

Spektroskopische Untersuchungen an der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
von der Fakultät für Physik der Universität (TH)
Karlsruhe

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Phys. Michael Horn
aus Landau in der Pfalz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2018
Referent: Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus
Koreferent: Prof. Dr. Thomas Schimmel

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Änderungen entnommen wurde.

Karlsruhe, 24.06.2018

.....
(Michael Horn)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1. Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)	1
1.1.1. Hämproteine	1
1.1.2. Die Rolle der NOS im menschlichen Körper	2
1.1.3. Mechanismus der NO Synthese	7
1.1.4. CO als sechster Ligand - die iNOS P450/P420-Spezies	12
1.2. Protein-Liganden Interaktion	14
1.2.1. Gleichgewichtssituation	14
1.2.2. Nichtgleichgewichtssituation	14
1.3. Spektroskopie	19
1.3.1. Absorption	20
1.3.2. UV/Vis-Spektroskopie	20
1.3.3. Infrarotspektroskopie	28
2. Materialien und Methoden	33
2.1. Proteinpräparation und Aufreinigung	33
2.2. Probenpräparation	34
2.2.1. UV/Vis-Spektroskopie	34
2.2.2. FTIR-Spektroskopie	34
2.3. UV/Vis-Spektroskopie	35
2.4. Zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse	35
2.4.1. Grundlagen der Blitzlichtphotolyse	35
2.4.2. Aufbau der Blitzlichtphotolyseanlage	36
2.4.3. Datenaufnahme	38
2.4.4. Datenverarbeitung	38
2.4.5. Methoden zur Datenanalyse	39
2.5. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)	42
2.5.1. Aufbau der FTIR-Spektroskopieanlage	42
2.5.2. Michelson-Interferometer	43
2.5.3. Fouriertransformation	44
2.5.4. Messmethoden	46

3. FTIR-Spektroskopie an iNOS_{oxy} -CO und iNOS_{oxy} -NO	53
3.1. FTIR-Spektroskopie an iNOS_{oxy} mit CO als Ligand	54
3.1.1. 4 K-Photolyse-Differenzspektren	54
3.1.2. Thermisch aktivierte CO-Rückbindungsprozesse	57
3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	61
3.2. FTIR-Spektroskopie an iNOS_{oxy} mit NO als Ligand	62
3.2.1. 4 K-Photolyse-Differenzspektren	62
3.2.2. Thermisch aktivierte NO-Rückbindungsprozesse	65
3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	70
4. UV/Vis-Spektroskopie an iNOS_{oxy} -CO	71
4.1. Blitzlichtphotolysemessungen an iNOS_{oxy} -CO	72
4.1.1. CO-Rückbindungskinetiken der P450-Spezies mit Substrat, Intermediat und Kofaktor	76
4.1.2. Abhängigkeit der CO-Rückbindung von der Substratkonzentration	79
4.2. $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ / $\text{iNOS}_{\text{P420}}$ -Konversionskinetiken	94
4.2.1. Konversionskinetiken ohne Substrat	94
4.2.2. Konversionskinetiken mit Substrat	101
4.2.3. Konversionskinetiken mit Urea	103
4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	107
5. Fazit	111
Literaturverzeichnis	115
A. Publikationen	131

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Die drei Mitglieder der NOS-Familie	3
1.2.	Schema der Geometrie eines NOS Homodimers	4
1.3.	Struktur der unswapped/swapped Zustände von iNOS _{oxy}	6
1.4.	Katalytisch aktives Zentrum von iNOS _{oxy}	8
1.5.	Struktur der Aminosäure Arginin	9
1.6.	Zweistufige Reaktion zur Produktion von NO durch die NOS	10
1.7.	Mechanismus der Arginin Hydroxilierung zu NOHA	11
1.8.	Das Häm-Ligand-Zweizustandsmodel.	16
1.9.	Energielandschaft eines Hämproteins.	18
1.10.	Das elektromagnetische Spektrum.	19
1.11.	Molekülorbitalbildung des Wasserstoffmoleküls.	21
1.12.	Molekülorbitale der s- und p-Atomorbitale.	22
1.13.	Ethen - Hybridisierung und Parität der Wellenfunktionen.	23
1.14.	Elektronische Übergänge zwischen Molekülorbitalen.	24
1.15.	UV/Vis-Absorptionsspektrum von iNOS _{oxy} im Met-Zustand.	26
1.16.	Das delokalisierte Elektronensystem des Häms.	27
1.17.	Modellpotentiale eines zweiatomigen Moleküls.	29
1.18.	Beispiele für Schwingungsmoden von Molekülen.	30
1.19.	σ -Hinbindung und π -Rückbindung.	32
2.1.	Absorptionsspektren von iNOS _{oxy} -CO und iNOS _{oxy} -Deoxy und zeitliche Änderung des Differenzabsorptionssignals.	36
2.2.	Aufbau der Blitzlichtphotolyseanlage.	37
2.3.	Schrittweise Verarbeitung der Daten von Rückbindungskinetiken.	39
2.4.	Anwendung der Maximum-Entropie-Methode (MEM) auf eine Rückbindungskinