenschaften zu erzeugen. Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen früheren Studien.<sup>[32,44,46]</sup> Da allerdings die starken Binder HB8 und PY4 kein Prolin neben dem Cystein haben, ist dieses offensichtlich nicht strikt erforderlich. In diesen Fällen müssen die anderen Reste den Verlust des Prolins kompensieren.<sup>[44]</sup> Mögliche Gründe könnten die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den stark positiv geladenen Peptiden und den negativ geladenen Seitenketten des Porphyrinrings und/oder Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Tyrosin und dem Porphyrinringssystem mit der Folge von Stapelbildung sein.



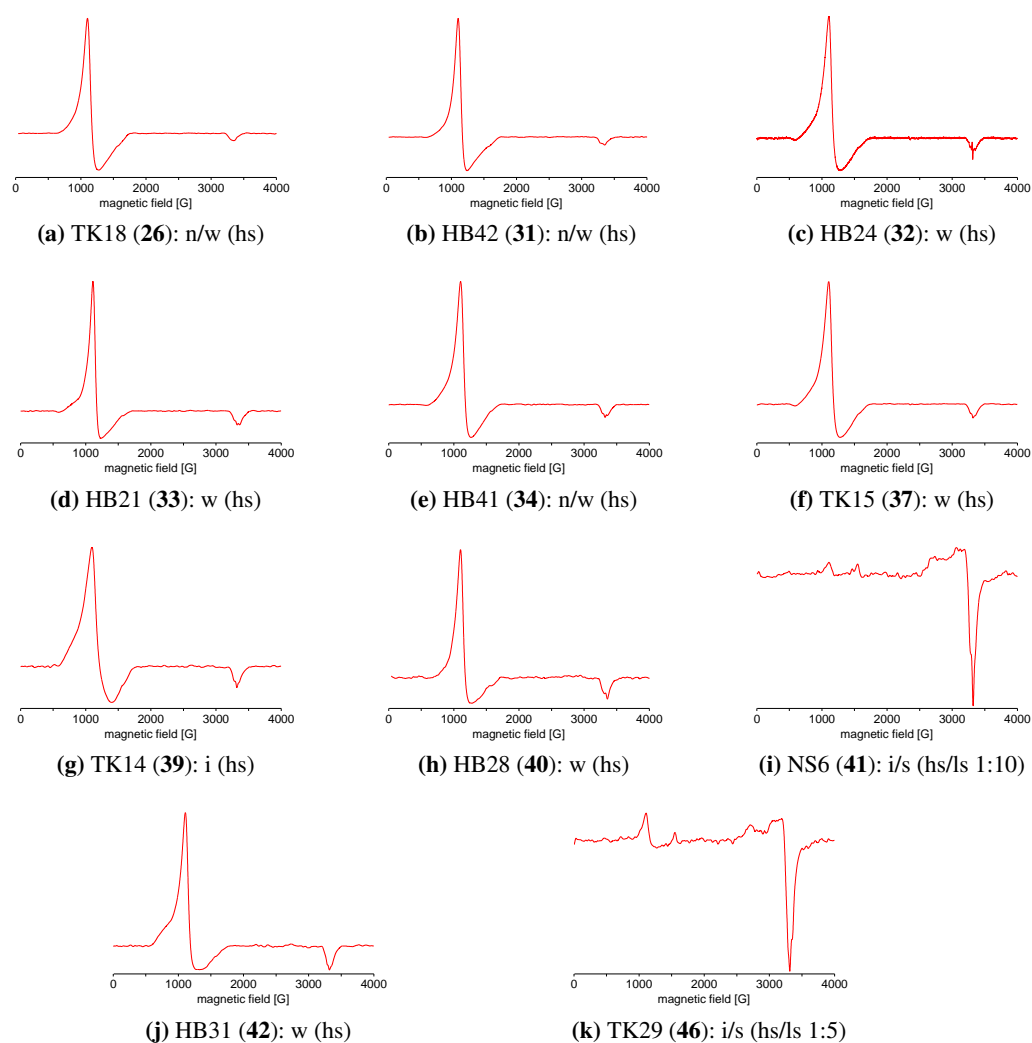
**Abb. 2.5.:** *cw* X-Band EPR-Spektren der Cystein-Proben (hintergrundkorrigiert). Die Bindungsstärke und der Spinzustand sind in der Bildunterschrift als none (n), weak (w), intermediate (i) und strong (s) sowie *high-spin* (hs) und *low-spin* (l<sub>s</sub>) vermerkt. Es sind zusätzlich zu den Buchstabenkürzeln der Peptide auch die Nummern der Peptide aus den entsprechenden Veröffentlichungen vermerkt.

Ein interessantes Ergebnis sind die Variationen in den Verhältnissen von *high-* zu *low-spin*-Zustand für die verschiedenen Peptide. Es ist bekannt, dass *low-spin*-Zustände durch Hexakoordination des Eisen(III)ions hervorgerufen werden.<sup>[10]</sup> Prinzipiell können die Peptide dies über zwei Wege erreichen: Entweder durch zwei koordinative Aminosäuren in einem Peptid oder durch die Bildung von Sandwich-Komplexen, in denen zwei Peptide ein Häminkmolekül von gegenüberliegenden Stellen binden.<sup>[46]</sup> Die starken Binder mit CP-Motiv weisen nur sehr kleine Anteile an *low-spin*-Signalen auf und scheinen entsprechend überwiegend fünffach koordiniert zu sein. Es ist anzumerken, dass 1:1-Verhältnisse aus Peptid und Häm in untersucht wurden und deshalb bei höheren Peptidkonzentrationen die Bildung von Sandwich-Komplexen durchaus auftreten kann. Vier Peptide der Cystein-, drei der Histidin- und zwei der Tyrosin-klassen zeigen recht hohe *low-spin*-Anteile, d. h. TK11, AW5, PY4 und HB1 mit 1:1, 3:2, 1:2 und 1:3; TK13, HB49 und TK7 mit 1:3, 1:3 und 1:3; NS6 und TK29 mit 1:10 und 1:5. Wenn die nicht-koordinierenden Aminosäuren nicht berücksichtigt werden, lassen sich die Sequenzen als  $xxCxHxxxx$ ,  $xxxxCxHYx$ ,  $xHxxCxxCx$  und  $HxxxCxxxx$ ;  $YxxHHxHxx$ ,  $xxxYHHxxx$  und  $HHxYHxYxx$ ; und  $xxxxYxHHY$  und  $HxxYYxxxx$  darstellen. Mit Ausnahme der ersten Sequenz fällt auf, dass die Aminosäuren, die in der Lage sind das Eisenzentrum zu koordinieren, zwei bis drei Aminosäuren Abstand zur zentralen Aminosäure haben. Dadurch wird den Peptiden zum Erreichen einer Hexakoordination entweder durch ein Biegen um das Häm in, wie es zuvor für HB1 gezeigt wurde,<sup>[46]</sup> oder die Bildung von Sandwich-Komplexen ermöglicht. Für den erstgenannten Fall scheint allerdings ein Mindestabstand von drei Aminosäuren zwischen den eisenkoordinierenden Aminosäuren nötig zu sein. Peptid TK11 hat nur eine Aminosäure Abstand zwischen seiner zentralen Aminosäure Histidin und der zusätzlichen koordinierenden Aminosäure Cystein. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass diese Aminosäuren beide Seiten des Porphyrinrings erreichen. Der hohe Anteil an *low-spin*-Signal scheint in diesem Fall durch die Bildung eines Sandwich-Komplexes begründet. Die Ursache für die starke Tendenz zur Bildung von Sandwich-Komplexen könnte in der Position des Cysteins nahe des Endes der Sequenz liegen, wodurch womöglich eine Komplexgeometrie, in der die zwei Peptide nicht gegeneinanderstoßen, entsteht. Unter Berücksichtigung des *g*-Tensors für das *low-spin*-Signal mit 2,52, 2,29 und 1,90 scheint nur einer der zwei axialen Liganden ein Histidin zu sein, da eine Bis(Histidin)-Koordinati-on zu einem weiter gefächerten *g*-Tensors mit 2,98, 2,29 und 1,53 führt.<sup>[30]</sup> So gibt der *g*-Tensor neben dem Spinzustand für *low-spin*-Komplexe zusätzlich über die Spreizung der *g*-Werte ( $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  und  $g_{zz}$ ) auch Auskunft über die axiale Koordination des Hämins (Tab. 2.2). Biochemisch relevante Heteroatome sind Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel (vgl. Tab 1.1). Eine Unterscheidung zwischen His/Cys- und Bis(Cys)-Koordinati-on nur anhand der *g*-Tensoren ist aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Werte schwierig. Dass es sich bei den Häm-in-Peptid-Komplexen von HB1 (HELVCAAST) und HB6 (QKGVQCQNTG) tatsächlich um His/Cys- bzw. Bis(Cys)-Koordinati-on handelt, wird zum einen durch NMR-Strukturen an Ga(III)-Häm-in-Peptid-Komplexen deutlich. Der zu NMR-Studien erforderliche Austausch von Fe(III) gegen Ga(III) wird auch in der Literatur beschrieben.<sup>[58,91]</sup> Gallium(III) ist aufgrund gleicher Ladung, ähnlicher Ionenradien und Koordinationschemie wie Eisen(III) geeignet,  $Fe^{3+}$  zu



**Abb. 2.6.:** *cw* X-Band EPR-Spektren der His-basierten Häm-peptid-Komplexe (hintergrund-korrigiert). Die Bindungsstärke und der Spinzustand sind in der Bildunterschrift als none (n), weak (w), intermediate (i) und strong (s) sowie *high-spin* (hs) und *low-spin* (ls) vermerkt. Es sind zusätzlich zu den Buchstabenkürzeln der Peptide auch die Nummern der Peptide aus den entsprechenden Veröffentlichungen vermerkt.





**Abb. 2.7.:** *cw* X-Band EPR-Spektren der Tyr-basierten Häm-in-Peptid-Komplexe (hintergrund-korrigiert). Die Bindungsstärke und der Spinzustand sind in der Bildunterschrift als none (n), weak (w), intermediate (i) und strong (s) sowie *high-spin* (hs) und *low-spin* (ls) vermerkt. Es sind zusätzlich zu den Buchstabenkürzeln der Peptide auch die Nummern der Peptide aus den entsprechenden Veröffentlichungen vermerkt.

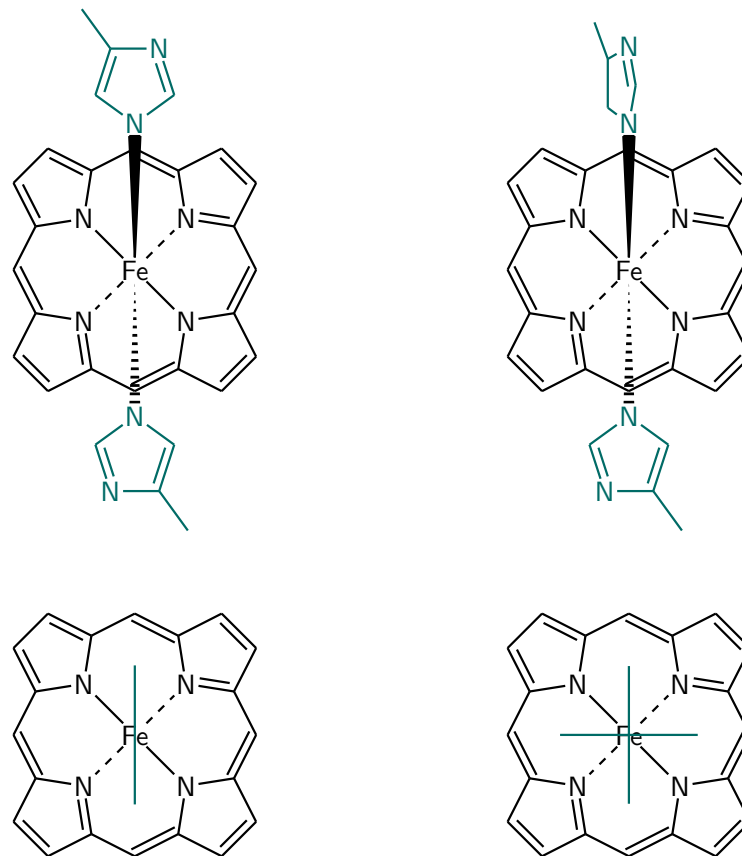
imitieren.<sup>[18,91]</sup> Die vorliegenden NMR-Strukturen zeigen, dass das HB1-Peptid sich um das Hämin legt und dadurch einen Pinzetten-Komplex mit Histidin und Cystein als koordinierenden Aminosäuren bildet (Abb. 2.9c). Das HB6-Peptid bildet einen Doppeldecker- bzw. Sandwich-Komplex, bei dem je zwei Peptide mit ihrem zentralen Cystein ein Ga(III) koordinieren.<sup>[46]</sup> Andererseits ergibt sich bei Betrachtung der Aminosäuresequenzen der Peptide die gefundene Koordination als die wahrscheinlichste. Für HB1 wäre z. B. auch ein Sandwich-Komplex mit Bis(Cystein)-Koordination möglich, dagegen sprechen aber einerseits, dass mit Histidin eine potenziell stark koordinierende Aminosäure vorliegt und andererseits der Chelat-Effekt, d. h. die Wahrscheinlichkeit für eine intramolekulare Koordination durch Histidin größer ist als für die intermolekulare Koordination durch das Cystein eines zweiten Peptids. Auch auf Proteinebene finden sich Fälle, in den eine Cys/His-Koordination des Hämins auftritt. Das Motiv CxxCH wurde für die BK-Kanäle (auch Slo-Kanäle genannt) als HRM entdeckt.<sup>[26,92,93]</sup> Wie bei HB1 trennen drei Aminosäurereste die häminligierenden Aminosäuren Cystein und Histidin. Erst kürzlich wurde in der Untereinheit SUR2A der ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle KATP das Motiv CxxHx<sub>16</sub>H als HRM identifiziert.<sup>[92]</sup> Allerdings befindet sich hier ein Abstand von mehr als drei Aminosäuren zwischen den koordinierenden Aminosäuren (Cys628 und His648), die mit Hämin eine Cys/His-Koordination eingehen. Größere Abstände finden sich auch für den Hormonrezeptor Rev-erbβ (Cys-384 und His-568). So scheint der Abstand von drei Aminosäurereste einen Minimalabstand zur Bildung von Pinzetten-Komplexen darzustellen, während auch größere Abstände möglich sind.

Das Peptid TK7 (HHQYHARVA) der Histidinklasse weist in Position –3 relativ zum zentralen Histidin ein zweites Histidin auf. Dieser Sequenzabstand sollte groß genug sein, um einen Pinzetten-Komplex zu ermöglichen.<sup>[35]</sup> Der *g*-Tensor seines *low-spin*-Signals ist mit 2,94, 2,25 und 1,86 typisch für die Histidinklasse (Abb. 2.9d). Die *low-spin*-Signale der anderen histidinbasierten Peptide zeigen auch einen solchen, vgl. mit der Cysteinklasse weiter aufgefächertem, *g*-Tensor, der auf das Vorliegen einer Bis(Histidin)-Koordination hinweist (Tab. 2.2). Dass das Peptid TK7 tatsächlich einen Pinzetten-Komplex mit Hämin bildet, lässt sich durch eine NMR-Struktur dieses Komplexes untermauern (Abb. 2.9e).<sup>[45]</sup> Die Sequenz von HB51 (HRKEHFEAF) trägt in Position –4 relativ zum zentralen Histidin ein zweites Histidin, womit ein genügend großer Sequenzabstand besteht, um auch in diesem Fall einen Pinzetten-Komplex zu ermöglichen. Alle anderen häminbindenden histidinbasierten Peptide erfüllen die Voraussetzung eines entsprechenden Sequenzabstandes nicht und sollten dementsprechend nur Sandwich-Komplexe bilden. Ein deutlich unterschiedlicher *g*-Tensor scheint zwischen Sandwich- und Pinzettenkomplex nicht zu bestehen. Allerdings wird in der Literatur ein merklicher Unterschied der *g*-Tensoren für die zwei möglichen Extrema paralleler und senkrechter Ausrichtung der Imidazolebenen zu einander berichtet (Tab. 2.2 und Abb. 2.8).<sup>[94,95]</sup>

**Tab. 2.2.:** Einfluss der axialen Liganden auf den g-Tensor des Fe(III) im Häm-in. Wenn ein Zustand mit aber auch ohne einen Liganden erreicht werden kann, ist dieser Ligand in Klammern gesetzt.

Koordinationssphäre		g-Tensor			Ursprung/Kommentar
5.	6.	$g_{xx}$	$g_{yy}$	$g_{zz}$	
<i>high-spin Komplexe (<math>S = 5/2</math>)</i>					
Cl <sup>-</sup>	(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	6,00	6,00	2,00	Fe(TPP)Cl <sup>[88]</sup> (planarer Porphyrinring)
Cl <sup>-</sup>	(H <sub>2</sub> O)	5,74	5,74	2,00	Häm-in
His	H <sub>2</sub> O	5,85	5,85	2,00	MetMb
His	H <sub>2</sub> O	5,98	5,87	2,00	MetMb <sup>[57]</sup>
His	H <sub>2</sub> O	5,80	5,80	2,00	HO-2 <sup>Ox</sup> /Häm-in-Komplex <sup>[39]</sup>
<i>low-spin Komplexe (<math>S = 1/2</math>)</i>					
His	OH <sup>-</sup>	2,67	2,21	1,80	HmuO/Häm-in-Komplex <sup>[90]</sup>
His	OH <sup>-</sup>	2,67	2,16	1,76	HO-1/Häm-in-Komplex <sup>[96]</sup>
His	OH <sup>-</sup>	2,87	2,26	1,63	HO-2 <sup>Ox</sup> /Häm-in-Komplex <sup>[39]</sup>
His	Cys	2,52	2,29	1,90	Irr/Häm-in-Komplex <sup>[30]</sup>
His	Cys	2,49	2,27	1,86	Rev-erb $\beta$ /Häm-in-Komplex <sup>[97]</sup>
His	Cys	2,47	2,27	1,87	IRP2/Häm-in-Komplex <sup>[98]</sup>
His	Cys	2,47	2,28	1,86	SUR2A(S615-L933)/Häm-in-Komplex <sup>[92]</sup>
His	Cys	2,41	2,26	1,91	HO-2 <sup>Red</sup> /Häm-in-Komplex <sup>[39]</sup>
His	Cys	2,43	2,27	1,90	HB1/Häm-in-Komplex <sup>[35,46]</sup>
Cys	Cys	2,48	2,27	1,89	HB6/Häm-in-Komplex <sup>[35,46]</sup>
Cys	Cys	2,50	2,27	1,89	P450/CH <sub>3</sub> SCH <sub>3</sub> -Komplex <sup>[99]</sup>
Cys	Cys	2,61	2,27	1,83	DGCR8/Häm-in-Komplex <sup>[100,101]</sup>
His	His	2,98	2,29	1,53	Irr/Häm-in-Komplex <sup>[30]</sup>
His	His	2,96	2,30	1,41	Ebenen der axialen Liganden parallel <sup>a</sup> und planarer Porphyrinring <sup>[94,95]</sup>
His	His	3,32	1,91	0,56	Ebenen der axialen Liganden senkrecht <sup>a</sup> und geraffter Porphyrinring <sup>[94,95]</sup>

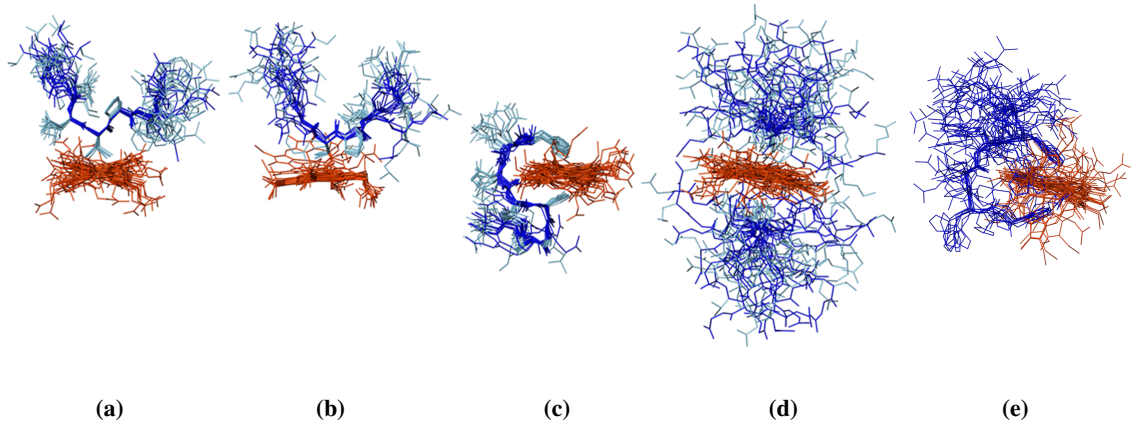
<sup>a</sup>in beiden Fällen stehen die Ebenen der Ringe der Liganden senkrecht zur Ebene des Porphyrinrings



**Abb. 2.8.:** Schematische Darstellung der verschiedenen Szenarien bei Bis(Histidin)-Koordination (Histidine in dunkelgrün dargestellt). Links ist die parallele und rechts die senkrechte Ausrichtung der Ebenen der axialen Liganden gezeigt. Im unteren Teil der Darstellung befinden sich die Draufsichten.

Im Falle der Tyrosinklasse mit zwei Vertretern (NS6 und TK29), die Hexakoordination zeigen, hat das Peptid TK29 (HVLYYYPQKP) ein Histidin in Position  $-3$  und sollte damit in der Lage sein, einen Pinzetten-Komplex zu bilden. Für NS6 (KPFKYDHHY) sollte dies, aufgrund des kurzen Abstandes von nur zwei Aminosäureresten zwischen der zentralen Position und dem am weitesten C-terminalen Histidin, nicht möglich sein. Folglich scheint ein Sandwich-Komplex für NS6 wahrscheinlich zu sein. Tatsächlich wird dies durch eine NMR-Struktur belegt.<sup>[45]</sup>

Abschließend zeigen die EPR-Ergebnisse, dass die Peptidsequenz einen spezifischen Spin-zustand des Häms hervorrufen kann. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in der räumlichen Struktur eines Proteins, Seitenketten, die nicht Teil des HRM sind, als zusätzliche Liganden fungieren. Dementsprechend muss, wenn das HRMs eines Peptides z. B. einen *high-spin*-Zustand hervorruft, dies für das Protein, das dieses HRM beinhaltet, überprüft werden.



**Abb. 2.9.:** NMR-Strukturen der Hämin-Peptid-Komplexe von (a) APS3, (b) APS6, (c) HB1, (d) HB6 und (e) TK7.<sup>[45,46]</sup>

### 2.1.3. Interaktionen in Hämin-Protein-Komplexen

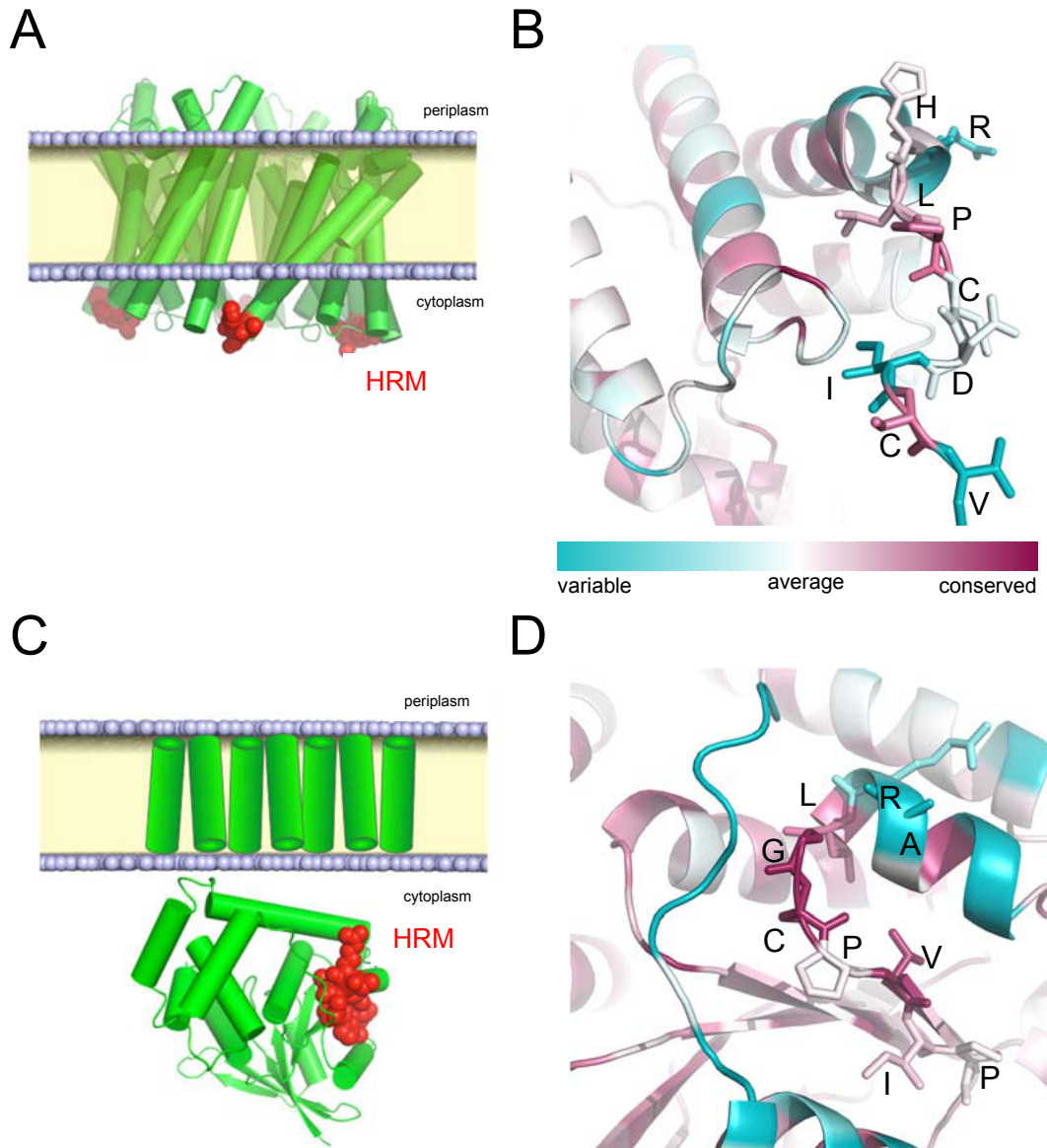
#### Expression von FeoB und GlpF, zwei Proteine mit potentiellen HRM

Um zu untersuchen, ob die EPR-Ergebnisse der Peptide auf die Proteinebene übertragbar sind, wurden zwei unterschiedliche Proteine mit je einem cysteinbasierten HRM aus Tabelle 2.1 exprimiert und aufgereinigt. Die Auswahl fiel auf die Proteine FeoB und GlpF, da ihre Expression und Aufreinigung zuvor berichtet wurden<sup>[102,103]</sup> und die HRMs in beiden Proteinen starke Binder auf der Peptidebene sind<sup>[44,46]</sup> (s. Abs. 2.1.2).

Das *glycerol uptake facilitator* Protein (GlpF) aus *E. coli* ist ein Transmembrankanale in der inneren Membran von *E. coli* und befördert kleine Moleküle wie Harnstoff, Glycin, DL-Glycerinaldehyd und Glycerin durch die Membran.<sup>[49]</sup> Es gibt allerdings keinen Bezug der Funktion zu Häm. Die Struktur von *E. coli* GlpF wurde in Jahr 2000 mit einer Auflösung von 2,2 Å gelöst (Abb. 2.10b)<sup>[102]</sup> und brachte zum Vorschein, dass das HRM (RHLPCDICV; Peptid PY4) am äußersten C-Terminus des Proteins liegt. Durch Analyse mit dem CONSURF-Server (<http://consurf.tau.ac.il>) zeigte sich, dass das Motiv in anderen Homologen des Proteins nicht erhalten ist (Abb. 2.10b). GlpF wurde geklont und in voller Länge aus *E. coli* BL21 mit einer Ausbeute von 1 mg/L bis 2 mg/L Bakterienkultur exprimiert.

FeoB schien ein besonders interessantes Ziel zu sein, da es ein Eisen(II)ionentransportprotein ist, das sich in vielen pathogenen und nicht pathogenen Bakterien wie z. B. *E. coli* oder *Vibrio cholerae* findet.<sup>[47,48]</sup> Das Protein hat eine  $\alpha$ -helikale Transmembran- (TM) Domäne mit sieben prognostizierten TM-Helices und einer löslichen Domäne, deren Kristallstruktur bekannt ist (Abb. 2.10c). Diese Domäne ähnelt sehr stark denen eukaryotischer GTPase-Proteine und soll die Aktivität des Transporters regulieren.<sup>[48]</sup> Sie enthält auch das potentielle HRM (ARLGCPVIP; Peptid PY5),<sup>[28]</sup> das sich an der molekularen Oberfläche befindet (Abb. 2.10a, rote Kugeln), so dass Häm an dieser Stelle prinzipiell binden kann (Abb. 2.10c, d). Die Thiolgruppe des Cysteinrests zeigt von der Oberfläche weg (Abb. 2.10d), so dass kleine Konformationsänderungen notwendig sind, um das HRM komplett freizulegen. Eine Analyse der Konservierung des poten-

tiellen HRM mit dem CONSERF-Server ergab, dass das Motiv recht gut in anderen Homologen erhalten ist (Abb. 2.10d). Die lösliche Domäne des Proteins wurde durch Einführung eines STOP-Kodons an Position 274 des *feoB*-Gens von *E. coli* BL21 exprimiert. Die lösliche N-terminale Domäne von FeoB wird üblicherweise „NFeoB“ genannt und das zu dieser Untersuchung verwendete Konstrukt wird als NFeoB<sup>1-273</sup> bezeichnet. Das Protein konnte mit guten Ausbeuten exprimiert werden (10 mg/mL Bakterienkultur).



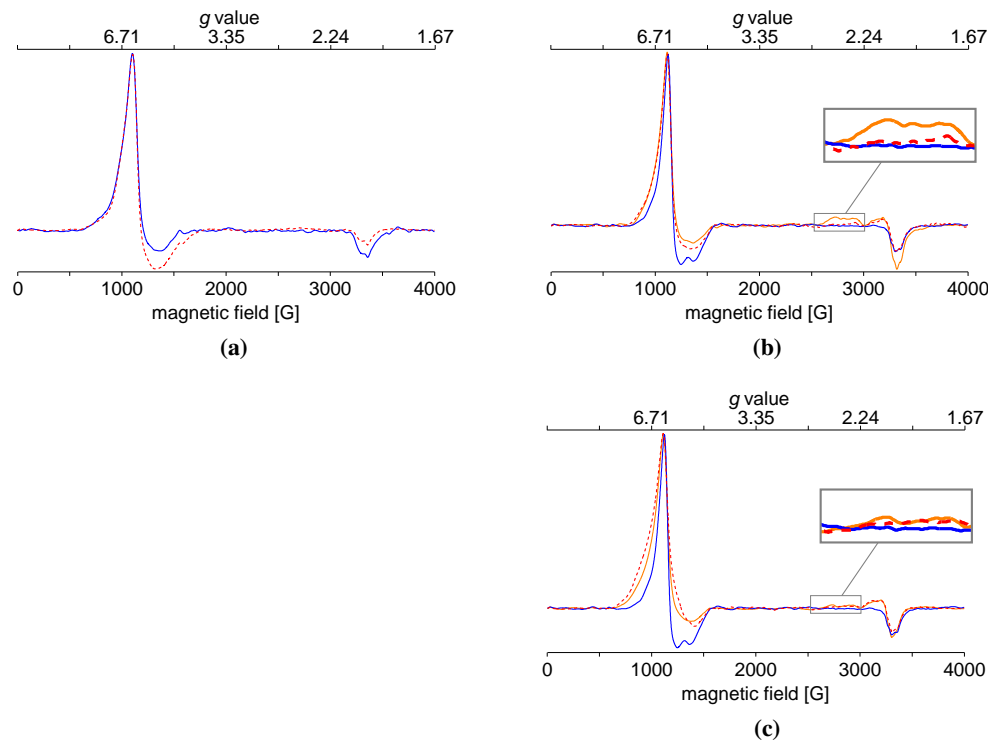
**Abb. 2.10.:** Strukturmodelle von (a) GlpF und (c) FeoB. Die ungefähre der Lage der inneren Membran ist gekennzeichnet. Die roten Bereiche markieren die potentiellen HRMs. Vergrößerungen der HRMs als Stabmodelle mit den Namen der Reste in (c) GlpF und (d) FeoB sind dargestellt. Das HRM in GlpF ist modelliert, da es in der Röntgenstruktur nicht komplett aufgelöst ist. Der Farbbalken zeigt die Konservierung der Reste an. Die Konservierungsergebnisse wurden mit dem CONSERF-Server (<http://consurf.tau.ac.il>,<sup>[34]</sup>) errechnet.<sup>[35]</sup>

### EPR- und UV-Vis-basierte Bindungsstudien von GlpF und NFeoB<sup>1-273</sup>

Bei der ersten untersuchten Proteinprobe handelte es sich um GlpF. Wie oben erwähnt beinhaltet dieses Protein PY4 als mögliches HRM. Für das entsprechende Peptid wurde starke Hämbindung mit *high-* sowie *low-spin*-Zustand beobachtet (Tab. 2.1, Anh. A.1). Interessanterweise zeigten die GlpF-Proben im selben Konzentrationsbereich (Protein/Häm 1:1) kein solches Verhalten. Weder ein *low-spin*-Signal, noch eine Verbreiterung des  $g_{\perp}$ -Signals waren zu beobachten (Abb. 2.11a). Bei einer Interaktion mit einem oder der Inkorporation in ein Protein sind Abweichungen des Hämins von der tetragonalen Symmetrie, die es als freies Häm in hat, zu erwarten. Bei Inkorporation in ein Protein ist eine solche Änderung auf geometrische Einschränkungen und Vorgaben der Bindungstasche zurückzuführen. Dass GlpF nicht durch Häm reguliert zu sein scheint, ist angesichts der Funktion des Proteins als Transporter von u. a. Glycerin nachvollziehbar.

Als nächstes wurde das FeoB-Protein untersucht. Das potentielle HRM in FeoB entspricht PY5, das ein starkes Hämbindungsverhalten und ausschließlich einen *high-spin*-Zustand aufwies. Die EPR-Messungen wurden an der löslichen Domäne von FeoB (NFeoB<sup>1-273</sup>) durchgeführt. Wie oben für GlpF wurde zuerst ein 1:1-Verhältnis von NFeoB<sup>1-273</sup> zu Häm untersucht. Diesmal zeigte sich eine leichte Verbreiterung des  $g_{\perp}$ -Signals (Abb. 2.11b). Eine Erhöhung der Proteinkonzentration, um ein 4:1-Verhältnis von NFeoB<sup>1-273</sup>/Häm zu erreichen, führte zu einer ausgeprägten Verbreiterung des  $g_{\perp}$ -Signals (Abb. 2.11c). Wenn auch weniger ausgeprägt, entspricht dies dem Effekt, der für den PY5-Häm-Komplex beobachtet wurde. Um sicherzustellen, dass Häm tatsächlich an der vermuteten HRM-Sequenz bindet, wurde die Punktmutation NFeoB<sup>1-273</sup> C143A kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Diese Mutation ist dadurch begründet, dass der Austausch des zentralen Cysteins gegen Alanin die Koordination des Hämins unterbinden sollte. Die Mutante verhielt sich während der Aufreinigung identisch wie der Wildtyp und die CD-Spektren der Mutante und des Wildtyps waren ununterscheidbar. Deshalb kann die Annahme, dass die Mutation die Gesamtstruktur des Proteins nicht verändert hat, als gesichert gelten. Die EPR-Messungen des mutierten NFeoB<sup>1-273</sup>-Proteins ergaben immer noch eine Verbreiterung  $g_{\perp}$ -Signals, die aber weniger ausgeprägt als im Wildtyp ist (Abb. 2.11c). Da diese Bindung nun nicht über das Cystein des HRMs erfolgen konnte, muss es eine weitere Bindungsstelle geben, an der das Häm fünfmal koordiniert vorliegt. Interessanterweise weisen alle NFeoB<sup>1-273</sup>-Spektren ein schwaches Signal bei  $g \approx 2$  auf, das für PY5 nicht zu beobachten war. Ein Auftreten von Signalen in diesem Feldbereich des Spektrums deutet auf sechsfach koordiniertes Häm hin. Folglich lässt sich das Signal als hexakoordinierte Häminspezies interpretieren. Dies könnte auf unspezifische Bindung des Hämins an einer anderen Stelle im FeoB hindeuten.

Um die EPR-Ergebnisse zu unterfüttern, wurde UV-Vis-Spektroskopie als orthogonale Methode eingesetzt. Das UV-Vis-Spektrum von Häm besitzt ein charakteristisches Maximum der „Soret-Bande“ zwischen 350 nm und 440 nm, das empfindlich gegenüber der molekularen Umgebung des Moleküls ist.<sup>[30,44,46]</sup> Aus diesem Grund wurde UV-Vis-Spektroskopie oft zur Analyse der Häm-Ligand-Wechselwirkung angewendet. Bei solchen Experimenten wird üblicher-



**Abb. 2.11.:** *cw* X-Band EPR-Spektren von: (a) Häm-GlpF-Komplex im 1:1-Verhältnis (MW-Leistung: 100,2 mW;  $g_{\perp} = 5,70$ ). Häm-NFeoB<sup>1-273</sup>-Komplexe (MW-Leistung: 100,2 mW;  $g_{\perp} = 5,58$ ) im Verhältnis (b) 1:1 und (c) 1:4. Rot, gestrichelt: Wildtyp; Orange: C143A; Blau: freie Häm-lösung. Die Vergrößerung zeigt den Beitrag des *low-spin*-Zustandes.

weise Häm als Ligand zu z. B. einer Protein- oder Peptidlösung titriert. Das funktioniert Be-  
 richten zufolge gut für starke Wechselwirkungen.<sup>[34,104-106]</sup> Um auch bei schwachen Wechselwir-  
 kungen Sättigungsbedingungen zu erreichen, bedarf es hoher Häminkonzentrationen. Wegen des  
 hohen Extinktionskoeffizienten des Hämins ( $5,84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ist dies experimentell nicht  
 machbar.<sup>[107]</sup> Deswegen wurde hier eine Untersuchung entwickelt, bei der die Häminkonzentra-  
 tion konstant (100  $\mu\text{M}$ ) gehalten und mit variierenden Proteinkonzentrationen (15 nM–500  $\mu\text{M}$ )  
 titriert wird. Auf diese Weise konnten hohe Überschüsse des Proteinliganden verwendet wer-  
 den. Ein Nanodrop-Spektrometer wurde eingesetzt, so dass nur relativ kleine Menge des Pro-  
 teins ( $\approx 2 \text{ mg}$ ) für eine Untersuchung erforderlich waren. Für jede Proteinkonzentration wur-  
 de ein Spektrum aufgenommen und davon ein Referenzspektrum (nur Häm) abgezogen, um  
 ein Differenzspektrum zu erhalten. Für den NFeoB<sup>1-273</sup>-Wildtyp ergaben sich zwei Signale bei  
 374 nm und 413 nm in den Differenzspektren (Abb. 2.12a). Interessanterweise weist das Pro-  
 tein Irr (*iron response regulator*) ein ähnliches UV-Vis-Verhalten auf, wenn es mit Häm titriert  
 wird.<sup>[30]</sup> Die Anpassung der Soret-Bande mit zwei Gaußkurven legte offen, dass sich nur  
 das Signal bei 374 nm während der Titration ändert. Dementsprechend wurde das Signal bei  
 374 nm zur Verfolgung der NFeoB<sup>1-273</sup>-Häm-Wechselwirkung mittels Auftragung von  $\Delta A_{374}$   
 gegen die NFeoB<sup>1-273</sup>-Konzentration genutzt (Abb. 2.12b). Die Bindungsdaten wurden mit ei-

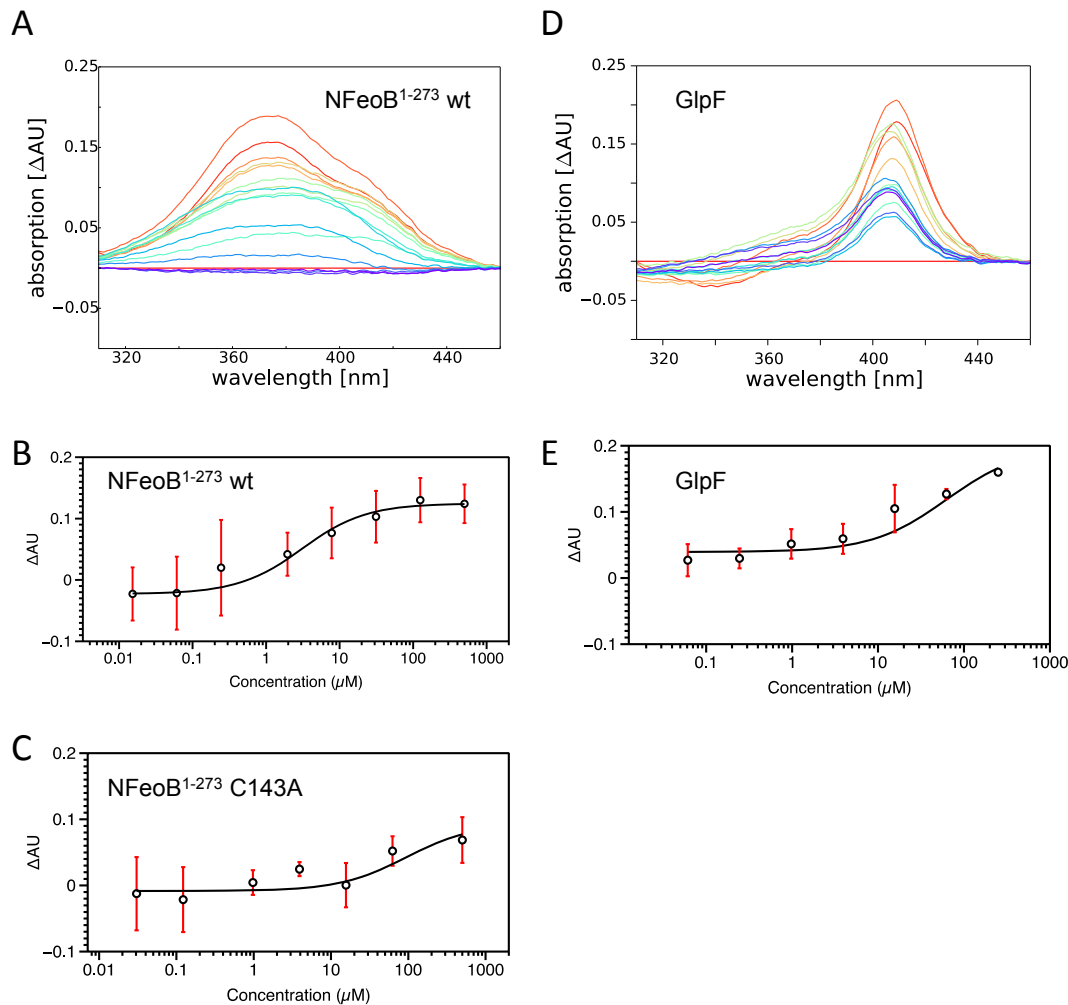


ner Langmuir-Gleichung angepasst, was zu einem  $K_D$  von  $\approx 2 \mu\text{M}$  für den NFeoB<sup>1-273</sup>-Wildtyp führt. Das Experiment wurde mit der Mutante C143A wiederholt. Tatsächlich wurde für die Mutante ein merklich erhöhter  $K_D$  von  $>66 \mu\text{M}$  bestimmt (Abb. 2.12c). Es gilt dabei zu berücksichtigen, dass die Bindungskurve der Mutante nicht sättigt und der  $K_D$  deshalb als zu gering bestimmt wird. Zur Analyse der statistischen Aussagekraft der  $K_D$ -Differenz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Als Resultat ergab sich einen p-Wert von  $<0,01$  für NFeoB w. t. vs. NFeoB C143A. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Unterschied in den  $K_D$ -Werten zufällig zu Stande kommt, bei unter 1 %. Diesem Ergebnis zufolge ist die  $K_D$ -Differenz statistisch relevant.

Dasselbe Experiment wurde mit dem Volllänge-GlpF durchgeführt. Durch Titration mit GlpF nahm nur die Absorption bei 413 nm zu (Abb. 2.12d). In diesem Fall ist die Bindungskurve bei  $500 \mu\text{M}$  nicht in Sättigung (Abb. 2.12b) und der  $K_D$ -Wert kann nicht bestimmt werden, ist aber klar größer als  $100 \mu\text{M}$  (Abb. 2.12e). Aufgrund der relativ geringen Expressionsniveaus dieses Membranproteins konnten keine höheren Konzentrationen in der UV-Vis-Untersuchung verwendet werden.

Schwache Wechselwirkungen zwischen Häm-in und GlpF wurden mittels UV-Vis-Spektroskopie festgestellt. Keine Anzeichen einer Wechselwirkung ließen sich durch cw EPR-Spektroskopie bei einem 1:1-Verhältnis von GlpF und Häm-in (höhere GlpF-Anteile waren experimentell nicht machbar) messen. Für das zweite Protein, NFeoB<sup>1-273</sup>, wiesen sowohl EPR- als auch UV-Vis-Spektroskopie auf eine Wechselwirkung mit Häm-in hin (Abb. 2.11 und Abb. 2.12). Allerdings ist diese Wechselwirkung schwach und sehr hohe Proteinkonzentrationen wurden im Rahmen der Bindungsstudie erforderlich. Die Mutation des zentralen Cysteins der potentiellen HRM-Sequenz führte zu einer erheblichen Schwächung der Häm-in-Protein-Wechselwirkung (Abb. 2.11 und Abb. 2.12). Folglich tritt tatsächlich eine spezifische Wechselwirkung zwischen der HRM-Sequenz von NFeoB und Häm-in auf. Sicherlich sind weitere Experimente zum Beweis einer funktionellen Relevanz der Häm-in-FeoB-Wechselwirkung von Nöten. Beispielsweise wäre es von Interesse zu untersuchen, ob die Zugabe von Häm ein verändertes Verhalten des Kanals in einer Transportstudie zur Folge hat. Die Regulation von FeoB durch Häm scheint aus funktioneller Sichtweise sinnvoll und tatsächlich wurde die Regulation durch sein Substrat Fe(II) bereits vorgeschlagen.<sup>[47]</sup> Die Regulation des FeoB-Kanals ist weit davon entfernt als verstanden zu gelten und die Wechselwirkung mit Häm – so denn funktionell relevant – erhöht die Komplexität dieses faszinierenden Proteins um eine zusätzliche Ebene.

Abschließend zeigt ein Vergleich der Proteine GlpF und FeoB mit den Peptiden der entsprechenden HRMs deutliche Unterschiede auf. Die EPR-Daten der Peptide PY5 (FeoB) und PY4 (GlpF) zeigten starke Häm-bindungseigenschaften, was sich in Übereinstimmung mit UV-Vis- und Resonanz-Raman-Studien dieser Peptide befindet.<sup>[46]</sup> Dies steht jedoch im Kontrast zu den schwachen Wechselwirkungen auf der Proteinebene. Durch strukturelle Begebenheiten der Proteine könnten die koordinierenden Aminosäuren des HRMs nicht so frei zugänglich wie bei den Peptiden sein. Weiter ist es möglich, dass eine räumlich andere, ungünstigere Anordnung dieser Liganden im HRM nicht die Bindungsmodi wie im Peptid erlaubt.



**Abb. 2.12.:** Wechselwirkung von Häm in mit FeoB und GlpF. (a) UV-Vis-Differenzspektren für NFeoB w. t. und (b) dessen Bindungskurve. (c) Bindungskurve für C143A, die Alaninmutante von NFeoB. (d) UV-Vis-Differenzspektren für (d) GlpF und (e) dessen Bindungskurve.<sup>[35]</sup>

Erste Untersuchungen zum Protein Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (Cat) aus *E. coli*, das das potentielle HRM des histidinbasierten Peptides HB51 enthält, wurden durchgeführt. Cat katalysiert die Diacetylierung des antibakteriellen Medikaments Chloramphenicol, das dadurch seine Fähigkeit verliert die bakterielle Peptidyl-Transferase zu inhibieren.<sup>[45]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass auch Häm in, wenn auch bei Häminkonzentrationen, die im bakteriellen Zytoplasma unwahrscheinlich sind, inhibitorsch auf die Cat-Aktivität wirkt.<sup>[45]</sup> Aufgrund dieser hohen Konzentrationen könnte bezweifelt werden, ob tatsächlich eine Regulation *in vivo* vorliegt. Die EPR-Daten des entsprechenden Peptids wiesen ein schwaches Häm inbindungsverhalten mit *low-spin*-Zustand auf (Abb. 2.6). Jedoch wurde für Cat eine intermediäre Bindungsstärke mit einem *high-spin*-Zustand beobachtet (Anh. 2.1.2). Das potentielle HRM (HxxxHxxxx) bietet mit drei Aminosäuren Abstand zwischen zentralem Histidin und einem weiteren Histidin gute Voraussetzungen für eine Hexakoordination. Dass für den Häm in-Cat-Komplex keine Hexakoordination

detektiert wurde, kann über eventuelle strukturelle Restriktion zu erklären sein. So können die Aminosäuren nicht aufeinander zu und im ungünstigsten Fall sogar voneinander weg ausgerichtet sein, was eine Hexakoordination des Hämins verhindert. Die Ergebnisse für Cat sind bis jetzt allerdings nur vorläufig. Eine Schwierigkeit bei der Erstellung der Proben ist eine ausreichende Menge an Protein mit entsprechend hoher Konzentration zu generieren.

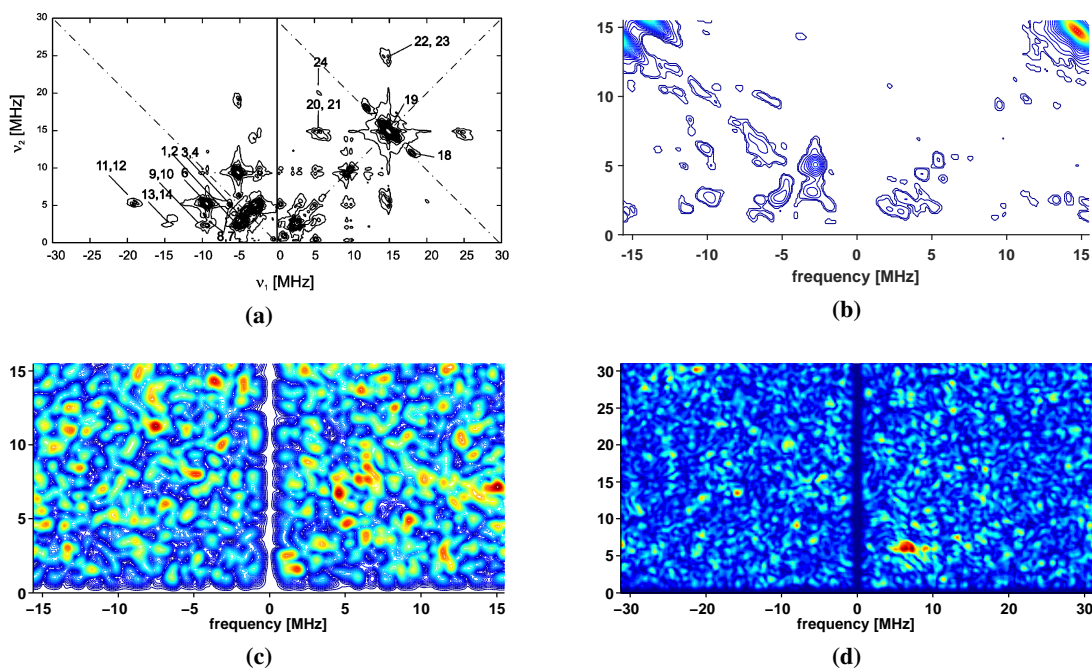
#### 2.1.4. Puls-EPR Experimente an Hämin-Peptid-/Protein-Komplexen

Da weitere Informationen über die Koordinationssphäre durch Hyperfeinkopplungen benachbarter Kerne des Fe(III) oft durch die Größe der Linienbreite des *cw* EPR-Spektrums nicht aufgelöst sind, werden Puls-EPR-Methoden zu ihrer Identifikation eingesetzt. Dies gestaltet sich allerdings für Eisen(III), aufgrund seiner schnellen Relaxationszeiten und der damit verbundenen schnell zerfallenden Signalintensität, schwierig. Im *high-spin*-Zustand ist die Relaxationszeit kürzer als im *low-spin*-Zustand, weshalb die Puls-EPR-Spektroskopie von Eisen(III)proteinen an ihrem *low-spin*-Zustand durchgeführt wurde.

An einer Metmyoglobinprobe in millimolarer Konzentration und unter Zusatz eines Glasbildners (Glycerin) konnte gezeigt werden, dass auch am *high-spin*-Zustand Puls-EPR-Spektroskopie möglich ist.<sup>[57]</sup> Der Glasbildner dient dabei zum Ausbilden einer amorphen Struktur der gefrorenen Probe, so dass es keine Vorzugsrichtungen wie im Kristall bei Eisbildung gibt, die zusätzliche Spin-Gitter-Relaxationspfade ermöglichen und so die Relaxationszeit weiter verkürzen (s. Abs. 2.1.1). Diese Machbarkeitsstudie zeigt allerdings auch, dass es sich nicht um ein gängiges Routinemessverfahren handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Probe von MetMb in zwei niedrigeren Konzentration (0,7 mM und 2 mM) und mit Ethylenglykol als Glasbildner erstellt. Besonders die 0,7 mM Probe diente einerseits als Referenz für die Puls-EPR-Spektroskopie an *high-spin* Fe(III) sowie andererseits als Testsystem für die Hämin-Peptid-Proben. Die geringere Konzentration dieser MetMb-Referenzprobe, sollte den Bedingungen der Hämin-Peptid-Proben ( $c = 300 \mu\text{M}$ ) näher kommen. Die Relaxationszeiten lagen im kleinen Submikrosekundenbereich. In den Pulsexperimenten wurde der Pulsabstand  $\tau$  möglichst so gewählt, dass er ein Vielfaches des reziproken Produkts aus dem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma_n$  des Protons ( $\gamma_n/2\pi = 42,576 \text{ MHz T}^{-1}$ ) und der Magnetfeldstärke  $B_0$  war. Dadurch sollte die Lamor-Frequenz  $\nu_L$  ( $\nu_L = \gamma_n/2\pi \cdot B_0$ ) der Lösungsmittelprotonen unterdrückt werden (sog. *blind spots*,  $\nu_L = n/\tau$  mit  $n = 0, 1, 2, \dots$ ),<sup>[108,109]</sup> um auch evtl. weniger intensive Hyperfeinkopplungen detektieren zu können (Abb. 2.13). Unter Berücksichtigung der veränderten Parameter zu der MetMb-Probe der Literatur, besonders der geringeren Konzentration, konnten die Literaturergebnisse prinzipiell reproduziert werden (Abb. 2.13a und Abb. 2.13b).

Die Hämin-Peptid-Proben zeigten selbst im Vergleich zur 0,7 mM MetMb-Probe eine deutlich reduzierte Signalintensität. In den Spektren wurde nur die Protonen-Lamorfrequenz des Puffers detektiert, während die zu erwartenden Stickstoffhyperfeinkopplungen vom Porphyrinliganden oder möglichen koordinierenden Histidinresten nicht detektiert werden konnten (Abb. 2.13c und



**Abb. 2.13.:** HYSORE-Spektren im X-Band mit den Zeiten der Pulssequenz  $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t_1 - \pi - t_2 - \pi/2 - \tau - \text{Echo}$  in ns in Klammern vermerkt: (a) 3,5 mM Metmyoglobin (30 % Glycerin) bei 3,8 K und 3490 G (16 – 80 – 16 – 96 + 8 – 32 – 96 + 8 – 16 – 80 – Echo) aus der Literatur,<sup>[57]</sup> (b) 0,7 mM Metmyoglobin (30 % Ethylenglykol) bei 3,4 K und 3450 G (16 – 100 – 16 – 100 + 32 – 44 – 100 + 32 – 16 – 100 – Echo) als Testsystem für die Hämin-Peptid-Proben und zur Reproduktion der Literaturergebnisse, (c) AW5 bei 3,1 K und 1650 G (8 – 140 – 8 – 90 + 32 – 12 – 90 + 32 – 8 – 140 – Echo) und (d) TK27 bei 3,05 K und 1469 G (8 – 158 – 8 – 90 + 16 – 14 – 90 + 16 – 8 – 158 – Echo).

Abb. 2.13d).

Die geringe Konzentration ist verbunden mit einem entsprechend schwachen Echo-Signal. Besonders bei längeren Pulssequenzen wie HYSORE ist dann das Echo-Signal bereits abgeklungen, bevor es detektiert werden kann. Die Relaxationszeiten der Hämin-Peptid-Proben sind vergleichbar mit denen der MetMb-Proben sowie synthetischen Fe(III)-Porphyrinen wie Fe(TPP)Cl. Für eben dieses Fe(TPP)Cl (TPP = Tetraphenylporphyrin) in Toluol sind  $T_{2\parallel} = 0,4 \mu\text{s}$ ,  $T_{2\perp} = 0,1 \mu\text{s}$ ,  $T_{1\parallel} = 5 \mu\text{s}$  und  $T_{1\perp} = 0,5 \mu\text{s}$ . Auch für Metmyoglobin wurden bei Temperaturen nahe 4 K längere Relaxationszeiten entlang der parallelen Achse als in der senkrechten Ebene berichtet. Gerade für Proben, die neben einem *high-* auch einen *low-spin*-Zustand aufweisen, ist aber das  $g_{\perp}$ -Signal von Interesse, da es nicht wie beim  $g_{\parallel}$ -Signal zu Überlappungen mit den Signalen des *low-spin*-Zustands kommen kann. Die kurzen Relaxationszeiten für *high-spin*-Komplexe führen dazu, dass Untersuchungen mit langen Pulssequenzen nicht möglich sind, da das Signal zu schnell abklingt.<sup>[110]</sup> Dass weitreichende Puls-EPR-Methoden an den Hämin-Peptid- bzw. Hämin-Protein-Komplexen ergebnislos blieben, ist auf die schnellen Relaxationszeiten sowie die geringen Konzentrationen zurückzuführen.

## 2.2. Kinetische Untersuchungen mit EPR-Spektroskopie

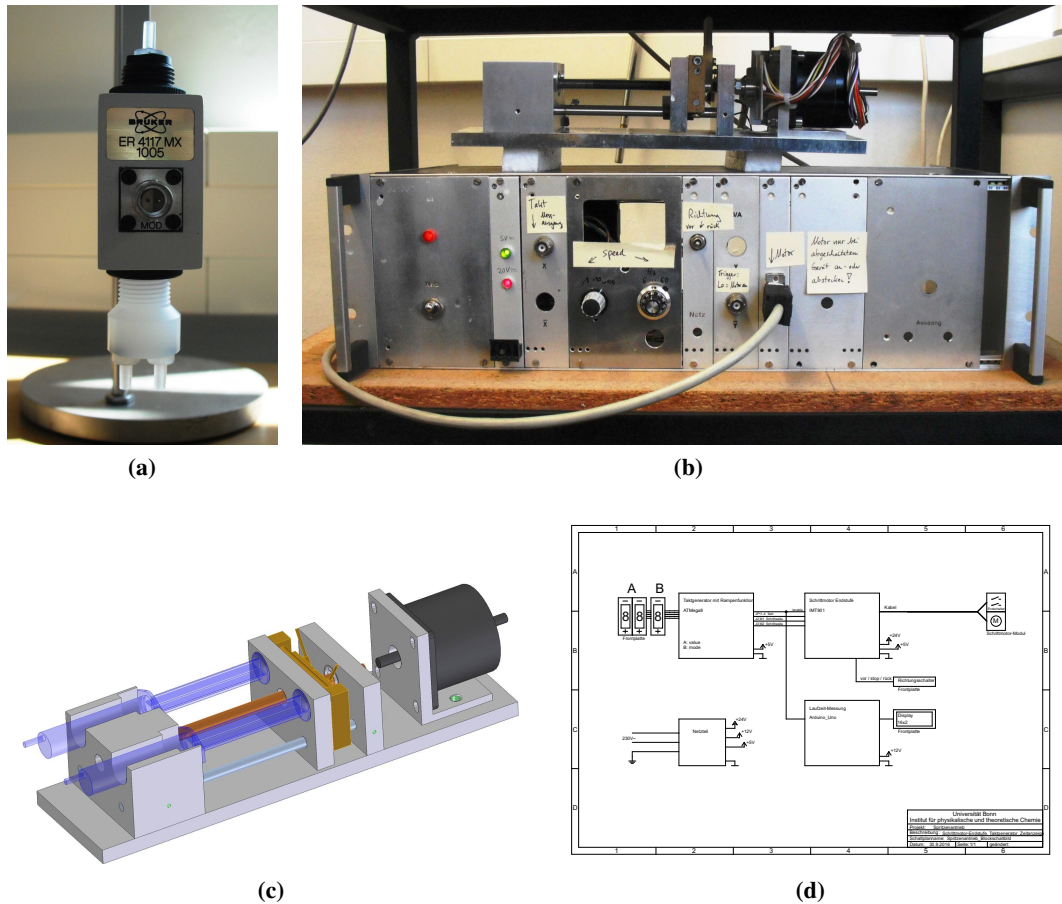
### 2.2.1. Kalibrierung des Mischresonators und des Spritzenmotors

Mischresonatoren machen die direkte Verfolgung kinetischer Prozesse in Lösung möglich. So konnte gezeigt werden, dass konformationelle Änderung eines Proteins verfolgt werden können. Dies wurde dadurch möglich, dass das Protein mit einer Spinsonde (MTSSL) versehen wurde. Anhand der Änderung des Signals der Spinsonde konnten Aussagen über die Kinetik der Proteinfaltung erhalten werden. Das dafür verwendete Messsystem war eine Eigenkonstruktion.<sup>[77]</sup> Hingegen ist der ER 4117 MX ein kommerziell erhältlicher EPR-Resonator von BRUKER mit zwei Luer-lock-Einlässen zum Anschluss an zwei Spritzen über Schlauchverbindungen (Abb. 2.14a). Im verwendeten Aufbau kamen Schläuche mit einer Länge von 95 cm und einem Innendurchmesser von 1,4 mm zum Einsatz. Jeder der Schläuche hatte ein Totvolumen von 1,45 mL, wobei – falls erforderlich – auch kürzere Schläuche eingesetzt werden können. Verglichen damit sind die Volumina vom Ende des Mischers bis zum Anfang des EPR-aktiven Bereichs sowie des EPR-aktiven Bereichs als solchen mit etwa 2,3  $\mu\text{L}$  bzw. 6,5  $\mu\text{L}$  vernachlässigbar. Die Lösungen aus den Schläuchen kommen direkt nach den Resonatoreinlässen in einer Y-förmigen Mischkammer in Kontakt.<sup>[111]</sup> Die turbulent gemischten Flüssigkeiten fließen durch eine Bor-Quarz-Kapillare (I. D. 0,4 mm) in die EPR-aktive Zone, wobei sie eine Strecke von 11 mm zurücklegen (Abstand zwischen Ende des Mischers und Mitte des EPR-aktiven Bereichs). Dort wird das  $B_1$ -Feld mittels eines Saphirrings auf die Probe fokussiert.<sup>[111–113]</sup>

Vor und nach jedem Einsatz wurden die Entleerzeiten der mit Wasser gefüllten Spritzen bei kombinierten Flussraten von 39,0 mL/min und 74,0 mL/min gemessen, um eine korrekte Funktionsweise des Flusssystems sicherzustellen. Die kleinen Kapillaren können leicht verstopfen, besonders wenn Reaktandenlösungen mit Konzentrationen nahe der Sättigung eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde zur Sicherheit erst die langsame und danach die schnellste Flussrate gemessen, damit die bei Verstopfungen auftretenden Kräfte potentiell weniger Schaden verursachen können.

Die zu den Arbeiten mit dem Mischresonator eingesetzte Spritzenpumpe besteht aus einer Spritzenhalterung samt Ramme, die von einem mikroprozessorgesteuertem Motor angetrieben wird (Abb. 2.14b). Die Rahmenkonstruktion entstammt der Feinmechanischen Werkstatt (Abb. 2.14c; Werkstattleiter: Herr Heinz-Peter Königshoven) und die Mikroprozessorsteuerung der Elektronikwerkstatt (Abb. 2.14d; Werkstattleiter: Herr Rolf Paulig) des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Der Schrittmotor arbeitet mit einer bestimmten Anzahl an Schritten pro Puls, wobei jeder Schritt mit einer entsprechenden Drehung der Motorachse zusammenhängt, wodurch ein Vorschub erzeugt wird. Zusammen mit der Frequenz des Motors und der Länge und des Volumens der Spritze lässt sich die theoretische Flussrate berechnen (Gleichung 2.2.1). Mit den eingesetzten 10 mL-Hamilton-Spritzen vereinfacht sich dieser Zusammenhang zu Formel (2.2.2).



**Abb. 2.14.:** (a) Mischresonator (BRUKER ER 4117 MX) mit zwei Einlässen (unten) und einem Auslass (oben). (b) Spritzenpumpe bestehend aus Motor (oben rechts) mit Spritzenhalterung (oben links) und Mikroprozessorsteuereinheit (unten). (c) Technische Skizze der Spritzenpumpe mit Motor in schwarz, Schnellverschluss in messingfarben und Spritzen in blau gehalten. (d) Blockschaltbild des Spritzenantriebs.

$$\begin{aligned}
 \text{Flussrate [mL/s]} &= \frac{\frac{\text{Schritt}}{\text{Puls}} \cdot \frac{\text{Grad}}{\text{Schritt}} \cdot \text{Vorschub} \cdot V_{\text{Spritze}} \cdot \frac{\text{Puls}}{\text{Sekunde}}}{l(V_{\text{Spritze}})} \\
 &= \frac{\frac{1}{8} \cdot \frac{360^\circ}{200} \cdot \frac{1 \text{ mm}}{360^\circ} \cdot V_{\text{Spritze}} [\text{mL}] \cdot \nu [\text{Hz}]}{l(V_{\text{Spritze}}) [\text{mm}]} \\
 &= \frac{1}{8} \cdot \frac{360^\circ}{200} \cdot \frac{1 \text{ mm}}{360^\circ} \cdot \frac{V_{\text{Spritze}} [\text{mL}]}{l(V_{\text{Spritze}}) [\text{mm}]} \cdot \nu [\text{Hz}] \\
 &= \underbrace{\frac{1}{1600} [\text{mm}]}_{\text{Motorkonstante}} \cdot \underbrace{\frac{V_{\text{Spritze}} [\text{mL}]}{l(V_{\text{Spritze}}) [\text{mm}]}}_{\text{Spritzenkonstante}} \cdot \underbrace{\nu [\text{Hz}]}_{\text{Motorfrequenz}} \quad (2.2.1)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Flussrate [mL/min]} &= \frac{1}{1600} [\text{mm}] \cdot \frac{10 [\text{mL}]}{60 [\text{mm}]} \cdot v [\text{Hz}] \cdot 60 \\ &= \frac{1}{160} [\text{mL}] \cdot v [\text{Hz}] \end{aligned} \quad (2.2.2)$$

Mit Hilfe zweier Räder der Kontrolleinheit des Schrittmotors können die Vorschubraten der Spritzenpumpe und darüber die Flussrate und Reaktionszeit eingestellt werden. Die Flussraten wurden durch das Messen der Entleerzeiten wassergefüllter Spritzen bestimmt. Die realen Flussraten sind mit den berechneten Werten nahezu identisch (ca. +2 % Abweichung, Tab. 2.3). Effektive Reaktionszeiten (zwischen Mischen und Detektion) wurden auf der Basis der Geometrie des Mischers und der Flussraten berechnet (Tab. 2.4). Zwei identische Spritzen wurden für die zwei Reaktandenlösungen verwendet, so dass die Gesamtflussrate der doppelten Flussrate pro Spritze entsprach.

Die Abmessungen der Mischkammer des Resonators ermöglichen es die Reaktionszeit der zwei Lösungen, bevor sie den EPR-aktiven Bereich erreichen, zu berechnen (Formel 2.2.3). Die Reaktionszeit ist die Zeit, die verstreicht, während die gemischten Lösungen das Volumen zwischen dem Ausgang des Mischers und dem Zentrum des EPR-aktiven Bereichs  $V_{\text{Reaktion}}$ , was einer Kapillarlänge von 11 mm entspricht, passieren.

$$\begin{aligned} t_{\text{Reaktion}} &= \frac{V_{\text{Reaktion}}}{2 \cdot \text{Flussrate pro Spritze}} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot l}{2 \cdot \text{Flussrate pro Spritze}} \\ &= \frac{\pi \cdot (0,2 \text{ mm})^2 \cdot 11 \text{ mm}}{2 \cdot \text{Flussrate pro Spritze}} \end{aligned} \quad (2.2.3)$$

Die Reynolds-Zahlen  $R_e$  wurden aus den Flussraten  $v$  in  $\text{m s}^{-1}$  nach Formel (2.2.4) berechnet.<sup>[114]</sup> Für eine Röhre dieser Abmessungen und mit diesen Flussparametern, ergibt sich die kritische Reynolds-Zahl  $R_{e,\text{limit}}$  von 2300, wonach der Fluss unter diesem Wert laminar ist ( $R_e < 2300$ ) und darüber beginnt turbulent zu werden ( $R_e > 2300$ ).<sup>[115]</sup>

$$R_e = \frac{v \cdot d \cdot \rho}{\eta} \quad (2.2.4)$$

Reynolds-Zahl  $R_e$  mit: Rohrrinnendurchmesser  $d = 0,4 \text{ mm}$

Dichte  $\rho = 998,203 \text{ kg m}^{-3}$

Dynamische Viskosität  $\eta = 0,001 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$

**Tab. 2.3.:** Messdaten zur Bestimmung der Flussraten des Mischresonators. Die angegebenen Volumenströme sind pro Spritze. Der theoretische Volumenstrom errechnet sich aus der gemessenen Pulsfrequenz  $\nu$  des Schrittmotors nach Formel (2.2.2). Nicht für alle Werte liegen Messungen der Elektronikwerkstatt vor. Der experimentelle Volumenstrom ergibt sich aus dem Quotienten des entleerten Spritzenvolumens und der dazu erforderlichen Zeit. Die Differenz  $\Delta$  dieser beiden Werte ist in % in der letzten Spalte angegeben.

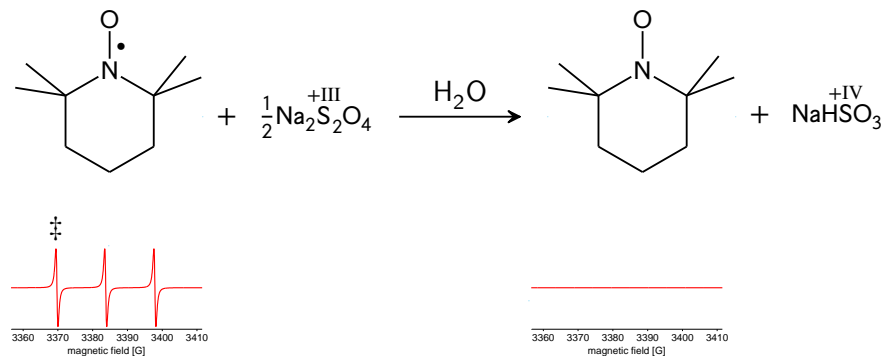
theoretisch		experimentell		$\Delta(\text{theo} - \text{exp})$
$\nu$ / Hz	Volumenstrom / mL min <sup>-1</sup>	Entleerzeit / s	Volumenstrom / mL min <sup>-1</sup>	Volumenstrom / %
591,0	3,69	163,4	3,67	-0,6
649,6	4,06	148,8	4,03	-0,6
721,0	4,51	134,0	4,48	-0,6
810,0	5,06	116,2	5,16	2,0
		111,5	5,38	
922,0	5,76	101,6	5,91	2,5
		97,3	6,17	
1078,0	6,74	87,1	6,88	2,2
		80,1	7,50	
1287,0	8,04	73,1	8,21	2,1
		65,7	9,13	
1597,0	9,98	58,6	10,24	2,6
		50,9	11,79	
2100,0	13,13	45,2	13,27	1,1
		40,9	14,66	
		37,3	16,09	
3090,0	19,31	30,9	19,40	0,5
		29,5	20,32	
		28,5	21,06	
		26,4	22,73	
		25,9	23,21	
		24,0	25,04	
		22,2	27,05	
		20,3	29,53	
		19,3	31,04	
		18,3	32,82	
5846,0	36,54	16,2	36,94	1,1



**Tab. 2.4.:** Korrelation der Flussraten, Reynoldszahl und effektiven Reaktionszeit.

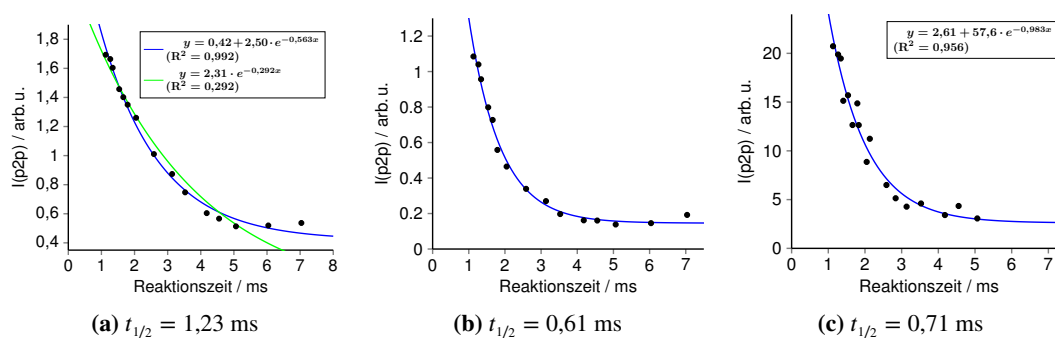
Volumenstrom pro Spritze / mL min <sup>-1</sup>	Flussgeschwindigkeit (2 Spritzen) / m s <sup>-1</sup>	Reynolds-Zahl	Reaktionszeit / ms
3,67	0,97	389	11,33
4,03	1,07	427	10,31
4,48	1,19	474	9,29
5,16	1,37	547	8,05
5,38	1,43	570	7,73
5,91	1,57	626	7,04
6,17	1,64	653	6,74
6,88	1,83	729	6,04
7,50	1,99	794	5,55
8,21	2,18	870	5,06
9,13	2,42	967	4,55
10,24	2,72	1085	4,06
11,79	3,13	1248	3,53
13,27	3,52	1405	3,13
14,66	3,89	1553	2,84
16,09	4,27	1704	2,58
19,40	5,15	2055	2,14
20,32	5,39	2152	2,05
21,06	5,59	2231	1,97
22,73	6,03	2407	1,83
23,21	6,16	2458	1,79
25,04	6,64	2652	1,66
27,05	7,18	2865	1,54
29,53	7,83	3127	1,41
31,04	8,23	3288	1,34
32,82	8,71	3476	1,27
36,94	9,80	3913	1,13

Zur Überprüfung der aus Flussraten und Resonatorgeometrie errechneten Reaktionszeiten sowie der Charakterisierung des Mischverhaltens wurde eine literaturbekannte Reaktion benötigt. Eine der wenigen möglichen Kalibrierungsreaktionen eines *Continuous-Flow*- oder *Stopped-Flow*-Systems mit EPR-Detektion stellt die Reduktion des Nitroxids TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy) oder TEMPOL (4-Hydroxy-TEMPO) durch Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) zum diamagnetischen Hydroxylamin dar (Abb. 2.15). Mit fortschreitender Reaktionszeit nimmt die Signalintensität des typischen Drei-Linien-Spektrums des Nitroxids ab.



**Abb. 2.15.:** Schema der Reduktion von TEMPO durch Dithionit. Unten dargestellt sind die cw X-Band EPR-Spektren. Das ‡ markiert die Position, die als Indikator der Konzentration verwendet wurde (s. u.).

Die Reaktion zwischen TEMPO und Dithionit wurde mit unterschiedlichen Verhältnissen der Reaktanden getestet. Dabei lag Dithionit im Überschuss vor, so dass die Reaktion als pseudoerster Ordnung in TEMPO behandelt werden kann. Die Messdaten ließen sich mit einem monoexponentiellen Verfall des EPR-Signals von TEMPO mit zunehmender Reaktionszeit beschreiben. Dies deckt sich mit Berichten für die parahydroxylierte Form von TEMPO, TEMPOL, deren Reaktion mit Dithionit zur Kalibrierung eines RFQ-<sup>[116]</sup> sowie Fluss-Stopp-Systems<sup>[78]</sup> eingesetzt wurde. Im Gegensatz dazu erhalten Scholes *et al.* unter Verwendung eines Systems, das im Konstanten-Fluss- oder Fluss-Stopp-Modus arbeiten kann, für die TEMPO-Dithionit-Reaktion einen linearen Zerfall und dementsprechend nullte Ordnung für TEMPO.<sup>[77]</sup> Da sie diese Analyse zur Bestimmung der Totzeit und Totvolumens einsetzen, bleiben diese Parameter fragwürdig.

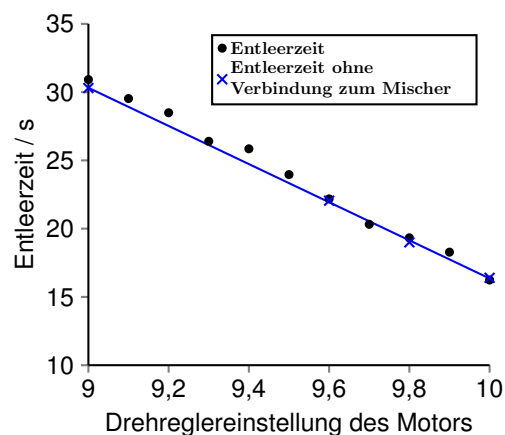


**Abb. 2.16.:** Kinetik der TEMPO-Dithionit-Reaktion mit  $[\text{TEMPO}]/[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4]$ -Verhältnissen von (a) 0,1:16,7, (b) 0,1:33,3 und (c) 3:1000 (absolute Zahlen in  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  sind an den Bildern vermerkt. Die grüne Anpassungsfunktion in (a) verdeutlicht wie ein Achsversatz (*peak-to-peak*-Intensität ist nicht null für reines Rauschen, d. h. für die Hintergrundlinie) die Anpassung verbessert. Zum Messen der Daten in (b) wurden 150 mL je Reaktand verbraucht. Mit der besten Fit-Funktion  $I(p2p) = 0,15 + 3,6 \cdot e^{-1,138 \cdot t}$  ( $R^2 = 0,989$ ) wird eine pseudo-erster-Ordnung-Geschwindigkeitskonstante von  $1138 \text{ s}^{-1}$  erhalten.

Abbildung 2.16 zeigt einen der mit dem ER 4117 MX aufgenommenen Datensätze und die ent-

sprechenden monoexponentiellen Anpassungskurven. Unter Verwendung der Literaturwerte der Konzentrationsverhältnisse TEMPO/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> von 3:1000 (absolute Zahlen in mmol/L) ergaben sich eine Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung  $k_1$  von 0,98 ms<sup>-1</sup> und eine Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von 0,71 ms (Abbildung 2.16c), die in Übereinstimmung mit den berichteten Werten sind ( $k_1 = 2,22 \text{ ms}^{-1}$  und  $t_{1/2} = 0,31 \text{ ms}$ ).<sup>[78]</sup> Das bestätigt auch die nach Formel (2.2.3) berechneten Reaktionszeiten. Mit dem verwendeten Aufbau sind Reaktionszeiten bis runter zu 1,1 ms realisierbar. Dabei wurde eine Gesamtflussrate von fast 74 mL/min pro Minute erreicht, was bereits mehr als dem doppelten Wert der Herstellerempfehlung von 32 mL/min entspricht. Somit ist es mit diesem Mischer möglich Submillisekundenprozesse zu untersuchen. Beispielsweise würden für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung mit einem  $t_{1/2}$  von 0,25 ms und einer Ausgangskonzentration im submillimolaren Bereich genügend signifikante Messpunkte, für eine monoexponentielle Anpassungsfunktion mit zufriedenstellender Güte, erhalten.

Die einwandfreie Funktionsweise in diesem hohen Flussratenbereich zeigt sich daran, dass der Mischer keinen Widerstand aufbaut sowie durch den monoexponentiellen Verlauf der TEMPO-Dithionit-Reaktion. Die Entleerzeiten der Spritzen mit und ohne Verbindung zum Mischer sind auf der höchsten Vorschubrate identisch (Abb. 2.17).



**Abb. 2.17.:** Auftragung der Entleerzeiten pro Spritze bei den höchsten einstellbaren Werten des Schrittmotors. Die schwarzen Datenpunkte zeigen Werte für eine bestehende Verbindung zum Mischer, während diese bei den blauen Punkten nicht bestand, so dass sich kein potenzieller Gegendruck des Mixers für den Motor aufbauen konnte.

Für Reaktionszeiten, die etwa 7 ms übersteigen, weicht das TEMPO-Signal von der Fit-Funktion ab. Es steigt wieder an, bis es die Intensität der TEMPO-Lösung, wenn sie nur mit Wasser durch den Mischresonator geschoben wird, erreicht. Dieses Verhalten wird dem Auftreten von ineffektivem, nicht turbulentem Mischen bei geringen Flussraten zugeschrieben. In der Strömungslehre wird die Reynolds-Zahl, eine dimensionslose Größe, als Indiz dafür verwendet, ob eine Strömung in einem Rohr laminar oder turbulent ist. Obwohl die Geometrie eines Y-Mischers nicht so einfach wie die eines Rohres ist, kann die vereinfachte Reynolds-Zahl für ein Rohr vergleichbarer Größe einen Anhalt geben. Unter diesen Annahmen wird die kritische Reynolds-Zahl bei einer Gesamtflussrate von 21,1 mL/min erreicht, was einem Reaktionszeitpunkt von 2,0 ms ent-

spricht und in derselben Größenordnung wie der experimentell bestimmten Grenze für effektives Mischen liegt.

Verglichen damit geben Scholes *et al.*<sup>[77]</sup> einen Arbeitsbereich von 150  $\mu\text{s}$  bis 2 ms für ihren Eigenbau-Mischresonator an.<sup>[77]</sup> Allerdings liefert ihr System in diesem Bereich ein lineares Verhalten (nullte Ordnung) für die TEMPO-Dithionit-Reaktion, was den vorliegenden Ergebnissen und denen anderer Gruppen<sup>[78,116]</sup> widerspricht und die einwandfreie Funktionsweise ihres Mischers in Frage stellt.

Anstatt Mischresonatoren können auch Mischzellen, die bei WILMAD-LABGLASS zu erstehen sind, eingesetzt werden. Die Flachzellen haben relativ große Probenvolumina von 125  $\mu\text{L}$  (WG-804-Q) und 85  $\mu\text{L}$  (WG-865-B-Q) sowie Totvolumina von etwa 9,5  $\mu\text{L}$ , das zu einem kinetisch relevanten Reaktionsverfallvolumens von mehr als 50  $\mu\text{L}$  führt (Mischer zum Zentrum des EPR-aktiven Bereichs, d. h. Totvolumen +  $1/2$  Probenvolumen). Verglichen damit hat der vorliegende Mischresonator ein Probenvolumen von 1,6  $\mu\text{L}$ , ein Totvolumen von 0,6  $\mu\text{L}$  (Mischer bis Eingang EPR-aktiver Bereich) und ein Reaktionsverfallvolumen von nur 1,4  $\mu\text{L}$ .

So einfach die TEMPO-Dithionit-Reaktion dem ersten Anschein nach ist, zeigen sich in der Praxis doch manche Schwierigkeiten. Alleine die Tatsache, dass diese Reaktion gerade einmal von drei Gruppen zur Kalibrierung ihrer *Continuous-Flow*-,<sup>[77]</sup> *Stopped-Flow*-<sup>[78]</sup> oder RFQ-Systeme<sup>[117]</sup> eingesetzt wurde, verwundert, da die EPR-Spektroskopie heutzutage keinen Exotenstatus unter den spektroskopischen Methoden mehr besitzt. Es gibt allerdings mehrere Aspekte der TEMPO-Dithionit-Reaktion, die einer Betrachtung bedürfen. Dithionit liegt im Gleichgewicht mit seinem Monomer dem Radikalanion  $\text{SO}_2^{\bullet-}$  vor. Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von  $1,4 \cdot 10^{-9}$  M zeigt, dass nur ein sehr kleiner Teil des Dithionits als Radikalanion vorliegt.<sup>[18,118,119]</sup> Eine Reduktion kann sowohl durch  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  oder  $\text{SO}_2^{\bullet-}$  erfolgen. Beispielsweise reagiert die Chlorperoxidase, wie andere Hämoproteine (Meerrettichperoxidase, Metmyoglobin), bevorzugt mit dem Radikalanion anstatt mit Dithionit.<sup>[120]</sup> Ob TEMPO durch Dithionit oder  $\text{SO}_2^{\bullet-}$  zum Hydroxylamin reduziert wird, ist nicht bekannt, aber für den Reaktionsmechanismus von entscheidender Bedeutung.

Unter Verwendung eines TEMPO/Dithionit-Verhältnisses von 3 mM : 1000 mM ließ sich zwar die berichtete Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung reproduzieren. Allerdings ändert sich diese Konstante, wenn die TEMPO-Konzentration gleichgehalten, aber die Dithionit-Konzentration – immer noch im Überschuss – variiert wird. Dieses Verhalten zeigt sich für die vorliegenden Datensätze sowie die Ergebnisse der Literaturberichte. Somit scheint die Annahme, dass die Reaktion erster Ordnung in Bezug auf TEMPO ist, nicht gerechtfertigt zu sein.

Weiter ist zu beachten, dass Dithionit oxidationslabil gegenüber Sauerstoff ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$ ) und Wasser ( $2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 2 \text{NaHSO}_3$ ) ist (vgl. SIDS-Dokumentation).<sup>[121,122]</sup> Da  $\text{NaHSO}_4$  sowie  $\text{NaHSO}_3$  den pH-Wert verringern, ist dieser Zerfall autokatalytisch und gepufferte Dithionitlösungen wurden bei den vorliegenden Arbeiten verwendet.

### 2.2.2. Kinetische Untersuchungen der Fenton-ähnlichen Reaktion von Ethanol

Mischungen aus Eisen(II)salzen und Wasserstoffperoxid wurden im Jahre 1894 von Fenton als Möglichkeit zur Oxidation von organischen Substanzen entdeckt.<sup>[81]</sup> Später stellte sich heraus, dass das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) die reaktive Spezies der sogenannten Fenton-Reaktion ist.  $\text{OH}^\bullet$  abstrahiert anschließend ein  $\text{H}^\bullet$  von der organischen Substanz, wodurch organische Radikale  $\text{R}^\bullet$  entstehen. Die Oxidation organischer Verbindungen kann ebenso erzielt werden, wenn  $\text{Fe(II)}$  gegen andere Metallionen wie z. B.  $\text{Cu(I)}$ ,  $\text{Ti(III)}$  oder  $\text{Cr(II)}$  ersetzt wird. Solche hydroxylradikalerzeugenden Reaktionen werden dann als Fenton-ähnlich bezeichnet. Anstatt  $\text{H}_2\text{O}_2$  können auch organische Peroxide wie *t*-BuOOH eingesetzt werden.<sup>[123]</sup>

Bislang wurden zahlreiche Artikel, die den Reaktionsverlauf, seine Zwischenstufen und Produkte sowie deren Zerfall mit Hilfe optischer Methoden untersuchen, veröffentlicht.<sup>[124–127]</sup> Neben Fenton- und Fenton-ähnlichen Reaktion wurde auch Radiolyse zur Erzeugung der reaktiven  $\text{OH}^\bullet$  verwendet, wobei EPR-Spektroskopie zur qualitativen Bestimmung der entstandenen organischen Radikale diente.<sup>[80,128–130]</sup> Das erste berichtete EPR-Spektrum von Radikalen in Lösung, die durch ein Fenton-ähnliches System entstanden, wurde 1963 veröffentlicht.<sup>[131]</sup> Diese Untersuchung widmete sich den Oxidationsprodukten verschiedener Alkohole, unter denen sich auch das aus Ethanol gebildete Hydroxyethylradikal ( $\text{EtOH}^\bullet$ ) befand. Ausführliche Studien zu den Bildungsmechanismen sowohl der Hydroxyl- sowie resultierenden organischen Radikale folgten. Es wurde gezeigt, dass im Falle von Ethanol verschiedene Radikale mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten entstehen, abhängig davon, ob das Oxidationssystem  $\text{TiCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  ist.<sup>[132]</sup>

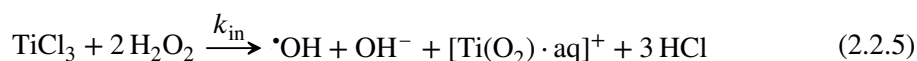
Kinetische Studien an verschiedenen Alkoholradikalen, u. a. dem Hydroxyethylradikal, unter Verwendung von UV-Vis-Spektroskopie zur Detektion<sup>[127,133]</sup> und Radiolyse zur Erzeugung solcher organischer Radikale, wurden durchgeführt. Zum anderen fand EPR-Spektroskopie in Verbindung mit Mischer-Fluss-Systemen Einsatz zur Untersuchung des Zerfalls des Hydroxymethylradikals,<sup>[132,134]</sup> wobei die Ergebnisse entweder nicht diskutiert<sup>[134]</sup> oder, wie sich später herausstellte, nicht konsistent und falsch interpretiert wurden.<sup>[132,135]</sup> Des Weiteren liegen Studien der Reaktion von  $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{Ti(III)}/\text{H}_2\text{O}_2$  mit Carbonsäuren, Ketonen und anderen organischen Substanzen vor.<sup>[112,113,136–139]</sup> Trotzdem wurde bisher nie das vollständige Spektrum des untersuchten Radikals während der gesamten kinetischen Untersuchung aufgenommen, wobei nur so der alleinige Beitrag der beobachteten Spezies zum gemessenen Signal sicherzustellen ist. Das Fehlen dieser vollspektralen Analyse für jeden Reaktionszeitpunkt erklärt sich dadurch, dass sie – besonders für schnelle Reaktionen – üblicherweise zeit- und substanzmengenintensiv ist. Ferner wurden bis jetzt keine kinetischen Studien zum Zerfall des Hydroxyethylradikals, weder mit einem Flusssystem zur Radikalerzeugung noch EPR-Spektroskopie zur quantitativen Detektion, durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit zeigt die kinetische Analyse des Zerfalls des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals, das aus Ethanol mit dem  $\text{TiCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ -System erzeugt wurde, mittels EPR-Spektroskopie und

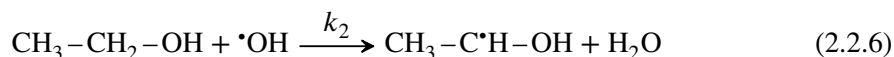
demonstriert die Stärke der EPR-Spektroskopie als direkte, empfindliche und eigenständige *in-situ*-Methode in kinetischen Untersuchungen. Spezifisch für den Zerfall des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals, das über das Ti(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-System erhalten wurde, sind mögliche Beiträge von Reaktionen mit O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ti<sup>3+/4+</sup> und Eigenrekombination auf den Radikalzerfall beleuchtet worden. Die Geschwindigkeitskonstanten für den Initiationsschritt, d. h. die OH<sup>•</sup>-Erzeugung, und den bimolekularen Zerfall des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals, der sich als der dominante Zerfallsprozess herausstellte, wurden bestimmt.<sup>[2]</sup>

### Radikalbildende Reaktionen

Das Fenton-ähnliche System aus TiCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugt das Hydroxyethylradikal in den folgenden zwei Schritten. Zuerst reduziert Titan(III)chlorid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das infolgedessen unter Bildung von Hydroxylradikalen zerfällt (Reaktion 2.2.5).<sup>[131,136]</sup>

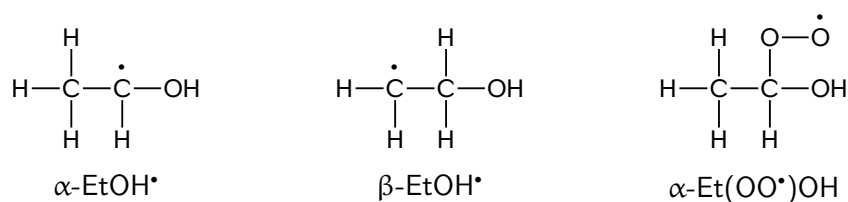


Das Hydroxylradikal reagiert mit Ethanol unter Abspaltung eines H-Atoms, mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  von  $1,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  an der  $\alpha$ -Position (Reaktion 2.2.6).<sup>[80,124,138]</sup> Die Bildung des  $\beta$ -Isomers wurde als um eine Größenordnung langsamer berichtet, wodurch ein kleinerer Beitrag des  $\beta$ -Hydroxyethylradikals in der Fenton-ähnlichen-Reaktion erwartet wird (Abb. 2.18).<sup>[138,140]</sup> Interessanterweise wird in der „originären“ Fenton-Reaktion mit FeCl<sub>2</sub> hauptsächlich das  $\beta$ -Radikal beobachtet, was den Beitrag von Fe(III) im Zerfall des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals widerspiegelt. Während Fe(III) das elektronenreiche  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal ( $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) um zwei Größenordnungen schneller als das  $\beta$ -Isomer oxidiert und dadurch seinen Anteil verringert,<sup>[135,138,141]</sup> geht die Oxidation durch Ti(IV) (im Falle des Ti(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-System) für beide Isomere deutlich langsamer vonstatten.<sup>[135,142]</sup>



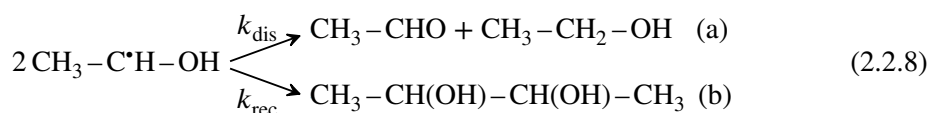
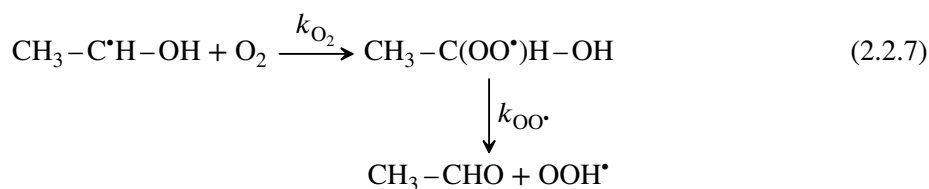
### Radikalabbauende Reaktionen

In der Literatur finden sich verschiedene Vorschläge zu den Zerfallsmechanismen des Hydroxyethylradikals: Oxidation durch Luftsauerstoff,<sup>[80,82]</sup> Disproportionierung<sup>[126,127,143,144]</sup> und Eigenrekombination der Radikale mit dem Ergebnis nichtradikalischer Spezies.<sup>[80,125–127,144]</sup> Die Oxidation des Hydroxyethylradikals mit O<sub>2</sub> führt zum Hydroxyethylperoxyradikal (CH<sub>3</sub>C(OO<sup>•</sup>)HOH), das schließlich zu Acetaldehyd und dem Hydroperoxyradikal zerfällt (Reaktion 2.2.7;  $k_{\text{O}_2} \approx 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{OO}^{\cdot}} = 50 \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[80,82]</sup> Dieser Verlauf dominiert vermutlich, wenn die Lösung höhere Konzentrationen gelösten Sauerstoffs enthält, z. B. durch dauerhaftes Rühren der Reaktionslösung. Wenn das Hydroxyethylradikal in größeren Konzentrationen auftritt, disproportioniert es entweder zu Acetaldehyd und Ethanol (Reaktion 2.2.8 (a);  $k_{\text{dis}} \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>[127]</sup> oder bildet durch Eigenrekombination 2,3-Bitandiol (Reaktion 2.2.8



**Abb. 2.18.:** Mögliche ethanolbasierte Radikale. Die verwendeten Abkürzungen entsprechen folgenden IUPAC-Namen:  $\alpha\text{-EtOH}^\bullet = 1\text{-Hydroxyethyl}$ ;  $\beta\text{-EtOH}^\bullet = 2\text{-Hydroxyethyl}$ ;  $\alpha\text{-Et}(\text{OO}^\bullet)\text{OH} = 1\text{-(Hydroxyethyl)peroxyl}$

(b);  $k_{\text{rec}} \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),<sup>[127]</sup> wobei Eigenrekombination der beherrschende Pfad ist.<sup>[126]</sup> Diese bimolekularen Zerfallswege können mit Hilfe der EPR-Spektroskopie nicht unterschieden werden, da die Endprodukte diamagnetisch sind, so dass die Kombination aus Disproportionierung und Eigenrekombination in einem einzigen  $k_{\text{bi}}$  berücksichtigt sind.

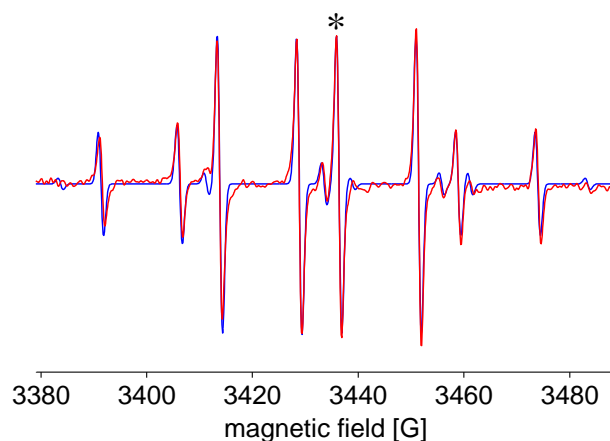


Jedoch könnten auch andere Zerfallsmechanismen auftreten. Beispiele solcher möglichen konkurrierenden Reaktionen sind die Reduktion des organischen Radikals durch  $\text{Ti}^{3+}$  oder die Weiteroxidation des organischen Radikals durch  $\text{Ti}^{4+}$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wodurch im Falle der Reduktion nichtradikalische Anionen und durch Oxidation nichtradikalische Kationen entstehen. Des Weiteren stellt  $\text{H}^\bullet$ -Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch das Hydroxyethylradikal den Alkohol wieder her, während  $\text{H}^\bullet$ -Abspaltung vom organischen Radikal durch Wasserstoffperoxid  $\text{OH}^\bullet$  und den entsprechenden Aldehyd liefert.<sup>[138]</sup> Als weiterer Zerfallsweg des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals ist Isomerisierung zum  $\beta$ -Radikal möglich.<sup>[135]</sup> Da diese verschiedenen Pfade zur Verfügung stehen, erschwert sich die Bestimmung des dominanten Zerfallsmechanismus bei bestimmten experimentellen Bedingungen. Beiträge mehrerer Pfade in unterschiedlichem Ausmaß sind wahrscheinlich.

### Analyse des EPR-Spektrums

Das EPR-Spektrum (Abb. 2.19) des, durch das Fenton-ähnliche  $\text{TiCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ -System erzeugten, Radikals zeigt acht Linien, die durch zwei unterschiedliche isotrope Hyperfeinkopplungen, einem Quartett mit  $A_{\text{iso}} = 22,6 \text{ G}$  und einem Dublett mit  $A_{\text{iso}} = 15,0 \text{ G}$ , verursacht werden (Abb. 2.20a). Diese gemessenen Kopplungskonstanten befinden sich in guter Übereinstimmung

mit den für das  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal in der Literatur veröffentlichten Werten mit einem  $H_\alpha$  (Dublett,  $A_{\text{iso}} = 15,0$  G) und drei  $H_\beta$  (Quartett,  $A_{\text{iso}} = 22,2$  G).<sup>[131,132]</sup> Die intensitätsschwächeren Signale stammen von einem 10 %-igem Beitrag des  $\beta$ -Hydroxyethylradikals (Abb. 2.20b), was sich mit früheren Berichten deckt.<sup>[79,140,141,145]</sup>



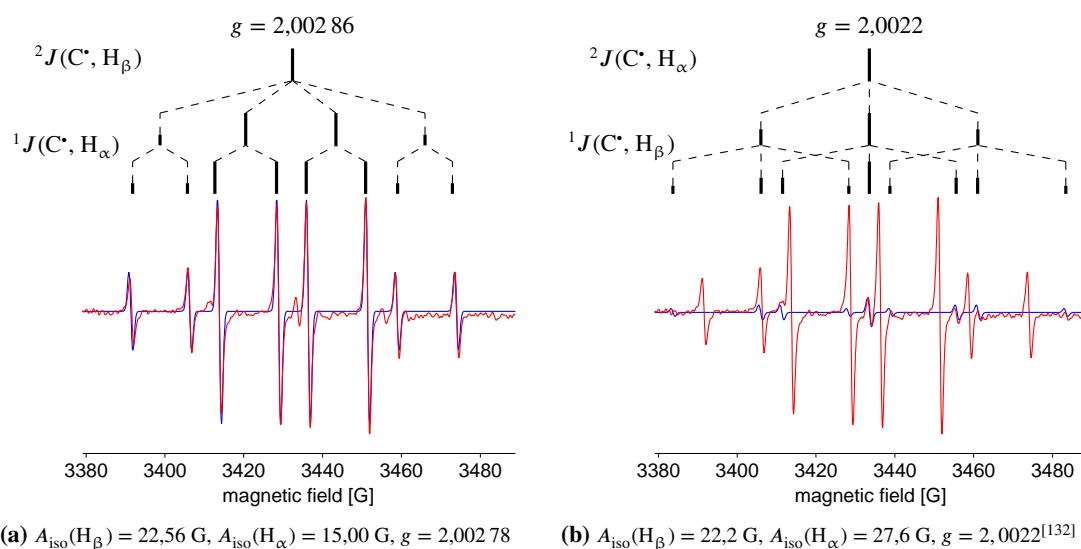
**Abb. 2.19.:** EPR-Spektrum der Reaktion Ti(III)/ $H_2O_2$ -Systems mit Ethanol bei einer Flussrate von 7,96 mL/min (d. h. 5,2 ms Reaktionszeit) und den Messparametern aus Tabelle 4.2. Zusätzlich zum  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal ist ein kleiner Beitrag des  $\beta$ -Hydroxyethylradikals sichtbar. Die Linie, die als Konzentrationsindikator für die Zerfallsanalyse verwendet wurde, ist mit einem Sternchen markiert. Das experimentelle Spektrum ist in rot dargestellt und mit seiner Simulation in blau überlagert.

Angesichts des Aufspaltungsmusters kann das Spektrum offensichtlich nicht durch das  $\beta$ -Hydroxyethylradikal hervorgerufen werden, da dies ein Triplet von Triplets zeigen würde (Abb. 2.20b).<sup>[132]</sup> Für das Zerfallsprodukt weiterer Oxidation durch  $O_2$ , namentlich das  $\alpha$ -Hydroxyethylperoxyradikal, ist allerdings ein Quartett von Dubletts im EPR-Spektrum zu erwarten. Um zwischen diesen zwei Szenarios zu unterscheiden, wurden Dichte-Funktional-Theorie (DFT) Rechnungen durchgeführt (Tab. 2.5). DFT sagte für das  $\alpha$ -Hydroxyethylperoxyradikal viel kleinere isotrope Kopplungskonstanten als für das  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal voraus, was aufgrund des größeren Abstands zwischen dem ungepaarten Elektron (hauptsächlich auf  $C_\alpha$  lokalisiert) und seinen Kopplungspartnern (d. h.  $H_\alpha$  und  $H_\beta$ ) zu erwarten ist. Des Weiteren stimmen die experimentell beobachteten Kopplungskonstanten am ehesten mit den DFT-errechneten Kopplungskonstanten des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals überein. Ferner wurde dasselbe EPR-Spektrum erhalten, wenn die Reaktion unter Argonatmosphäre ablief, um potentielle weitere Oxidation durch  $O_2$  zu verhindern, womit experimentell die Anwesenheit jeglichen messbaren Beitrags des  $\alpha$ -Hydroxyethylperoxyradikals zum Spektrum auszuschließen ist.

Die Simulation der EPR-Spektren des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals und des  $\beta$ -Hydroxyethylradikals sind in Abbildung 2.20 dargestellt. Durch die Identifikationen der zwei einzelnen Komponenten im Spektrum, konnte im Weiteren das gesamte Spektrum als Kombination dieser Beiträge verstanden werden (Abb. 2.19). Für die DFT-Rechnungen wurde das ORCA-Quantenchemieprogramm verwendet.<sup>[146]</sup> Zu Anfang wurden kartesische Atomkoordinaten mittels des Che-



miezeichenprogramms ChemAxon Marvin Sketch generiert.<sup>[147]</sup> Diese Rohdaten wurden geometrieoptimiert bevor die magnetischen Parameter errechnet wurden, wobei beides mittels ORCA geschah (s. Abs. 4.3). Die größeren beobachteten Kopplungskonstanten für die  $\beta$ -Wasserstoffatome des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals (22,6 G für  $H_\beta$  vs. 15,0 G für  $H_\alpha$ ) sind auf Hyperkonjugation zurückzuführen.<sup>[148–151]</sup>



**Abb. 2.20.:** EPR-Spektrum der Hydroxyethylradikale bei einer Flussrate von 7,96 mL/min (d. h. 5,2 ms Reaktionszeit) in rot (sieben Einzelspektren gemittelt) und ihre Simulationen unter Verwendung von *EasySpin*<sup>[152]</sup> in blau (Gauß'sche Linienverbreiterung: 1 G; Details s. Bildunterschriften). Die Kopplungsschemata für das (a)  $\alpha$ - und (b)  $\beta$ -Isomer sind über den Spektren dargestellt.

**Tab. 2.5.:** Hyperfeinkopplungskonstanten verschiedener potenzieller Radikale.

Radikal	Hyperfeinkopplung / G	Quelle
$\alpha$ -EtOH•	(C•, $H_\alpha$ ) 15,0	Diese Arbeit, Abb. 2.19
	(C•, $H_\beta$ ) 22,6	
$\alpha$ -EtOH•	(C•, $H_\alpha$ ) -8,3	DFT
	(C•, $H_\beta$ ) 20,5	
$\alpha$ -EtOH•	(C•, $H_\alpha$ ) 15,0	[132]
	(C•, $H_\beta$ ) 22,2	
$\beta$ -EtOH•	(C•, $H_\alpha$ ) 36,1	DFT
	(C•, $H_\beta$ ) -24,5	
$\beta$ -EtOH•	(C•, $H_\alpha$ ) 27,6	[132]
	(C•, $H_\beta$ ) 22,2	
$\alpha$ -Et(OO•)OH	(C•, $H_\alpha$ ) 6,5	DFT
	(C•, $H_\beta$ ) -0,3	

## Kinetische Analyse

Zur Untersuchung der Kinetik des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals wurden EPR-Spektren bei verschiedenen Flussraten aufgenommen. Wie in Abb. 2.21a zu erkennen, wurde anstatt die Intensität eines Punktes zu verfolgen, das ganze Spektrum für jeden Reaktionszeitpunkt aufgenommen. Die resultierende Kurve der Auftragung der Intensität des Hydroxyethylradikals gegen die Reaktionszeit lässt sich am besten unter der Annahme eines monoexponentiellen Zerfalls beschreiben (Abb. 2.21b). Andererseits sind unter den experimentellen Bedingungen und Konzentrationen bimolekulare Prozesse der Eigenrekombination und Disproportionierung die dominanten Mechanismen des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikalzerfalls.<sup>[136]</sup> Wie an anderer Stelle berichtet, können diese offensichtlichen Diskrepanzen unter der Annahme in Einklang gebracht werden, dass die Bildung der Intermediate (d. h.  $\text{OH}^{\bullet}$ ) sich bis in den Resonator fortsetzt.<sup>[135,136]</sup> Mit entsprechenden unten erwähnten Vereinfachungen wird das Geschwindigkeitsgesetz (2.2.9), das die beobachtete Zerfallskinetik beschreibt, erhalten.<sup>[135]</sup>

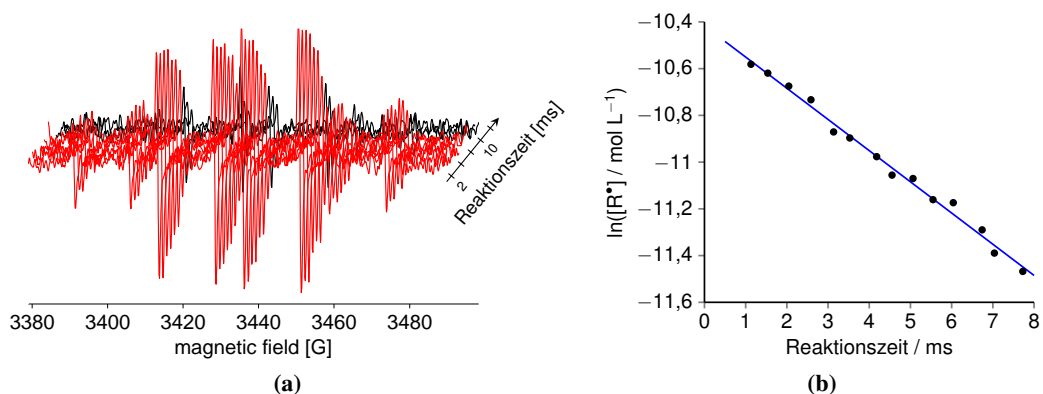
$$[\text{R}^{\bullet}] = \sqrt{\frac{k_{\text{in}} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0 \cdot [\text{Ti(III)}]_0}{2 \cdot k_{\text{bi}}}} \cdot e^{-k_{\text{in}} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0 \cdot t/2} \quad (2.2.9)$$

$$\ln[\text{R}^{\bullet}] = \underbrace{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{k_{\text{in}} [\text{Ti(III)}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]_0}{2 k_{\text{bi}}} \right)}_{\text{y-Achsenabschnitt } (b)} - \underbrace{\frac{k_{\text{in}} [\text{H}_2\text{O}_2]_0}{2}}_{\text{Steigung } (m)} \cdot t \quad (2.2.10)$$

$$k_{\text{in}} = -\frac{2m}{[\text{H}_2\text{O}_2]_0} \quad k_{\text{bi}} = \frac{k_{\text{in}} [\text{Ti(III)}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]_0}{2e^{2b}}$$

Gleichung (2.2.9) fußt auf folgenden Annahmen: (i) die Anfangskonzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist deutlich größer als die von  $\text{Ti(III)}$ , (ii) die Initiationsreaktion zwischen dem niedrigvalentem Metall und dem Wasserstoffperoxid ist vor dem Eintritt in den Resonator nicht vollständig abgeschlossen, (iii) für  $[\text{OH}^{\bullet}]$  und  $[\text{R}^{\bullet}]$  gilt das Bodenstein'sche Quasistationaritätsprinzip und (iv) andere Zerfallswege als die bimolekularen Ereignisse der Eigenrekombination und Disproportionierung sind vernachlässigbar (für eine ausführlichere Herleitung von Gleichung 2.2.9 s. u. Abs. 2.2.2 S. 72 ff.;  $\text{R}^{\bullet} \equiv \text{EtOH}^{\bullet}$ ).<sup>[133,136]</sup> Vor der Analyse der Messdaten mit Gleichung 2.2.10 müssen die Intensitäten in Konzentrationen überführt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Spektrum (aus mehreren Aufnahmen) mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) des Hydroxyethylradikals zur Bestimmung des Verhältnisses aus dem Zahlenwert des Doppelintegrals (DI) des Hydroxyethylradikal-Spektrums und der Intensität seiner in Abbildung 2.19 mit einem Sternchen versehenen EPR-Linie genutzt. Dann wurde ein Spektrum einer TEMPO-Probe bekannter Konzentration bei denselben Messparametern aufgenommen. Durch Vergleich des DI's dieses TEMPO-Spektrums (bekannter Konzentration) mit dem DI des Hydroxyethyl-Spektrums wurden die Intensitäten der Linie der Hydroxyethyl-Spektren mit der tatsächlichen Konzentrationen des Hydroxyethylradikals korreliert (für Details s. Abs. 4.3.2). Die Verwendung der schmalen,

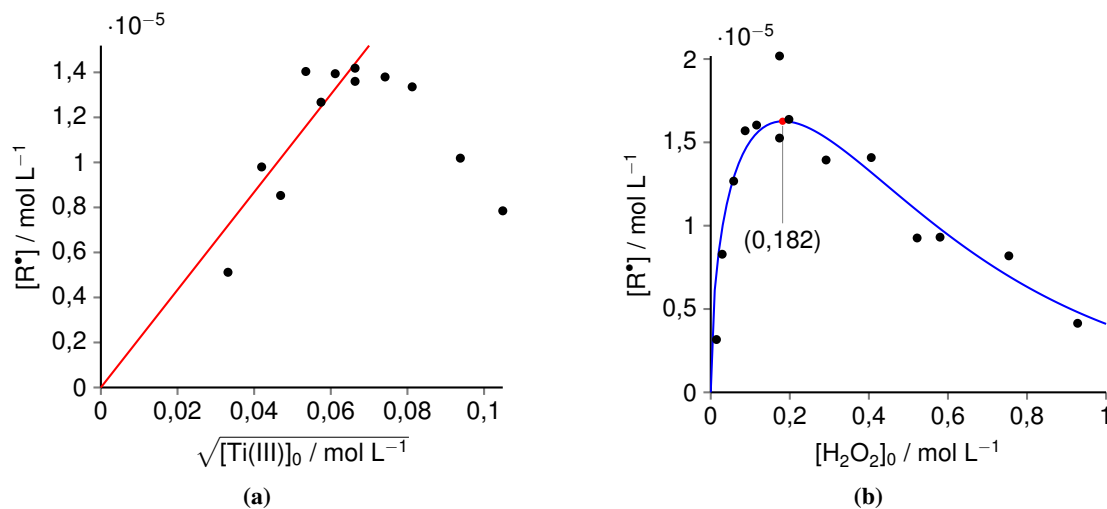
scharfen Linie des Hydroxyethylradikal-Spektrums als Gradmesser der Spin-Konzentration ist von besonderem Wert bei Spektren schwächerer Intensität, bei denen Doppelintegration üblicherweise, aufgrund eines geringen Signal-Rausch-Verhältnisses, fehlerhaft ist. Der relative Fehler der Konzentrationsbestimmung verschiedener TEMPO-Lösungen bekannter und experimentell relevanter Konzentration beträgt etwas weniger als 9 %, was im Folgenden als relativer prozeduraler Fehler aller Konzentrationsbestimmungen verwendet wurde.



**Abb. 2.21.:** (a) Versetzt aufgetragene EPR-Spektren des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals bei unterschiedlichen Reaktionszeiten im Rahmen von 2 ms bis 20 ms (schwarze Spektren entsprechen Flussraten mit ineffizientem Mischen). (b) Die Anpassung der Messdaten an einen linearisierten monoexponentiellen Zerfall mit  $\ln[R^*] = -0,134 \cdot t + 10,417$  ( $R^2 = 0,99$ ). Ein Gesamtvolumen von 125 mL pro Reaktandlösung wurde benötigt, um diesen Datensatz aufzunehmen.

Mittels der Auftragung  $\ln[R^*]$  vs.  $t$  lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten des Initiationschritts  $k_{in}$  (Reaktion 2.2.5) und der bimolekularen Zerfallsreaktion  $k_{bi}$  (Reaktion 2.2.8; Reaktion 2.2.14 der Herleitung 2.2.2, s. S. 72 ff.) aus Steigung bzw. y-Achsenabschnitt der linearen Anpassungsfunktion (Gl. 2.2.10) bestimmen. Damit wird aus den Daten in Abbildung 2.21b ein  $k_{in}$  von  $4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{bi}$  von  $6,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  erhalten. Folglich stimmt dieses  $k_{bi}$  in hohem Maße mit den Literaturwerten, die in einem Bereich von  $2,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  liegen,<sup>[125–127,135,136,143,144]</sup> überein. Ähnlich ist auch der ermittelte Wert für  $k_{in}$  in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur berichteten  $2,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>[145]</sup> Die unter aeroben Bedingungen aufzeichneten Daten (Abb. 2.24, s. S. 72 ff.) wiesen auch einen monoexponentiellen Zerfall, mit einem  $k_{bi}$  von  $7,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , auf, was lediglich auf einen kleinen Effekt der Oxidation durch  $\text{O}_2$  auf die Kinetik, als Folge der Oxidation von Ti(III) durch Sauerstoff, hindeutet.<sup>[134]</sup> Wenn Sauerstoff direkt mit dem Radikal reagieren würde, wäre Gleichung (2.2.10) nicht mehr gültig und die aeroben Daten ließen sich nicht mit einem monoexponentiellen Zerfall erklären. Damit geht in der Praxis die Erleichterung einher, dass für Prozesse, wie das Prüfen der Mischeffizienz, der Einfluss von  $\text{O}_2$  vernachlässigt werden kann. Bei langsamen Flussraten, die einer Reaktionszeit von ca. 7 ms und länger entsprechen, beginnen die Messwerte aufgrund des Versagens effizienten Mischens, wie es schon in ähnlicher Weise für

die TEMPO-Dithionit-Reaktion beobachtet wurde, von einem monoexponentiellen Zerfall abzuweichen (s. Abs. 2.2.1).

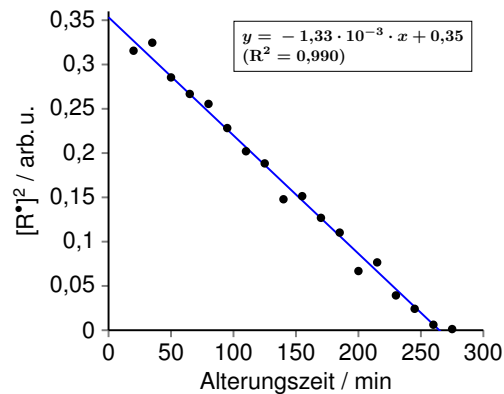


**Abb. 2.22.:** (a) Der Effekt verschiedener  $\text{TiCl}_3$ -Konzentrationen auf  $[R^\bullet]$ . Der lineare Anstieg von  $[R^\bullet]$  mit  $[\text{Ti(III)}]^{1/2}$ , wie nach Gl. (2.2.9) erwartet, ist durch die rote Linie wiedergegeben. (b) Der Effekt von  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  auf  $[R^\bullet]$ . Wenn  $\text{H}_2\text{O}_2$  am Zerfall beteiligt ist, sollte  $[R^\bullet]$  durch Gl. (2.2.9) (blaue Linie) beschrieben werden, was in der Tat der Fall ist.  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ , womit  $[R^\bullet]_{\text{max}}$  erreicht wird, ist durch einen roten Punkt dargestellt. Für Details siehe Text.

Um ferner zu klären, ob die Oxidation/Reduktion des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals mit entweder  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{Ti(III)}$  unter den experimentell untersuchten Bedingungen zu seinem Zerfall beitragen, wurde die Ausgangskonzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{Ti(III)}$  variiert, während die Konzentration des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals beim stets selben Reaktionszeitpunkt (d. h. derselben Flussrate) gemessen wurde (Abb. 2.22). Wenn  $\text{Ti(III)}$  das  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal nicht oxidiert, sollte die Signalintensität des Radikals linear mit  $[\text{Ti(III)}]^{1/2}$  ansteigen (Gl. 2.2.10). Andererseits führt die Anwesenheit jedes weiteren Zerfallswegs des Radikals durch Reduktion/Oxidation mit  $\text{Ti(III)}/\text{Ti(IV)}$  zu einem insgesamt schnelleren Zerfall und einer Abweichung von einer solchen Geraden. Abbildung 2.22a veranschaulicht, dass eine solche Abweichung allerdings nur bei  $\text{Ti(III)}$ -Konzentrationen auftritt, die höher als die für die kinetische Analyse gewählten sind, was die Annahme der Vernachlässigung  $\text{Ti(III)}$ -basierter Zerfallswege unterstützt. Ähnlich kann die Konzentration des Hydroxyethylradikals bei verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Startkonzentrationen zufriedenstellend mit Gleichung 2.2.9), die unter der Annahme hergeleitet wurde, dass keine Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit dem Hydroxyethylradikals auftritt, beschrieben werden. Es zeigt sich nur ein vernachlässigbarer Beitrag von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Radikalzerfall (Abb. 2.22b).

Des Weiteren fußt auf Gleichung (2.2.9), dass durch Änderung der Wasserstoffperoxidkonzentration das Maximum der Hydroxyethylradikal-Konzentration erreicht wird, wenn  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{0,\text{R}^\bullet_{\text{max}}} = (k_{\text{in}} \cdot t)^{-1}$  ist, womit sich ein Wert von  $2,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{\text{in}}$  (Reaktion 2.2.5) ergibt, wenn die Reaktion nicht unter Ausschluss von Luft durchgeführt wird, der nahe dem anaer-

roben Wert von  $4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (s. o.) ist und wiederholt den kleinen Effekt von Luftsauerstoff zeigt (s. Abb. 2.22b und Herleitung in Abs. 2.2.2, s. S. 72 ff.).



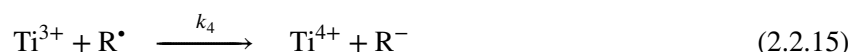
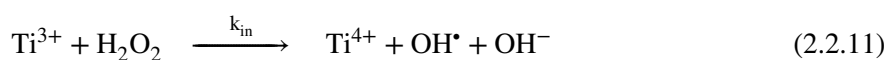
**Abb. 2.23.:** Aufzeichnung des Ti(III)-Zerfalls mittels des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals. Die Konzentration des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals ist bei einem gegebenen Reaktionszeitpunkt proportional zu  $\sqrt{[\text{Ti(III)}]_0}$ , d. h.  $[\text{Ti(III)}]_0 \propto [\text{R}^*]^2$ . Die blaue Anpassungsgerade beschreibt den Zerfall nullter Ordnung.

Während der Arbeiten am Fenton-ähnlichen System fiel auf, dass die Titan(III)chloridlösung recht schnell von ihrem eigentlichen verdünnten Lila verblasste. Es wurde in der Vergangenheit berichtet, dass gelöster Sauerstoff den Gehalt von Titan(III) in der Stammlösung verringert.<sup>[134]</sup> Um die Stabilität der Titan(III)-Reaktandenlösung zu untersuchen, wurden einer Stammlösung (Herstellung wie in Abs. 4.3) nach verschiedenen langen Lagerungszeiten Proben entnommen, um Hydroxyethylradikale zu generieren. Gleichung (2.2.9) zeigt, dass die Konzentration des organischen Radikals bei fixem Reaktionszeitpunkt proportional zu  $\sqrt{[\text{Ti(III)}]_0}$  ist, d. h.  $[\text{Ti(III)}]_0 \propto [\text{R}^*]^2$ . Abbildung 2.23 stellt die Auftragung von  $[\text{R}^*]^2$  gegen die Alterungszeit der Titan(III)-Reaktandenlösung und die lineare Anpassungsgerade, d. h. einen Zerfall nullter Ordnung, dar. Dieses Verhalten deckt sich mit der Annahme, dass die Reaktion zwischen Ti(III) und  $\text{O}_2$  unimolekular in beiden Reaktionsteilnehmern und die Reaktionsgeschwindigkeit begrenzt durch die Diffusion von Luftsauerstoff durch die Oberfläche der Ti(III)-Reaktandenlösung ist. Wenn das Ti(III)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -System für die Kalibrierung eines Flußsystems verwendet werden soll, müssen frische Ti(III)-Lösungen verwendet werden.

Der Hersteller des verwendeten Mischresonators empfiehlt eine maximale Gesamtflussrate von 32 mL/min, da seinen Tests zufolge ab dieser Flussrate ein maximales EPR-Signal erzeugt werden konnte. Höhere Flussraten hätten demnach nur einen höheren Substanzverbrauch zur Folge. Ebenso birgt eine weitere Steigerung die Gefahr, dass sich mischerseitig ein Gegendruck aufbaut, der zum Abplatzen der über Luer-Lock verbundenen Schläuche an den Resonatoreingängen führt. Falls sich diese Schwachstelle nicht als erste löst, könnten Beschädigungen im Inneren des Resonators entstehen, so dass eine Reparatur durch den Hersteller von Nöten wäre. Durch Veränderungen der Elektronikwerkstatt am Mikroprozessor der Spritzenpumpe (u. a. neben  $\frac{1}{8}$  jetzt auch bis zu 1 Schritt pro Puls möglich) konnte die Entleerzeit der Spritzen von ursprünglich 16,24 s auf 2,54 s mehr als gesehelt werden. Dies entspräche einer Gesamtflussrate von 472 mL/min

und einer Reaktionszeit von 176  $\mu\text{s}$ . Bis jetzt wurden diese Werte allerdings nur ohne Verbindung der Spritzen zum Mischer getestet. Selbst wenn der Mischer diese Belastung verkraften würde, bleibt mit etwas mehr als zweieinhalb Sekunden nur ein sehr kurzes Fenster zur Detektion. Für die bis jetzt schnellste Entleerzeit, war es möglich zwei volle Spektren aufzunehmen, da es einen Moment braucht, bis stabile Flussverhältnisse herrschen. Wird die Entleerzeit deutlich kürzer, ist eine vollspektrale kinetische Analyse, zumindest mit dem momentan im Aufbau vorgesehenen Spritzenvolumen von 10 mL, nicht mehr möglich. Zur Lösung dieses Problems wären Spritzen mit größeren Volumen und/oder das Messen der Intensität kleiner Bereiche bis hin zu Punkten des EPR-Spektrums von Nöten.

**Herleitung des Geschwindigkeitsgesetzes** Die für die Bildung von Hydroxyl- und Hydroxyethylradikal zu berücksichtigten Reaktionen lauten:<sup>[133,136]</sup>



Unter Berücksichtigung der Reaktionen (2.2.11)–(2.2.15) folgen die Geschwindigkeitsgesetze (2.2.16)–(2.2.18). Der Ausdruck Eigenrekombination umschreibt die Reaktion (2.2.14), da er beide homobimolekularen Zerfallsprozesse, namentlich Dimerisierung und Disproportionierung, einschließt. In den Reaktionen (2.2.11)–(2.2.15) ist die Oxidation des organischen Radikals durch  $\text{Ti}^{4+}$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  vernachlässigt, da ihre Geschwindigkeitskonstanten (ca.  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>[135–138]</sup>) um Größenordnungen kleiner als die der Eigenrekombination (ca.  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) sind.<sup>[136,137]</sup>

$$-\frac{d[\text{Ti(III)}]}{dt} = k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2] + k_1[\text{OH}^\bullet][\text{Ti(III)}] + k_4[\text{Ti(III)}][\text{R}^\bullet] \quad (2.2.16)$$

$$\frac{d[\text{OH}^\bullet]}{dt} = k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2] - k_1[\text{Ti(III)}][\text{OH}^\bullet] - k_2[\text{OH}^\bullet][\text{RH}] \quad (2.2.17)$$

$$\frac{d[\text{R}^\bullet]}{dt} = k_2[\text{OH}^\bullet][\text{RH}] - 2k_3[\text{R}^\bullet]^2 - k_4[\text{Ti(III)}][\text{R}^\bullet] \quad (2.2.18)$$

Wenn  $k_2[\text{RH}] \gg k_1[\text{Ti(III)}]$  und Quasistationarität für  $\text{OH}^\bullet$  gilt, verkürzt sich Formel (2.2.17)

zu Formel (2.2.19).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{OH}^\bullet]}{dt} &= k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2] - k_1[\text{Ti(III)}][\text{OH}^\bullet] - k_2[\text{OH}^\bullet][\text{RH}] \stackrel{!}{=} 0 \\ k_2 &= \frac{k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2]}{[\text{OH}^\bullet][\text{RH}]} \end{aligned} \quad (2.2.19)$$

Durch Ersetzen von  $k_2$  in Formel (2.2.18), der Annahme von Quasistationarität für  $\text{R}^\bullet$  und Vernachlässigung von negativen Radikalkonzentrationen wird ein Ausdruck für  $[\text{R}^\bullet]$  erhalten (Gl. 2.2.20).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{R}^\bullet]}{dt} &= k_2[\text{OH}^\bullet][\text{RH}] - 2k_3[\text{R}^\bullet]^2 - k_4[\text{Ti(III)}][\text{R}^\bullet] \stackrel{!}{=} 0 \\ 0 &= k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2] - 2k_3[\text{R}^\bullet]^2 - k_4[\text{Ti(III)}][\text{R}^\bullet] \\ 0 &= [\text{R}^\bullet]^2 + \frac{k_4}{2k_3}[\text{Ti(III)}][\text{R}^\bullet] - \frac{k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2]}{2k_3} \\ [\text{R}^\bullet] &= -\frac{k_4[\text{Ti(III)}]}{4k_3} + \sqrt{\frac{k_4^2[\text{Ti(III)}]^2}{16k_3^2} - \frac{k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2]}{2k_3}} \\ [\text{R}^\bullet] &= -\frac{k_4[\text{Ti(III)}]}{4k_3} + \sqrt{\frac{k_4^2[\text{Ti(III)}]^2 - 8k_3k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2]}{16k_3^2}} \\ [\text{R}^\bullet] &= \frac{\sqrt{k_4^2[\text{Ti(III)}]^2 - 8k_3k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2]} - k_4[\text{Ti(III)}]}{4k_3} \end{aligned} \quad (2.2.20)$$

Weiter vereinfacht sich Gleichung (2.2.16) unter der Annahme, dass  $k_4$  vernachlässigbar ist. Diese Annahme ist durch die Wahl einer  $\text{Ti(III)}$ -Konzentration unterhalb des Bereiches, in dem Reduktion des organischen Radikals durch  $\text{Ti(III)}$  auftritt, gerechtfertigt (s. o., Abs. 2.2.2, S. 68 ff.). In diesem Fall wird das gesamte  $\text{Ti(III)}$  in der Initiationsreaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  verbraucht (Gl. 2.2.11), was für  $\text{Ti(III)} \ll \text{H}_2\text{O}_2$  ein geläufiger Zerfall pseudo-erster Ordnung wäre.<sup>[136]</sup>

$$-\frac{d[\text{Ti(III)}]}{dt} = k_{\text{in}}[\text{Ti(III)}][\text{H}_2\text{O}_2] + k_1[\text{OH}^\bullet][\text{Ti(III)}] + k_4[\text{Ti(III)}][\text{R}^\bullet] \quad | \text{ mit } [\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_0$$

$$[\text{Ti(III)}] = [\text{Ti(III)}]_0 \cdot e^{-k_{\text{in}}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 t} \quad (2.2.21)$$

Entsprechend folgt aus Gleichung (2.2.20):

$$[\text{R}^\bullet] = \sqrt{\frac{k_{\text{in}}[\text{H}_2\text{O}_2]_0[\text{Ti(III)}]_0 \cdot e^{-k_{\text{in}}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 t}}{2k_3}} \quad (2.2.22)$$

Die Anwendung des Quasistationaritätsprinzips von Bodenstein, nach dem die zeitliche Änderung der Konzentration vernachlässigbar wird, ist gerechtfertigt, wenn  $k_2 < k_3$ .

Alternativ lässt sich der Ausdruck (2.2.22) auch aus Gleichung (2.2.18) unter der Annahme eines stationären Zustands für  $R^\bullet$  und Einsetzen der Formeln (2.2.21) und (2.2.19) erhalten (Gl. 2.2.22).

$$\frac{d[R^\bullet]}{dt} = k_2[OH^\bullet][RH] - 2k_3[R^\bullet]^2 - k_4[Ti(III)][R^\bullet] \stackrel{!}{=} 0 \quad | \text{ mit (2.2.21) und (2.2.19)}$$

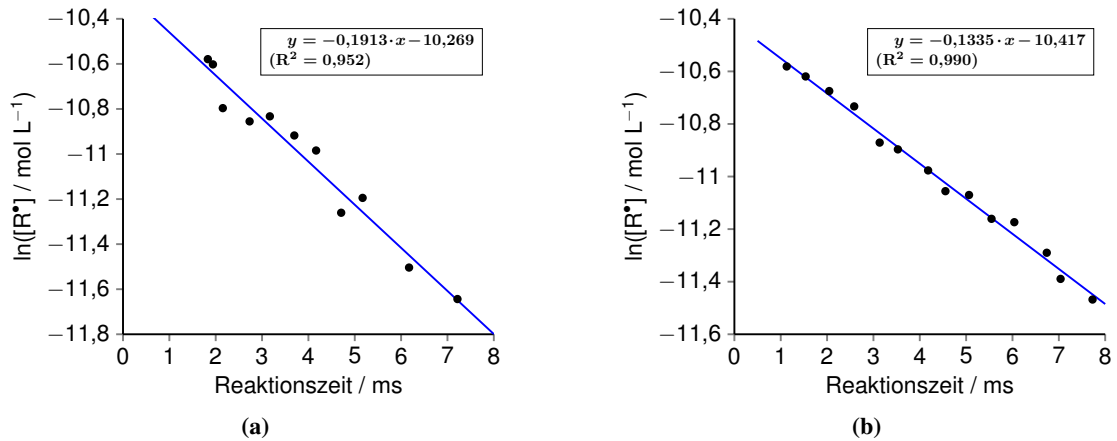
$$[R^\bullet] = \sqrt{\frac{k_{in}[H_2O_2]_0[Ti(III)]_0}{2k_3}} \cdot e^{-k_{in}[H_2O_2]_0 t/2} \quad (2.2.22)$$

Durch die Auftragung von  $\ln[R^\bullet]$  gegen  $t$ , können die Geschwindigkeitskonstanten der Initiationsreaktion zwischen Ti(III) und  $H_2O_2$ ,  $k_{in}$  und des bimolekularen Zerfalls von  $R^\bullet$ ,  $k_3$  alias  $k_{bi}$ , von der Steigung bzw. des y-Achsenabschnitts der linearen Regression bestimmt werden (Gl. 2.2.23; entspricht Gl. 2.2.10 s. o., S. 68 ff.). Die extrapolierte „Anfangskonzentration“ des Hydroxyethylradikals kann als 30  $\mu\text{M}$  abgeschätzt werden. Mit dieser Methode ergibt sich aus den experimentellen Daten eine Zerfallskonstante  $k_3$  von  $6,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit den Literaturwerten, die im Bereich von  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  liegen.<sup>[124–127,135,136,144]</sup> Wenn das Experiment unter aeroben Bedingungen ausgeführt wird, ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung von  $191 \text{ s}^{-1}$  (s. Abb. 2.24), im Gegensatz zu  $134 \text{ s}^{-1}$  unter anaeroben Bedingungen, was nur einen kleinen Einfluss von Sauerstoff bedeutet.

$$\ln[R^\bullet] = \underbrace{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{k_{in}[Ti(III)]_0[H_2O_2]_0}{2k_3} \right)}_{\text{y-Achsenabschnitt (b)}} - \underbrace{\frac{k_{in}[H_2O_2]_0}{2}}_{\text{Steigung (m)}} \cdot t \quad (2.2.23)$$

$$k_{in} = -\frac{2m}{[H_2O_2]_0} \quad k_3 = \frac{k_{in}[Ti(III)]_0[H_2O_2]_0}{2e^{2b}}$$





**Abb. 2.24.:** Auftragung der logarithmierten Konzentration des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals gegen die Reaktionszeit für (a) aerobe und (b) Argon-Bedingungen

$k_{in}$  kann über das Maximum der Konzentration des Alkoholradikals, wenn  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$  variiert wird (Gleichung 2.2.9), bestimmt werden.

$$\begin{aligned} \frac{d}{d[\text{H}_2\text{O}_2]_0} [\text{R}^*] &= \frac{d}{d[\text{H}_2\text{O}_2]_0} \left( \sqrt{\frac{k_{in}[\text{H}_2\text{O}_2]_0[\text{Ti(III)}]_0}{2k_3}} \cdot e^{-k_{in}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 t/2} \right) \\ &= \sqrt{\frac{k_{in}[\text{Ti(III)}]_0}{2k_3}} \frac{1}{2\sqrt{[\text{H}_2\text{O}_2]_0}} \cdot e^{-k_{in}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 t/2} \\ &\quad - \frac{k_{in}t}{2} e^{-k_{in}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 t/2} \cdot \sqrt{\frac{k_{in}[\text{H}_2\text{O}_2]_0[\text{Ti(III)}]_0}{2k_3}} \end{aligned} \quad (2.2.24)$$

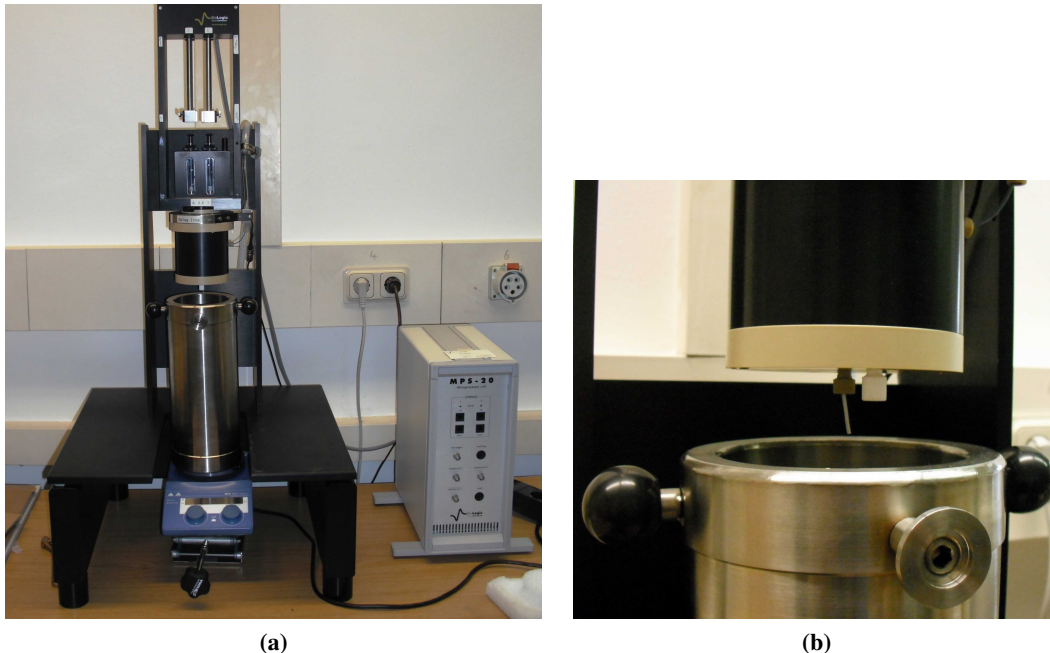
$$0 = \underbrace{\sqrt{\frac{k_{in}[\text{Ti(III)}]_0}{2k_3}} e^{-k_{in}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 t/2}}_{\neq 0} \cdot \underbrace{\left( \frac{1}{2\sqrt{[\text{H}_2\text{O}_2]_0}} - \frac{k_{in}t}{2} \sqrt{[\text{H}_2\text{O}_2]_0} \right)}_0$$

$$\frac{k_{in}t}{2} \sqrt{[\text{H}_2\text{O}_2]_0} = \frac{1}{2\sqrt{[\text{H}_2\text{O}_2]_0}}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{0,[\text{R}^*]_{\max}} = \frac{1}{k_{in}t} \Rightarrow k_{in} = \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{0,[\text{R}^*]_{\max}} t} \quad (2.2.25)$$

### 2.2.3. Kalibrierung des RFQ-Gerätes

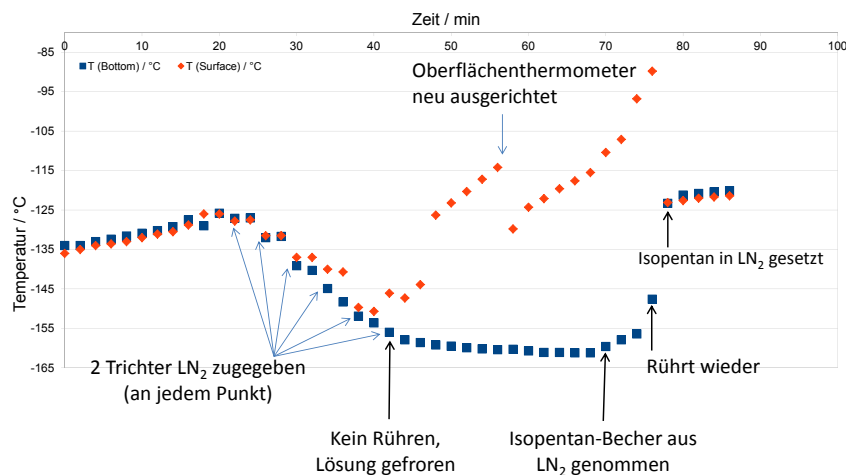
Das verwendete *Rapid Freeze Quench*-Gerät ist das BioLogic SFM-20, das es erlauben soll Zeitpunkte ab etwa 10 ms Reaktionszeit zu untersuchen. Es besteht aus einer Rahmenkonstruktion und einem computergesteuertem Motor (Abb. 2.25a). Am Gestell sind die Spritzenbefestigungen, mit der Möglichkeit entweder zwei 1-mL- oder zwei 2,5-mL-Spritzen aufzunehmen und das Mischerteil befestigt. Die Spritzen werden von einem motorgetriebenen Rammbock, der auch am Gestell angebracht ist, befördert. Die Geschwindigkeit der Ramme und die daraus resultierende Flussgeschwindigkeit kann im entsprechenden Steuerprogramm des PCs ebenso wie die Verweilzeit der gemischten Reaktionslösung im Auslass vorgegeben werden. Mit einem Gasstoß wird anschließend die Reaktionslösung in das unter der Mischereinheit platzierte Isopentan-Kältebad geschossen (Abb. 2.25b). Die gesamte Reaktionszeit der Probe setzt sich endgültig aus Mischzeit und eventueller Verweilzeit, Flugzeit und Frierzeit zusammen (s. u. Formel 2.2.26).



**Abb. 2.25.:** (a) RFQ-Gerät bestehend aus Gestell mit Mischer und Spritzenmotor. Unterhalb des Mixers befindet sich das Kältebad, das auf einem Magnetrührer steht. (b) Vergrößerung des Mischerauslasses.

Vor den eigentlichen Arbeiten wurde das Verhalten des Isopentan-Kältebades getestet. Es besteht aus einem Isoliermantel der mittels Turbomolekularpumpe evakuiert wurde. Darin wird ein Metallbecher gestellt, der Isopentan und einen Rührfisch entsprechender Größe beinhaltet. Diese Konstruktion wird auf einen hinreichend starken Magnetrührer gestellt. In den Zwischenraum von Isoliermantel und Metallbecher wird solange flüssiger Stickstoff mit Hilfe eines Teflon-Trichters geschüttet, bis das Isopentanbad die gewünschte Temperatur hat. Währenddessen wird mit einem Thermometer die Temperatur am Boden des Isopentanbades kontrolliert, um sicherzustellen, dass die Temperatur  $-140\text{ °C}$  nicht unterschreitet. Falls dies geschieht, beginnt das

Isopentan (Schmelzpunkt  $-159,9\text{ °C}$ ) eine kleberartige Konsistenz zu bekommen und schließlich zu frieren. Das hat zur Folge, dass der Rührfisch am Boden festfriert und die Bodentemperatur sich dem Gefrierpunkt von Isopentan nähert, während die Temperatur an der Oberfläche des Kältebades steigt (Abb. 2.26). Wird dies frühzeitig bemerkt, kann versucht werden den Rührfisch mit Hilfe eines (magnetischen) Stabes zu befreien. Andernfalls wird das innere Metallgefäß aus dem Isoliermantel auf den Magnetrührer gesetzt, bis sich der Rührfisch wieder zu drehen beginnt. Dieser Versuch stellte auch die gute Funktionsweise des Isoliermantels unter Beweis. Der Wärmetransport erfolgt hauptsächlich über Konvektion, während Wärmeleitung und -strahlung vernachlässigbar sind.



**Abb. 2.26.:** Test des Temperaturverhaltens des Isopentankältebades. Die Boden- und Oberflächentemperatur sind in blauen und orangefarbenen Punkten wiedergegeben. Solange sich der Rührfisch im Isopentan dreht, sind Boden- und Oberflächentemperatur ähnlich (Zeit: 0–40 Minuten). Erfolgt die Zugabe von flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>) in zu kurzen Zeitabständen, beginnt das Isopentan am Boden des Gefäßes zu frieren. Dies geschah im Versuch bei  $-156\text{ °C}$ . Die Werte der Temperaturen an Boden und Oberfläche laufen zunehmend auseinander (Zeit: 42–76 Minuten). Sobald der Rührfisch von neuem dreht, stellt sich schnell ( $\approx 2$  Minuten) das Temperaturgleichgewicht wieder her (Zeit: 78–86 Minuten).

Die Erfahrung zeigt, dass für einen Tag Arbeit am RFQ-Gerät eine 2,5 L-Flasche Isopentan, 3 L bis 4 L flüssiger Stickstoff für das anfängliche Runterkühlen des Isopentans und je ein weiterer Liter je erstellter Probe benötigt werden. Zu Anfang empfiehlt es sich das Isopentanbad zur Hälfte zu füllen und zu kühlen, um schnell die Geruchsbelästigung durch Isopentan zu minimieren. Danach wird weiter mit Isopentan aufgefüllt und gekühlt bis sich der Flüssigkeitsstand etwa ein bis zwei Zentimeter unterhalb des Randes befindet. Eine Rührgeschwindigkeit des Isopentanbades von 390 Umdrehungen pro Minute stellte sich als Optimum heraus. Bei einer Oberflächentemperatur von  $-125\text{ °C}$  bzw. Bodentemperatur von  $-140\text{ °C}$  ist das Kältebad fertig vorbereitet.

Die Probenröhrchen werden in einem trichterförmigen Probenhalter mit Hilfe einer Klemmringverschraubung befestigt. Aufgrund der Abmessungen des inneren Metallgefäßes müssen die üblichen X-Band EPR-Röhrchen von 25 cm um etwa fünf bis sechs Zentimeter auf 19 bzw. 20 cm

gekürzt werden, damit sie nicht mit dem Rührfisch des Isopentanbades kollidieren. Um die Temperatur des Isopentans im Trichter weiter zu senken, kann vor jedem Schuss vorsichtig ein wenig flüssiger Stickstoff hineingegeben werden, bis  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder sogar  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Trichter erreicht sind. Das Kältebad samt Probenhalter wird unter der RFQ-Apparatur auf einem zweiten Rührer platziert, die gemischte Reaktionslösung ins Kältebad mittig in den Trichter geschossen und anschließend das Kältebad zum Sammeln der Probe auf den Rührer vor der RFQ-Apparatur gestellt. Der Auslass (*ejection delay line*, EDL) der Mischereinheit wird nach jedem Schuss mit einem Stickstoffgasstoß gespült. Der zeitliche Abstand zwischen dem eigentlichen Schuss und der Reinigung der EDL sollte lang genug gewählt sein (min. 5 s bis 10 s), um das Kältebad zu entfernen.

Die entstehenden gefrorenen Probenpartikel werden mit Hilfe eines Teflon-Stabes in das EPR-Röhrchen gestopft. Es sollte sich schlussendlich so viel Probensubstanz, aber so wenig Isopentan wie möglich im EPR-Rohr befinden. Eine höhere Packungsdichte der Probe resultiert in einer größeren EPR-Signalintensität. Je nach Flussrate kann es von Nöten sein, die geschossene Probenmenge zu verändern, um zu leichte, auf der Oberfläche schwimmende Partikel zu vermeiden. Das Sammeln der Partikel kann unter zur Hilfenahme einer Teflon-Pinzette erleichtert werden. Der Fortschritt des Sammelns und die Dichte der Packung können durch kurzes Abheben des Trichters aus dem Isopentanbad überprüft werden.

Ein Verbrauch von  $400\text{ }\mu\text{L}$ , d. h.  $200\text{ }\mu\text{L}$  pro Reaktand, sollten eine ausreichende Menge darstellen, um ein EPR-Rohr entsprechend zu füllen. In der Regel wurden  $52,5\text{ }\mu\text{L}$  pro Reaktand und Schuss verwendet. Wenn kein nennenswerter Verlust beim Sammeln der Probenpartikel auftritt, reichen zwei Schüsse zum Erstellen einer Probe aus. Wie weiter oben erwähnt, war es, abhängig von der Flussrate, öfter von Vorteil das doppelte Volumen ( $104\text{ }\mu\text{L}$ ) pro Schuss zu verwenden, um entsprechend schwere Partikel zu produzieren.

Ist die Probe gepackt, wird, um Kreuzverunreinigungen zwischen Proben unterschiedlicher Reaktionszeit zu verhindern, das Isopentan im Trichter verworfen und gegen frisches ersetzt. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die Hauptmenge des Isopentans, aus dem Bereich unterhalb des Trichters, wiederverwendet werden kann. Die Probe wird aus dem Trichter entfernt, in flüssigem Stickstoff gelagert und der Trichter für den nächsten Einsatz gereinigt. Für den Fall, dass der Verschluss des Trichters sich nicht oder nur sehr schwer öffnen lässt, sollte er mit einem Föhn auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Für die Experimente mit MetMb ( $0,5\text{ mM}$ ) und den Liganden Azid ( $12,5\text{ mM}$ ) bzw. Imidazol ( $50\text{ mM}$ ) wurden für acht Proben  $2\text{ mL}$  bzw.  $1,8\text{ mL}$  und für fünf Häm/ HB 1-Proben  $2,2\text{ mL}$  (ca.  $600\text{ }\mu\text{M}$ ) pro Reaktand benötigt. Um eine entsprechende Anzahl an Proben pro Zeit herstellen zu können, ist ein entsprechendes Maß an Erfahrung der Abläufe und Handhabung des RFQ-Aufbaus erforderlich. Entsprechend dauert dann das Erstellen einer Probe zwischen 20 und 50 Minuten.

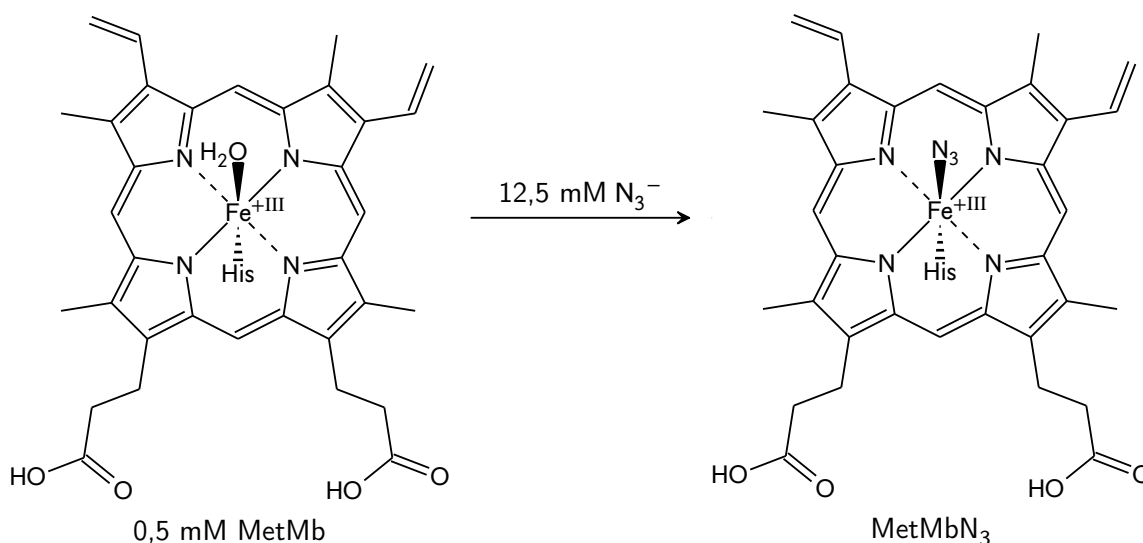
Der Abstand zwischen dem Auslass des RFQ-Gerätes ( $0,5\text{ mm}$  Innendurchmesser,  $19\text{ }\mu\text{L}$  Volumen) und der Oberfläche des Kältebades betrug etwa  $2\text{ cm}$  bis  $2,5\text{ cm}$ . Durch Verringerung dieses Abstandes kann die Flugzeit und damit die Reaktionszeit bis zu einem gewissen Grad ver-

kürzt werden. Unter der Annahme, dass der Tropfen auf diesem Weg sich durch einen Zylinder mit den Radius des Auslasses bewegt, lässt sich die Flugzeit aus der Flussrate (mL/s) berechnen (Formel 2.2.26).

$$\tau_{\text{Flug}} = \frac{V_{\text{Zylinder}}}{\text{Flussrate}} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot h}{\text{Flussrate}} = \frac{\pi \cdot 0,25^2 \cdot 25}{\text{Flussrate}} \text{ [ms]}$$

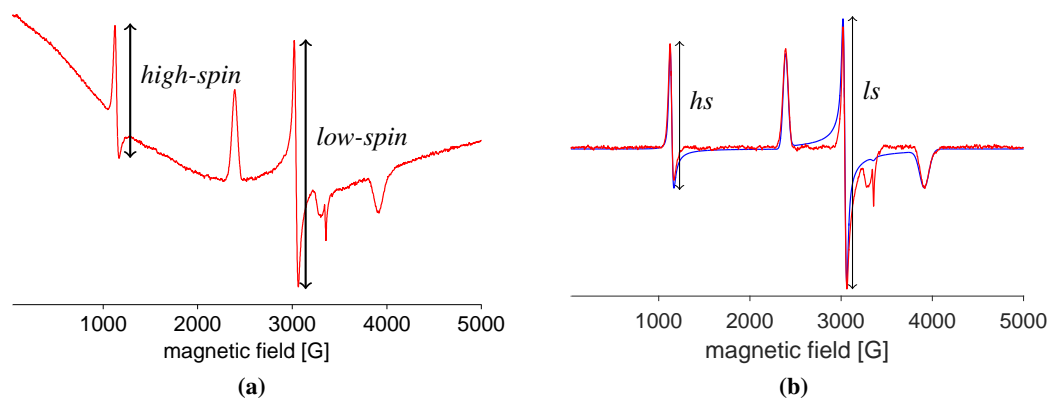
$$\tau_{\text{total}} = \tau_{\text{EDL}} + \tau_{\text{Flug}} + \tau_{\text{frier}} \quad (2.2.26)$$

Zur Kalibrierung des RFQ-Gerätes mittels EPR-Spektroskopie wurde die literaturbekannte Reaktion von MetMb mit Natriumazid verwendet,<sup>[153–157]</sup> die auch (bei niedrigerem pH-Wert) für die Kalibrierung von MHQ-Geräten (*Microsecond Hyper-freeze Quenching*) genutzt wurde.<sup>[158,159]</sup> Dabei wird das Wassermolekül an der sechsten Koordinationsstelle des Hämins im MetMb durch Azid ausgetauscht (Abb. 2.27). Das *cw* X-Band EPR-Spektrum zeigt dabei einen Übergang vom wasserkoordinierten *high-spin*-Komplex ( $g_{\perp} = 5,84$ ) zum azidgebundenen *low-spin*-Komplex ( $g_{xx} = 2,81$ ,  $g_{yy} = 2,21$  und  $g_{zz} = 1,71$ ) (Abb. 2.28; für die EPR-Spektren des Anfang- und Endzustands s. Abb. 2.1, S. 31 f.). Das Verhältnis aus *low*- zu *high-spin*-Komplex nimmt für fortschreitende Reaktionszeit zu und kann als Maß für den Reaktionsfortschritt dienen (Formel 2.2.27).



**Abb. 2.27.:** Reaktionsschema der Ligationsreaktion von MetMb durch  $\text{NaN}_3$ . Zur Vereinfachung ist nur das Häm *b* gezeigt und seine Koordination an das Proteingerüst durch Histidin angedeutet. Die Konzentrationen der Edukte sind vermerkt.

Da das Azid im Überschuss zum MetMb eingesetzt wird, kann die Reaktion als pseudo-erster Ordnung in MetMb betrachtet werden. Ist die Konzentration eines Reaktanden verglichen zu den anderen Reaktanden sehr groß oder sehr klein, kann die zeitliche Änderung der Konzentration dieses Reaktionsteilnehmers über den Verlauf der Reaktion als nahezu konstant betrachtet



**Abb. 2.28.:** *cw* X-Band EPR-Spektrum der MetMb-N<sub>3</sub><sup>-</sup>-Reaktion bei einer Alterungszeit von 30 ms (0,8 mL/s Flussrate) bei 19 K (Messparameter s. Abs. 4.2 Tab. 4.1). Die Pfeile zeigen die Intensität der Linien für den *high-spin*- (*hs*) und *low-spin*-Zustand (*ls*). Die Packung der Probe hat einen Einfluss auf die Grundlinie des Spektrums, weshalb die (a) Original- und (b) hintergrundkorrigierten Daten angegeben sind. Die blaue Linie zeigt die *EasySpin*-Simulation für den *high*- ( $S = 5/2$ ) und *low-spin*-Zustand ( $S = 1/2$ ) mit  $g$ -Tensoren von [5,91 2,00] bzw. [2,81 2,21 1,72] und Voigt'scher Linienbreite in mT (Gauß, Lorentz) von [2,4 1,6] bzw. [3,1 0] (Gewichtung *hs*/*ls* 1:213).

werden (Bodenstein'schen Quasistationaritätsprinzip). Dementsprechend kann die eigentlich bimolekulare Reaktion (also zweiter Ordnung:  $v = k[\text{MetMb}][\text{Azid}]$ ) von MetMb und Azid als pseudo-erster Ordnung ( $v = k'[\text{MetMb}]$  mit  $k' = k[\text{Azid}]$ ) betrachtet werden. Der Einfachheit halber wird im Folgenden  $k$  für die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung verwendet und, wenn zwischen (pseudo-)erster und zweiter Ordnung unterschieden werden soll, von  $k_{1\text{st}}$  und  $k_{2\text{nd}}$  gesprochen. Zur Analyse der Kinetik wird die Intensität des *high-spin*-Zustandes zum Zeitpunkt Null und  $t$  als  $h_0$  und  $h_t$  definiert. Da sich der *high-spin*- mit zunehmender Reaktionszeit in den *low-spin*-Zustand  $l_t$  umwandelt, ist seine Abnahme proportional zu  $e^{-kt}$ . Ist die Reaktion vollständig abgeschlossen, liegen alle MetMb-Moleküle im *low-spin*-Zustand vor (Zeitpunkt  $l_\infty$ ). Das Verhältnis von *high*- zu *low-spin*-Zustand zum Zeitpunkt  $t$  und für den Maximalzustand (nur *high*- oder nur *low-spin*-Zustand,  $h_0$  bzw.  $l_\infty$ ) ist  $R_t$  bzw.  $R$ . Dabei wird das Verhältnis  $R$  aufgrund der unterschiedlichen Intensitäten bzw. Sättigungs- und Relaxationsverhalten pro Molekül im *high*- bzw. *low-spin*-Zustand benötigt. Im Handbuch „ $\mu\text{MIX}$  &  $\text{FREEZE ACCESSORY}$ “ wird  $R$  mit einem Wert von 13 angegeben (bei 12 K). Darüber wird ein relativer Ausdruck für den Umsatz der Reaktion erhalten. Es ist kein externer Standard von Nöten, da nur das Verhältnis von *high*- zu *low-spin*-Zustand, das jedem einzelnen Spektrum entnommen werden kann, von Interesse ist (Formel 2.2.27).

$$\frac{l_t}{l_\infty} = 1 - e^{-k \cdot t} \quad \Leftrightarrow \quad l_t = l_\infty \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

$$\frac{h_t}{h_0} = e^{-k \cdot t} \quad \Leftrightarrow \quad h_t = h_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad | : l_t$$

$$\frac{h_t}{l_t} = \frac{h_0}{l_\infty} \frac{e^{-k \cdot t}}{(1 - e^{-k \cdot t})} = \frac{h_0}{l_\infty} \frac{e^{-k \cdot t}}{e^{-k \cdot t} (e^{k \cdot t} - 1)} = \frac{h_0}{l_\infty} \cdot \frac{1}{e^{k \cdot t} - 1} \quad | R_t \equiv \frac{h_t}{l_t} \wedge R \equiv \frac{h_0}{l_\infty}$$

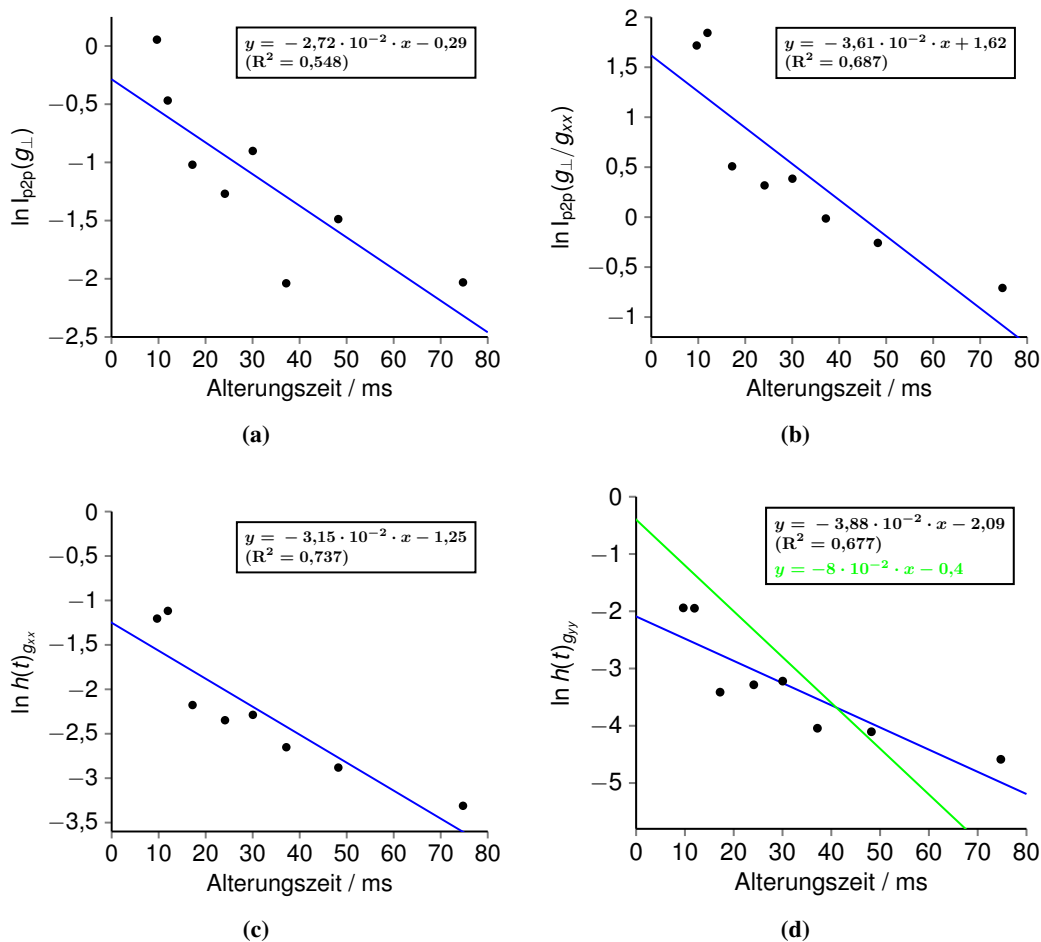
$$R_t = R \frac{1}{e^{k \cdot t} - 1} \quad | : R$$

$$\frac{R_t}{R} = \frac{1}{e^{k \cdot t} - 1} \quad \Leftrightarrow \quad \frac{R}{R_t} = e^{k \cdot t} - 1 \quad | + 1$$

$$e^{k \cdot t} = \frac{R}{R_t} + 1 = \frac{R + R_t}{R_t} \quad \Leftrightarrow \quad \boxed{e^{-k \cdot t} = \frac{R_t}{R + R_t}} \quad (2.2.27)$$

In der Literatur finden sich allerdings genauso Fälle, in denen nur die Intensität des *high-spin*-Zustands ( $k_{2\text{nd}}$  von  $1390 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit  $0,2 \text{ mM}$  MetMb und  $50 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ <sup>[160]</sup> und  $k_{1\text{st}}$  von  $2690 \text{ s}^{-1}$  und  $3530 \text{ s}^{-1}$ <sup>[154]</sup> mit  $0,5 \text{ mM}$  MetMb  $12,5 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ ) oder das Verhältnis der Intensitäten von *high-spin*-Signal zum Zeitpunkt Null und  $t$  ( $k_{2\text{nd}}$  von  $1,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit  $12,5 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  und  $2,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit  $6,25 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ <sup>[156]</sup> und jeweils mit  $0,5 \text{ mM}$  MetMb) zur Auswertung genutzt wurde. Die Gruppe um Bennati,<sup>[153]</sup> die die Auswertung nach Formel (2.2.27) durchführte, erhält Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung von ca.  $6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Da es sich bei diesen verschiedenen Arten der Auswertungen im Prinzip nur um Normierungen handelt, sollte die Steigung der Auftragung und damit die Reaktionsgeschwindigkeit vergleichbar sein. Allerdings ist die größte Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung fast um einen Faktor fünf größer als der kleinste Wert für  $k_{2\text{nd}}$ . Die aus den vorliegenden Messdaten bestimmten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten liegen zwischen  $4,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Abb. 2.29a,  $\tau_{\text{frier}} = 10,6 \text{ ms}$ ) und  $6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Abb. 2.29d,  $\tau_{\text{frier}} = 53,6 \text{ ms}$ ) und sind damit in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Die Werte in Abbildung 2.29c und Abbildung 2.29d wurden durch die Auswertung nach Formel (2.2.27) erhalten. Die ermittelten Frierzeiten scheinen mit  $40 \text{ ms}$  bis  $50 \text{ ms}$  deutlich zu groß zu sein. Da die Spektren nicht bei  $12 \text{ K}$  wie im Falle des  $\mu\text{MIX}$ -Handbuchs, sondern bei  $19 \text{ K}$  aufgenommen wurden, kann dieses einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, da  $R$  temperaturabhängig sein sollte. Wird  $R$  auf ein Zehntel des Referenzwertes von  $13$  gesetzt, verringern sich die Werte für die Frierzeiten in Abbildung 2.29c und Abbildung 2.29d zu  $9,8 \text{ ms}$  ( $k_{2\text{nd}} = 2,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und  $17,0 \text{ ms}$  ( $k_{2\text{nd}} = 4,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Mit einem selbstbestimmten Wert für  $R$  von  $7,8$  ergeben sich folglich für die Abbildung 2.29c und Abbildung 2.29d Frierzeiten von  $31,0 \text{ ms}$  ( $k_{2\text{nd}} = 4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und  $43,5 \text{ ms}$  ( $k_{2\text{nd}} = 6,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Das zeigt auch, dass sehr drastische Änderung von  $R$  auftreten müssen, um

die hohen Werte der Frierzeit, die nach der Auswertung mit Formel (2.2.27) entstehen zu erklären. Um 5 ms Frierzeit zu erhalten, müsste die Steigung der Ausgleichsgerade und damit die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt werden (Abb. 2.29d). Die in der Literatur berichteten Werte für die Frierzeit liegen im Bereich von 2 ms bis 10 ms. Das im vorliegenden Versuchsaufbau verwendete Kältebad hatte mit mindestens  $-125\text{ °C}$  eine Temperatur, die ähnlich niedrig oder sogar niedriger als für die in der Literatur berichteten Fälle war. Das sollte eine entsprechend schnelle Abkühlung der Probenpartikel gewährleisten, so dass ein Wert von etwa fünf Millisekunden für die Frierzeit realistisch erscheint.



**Abb. 2.29.:** Verschiedene Auswertungen der MetMb- $\text{NaN}_3$ -Reaktionskinetik anhand (a) der Intensität des *high-spin*-Signals ( $g_{\perp}$ ), (b) dem Verhältnis der Intensitäten aus *high*- und *low-spin*-Signal ( $g_{xx} = 2,81$ ), (c) Formel (2.2.27) mit  $g_{xx} = 2,81$  und (d) Formel (2.2.27) mit  $g_{yy} = 2,21$ . Die *ageing time* bzw. Reaktionszeit ist hier die Summe aus Misch- und Flugzeit. Der Schnittpunkt der linearen Anpassungsfunktion mit der  $x$ -Achse ergibt einen Versatz, die Frierzeit: Für (a) 10,6 ms, (b) 44,9 ms, (c) 40,3 ms und (d) 53,6 ms – die entsprechenden  $k_{2\text{nd}} / 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  sind für (a) 4,3, (b) 5,8, (c) 5,0 und (d) 6,2. In Auftragsung (d) wurde die Steigung der grünen Gerade so gewählt ( $k_{2\text{nd}} = 12,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), dass sie in einer Frierzeit von 5 ms resultiert.



In einem weiteren Experiment wurde versucht das sehr giftige Azid gegen eine weniger schädliche Substanz zu ersetzen und damit eine alternative Kalibrierungsreaktion zu haben. Die Wahl fiel dabei auf die starke Base Imidazol, das das *high-spin*-Eisenion komplexiert und dadurch in seinen *low-spin*-Zustand überführt. Da die Affinität von Imidazol zum Fe(III) etwa dreimal geringer als die von  $\text{NaN}_3$  ist,<sup>[161]</sup> wurde mit 50 mM ein entsprechend größerer Ligandenüberschuss gewählt (größeres  $k'$ , s. o.).<sup>[162]</sup> Die Proben, die am RFQ-Gerät erstellt wurden, zeigten keine stetige Verkleinerung des *high-* zu *low-spin*-Verhältnisses im untersuchten Bereich von Reaktionszeiten (von 10 ms bis etwa 75 ms *ageing time*). Um den *R*-Wert für MetMb-Imidazol zu bestimmen, wurde eine MetMb-Probe für 45 Minuten mit dem entsprechenden Überschuss an Imidazol inkubiert und trotzdem war nach dieser Zeit immer noch ein kleiner Anteil an *high-spin*-Zustand vorhanden. In der Literatur findet sich ein Wert für die Geschwindigkeitskonstante von  $3,5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Somit ist die Ligandenaustauschreaktion am MetMb mit Azid etwa 2000-mal schneller als mit Imidazol.<sup>[162,163]</sup> Die Versuche mit Imidazol zeigten eine, verglichen mit Azid, zu geringe Reaktionsgeschwindigkeit, um als RFQ-Kalibrierungsreaktion geeignet zu sein.

Um Reaktionszeiten im Submillisekundenbereich zu erreichen, kommen nicht kommerzielle MHQ-Geräte zum Einsatz. Bei den wenigen bekannten Beispielen wird die gemischte Reaktionslösung in hoher Geschwindigkeit auf eine auf Flüssig-Stickstoff-Temperatur gekühlte Metalloberfläche gesprüht. Es werden Reaktionszeiten runter bis zu  $50 \mu\text{s}$ <sup>[158]</sup> oder ca.  $100 \mu\text{s}$ <sup>[159]</sup> ermöglicht. Beim letztgenannten Gerät der de Vries-Gruppe aus Delft kamen zur Analyse der Proben UV-Vis-,<sup>[164,165]</sup> EPR-,<sup>[159,165]</sup> und Resonanz-Raman-Spektroskopie<sup>[166]</sup> zum Einsatz. Die sehr kurzen Reaktionszeiten werden durch den Einsatz von Mikromischern sowie 77 K kalten Metalloberflächen möglich, wodurch Misch- und Frierzeit deutlich reduziert werden. Probleme treten u. a. beim Sammeln der Probe auf oder wenn die Probe auf rotierende Kupferräder gesprüht wird, da so eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Proben kupferkontaminiert sind. Die MHQ-Anlage des Forschungszentrums caesar (Center of Advanced European Studies and Research) wurde dereinst von Mitarbeitern der Technischen Universität Delft erdacht und durch Mitarbeiter des caesar nachgebaut. Damit können Reaktionszeiten bis runter zu  $85 \mu\text{s}$  aufgenommen werden, womit es zu den zu den schnellsten „freeze quench“-Systemen der Welt gehört.

#### 2.2.4. Kinetik der Interaktionen in Hemin-Peptid/Protein-Komplexen

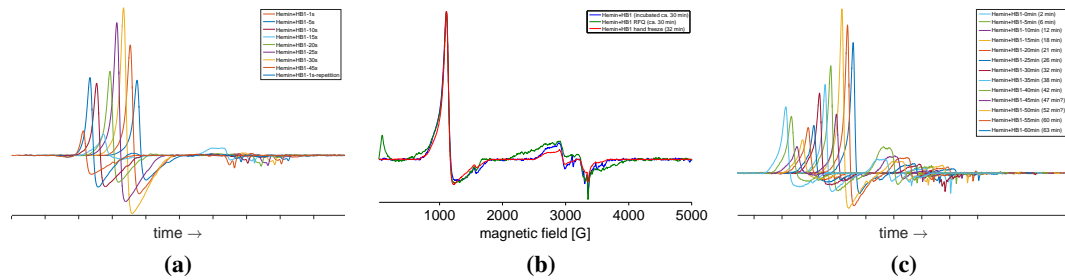
Die RFQ-Technik wurde bereits zur Untersuchung von Intermediaten in Hämproteinen so z. B. für die NO-Bindung an MetMb unter anaeroben Bedingungen mit Resonanz-Raman-Spektroskopie eingesetzt.<sup>[167]</sup> Die Konzeption in der vorliegenden Arbeit war Informationen über die Bindungskinetik der bereits mit EPR-Spektroskopie untersuchten Peptide und Proteine (s. Abs. 2.1) zu erhalten. Um ähnlich wie bei der Ligationsreaktion von  $\text{NaN}_3$  an MetMb eine Umwandlung des freien *high-spin*-Hämins in den gebundenen *low-spin*-Zustand verfolgen zu können, wurde das cysteinbasierte Peptid HB1 ausgesucht (Abb. 2.4c). Das *cw* X-Band EPR-Spektrum von HB1 weist deutlich größere Anteile des *low-* als *high-spin*-Zustandes auf. Für die kinetischen Untersuchungen wurde ein HB1 mit acetyliertem N-Terminus verwendet, was zur Unterscheidung

HB1<sup>syn</sup> genannt wird (H-HELVCAAST-NH<sub>2</sub> vs. Ac-HELVCAAST-NH<sub>2</sub>).

Das *cw* X-Band EPR-Spektrum von HB1<sup>syn</sup> zeigte nach den üblichen 30 Minuten Inkubationszeit sowohl weniger gebundenes Hämin, als auch weniger intensive *low-spin*-Signale, als HB1. Die RFQ-Proben wurden in einem Bereich von Reaktionszeiten zwischen 10 ms und 500 ms erstellt (Abb. 2.30a). Es zeigt sich kein Anstieg der *low-spin*-Signalintensität mit zunehmender Reaktionszeit. So scheint sich der Häminbindungsprozess durch das Peptides vielmehr im Sekunden- und Minuten- denn im Millisekundenbereich abzuspielen. Ebenso auffällig war, dass die Kontrollprobe, die nach dem Erstellen aller gewünschten Proben am Ende des Experiments als Reproduktion der ersten Probe gedacht war, nicht dasselbe Ergebnis wie die erste Probe zeigte. Da dies auch auf etwaige Instabilität des Peptides oder Hämins über Stunden hindeuten kann, wurde dies überprüft. Einer Häminstammlösung, die durch Aluminiumfolie vor Sonnenlicht geschützt war, wurden über einen Zeitraum von vier Stunden Proben entnommen und im EPR-Spektrometer vermessen. Die Signalintensitäten dieser Proben zeigten keine deutliche Abnahme mit zunehmender Lagerungszeit. Somit sollte die Stabilität der Häminlösung nicht der Grund für die obigen Beobachtungen sein. Im Falle des Peptides ist es denkbar, dass es über Disulfidbrücken Dimere bildet, wodurch das veränderte Häminbindungsverhalten erklärt werden könnte. Die Stabilität des Peptides wurde dadurch überprüft, dass ein Teil der Lösung nach einer Stunde bei Raumtemperatur in eine HPLC eingespritzt und nur ein Signal detektiert (UV-Vis 220 nm) wurde. Folglich kann also nur eine Spezies vorliegen, d. h. nur Monomere oder Dimere. Bei anschließender Prüfung im Massenspektrometer (LCMS, ESI(+)) zeigte sich nur ein Signal mit der Masse des Monomers. Auch ein zur Kontrolle auf einem anderen Spektrometer gemessenes MALDI(+)-Massenspektrum zeigte keine Anzeichen von Dimerbildung durch Disulfidbrücken (S-S-Brücken). Eine andere Möglichkeit, warum die RFQ-Proben nahezu kein *low-spin*-Signal zeigen, könnte Folge des Brechens der Komplexbindung durch das Auftreffen oder schockfrieren der Probe im Isopentankältebad sein. Um dies auszuschließen wurde eine Lösung aus Hämin und Peptid nach 30 Minuten einerseits von Hand gefroren sowie andererseits in die Spritzen des RFQ-Geräts gefüllt und im Kältebad schockgefroren. Da die EPR-Spektren nahezu identische Ergebnisse lieferten, ist davon auszugehen, dass der Hämin-Peptid-Komplex die RFQ-Präparation übersteht (Abb. 2.30b). Somit scheint die Ligationsreaktion des Peptides am Hämin zu langsam für die RFQ-Apparatur zu sein. Deswegen wurden die weiteren Versuche mit handgefrorenen Proben absolviert. Dazu wurden verschiedene Prozeduren ausprobiert.

Bei der ersten Methode erfolgte das Abnehmen von Proben aus einer Stammlösung in die EPR-Rohre, die anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren wurden (Abb. 2.30c). Diese Proben zeigten ein kleiner werdendes Signal für das freie Hämin, einhergehend mit einer Verbreiterung des  $g_{\perp}$ -Signals bis zwölf Minuten und einen Anstieg der Intensität der *low-spin*-Signale bis sechs Minuten. Danach, bis etwa eine Stunde vergangen war, wurde das  $g_{\perp}$ -Signal wieder schmaler und intensiver, während die *low-spin*-Signale ein kleines Plateau bilden und danach langsam schwächer werden.

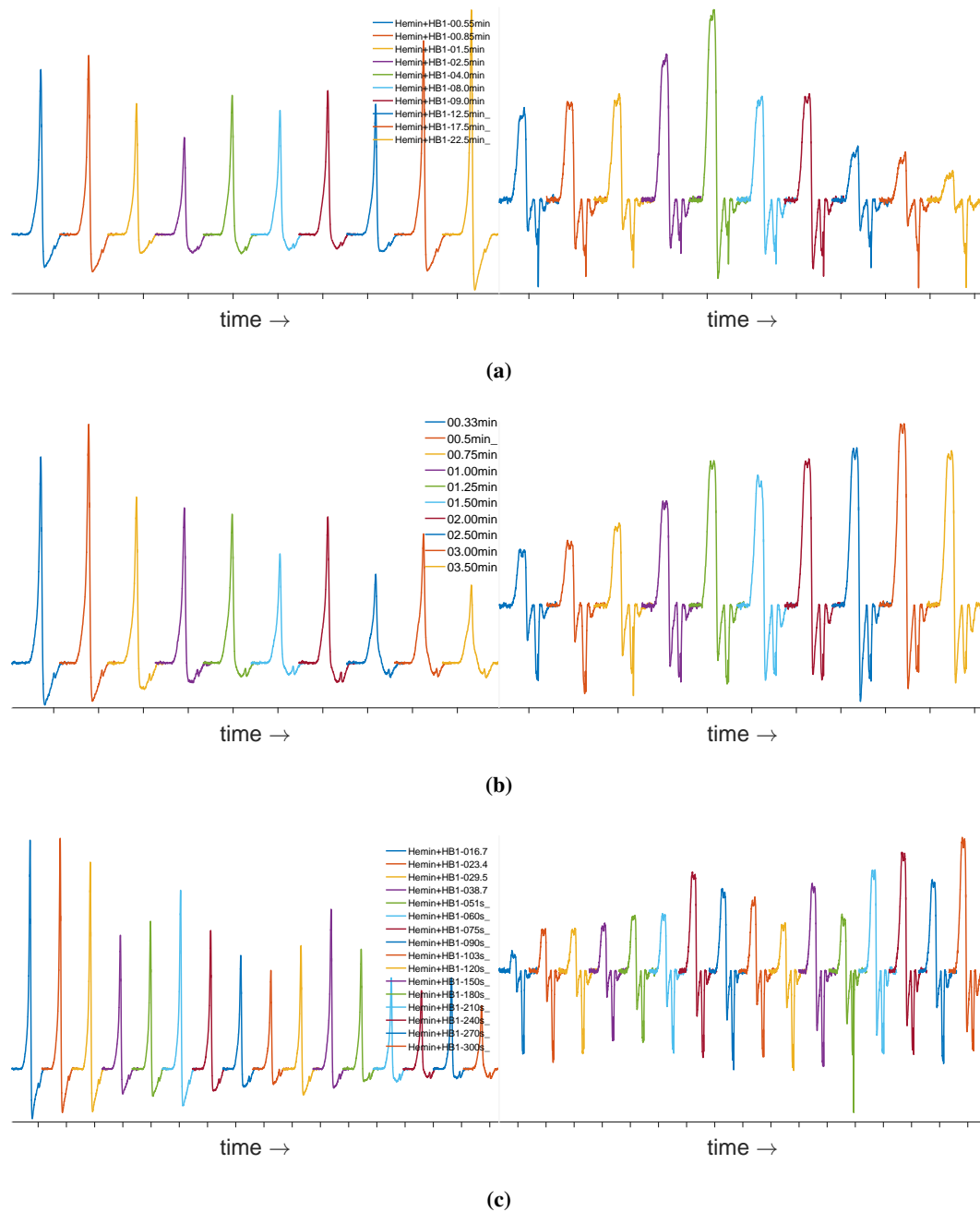
Um kürzere Reaktionszeiten zu ermöglichen, wurden im nächsten Experiment die Hämin und Peptidlösung, die für eine Probe benötigt wurden, in einem Eppendorfgefäß gemischt und an-



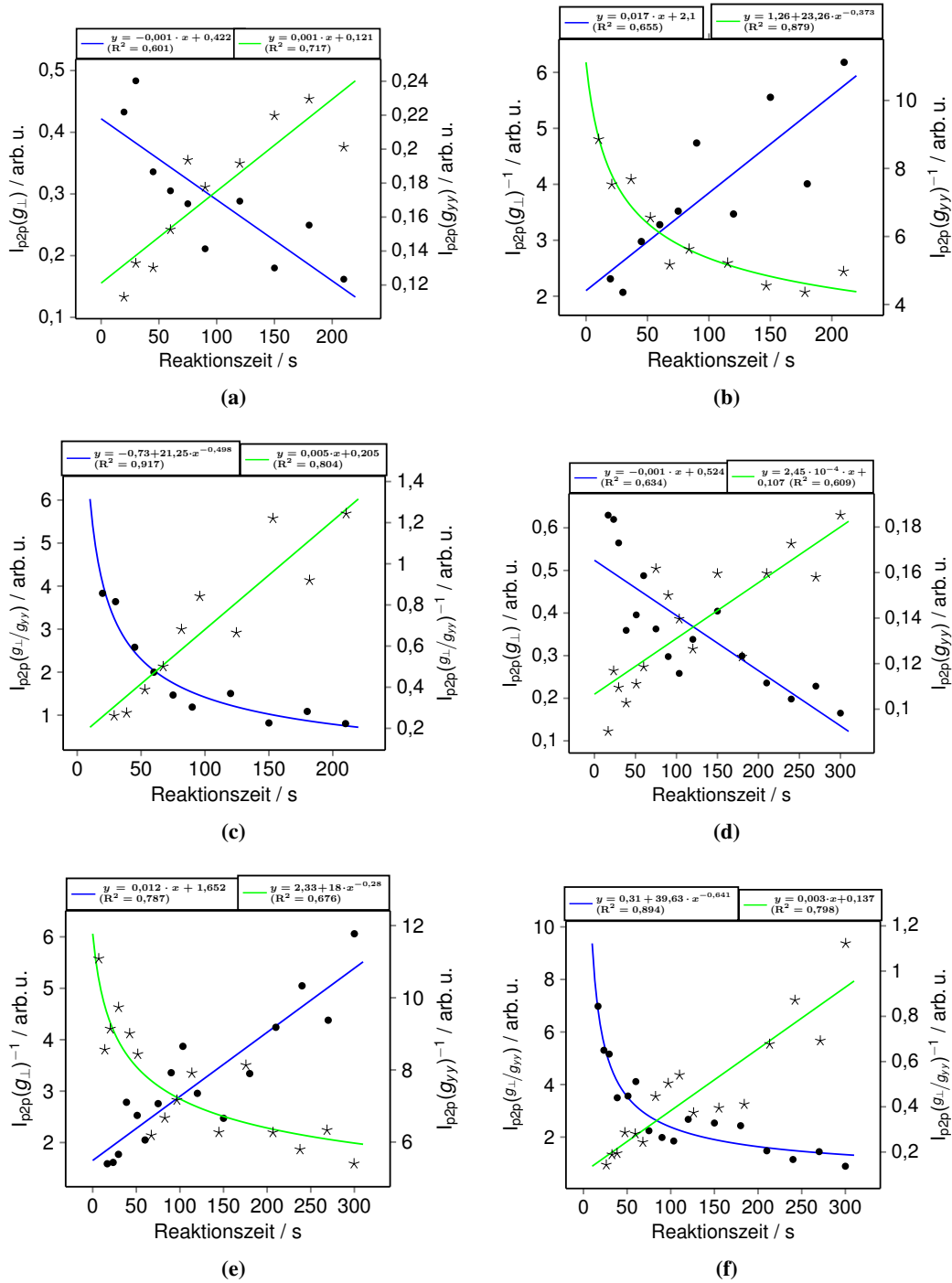
**Abb. 2.30.:** *cw* X-Band EPR-Spektren von HB1<sup>syn</sup> von (a) RFQ-Proben, (b) RFQ-Proben und handgefrorene Proben nach 30 Minuten Inkubationszeit und (c) Zeitserien handgefrorener Proben vom 14.10.15. Für die zeitabhängigen Spektren (a) und (c) sind die Spektren von links nach rechts mit steigender Reaktionszeit gestaffelt dargestellt. Das *low-spin*-Signal zeichnet sich, wie üblich, durch ein orthorhombisches EPR-Signal aus, das mit einem recht deutlich sichtbaren scharfen Teil des Hintergrundsignals (negative Intensität bei  $g \approx 2$ ) überlagert ist. Das Signal nahe 0 G im grünen Spektrum in Tafel (b) ist ein Artefakt der Hintergrundkorrektur.

schließend ins EPR-Rohr überführt und gefroren (Abb. 2.31a). Nach dieser Vorgehensweise konnte als geringste Reaktionszeit etwa eine halbe Minute erreicht werden. Ebenso von Vorteil gegenüber der Methode mit Stammlösung (s. o.) war, dass das Erstellen weiterer Proben mit beliebiger Reaktionszeit sowie Kontrollproben ermöglicht wurde. Es zeigte sich in diesem Experiment das bereits zuvor beobachtete Verhalten der Abnahme des *high-spin*- (bis 2,5 Minuten) und Zunahme des *low-spin*-Signals bis zu einem gewissen Zeitpunkt (4 Minuten), nachdem dann wieder das *high-spin*-Signal ansteigt und das *low-spin*-Signal abnimmt.

Für die letzten beiden Zeitserien wurde die Prozedur zur Probenpräparation ein weiteres Mal verfeinert (Abb. 2.31b und Abb. 2.31c). Die Peptidlösung wurde im EPR-Rohr vorgelegt und die Häminlösung mit Hilfe eines Schlauchs am Auslass der Spritze zugegeben und gemischt und anschließend gefroren. Somit waren als kürzeste Reaktionszeiten bis zu zehn Sekunden möglich. Das prinzipielle Verhalten ist wie für die Probensätze oben beschrieben (Abb. 2.30a–c und Abb. 2.31a): Das Maximum an *low-spin*-Signalintensität wird nach etwa drei (Abb. 2.31b) bis fünf Minuten (Abb. 2.31c) erreicht. Der Abfall der *low-spin*-Signalintensität nach Bildung eines Plateaus wird nicht beobachtet, weil sich diese Probenserien auf einen kurzen, biologisch relevanteren Zeitbereich fokussierten (s. u.).



**Abb. 2.31.:** *cw* X-Band EPR-Spektren handgefrorener Proben von HB1<sup>syn</sup>. Zeitserien vom (a) 4.11.15, (b) 7.12.15 und (c) 26.1.16. Die Spektren sind von links nach rechts mit steigender Reaktionszeit gestaffelt dargestellt. Damit alle Spektren in einem Bild dargestellt werden können sind nur das *high-* und *low-spin*-Signal der entsprechenden Spektren gezeigt. Das *low-spin*-Signal zeichnet sich, wie üblich, durch ein orthorhombisches EPR-Signal aus, dass mit einem recht deutlich sichtbaren scharfen Teil des Hintergrundsignals (negative Intensität bei  $g \approx 2$ ) überlagert ist.

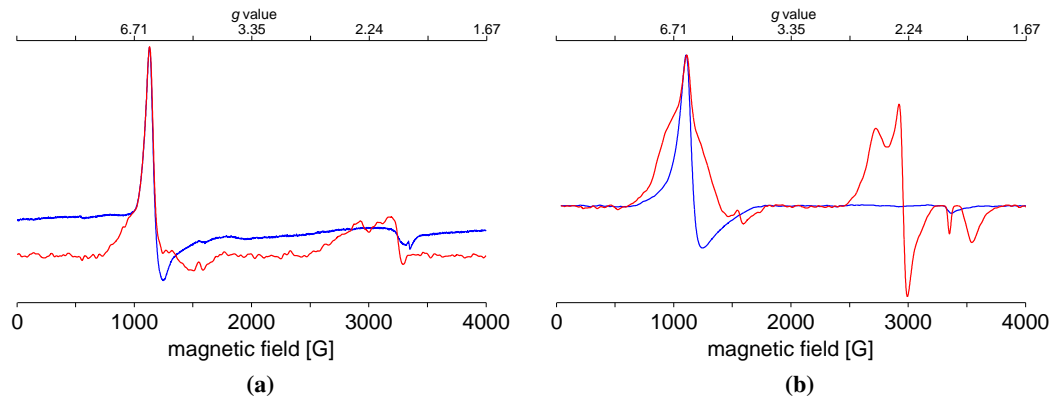


**Abb. 2.32.:** Mögliche Ansätze zur kinetischen Analyse der Datensätze aus Abbildung 2.31b in den Tafeln (a)–(c) sowie aus Abbildung 2.31c in den Tafeln (d)–(f) mittels Auftragung der *high*- bzw. *low-spin*-Intensität oder deren Verhältnis gegen die Reaktionszeit  $t$ . Die Linearisierung der Daten wurde gemäß der angenommenen Kinetik zweiter Ordnung über die reziproke Auftragung dieser Intensitäten bewerkstelligt.

Prinzipiell scheint der beobachtete Prozess zwischen Peptid und Hämin wie folgt abzulaufen:  $(\text{PPIX})\text{FeCl} + \text{HB1} \longrightarrow (\text{PPIX})\text{Fe}(\text{HB1}) \longrightarrow (\text{PPIX})\text{Fe}(\text{HB1})_2 \longrightarrow (\text{PPIX})\text{FeCl}$ . Im ersten Schritt wird das freie Hämin vom Peptid gebunden und durchläuft wahrscheinlich erst den Zustand der Pentakoordination, bevor es von dort in die Hexakoordination mit einem Pinzettenkomplex wechselt. Diese komplexgebundenen Zustände geben nach einer gewissen Zeit schließlich das Hämin wieder frei. Der Versuch einer genaueren kinetischen Analyse erfolgte über die Auftragung der Intensität des *high-* oder *low-spin*-Signals oder ihrem Verhältniswert sowie jeweils deren reziproken Werte gegen die Reaktionszeit. Da keiner der beiden Bindungspartner im Überschuss vorliegt, ist das Verhalten der Kinetik zweiter Ordnung einer Umsetzung gleicher Reaktionspartner zu erwarten, d. h.  $v = k[\text{A}]^2 \rightarrow 1/[\text{A}] = 2kt + 1/[\text{A}]_0$ . Durch eine, wie zuvor beschriebene reziproke Auftragung, sollte ein linearer Zusammenhang sichtbar werden, was allerdings nicht stringent für alle Datensätze der Fall war. So führt dieses Verfahren für den *high-spin*-Zustand nach Umrechnung von arb. u. in molare Konzentrationswerte zu einer Geschwindigkeitskonstante  $k_{2\text{nd}}$  von ca.  $110 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und einer unrealistisch großen Halbwertszeit in der Größenordnung von Tagen bis Wochen ( $t_{1/2} \approx 750$  Stunden). Auch der vielversprechendste Ansatz, den Bindungsprozess über das *high-* zu *low-spin*-Verhältnis auszudrücken, lieferte über die reziproke Auftragung und anschließende lineare Regression eine Anpassung, der Werte für eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung  $k_{2\text{nd}}$  entnommen werden könnten. Allerdings zeigt diese lineare Anpassung systematische Abweichungen in Form zunehmender Streuung für Messdaten höherer Reaktionszeit (Abb. 2.32c und Abb. 2.32f). Sicher lässt sich nur sagen, dass im Bereich von etwa drei bis fünf Minuten das  $g_{\perp}$ -Signal ein Minimum und der *low-spin*-Zustand ein Maximum durchlaufen, wonach das  $g_{\perp}$ -Signal wieder zunimmt und das *low-spin*-Signal langsam zerfällt.

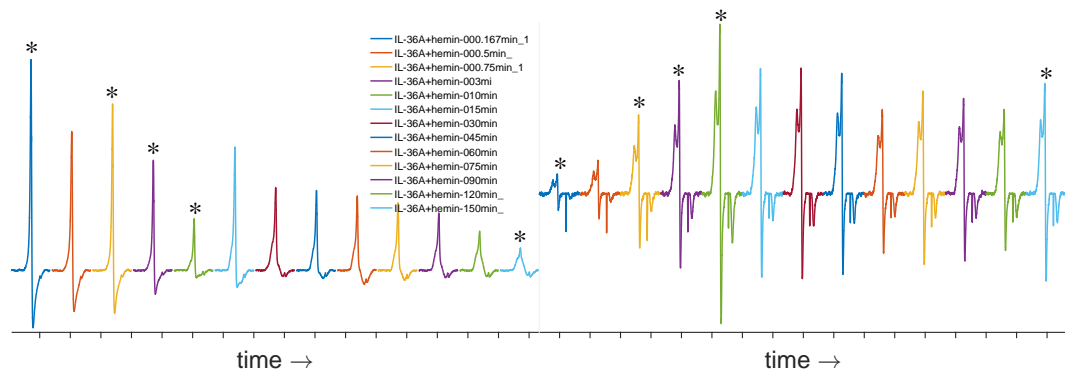
Diese kinetischen Untersuchungen wurden mit dem Protein Interleukin-36  $\alpha$  (IL-36  $\alpha$ ) wiederholt. Zuerst wurden allerdings statische Proben, d. h. Proben entsprechend langer Inkubationszeit wie für die in Abs. 2.1 diskutierten Komplexe, erstellt. Im *cw* X-Band EPR-Spektrum zeigte IL-36  $\alpha$  ein intermediäres bis starkes Häminbindungsverhalten mit Penta- sowie Hexakoordination. Ähnliche, wenn auch schwächere Ergebnisse, wurden in der Vergangenheit für das cysteinbasierte Nonapeptid APS6, das das potentielle HRM von IL-36  $\alpha$  darstellt, erreicht (Abb. 2.33). Der *low-spin*-Zustand, den IL-36  $\alpha$  induziert, scheint strukturell recht definiert zu sein, da die drei prinzipiellen  $g$ -Werte deutlich zu erkennen sind.

Mit den bereits oben für HB1<sup>syn</sup> beschriebenen Probenpräparationsroutinen mit Vormischen im Eppendorfgefäß oder Mischen direkt im EPR-Rohr konnten als kürzeste Reaktionszeit 30 Sekunden bzw. 10 Sekunden erreicht werden (Abb. 2.34). Prinzipiell verläuft der Prozess der Häminbindung von IL-36  $\alpha$  ähnlich wie bei HB1<sup>syn</sup>: Bis etwa zehn Minuten nimmt die Intensität des *high-spin*-Zustandes ab, während die des *low-spin*-Zustandes steigt, gefolgt von einem Intensitätsplateau und anschließender langsamer Abnahme des *low-spin*-Signals. Im Unterschied zu HB1<sup>syn</sup> wird allerdings nicht einhergehend mit der Intensitätsverringering des *low-spin*-Signals ein größerer Anteil freien Hämins detektiert. Das  $g_{\perp}$ -Signal zeigt über den gesamten beobachteten Zeitraum zunehmend Verbreiterung. Wenn dieser Prozess durch reine Häminbindung her-



**Abb. 2.33.:** *cw* X-Band EPR-Spektren des (a) Nonapeptids APS6 und des (b) Proteins Interleukin-36  $\alpha$ , das die APS6-Sequenz trägt, in rot. Die entsprechenden Lösungen des freien Hämins sind in blau dargestellt.

vorgerufen wird, ist davon auszugehen, dass der stabile Zustand in einer Pentakoordination liegt. Wie auch schon beim HB1<sup>syn</sup> sollte der Fokus nicht auf diesem langen Zeiträumen liegen, da sie für den Vorgang der Regulation durch Hämin viel zu langsam erscheinen, um biologische Relevanz zu haben. Dabei ist an Prozesse wie das Öffnen und Schließen von Kanälen zu denken, die einer schnellen Steuerung bedürfen.



**Abb. 2.34.:** Zeitserie von *cw* X-Band-EPR-Spektren des Häminbindungsprozesses durch IL-36  $\alpha$ . Die EPR-Spektren der Proben, die direkt im EPR-Rohr gemischt wurden, sind mit Sternchen versehen.

Für das Peptid HB1<sup>syn</sup> zeigte sich ein Maximum des sechsfachkoordinierten Komplexes mit Hämin nach ca. drei bis fünf Minuten Reaktionszeit. Mit dem Protein IL-36  $\alpha$  wurde das stärkste Signal des sechsfachkoordinierten Hämins nach zehn Minuten gemessen. Dass das Maximum der Häminbindung beim Protein später erreicht wird als beim Peptid ist darüber verständlich, dass konformationelle Änderung größerer Moleküle mehr Zeit in Anspruch nehmen als die kleiner Moleküle. So konnte für die Untereinheit SUR2A(S615-L933) des Ionenkanals KATP mittels zeitaufgelöster Resonanz-Raman-Spektroskopie gezeigt werden, dass bis zum Erreichen eines Maximums des Hämin-Komplexes vier Stunden vergehen.<sup>[92]</sup>





### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Die für essentielle biologische Prozesse wie Atmung, Gastransport und Katalyse prosthetische Gruppe Häm findet nicht nur festgebunden an Proteine Verwendung. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sie durch temporäre Bindung auch regulatorisch auf Prozesse wie Gentranskription wirken kann. Dazu bindet Häm an kurze Aminosäuresequenzen, die sogenannten HRMs. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte mittels EPR-Spektroskopie der Einfluss weiterer potentieller HRMs gezeigt werden. Untersucht wurden kurze Peptide mit potentiellen HRM auf Basis von Cystein, Histidin oder Tyrosin. Die Interaktion zwischen Hämin und Peptid waren in der Regel am stärksten für die cysteinbasierten HRMs, während sie für die histidin- und tyrosinbaiserten HRMs schwächer waren. Histidinbasierte Peptide zeigten eine Tendenz zur Bildung sechsfachkoordinierter Häminkomplexe. Das bereits als HRM bekannte CP-Motiv konnte auch mittels EPR-Spektroskopie bestätigt werden. Seine Anwesenheit ist von großer Bedeutung für die Wechselwirkung. Die Abwesenheit von Prolin kann toleriert werden, weil wahrscheinlich auch die Interaktion anderer Aminosäuren zu einer exponierten Position des Cysteins führen kann. Eine Vielzahl an Peptiden bildete sowohl fünf- wie sechsfachkoordinierte Hämin-Peptid-Komplexe. Das Verhältnis zwischen beiden Komplexgeometrien variierte abhängig vom Peptid. Die an Peptiden gewonnen Erkenntnisse wurden teilweise auf der Proteinebene weiter untersucht. Dies sollte u. a. zeigen, in wieweit die auf der Peptidebene gewonnen Erkenntnisse sich auf die Proteinebene übertragen lassen. Die Untersuchung eines Proteins hingegen nähert sich dem realen Fall der Zelle weiter an. So wurden die zwei Proteine FeoB und GlpF, die die potentiellen HRMs der stark wechselwirkenden Peptide PY5 bzw. PY4 beinhalten, exprimiert und aufgereinigt. Für das Protein FeoB konnte das potentielle HRM (PY5-Sequenz) als Hämbindemotiv nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung mit Hämin war schwach und ortsspezifisch. Ein Beweis ihrer biologischen Relevanz steht indes noch aus. Für GlpF konnte hingegen keine Bindung von Hämin festgestellt werden. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse, dass Untersuchungen auf Peptidebene ein sinnvolles Werkzeug zur Ermittlung potentieller hämregulierter Proteine sind. In einer kurzen Peptidsequenz ist es weitaus wahrscheinlicher, dass tatsächlich das potentielle HRM für die etwaige Interaktion mit dem Hämin verantwortlich ist.

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der dielektrische Mischresonator ER 4117 MX (BRUKER), der als Konstanter-Fluss-System arbeitet, charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Resonator Reaktionen mit Halbwertszeiten im Bereich von Millis bis Submillisekunden quantitativ bei Probenvolumina von 10 mL pro Zeitpunkt und Reaktand verfolgt werden können. Die Vorteile dieses Mischresonators liegen in seiner kommerziellen Verfügbarkeit, vollständigen Charakterisierung durch diese Arbeit und einem technisch weniger

anspruchsvollen Aufbau als für Fluss-Stopp-Geräte.

Unter Einsatz dieses Aufbaus wurde die Kinetik des Fenton-ähnlichen Systems aus  $\text{TiCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  und Ethanol untersucht, die Geschwindigkeitskonstanten des Initiationsschrittes, d. h.  $\text{OH}^\bullet$ -Bildung, und des bimolekularen Zerfalls des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals erfolgreich bestimmt sowie ihre gute Übereinstimmung mit früheren Berichten gezeigt. Der Effekt von Luftsauerstoffoxidation auf das  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal stellte sich als vernachlässigbar heraus. Des Weiteren tragen Reaktionen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Ti}^{3+/4+}$  nur bei höheren Konzentration zum Zerfall des  $\alpha$ -Hydroxyethylradikals bei, womit nur der bimolekulare Zerfall aus Eigenrekombination und Disproportionierung als signifikanter Zerfallsweg bleibt. Im Rahmen dieser Studie wurden durchweg vollständige EPR-Spektren verwendet, um den alleinigen Beitrag der zu untersuchenden chemischen Spezies zum beobachteten kinetischen Phänomen sicherzustellen. Diese Arbeit veranschaulicht die Stärke der EPR-Spektroskopie als direkte und empfindliche Methode in kinetischen Studien. Dieser Ansatz könnte sich auch als wertvoll für *in-situ* Kinetikstudien konformationeller Änderungen in biologisch relevanten Makromolekülen erweisen. Ebenso ermöglicht dieser Mischresonator auch die Untersuchung von Bindungskinetik, sofern die untersuchte Probe bei Raumtemperatur ein EPR-Signal liefert. Wenn die Häminbindungskinetik in Lösung untersucht werden sollte, müsste entweder das Hämin oder das es bindende Peptid bzw. Protein mit einer Spinsonde versehen werden. Generell beschränken die relativ großen Probenvolumina von 10 mL pro Zeitpunkt die Anwendung auf Fälle, in denen genug Protein hergestellt werden kann.

Nach Kalibrierung des RFQ-Aufbaus mit der Reaktion zwischen MetMb und Azid sollte diese Methode verwendet werden, um Informationen über die Kinetik der Bindung zwischen Hämin und Peptiden bzw. Proteinen zu erhalten. Allerdings zeigte sich auf der Millisekundenzeitskala kein nennenswerter Fortschritt der Häminbindung. So konnten weder der Mischresonator noch der RFQ-Aufbau für die Untersuchung der Bindungskinetik zwischen Hämin und Peptiden bzw. Proteinen eingesetzt werden. Dementsprechend wurden in anschließenden Versuchen die Hämin-Peptid/Protein-Proben von Hand gemischt und gefroren, wobei Reaktionszeitpunkte bis runter zu zehn Sekunden festgehalten werden konnten. Diese Experimente zeigten, dass sich der Bindungsprozess im Bereich von Minuten abspielte und somit nicht mit Methoden untersucht werden kann, deren Beobachtungsfenster auf Millisekunden ausgelegt ist. Für das untersuchte Peptide HB1<sup>syn</sup> und das Protein IL-36  $\alpha$  ergab sich prinzipiell derselbe Ablauf des Häminbindungsvorgangs. Nach wenigen Minuten bildete sich das Maximum eines sechsfachkoordinierten Hämin-Komplexes aus. Dieser Komplex zerfiel dann wieder langsam mit zunehmender Zeit. Es konnte gezeigt werden, dass mit der verwendeten Technik eine Möglichkeit besteht, die Häminbindungskinetik zu untersuchen.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Interaktionen in Hemin-Peptid/Protein-Komplexen

Die Synthese und Aufreinigung der Peptide erfolgte wie vormals beschrieben.<sup>[47,48]</sup>

Das Heminchlorid (Hemin) wurde von CARL ROTH bezogen. Fe(III)-Häm und die Peptide wurden in einem 1:1-Verhältnis in Phosphatpuffer (100 mM Phosphatpuffer mit 50 mM NaCl, pH 7,0) gemischt, um eine Endkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Die Komplexe wurden für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und zentrifugiert, bevor sie in EPR-Probenröhrchen gefüllt wurden. Heminchlorid wurde in 30 mM NaOH gelöst und mit Puffer verdünnt, um eine Endkonzentration von 600  $\mu\text{M}$  bei pH 7,0 zu erhalten.

Fe(III)-Häm-Lösung, 10-fach (10 $\times$ ) konzentrierter Puffer, Wasser und GlpF wurden gemischt, im Dunkeln für eine Stunde inkubiert und in EPR-Probenröhrchen gefüllt. Das Häm/GlpF-Verhältnis war 1:1 bei einer Häm-Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$ . Fe(III)-Häm-Lösung, Puffer (0,1 M HEPES, pH 7,0) und NFeoB<sup>1-273</sup> wurden gemischt, im Dunkeln für eine Stunde inkubiert und in EPR-Probenröhrchen gefüllt. Die Häm/NFeoB<sup>1-273</sup>-Verhältnisse waren 1:1 und 1:4 mit einer Häm-Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$ . In Referenzproben wurde das Volumen des Proteins durch Puffer ersetzt – im Text als freie Häm-lösung bezeichnet.

Die hergestellten Proben wurden gefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die EPR-Spektren wurden mit einem ELEXSYSII E580 X-Band EPR-Spektrometer von BRUKER, das mit einem Super High Sensitivity (SHQ) Resonator für die X-Band-Messungen ausgestattet war, aufgenommen. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines OXFORD ESR900 Kryostaten in Verbindung mit einem ITC503S kontrolliert. Die Proben wurden bei 10 K mit einer Modulationsamplitude von 5 G, einer Zeitkonstante von 20,48 ms, einer Konvertierungszeit von 21 ms und in einem Feldbereich zwischen 0 G und 4000 G mit einer Auflösung von einem Punkt pro G gemessen. Die Spektren wurden hintergrundkorrigiert (s. Anh. A.1).

### 4.2. Kinetik der Interaktionen in Hemin-Peptid/Protein-Komplexen

Für die Reaktion von Natriumazid mit Metmyoglobin zur Kalibrierung des RFQ-Gerätes wurden Lösungen der Reaktanden in 0,1 M HEPES (pH-Wert 7,3) in Konzentrationen von 12,5 mM bzw. 0,5 mM hergestellt und in die 2,5 mL-Glasspritzen aufgezogen, die anschließend in das RFQ-Gerät eingesetzt wurden. Die verwendete Auslassdüse (EDL, *ejection delay line*) am RFQ-Gerät hatte einen Innendurchmesser von 0,5 mm und ein Volumen von 19  $\mu\text{L}$ . Als Kältebad kam ein

Isopentanbad, bei üblicherweise ca.  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zum Einsatz. Die Kühlung erfolgte mit flüssigem Stickstoff, der sich im Zwischenraum von äußerem Isoliermantel und Isopentanbad befand. In das Isopentanbad wurde ein Trichter gehalten, an dessen Ende das auf 19 cm gekürzte EPR-Röhrchen befestigt war. Der Bau des gesamten Kältebades sowie Modifikationen am Trichter wurden von der Feinmechanischen Werkstatt (Werkstattleiter: Herr Heinz-Peter Königshoven) durchgeführt.

Das HB1<sup>syn</sup>-Peptid wurde von Synpeptide erworben. Die gesamte Menge (10,1 mg) wurde in 0,1 M Phosphatpuffer gelöst, aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Stammlösung wurde so angesetzt, dass die Konzentration 1316  $\mu\text{M}$  sein sollte. Später stellte sich heraus, dass der Gehalt der erhaltenen Substanz nur 65 % betrug ( $c_{\text{ist}} = 855\text{ }\mu\text{M}$ ), was bei späteren Probenpräparationen berücksichtigt wurde. Zur Herstellung der Proben wurde die HB1<sup>syn</sup>-Lösung in einem EPR-Röhrchen vorlegt, so viel Häminlösung zugegeben, dass eine Hämin-Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  erreicht wurde, gemischt und nach einer bestimmten Zeit in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Zeit zwischen der Häminzugabe und dem Einfrieren wurde als Reaktionszeit notiert. Die Zugabe der Häminlösung und das anschließende Mischen erfolgten mittels HAMILTON-Spritze mit einem PEEK-Schlauchauslass, der etwas länger als ein EPR-Röhrchen war. Nach dieser Methode waren die frühesten zu beobachtenden Reaktionszeiten 10 s.

Das Protein Interleukin-36  $\alpha$  stammte aus einer Kooperation mit dem AK Imhof des Pharmazeutischen Instituts der Universität Bonn. Es wurde eine Stammlösung in 1 $\times$  PBS (pH-Wert 7,2) hergestellt. Die Konzentration sollte nominell 1,20 mM betragen, ergab sich aber zu 1,05 mM unter Verwendung eines Absorptionskoeffizienten von ExPASy.<sup>[168]</sup> Die Präparation der kinetischen Proben erfolgte wie oben für das Peptid HB1<sup>syn</sup> beschrieben.

Die EPR-Spektren wurden mit einem EMX Micro EPR-Spektrometer von BRUKER, das mit einem Super High Sensitivity (SHQ) Resonator für die X-Band-Messungen ausgestattet war, aufgenommen. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines OXFORD ESR900 Kryostaten in Verbindung mit einem MercuryTC kontrolliert. Die Proben wurden mit 1 mW Mikrowellenleistung aufgenommen, um das Sättigen des *low-spin*-Zustandes zu vermeiden. Weitere Messparameter finden sich in Tabelle 4.1.

**Tab. 4.1.:** Messparameter für die *cw* X-Band-Messungen der Häminproben am BRUKER EMX Micro EPR-Spektrometer.

Mikrowellenleistung / mW	1,10
Modulationsamplitude / G	5
Zeitkonstante / ms	20,48
Konvertierungszeit / ms	21,30
Punkte pro G	1
Messungen	20

### 4.3. Kinetik der TEMPO/Dithionit- und Fenton-ähnlichen Reaktion

Der experimentelle Aufbau bestand aus einem BRUKER ER 4117 MX dielektrischem Mischresonator<sup>[111,169,170]</sup> in Verbindung mit einem BRUKER EMX Micro EPR-Spektrometer. Die Reaktandenlösungen wurden in zwei 10 mL-HAMILTON-Spritzen aufgezogen, in eine selbstgebaute Spritzenpumpe mit variablem Vortrieb eingesetzt und mittels PTFE-Schläuchen in den Resonator befördert.

Alle Spektren wurden bei X-Band-Mikrowellenfrequenz und bei Raumtemperatur unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 4.2 aufgenommen.

**Tab. 4.2.:** Messparameter der *cw* X-Band-Messungen mit dem Mischresonator für die Kinetik der TEMPO- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - und der Fenton-ähnlichen Reaktion.

	TEMPO/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Fenton-ähnlich
Mikrowellenleistung / mW	2,17	2,17
Modulationsamplitude / G	0,5	0,5
Zeitkonstante / ms	5,12	5,12
Konvertierungszeit / ms	5,20	6,05
Punkte pro G	10	10

Zur Untersuchung der Kinetik wurden *cw* X-Band EPR-Spektren im 2D-Time-Delay-Modus, der es erlaubt mehrere Einzelspektren über einen gewünschten Zeitraum aufzunehmen, gemessen. Das Magnetfeld wurde von niedrigen zu hohen Werten durchgeföhren. Als Indikatoren für die Konzentration der jeweiligen Reaktion dienten die *peak-to-peak*-Intensitäten, entweder der Linie der TEMPO-Spektren, die mit einem ‡ (im Falle der TEMPO-Dithionit-Reaktion, s. Abb. 2.16) oder die Linie der  $\alpha$ -Hydroxyethylradikal-Spektren, die mit einem Sternchen (Fenton-ähnlichen Reaktion, Abb. 2.19) markiert waren.

DFT-Rechnungen wurden mit ORCA unter Verwendung von einem PBE0-Basissatz und EPRII-Funktional ausgeführt (s. Tab. 2.5).<sup>[146]</sup> Simulationen der EPR-Spektren erfolgten mit *EasySpin* (s. Abb. 2.20).<sup>[152]</sup>

#### 4.3.1. Herstellung der Lösungen

**TEMPO-Dithionit-Reaktion** Die TEMPO-Dithionit-Reaktion wurde zur Bestimmung des Flußratenbereiches, in dem effizientes Mischen im Flußsystem stattfindet, verwendet (s. Abs. 2.2.1). Je 200 mL Stammlösungen von TEMPO sowie Dithionit wurden hergestellt und je 10 mL pro Durchlauf in die entsprechende Reaktandenspritze aufgezogen. Lösung 1 bestand aus TEMPO (Analysequalität, gekauft von ACROS) in destilliertem Wasser (18 M $\Omega$ ). Für Lösung 2 wurde ein 10 mM Phosphatpuffer (1 $\times$  PBS) unter Argonatmosphäre geröhrt und für mindestens 30 Minuten mit Argon durchströhmt bevor  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (gekauft von ACROS, nach Öffnen unter Argonatmosphäre gehalten) zugesetzt wurde. Vor jedem Durchlauf wurden die Spritzen mit

10 mL der unter Argon stehenden Dithionit-Stammlösung gefüllt. Konzentrationen im Bereich von 0,1 mM bis 3 mM für TEMPO und 16,7 mM bis 1000 mM für Dithionit wurden hergestellt.

**Fenton-ähnliche Reaktion.** Für die Fenton-ähnliche Reaktion wurden je Reaktandlösung 100 mL angesetzt. Lösung 1 setzte sich aus 1,0 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Analysequalität, gekauft von MERCK), 0,75 mL einer 15 %-igen  $\text{TiCl}_3$ -Lösung in 10 % HCl (gekauft von MERCK, Bestellnr. 110789) und 1,0 mL Ethanol (absolut, gekauft von VWR) zusammen. Lösung 2 bestand aus 1,0 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1,0 mL einer 35 %-igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (gekauft von MERCK) und 1,0 mL EtOH. Die Reaktandenlösungen in beiden Spritzen beinhalteten EtOH (171 mM) und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (188 mM), während Spritze 1  $\text{TiCl}_3$  (8,8 mM) und nur Spritze 2  $\text{H}_2\text{O}_2$  (116 mM) enthielt. Die Reaktanden wurden in 80 mL destilliertem Wasser (18 M $\Omega$ ) gelöst und anschließend auf 100 mL aufgefüllt. Für jedes Experiment wurden die Lösungen frisch angesetzt, da  $\text{TiCl}_3$  oxidationsempfindlich ist ( $t_{1/2}$  ca. 120 Minuten unter aeroben Bedingungen, s. Abs. 2.2.2). Mit der Zeit zerfällt Ti(III) unter Luft, was zum Bleichen der blass violetten Lösung führt. Deshalb wurden die Lösungen in argongesättigtem Wasser erstellt und unter Argonatmosphäre gehalten (s. o., Abs. 4.3.1).

#### 4.3.2. Bestimmung der Konzentration des organischen Radikals

Die Quantifizierung der relativen Konzentration über das Doppelintegral (DI) des Spektrums war aus folgenden Gründen ziemlich schwierig: Nicht nur führte die geringe Konzentration des Radikals zu einem recht verrauschtem Signal, sondern waren auch die Linien so eng beieinander, dass ein ausreichendes Maß an Hintergrundlinie fehlte. Dementsprechend würde das DI stärkere Schwankungen, die nicht von der Radikalkonzentration herrühren, zeigen und das Ergebnis verfälschen. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurden mehrere Spektren für jeden Zeitpunkt aufgenommen und anschließend die *peak-to-peak*-Intensitäten ( $I_{p2p}$ ) gemittelt. Zum Abschätzen der EtOH-Radikalkonzentration war es von Nöten die *peak-to-peak*-Intensitäten in tatsächliche Konzentrationen zu überführen, wozu ein TEMPO-Spektrum bekannter Konzentration genutzt wurde. So wurde für ein EtOH $\cdot$ -Referenzspektrum, das bei kurzer Reaktionszeit mit guter Signalintensität gemessen wurde, das DI des ganzen Spektrums durch die *peak-to-peak*-Intensität seiner dritten intensiven Linie (in Abb. 2.19 mit einem \* markiert) geteilt, um einen Umwandlungsfaktor  $\gamma$  (für EtOH $\cdot$ ) zu erhalten. Als nächstes wurde ein Spektrum einer TEMPO-Probe bekannter Konzentration unter denselben Bedingungen aufgenommen. Die TEMPO-Konzentration wurde mit dem DI ihres Spektrums dividiert, woraus sich der Umwandlungsfaktor  $\lambda$  ergab. Die Multiplikation der Intensität einer gemessenen *peak-to-peak*-Intensität des EtOH-Radikals bei einer bestimmten Reaktionszeit mit diesen Faktoren liefert die EtOH-Radikalkonzentration (s. Gleichung 4.3.1).

$$[\text{R}^*] = I_{p2p}(\text{R}^*(t)) \cdot \gamma \cdot \lambda \quad (4.3.1)$$

$$\text{mit: } \gamma = \frac{\text{DI}(\text{R}_{\text{ref}}^*)}{I_{p2p}(\text{R}_{\text{ref}}^*)} \text{ und } \lambda = \frac{[\text{TEMPO}]}{\text{DI}(\text{TEMPO})}$$

# Literaturverzeichnis

- [1] K. Ogawa, J. Sun, S. Taketani, O. Nakajima, C. Nishitani, S. Sassa, N. Hayashi, M. Yamamoto, S. Shibahara, H. Fujita, K. Igarashi, *EMBO J.* **2001**, *20*, 2835–2843.
- [2] E. Schubert, T. Hett, O. Schiemann, Y. NejatyJahromy, *J. Magn. Reson.* **2016**, *265*, 10–15.
- [3] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie - Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen*, 4. Aufl., Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2005**.
- [4] G. Zoppellaro, K. L. Bren, A. A. Ensign, E. Harbitz, R. Kaur, H.-P. Hersleth, U. Ryde, L. Hederstedt, K. K. Andersson, *Biopolymers* **2009**, *91*, 1064–1082.
- [5] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox., *Lehninger*, 4. Aufl., New York, **2005**.
- [6] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox., *Lehninger*, 4. Aufl., New York, **2013**.
- [7] U. Dettmer, M. Folkerts, R. Kunisch, A. Lantermann, E.-M. Schindler, A. C. Sönnichsen, *Kurzlehrbuch Biochemie*, 1. Aufl., Elsevier, München, **2013**.
- [8] A. Walker, *The Porphyrin Handbook - NMR and EPR*, Bd. 5, (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, **2000**, S. 81–183.
- [9] S. Severance, I. Hamza, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, PMID: 19764719, 4596–4616.
- [10] M. Nakamura, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2271–2294.
- [11] S. Schreier, J. C. Bozelli, N. Marín, R. F. F. Vieira, C. R. Nakaie, *Biophys. Rev. Dez.* **2011**, *4*, 45–66.
- [12] T. A. Rouault, *Nat. Chem. Biol.* **Aug. 2006**, *2*, 406–414.
- [13] L. N. Grinberg, P. J. O'Brien, Z. Hrkal, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 214–219.
- [14] S. W. Ryter, R. M. Tyrrell, *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 289–309.
- [15] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie - mit Pathobiochemie*, 7. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2008**.
- [16] G. C. Ferreira, J. Gong, English, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 151–159.
- [17] T. J. Sadlon, T. Dell'Oso, K. H. Surinya, B. K. May, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 1153–1167.
- [18] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, **1995**.
- [19] T. L. Poulos, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 504–510.

- [20] J. Sun, H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M. M. Taketo, M. Yamamoto, K. Igarashi, *EMBO J.* **2002**, *21*, 5216–5224.
- [21] K. Kaasik, C. Chi Lee, *Nature* **Juli 2004**, *430*, 467–471.
- [22] K. R. Rodgers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 158–167.
- [23] M. Faller, M. Matsunaga, S. Yin, J. A. Loo, F. Guo, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **Jan. 2007**, *14*, 23–29.
- [24] G. Zoppellaro, K. L. Bren, A. A. Ensign, E. Harbitz, R. Kaur, H.-P. Hersleth, U. Ryde, L. Hederstedt, K. K. Andersson, *Biopolymers* **2009**, *91*, 1064–1082.
- [25] T. Kühn, D. Imhof, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2024–2035.
- [26] X. D. Tang, R. Xu, M. F. Reynolds, M. L. Garcia, S. H. Heinemann, T. Hoshi, *Nature* **Okt. 2003**, *425*, 531–535.
- [27] L. Zhang, *HEME BIOLOGY: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes*, World Scientific Publishing Company, Singapore, **2011**.
- [28] T. Kühn, N. Sahoo, M. Nikolajski, B. Schlott, S. H. Heinemann, D. Imhof, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2846–2855.
- [29] S. M. Mense, L. Zhang, *Cell Res.* **Aug. 2006**, *16*, 681–692.
- [30] H. Ishikawa, M. Nakagaki, A. Bamba, T. Uchida, H. Hori, M. R. O’Brian, K. Iwai, K. Ishimori, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1016–1022.
- [31] Z. Qi, I. Hamza, M. R. O’Brian, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Nov. 1999**, *96*, 13056–13061.
- [32] T. Shimizu, *J. Inorg. Biochem.* **März 2012**, *108*, 171–177.
- [33] R. S. Eisenstein, *Annu. Rev. Nutr.* **2000**, *20*, PMID: 10940348, 627–662.
- [34] S. Hira, T. Tomita, T. Matsui, K. Igarashi, M. Ikeda-Saito, *IUBMB Life* **2007**, *59*, 542–551.
- [35] E. Schubert, N. Florin, F. Duthie, H. H. Brewitz, T. Kühn, D. Imhof, G. Hagelueken, O. Schiemann, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *148*, 49–56.
- [36] H. Munakata, J.-Y. Sun, K. Yoshida, T. Nakatani, E. Honda, S. Hayakawa, K. Furuyama, N. Hayashi, *J. Biochem.* **Aug. 2004**, *136*, 233–238.
- [37] D. Chiabrando, S. Mercurio, E. Tolosano, *Haematologica* **2014**, *99*, 973–983.
- [38] A. S. Fleischhacker, A. Sharma, M. Choi, A. M. Spencer, I. Bagai, B. M. Hoffman, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* **Mai 2015**, *54*, 2709–2718.
- [39] I. Bagai, R. Sarangi, A. S. Fleischhacker, A. Sharma, B. M. Hoffman, E. R. P. Zuiderweg, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* **Mai 2015**, *54*, 2693–2708.
- [40] C. Ghosh, S. Mukherjee, M. Seal, S. G. Dey, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 1748–1757.



- [41] S. Mukherjee, S. G. Dey, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, PMID: 23611340, 5226–5235.
- [42] X. Yao, P. Balamurugan, A. Arvey, C. Leslie, L. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **Dez. 2010**, *403*, 30–35.
- [43] E. G. Argyris, J. M. Vanderkooi, Y. Paterson, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 925–931.
- [44] T. Kühl, A. Wißbrock, N. Goradia, N. Sahoo, K. Galler, U. Neugebauer, J. Popp, S. H. Heinemann, O. Ohlenschläger, D. Imhof, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, PMID: 23730736, 1785–1793.
- [45] H. H. Brewitz, N. Goradia, E. Schubert, K. Galler, T. Kühl, B. Syllwasschy, J. Popp, U. Neugebauer, G. Hagelueken, O. Schiemann, O. Ohlenschläger, D. Imhof, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2016**, *1860*, 1343–1353.
- [46] H. H. Brewitz, T. Kühl, N. Goradia, K. Galler, J. Popp, U. Neugebauer, O. Ohlenschläger, D. Imhof, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2216–2224.
- [47] K.-W. Hung, Y.-W. Chang, E. T. Eng, J.-H. Chen, Y.-C. Chen, Y.-J. Sun, C.-D. Hsiao, G. Dong, K. A. Spasov, V. M. Unger, T.-h. Huang, *J. Struct. Biol.* **Feb. 2010**, *170*, 501–512.
- [48] T. C. Marlovits, W. Haase, C. Herrmann, S. G. Aller, V. M. Unger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16243–16248.
- [49] R. M. Stroud, L. J. Miercke, J. O’Connell, S. Khademi, J. K. Lee, J. Remis, W. Harries, Y. Robles, D. Akhavan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 424–431.
- [50] F. Lottspeich, *Bioanalytik*, 3. Aufl., Springer-Verlag, **2012**.
- [51] J. A. Weil, J. R. Bolton, 2. Aufl., John Wiley & Sons, Inc., **2006**, S. 1–35.
- [52] D. M. Murphy in *Metal Oxide Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2009**, S. 1–50.
- [53] W. R. Hagen, *Biomolecular EPR Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, **2009**.
- [54] P. J. Mohr, D. B. Newell, B. N. Taylor, CODATA Recommended Values of the Fundamental Physical Constants: 2014, **Aug. 2015**.
- [55] B. Odom, D. Hanneke, B. D’Urso, G. Gabrielse, *Phys. Rev. Lett.* **Juli 2006**, *97*, 030801.
- [56] W. R. Hagen, *Dalton Trans.* **2006**, 4415–4434.
- [57] M. Fittipaldi, I. García-Rubio, F. Trandafir, I. Gromov, A. Schweiger, A. Bouwen, S. Van Doorslaer, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, PMID: 18321089, 3859–3870.
- [58] C. Caillet-Saguy, M. Piccioli, P. Turano, G. Lukat-Rodgers, N. Wolff, K. R. Rodgers, N. Izadi-Pruneyre, M. Delepierre, A. Lecroisey, *J. Biol. Chem.* **Aug. 2012**, *287*, 26932–26943.
- [59] C. A. Reed, T. Mashiko, S. P. Bentley, M. E. Kastner, W. R. Scheidt, K. Spartalian, G. Lang, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2948–2958.

- [60] J. Peisach, W. E. Blumberg, S. Ogawa, E. A. Rachmilewitz, R. Oltzik, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3342–3355.
- [61] S. Nistor, E. Goovaerts, S. Van Doorslaer, S. Dewilde, L. Moens, *Chem. Phys. Lett.* **Aug. 2002**, *361*, 355–361.
- [62] I. García-Rubio, M. Braun, I. Gromov, L. Thöny-Meyer, A. Schweiger, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1361–1373.
- [63] Y. NejatyJahromy, E. Schubert, *PBioSci* **2014**, *4*, 133–152.
- [64] D. P. Goldberg, J. Telser, J. Krzystek, A. G. Montalban, L.-C. Brunel, A. G. M. Barrett, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8722–8723.
- [65] W. R. Hagen, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190–192*, 209–229.
- [66] P. J. M. van Kan, E. van der Horst, E. J. Reijerse, P. J. M. van Bentum, W. R. Hagen, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2975–2978.
- [67] K. Mobius, A. Savitsky, *High-Field EPR Spectroscopy on Proteins and their Model Systems, Characterization of Transient Paramagnetic States*, The Royal Society of Chemistry, **2008**, P001–P375.
- [68] J. Krzystek, A. Ozarowski, J. Telser, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 20th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, 2308–2324.
- [69] M. Yulikov in *Electron Paramagnetic Resonance: Volume 24, Bd. 24*, The Royal Society of Chemistry, **2015**, S. 1–31.
- [70] L. Garbuio, E. Bordignon, E. K. Brooks, W. L. Hubbell, G. Jeschke, M. Yulikov, *J. Phys. Chem. B* **März 2013**, *117*, 3145–3153.
- [71] M. Qi, A. Groß, G. Jeschke, A. Godt, M. Drescher, *J. Am. Chem. Soc.* **Okt. 2014**, *136*, 15366–15378.
- [72] A. P. Jagtap, I. Krstic, N. C. Kunjir, R. Hänsel, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Free Radical Res.* **2015**, *49*, 78–85.
- [73] N. C. Kunjir, G. W. Reginsson, O. Schiemann, S. T. Sigurdsson, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19673–19685.
- [74] G. W. Reginsson, N. C. Kunjir, S. T. Sigurdsson, O. Schiemann, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 13580–13584.
- [75] C. S. Klug, J. B. Feix in *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*, Methods in Cell Biology, Academic Press, **2008**, S. 617–658.
- [76] J. P. Klare, *Biol. Chem.* **2013**, *394*, 1281–1300.
- [77] V. M. Grigoryants, A. V. Veselov, C. P. Scholes, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2702–2708.
- [78] G. Lassmann, P. P. Schmidt, W. Lubitz, *J. Magn. Reson.* **2005**, *172*, 312–323.

- [79] R. J. Elias, M. L. Andersen, L. H. Skibsted, A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, PMID: 19358607, 4359–4365.
- [80] M. L. Andersen, L. H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1272–1275.
- [81] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc. Trans.* **1894**, *65*, 899–910.
- [82] P. Alicja, S. M. Nien, Z. Henryk, C. von Sonntag, *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1984**, *39*, 1262–1267.
- [83] T. Itoh, T. Yamada, Y. Kodera, A. Matsushima, M. Hiroto, K. Sakurai, H. Nishimura, Y. Inada, *Bioconjugate Chem.* **Jan. 2001**, *12*, 3–6.
- [84] B. L. Bales, M. Peric, M. T. Lamy-Freund, *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 279–286.
- [85] M. Hendrich, P. Debrunner, *Biophys. J.* **1989**, *56*, 489–506.
- [86] A. Ozarowski, S. A. Zvyagin, W. M. Reiff, J. Telser, L.-C. Brunel, J. Krzystek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, PMID: 15161284, 6574–6575.
- [87] W. R. Hagen, *BBA - Proteins and Proteomics* **1982**, *708*, 82–98.
- [88] M. Nakamura, T. Ikeue, Y. Ohgo, M. Takahashi, M. Takeda, *Chem. Commun.* **2002**, 1198–1199.
- [89] H. Ruf, D. Schuhn, W. Nastainczyk, *FEBS Lett.* **Jan. 1984**, *165*, 293–296.
- [90] G. C. Chu, T. Tomita, F. D. Sönnichsen, T. Yoshida, M. Ikeda-Saito, *J. Biol. Chem.* **Aug. 1999**, *274*, 24490–24496.
- [91] A. B. Kelson, M. Carnevali, V. Truong-Le, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 707–716.
- [92] M. J. Burton, S. M. Kapetanaki, T. Chernova, A. G. Jamieson, P. Dorlet, J. Santolini, P. C. E. Moody, J. S. Mitcheson, N. W. Davies, R. Schmid, E. L. Raven, N. M. Storey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Apr. 2016**, *113*, 3785–3790.
- [93] L. Yi, J. T. Morgan, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* **Juni 2010**, *285*, 20117–20127.
- [94] I. García-Rubio, P. J. Alonso, M. Medina, J. I. Martínez, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 141–152.
- [95] I. García-Rubio, M. Medina, R. Cammack, P. J. Alonso, J. I. Martínez, *Biophys. J.* **Juni 2006**, *91*, 2250–2263.
- [96] S. Takahashi, J. Wang, D. L. Rousseau, K. Ishikawa, T. Yoshida, J. R. Host, M. Ikeda-Saito, *J. Biol. Chem.* **Jan. 1994**, *269*, 1010–1014.
- [97] N. Gupta, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* **Feb. 2011**, *286*, 4392–4403.
- [98] H. Ishikawa, M. Kato, H. Hori, K. Ishimori, T. Kirisako, F. Tokunaga, K. Iwai, *Mol. Cell* **2005**, *19*, 171–181.
- [99] J. H. Dawson, L. A. Andersson, M. Sono, *J. Biol. Chem.* **Apr. 1982**, *257*, 3606–3617.
- [100] H. M. Girvan, J. M. Bradley, M. R. Cheesman, J. R. Kincaid, Y. Liu, K. Czarnecki, K. Fisher, D. Leys, S. E. J. Rigby, A. W. Munro, *Biochemistry* **Aug. 2016**,

- [101] I. Barr, A. T. Smith, R. Senturia, Y. Chen, B. D. Scheidemantle, J. N. Burstyn, F. Guo, *J. Biol. Chem.* **Mai 2011**, 286, 16716–16725.
- [102] D. Fu, A. Libson, L. J. W. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, R. M. Stroud, *Science* **Okt. 2000**, 290, 481–486.
- [103] A. Guilfoyle, M. J. Maher, M. Rapp, R. Clarke, S. Harrop, M. Jormakka, *EMBO J.* **2009**, 28, 2677–2685.
- [104] N. Izadi, Y. Henry, J. Haladjian, M. E. Goldberg, C. Wandersman, M. Delepierre, A. Lecroisey, *Biochemistry* **Juni 1997**, 36, 7050–7057.
- [105] P. L. Oliveira, J. K. Kawooya, J. M. C. Ribeiro, T. Meyer, R. Poorman, E. W. Alves, F. A. Walker, E. A. Machado, R. H. Nussenzweig, G. J. Padovan, H. Masuda, *J. Biol. Chem.* **Mai 1995**, 270, 10897–10901.
- [106] J. Yang, K. D. Kim, A. Lucas, K. E. Drahos, C. S. Santos, S. P. Mury, D. G. S. Capelluto, C. V. Finkielstein, *Mol. Cell. Biol.* **August 1, 2008**, 28, 4697–4711.
- [107] F. Yang, X. Xia, H.-Y. Lei, E.-D. Wang, *J. Biol. Chem.* **Dez. 2010**, 285, 39437–39446.
- [108] M. N. J. Junk in *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**, Kap. 2, S. 7–52.
- [109] J. Harmer, G. Mitrikas, A. Schweiger in *High Resolution EPR*, (Hrsg.: L. Berliner, G. Hanson), Biological Magnetic Resonance, Springer New York, **2009**, S. 13–61.
- [110] M. H. Rakowsky, A. Zecevic, G. R. Eaton, S. S. Eaton, *J. Magn. Reson.* **März 1998**, 131, 97–110.
- [111] S. Eaton, G. Eaton in, *Biomedical EPR - Part B*, Springer, New York, **2005**, Kap. 3, S. 80.
- [112] G. Lassmann, L. A. Eriksson, F. Himo, F. Lenzian, W. Lubitz, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 1283–1290.
- [113] G. Lassmann, L. A. Eriksson, F. Lenzian, W. Lubitz, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 9144–9152.
- [114] J. P. Holman, *Heat Transfer*, 10. Aufl., McGraw-Hill, New York, **2010**.
- [115] N. Rott, *Annu. Rev. Fluid Mech.* **1990**, 22, 1–12.
- [116] R. Kaufmann, I. Yadid, D. Goldfarb, *J. Magn. Reson.* **2013**, 230, 220–226.
- [117] A. Potapov, D. Goldfarb, English, *Appl. Magn. Reson.* **2010**, 37, 845–850.
- [118] S. G. Mayhew, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 85, 535–547.
- [119] D. O. Lambeth, G. Palmer, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6095–6103.
- [120] A.-M. Lambeir, H. B. Dunford, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 147, 93–96.
- [121] <http://www.echemportal.org/>.
- [122] <http://webnet.oecd.org/hpv/ui/Default.aspx>.

- [123] S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski, *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *15*, 435–445.
- [124] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513–886.
- [125] E. Janata, *J. Chem. Sci.* **2002**, *114*, 731–737.
- [126] I. A. Taub, L. M. Dorfman, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 4053–4059.
- [127] M. Simic, P. Neta, E. Hayon, *J. Phys. Chem.* **1969**, *73*, 3794–3800.
- [128] R. Livingston, H. Zeldes, *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*, 1245–1259.
- [129] B. H. J. Bielski, E. Saito, *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 2266–2268.
- [130] A. G. Davies, A. G. Neville, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 163–169.
- [131] W. T. Dixon, R. O. C. Norman, *J. Chem. Soc.* **1963**, 3119–3124.
- [132] T. Shiga, *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 3805–3814.
- [133] D. Meisel, G. Czapski, A. Samuni, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1973**, 1702–1708.
- [134] Y. S. Chiang, J. Craddock, D. Mickewich, J. Turkevich, *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3509–3515.
- [135] G. Czapski, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 2957–2967.
- [136] B. C. Gilbert, R. O. C. Norman, R. C. Sealy, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1973**, 2174–2180.
- [137] B. C. Gilbert, R. O. C. Norman, R. C. Sealy, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, 824–830.
- [138] S. Croft, B. C. Gilbert, J. R. Lindsay Smith, A. C. Whitwood, *Free Radical Res.* **1992**, *17*, 21–39.
- [139] S. Croft, B. C. Gilbert, J. R. L. Smith, J. K. Stell, W. R. Sanderson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 153–160.
- [140] K. D. Asmus, H. Moeckel, A. Henglein, *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 1218–1221.
- [141] G. E. Adams, R. L. Willson, *Trans. Faraday Soc.* **1969**, *65*, 2981–2987.
- [142] R. O. C. Norman, P. R. West, *J. Chem. Soc. B* **1969**, 389–399.
- [143] J. W. Fletcher, P. J. Richards, W. A. Seddon, *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 3765–3768.
- [144] S. Pou, C. Ramos, T. Gladwell, E. Renks, M. Centra, D. Young, M. Cohen, G. Rosen, *Anal. Biochem.* **1994**, *217*, 76–83.
- [145] B. C. Gilbert, R. O. C. Norman, P. S. Williams, J. N. Winter, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1982**, 1439–1445.
- [146] F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.
- [147] <https://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>.

- [148] M. C. R. Symons, *J. Chem. Soc.* **1959**, 277–287.
- [149] M. Symons, *Tetrahedron* **1962**, *18*, 333–341.
- [150] C. Heller, H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1960**, *32*, 1535–1539.
- [151] W. T. Dixon, R. O. C. Norman, *J. Chem. Soc.* **1964**, 4850–4856.
- [152] <http://www.easyspin.org/>.
- [153] R. Pievo, B. Angerstein, A. J. Fielding, C. Koch, I. Feussner, M. Bennati, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 4094–4101.
- [154] R. J. Appleyard, W. A. Shuttleworth, J. N. S. Evans, *Biochemistry* **1994**, *33*, PMID: 8204615, 6812–6821.
- [155] R. Appleyard, J. Evans, *J. Magn. Reson. Ser B* **1993**, *102*, 245–252.
- [156] S. Oellerich, E. Bill, P. Hildebrandt, *Appl. Spectrosc.* **Okt. 2000**, *54*, 1480–1484.
- [157] D. P. Ballou, G. A. Palmer, *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 1248–1253.
- [158] Y. Lin, G. J. Gerfen, D. L. Rousseau, S.-R. Yeh, *Anal. Chem.* **Okt. 2003**, *75*, 5381–5386.
- [159] A. V. Cherepanov, S. de Vries, *BBA - Bioenergetics* **2004**, *1656*, 1–31.
- [160] R. C. Bray, D. J. Lowe, C. Capeillère-Blandin, E. M. Fielden, *Biochem. Soc. Trans.* **1973**, *1*, 1067–1072.
- [161] H. Zakariassen, M. Sørli, *Thermochim. Acta* **2007**, *464*, 24–28.
- [162] J. Lin, L. B. Vitello, J. E. Erman, *Arch. Biochem. Biophys.* **Apr. 1998**, *352*, 214–228.
- [163] J. Lin, J. Merryweather, L. B. Vitello, J. E. Erman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *362*, 148–158.
- [164] F. Wiertz, S. de Vries, *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 136–138.
- [165] F. G. M. Wiertz, O.-M. H. Richter, B. Ludwig, S. de Vries, *J. Biol. Chem.* **Okt. 2007**, *282*, 31580–31591.
- [166] S. Lu, F. G. M. Wiertz, S. de Vries, P. Moenne-Loccoz, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 359–362.
- [167] H. Matsumura, P. Moenne-Loccoz, English in *Metalloproteins*, (Hrsg.: J. C. Fontecilla-Camps, Y. Nicolet), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, **2014**, S. 107–123.
- [168] <http://web.expasy.org/protparam/>.
- [169] M. G. Bonini, O. Augusto, *J. Biol. Chem.* **März 2001**, *276*, 9749–9754.
- [170] M. G. Bonini, R. Radi, G. Ferrer-Sueta, A. M. D. C. Ferreira, O. Augusto, *J. Biol. Chem.* **Apr. 1999**, *274*, 10802–10806.

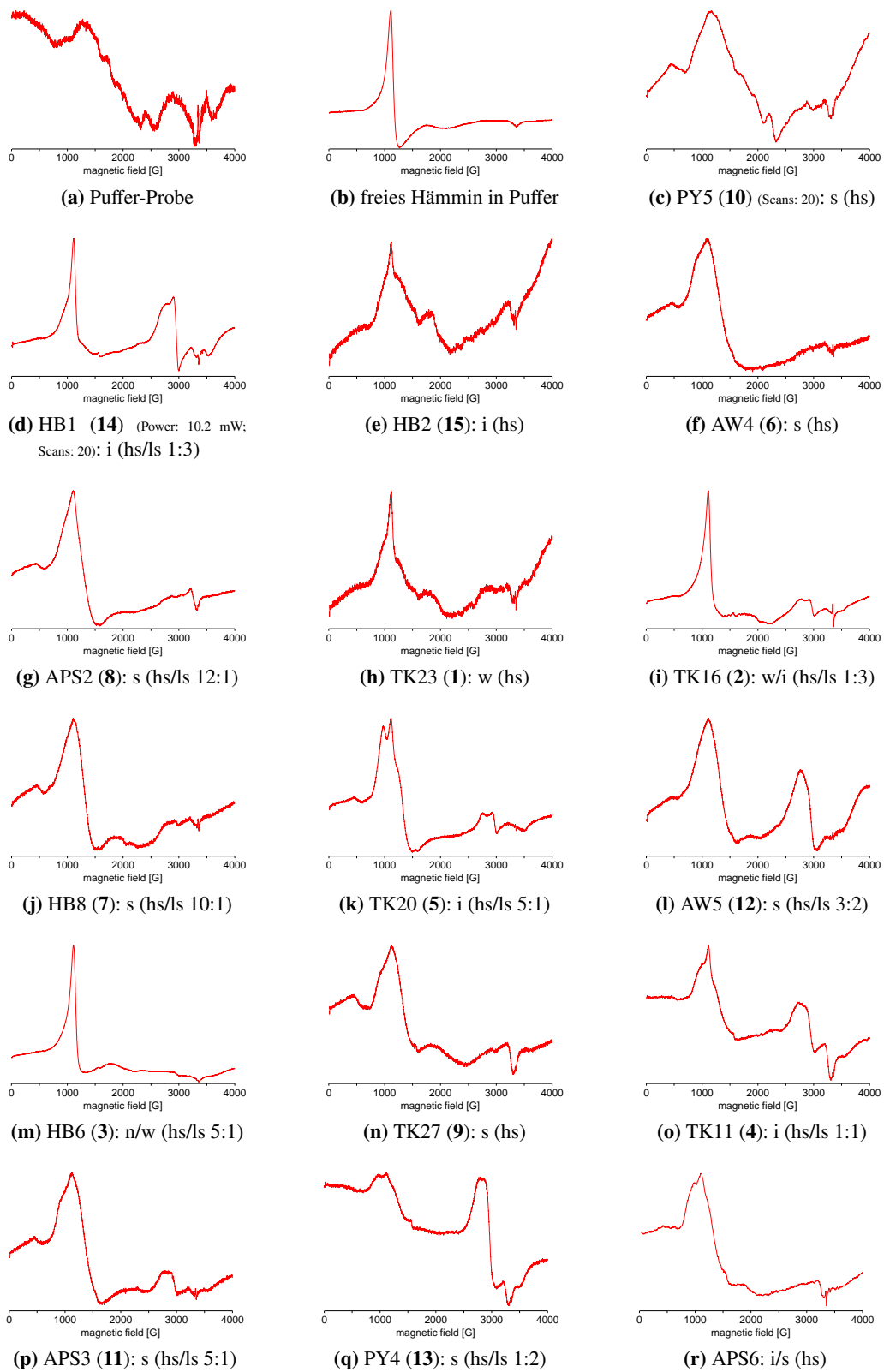
# A. Anhang

## A.1. X-Band *cw* EPR-Spektren der Hämin-Peptid-/Protein-Komplexe

- Cystein-Proben: *cw* X-Band EPR-Spektren der cysteinbasierten Hämin-Peptid-Proben auf Seite 106
- Histidin-Proben: *cw* X-Band EPR-Spektren der histidinbasierten Hämin-Peptid-Proben auf Seite 107
- Tyrosin-Proben: *cw* X-Band EPR-Spektren der tyrosinbasierten Hämin-Peptid-Proben auf Seite 108
- Protein-Proben: *cw* X-Band EPR-Spektren der Hämin-Protein-Proben auf Seite 109 und Seite 109 (hintergrundkorrigiert)

Die Bindungsstärke und der Spin-Zustand sind in der Bildunterschrift als none (n), weak (w), intermediate (i) und strong (s) sowie *high-spin* (hs) und *low-spin* (ls) vermerkt.

Es sind zusätzlich zu den Buchstabenkürzeln der Peptide auch die Nummern der Peptide aus den entsprechenden Veröffentlichungen vermerkt.



**Abb. A.1.:** *cw* X-Band EPR-Spektren der Cystein-Proben.



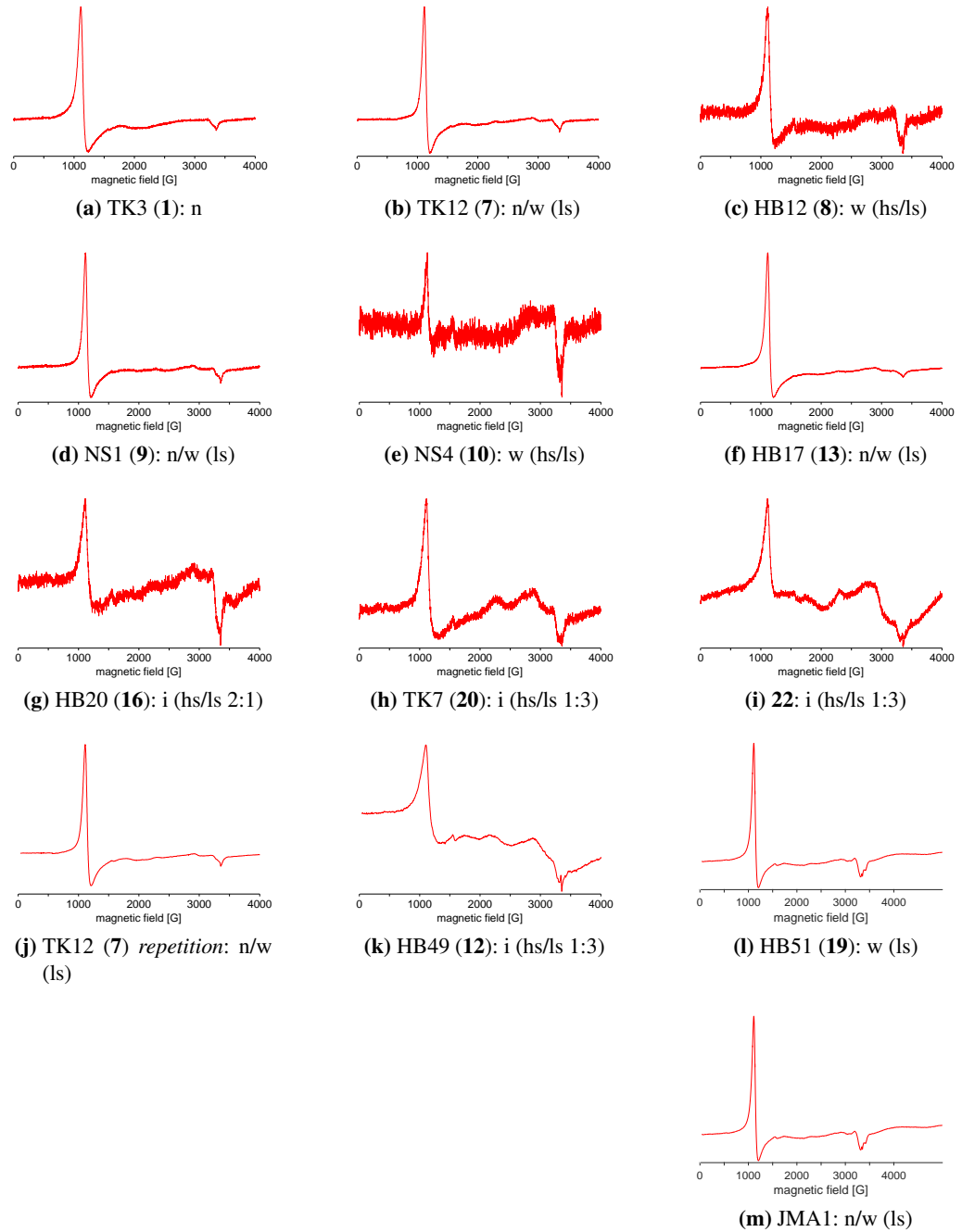
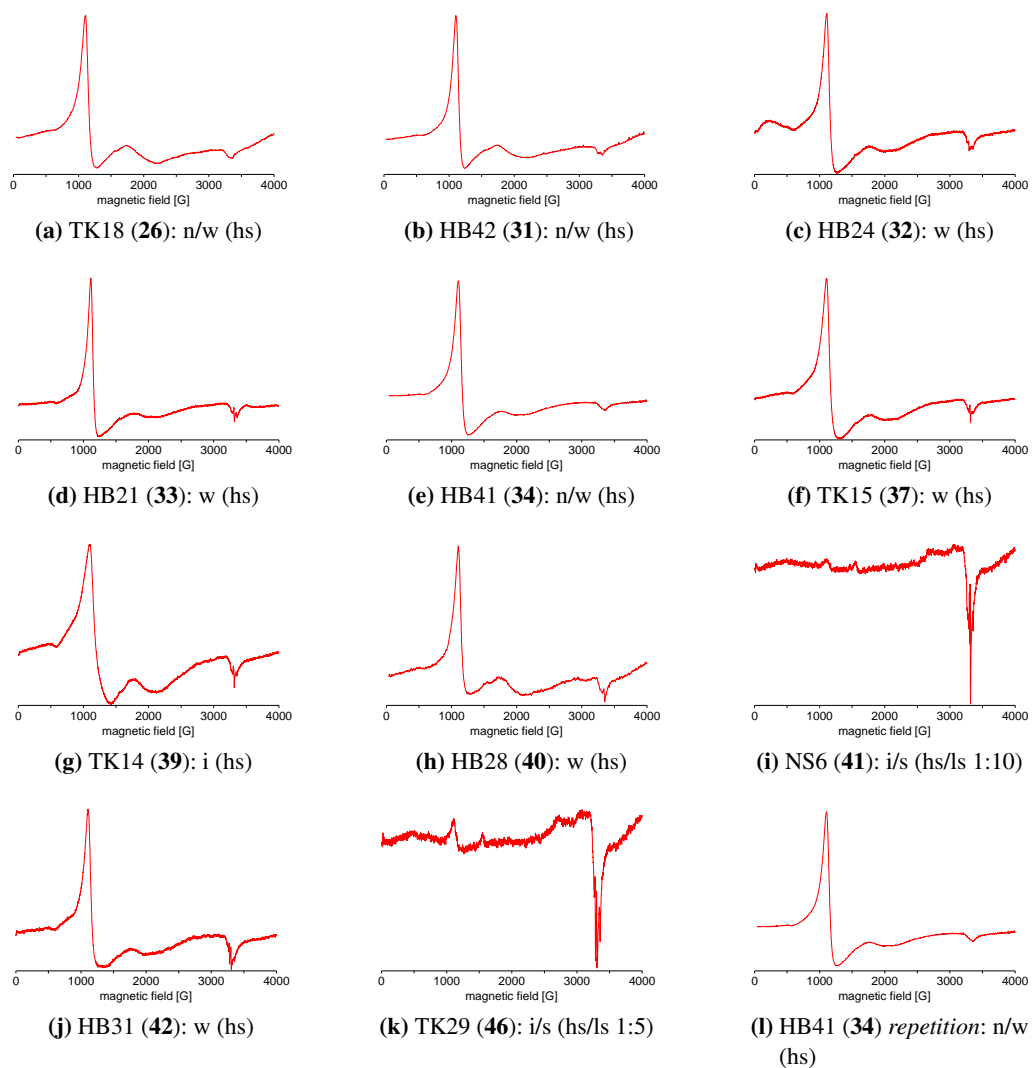


Abb. A.2.: cw X-Band EPR-Spektren der His-basierten Hämin-Peptid-Komplexe.



**Abb. A.3.:** cw X-Band EPR-Spektren der Tyr-basierten Häm-in-Peptid-Komplexe.

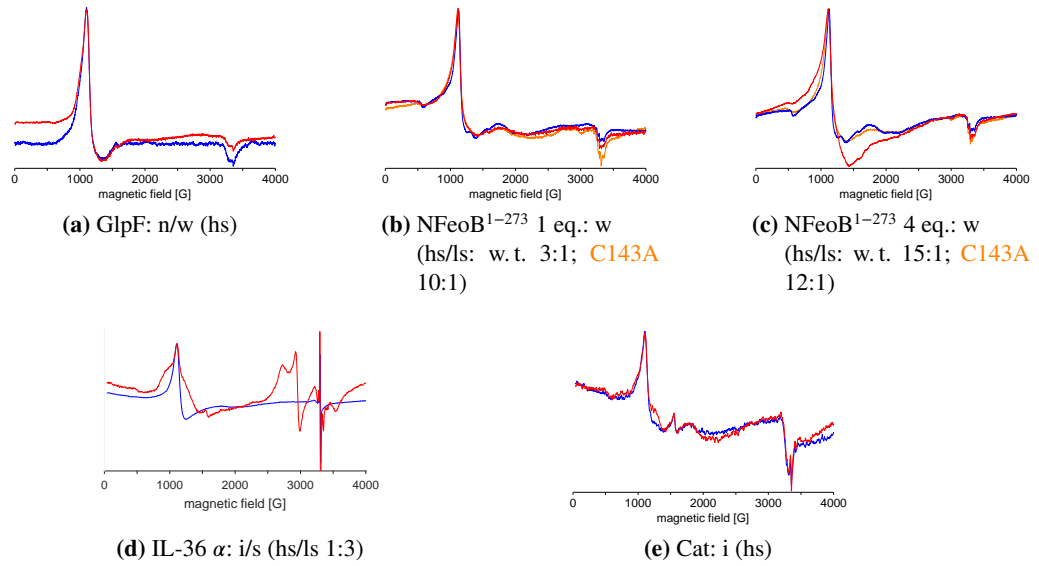


Abb. A.4.: cw X-Band EPR-Spektren der Hämin-Protein-Komplexe (blau: freies Hämin).

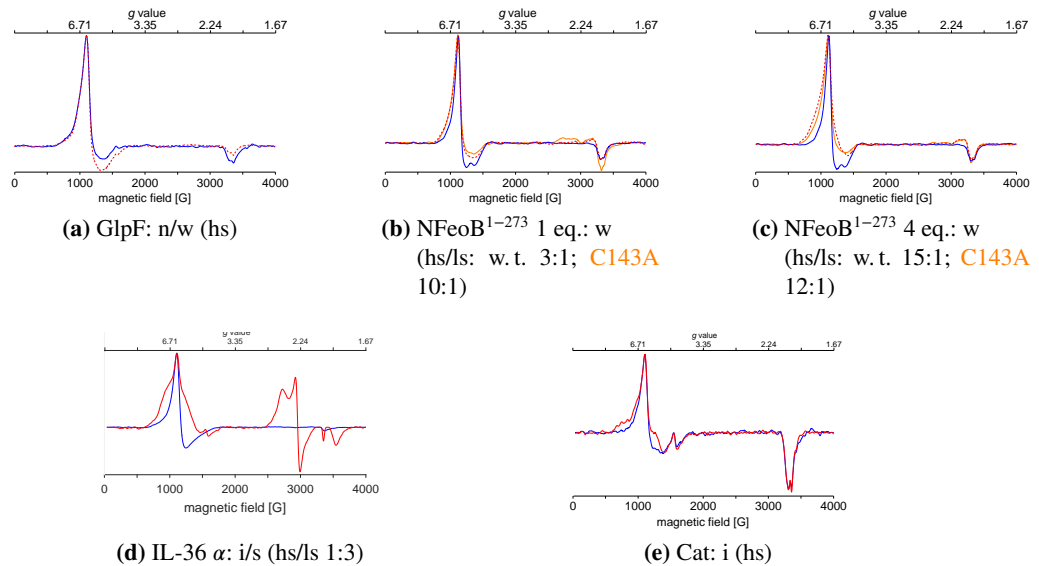


Abb. A.5.: cw X-Band EPR-Spektren der Hämin-Protein-Komplexe (hintergrundkorrigiert; blau: freies Hämin).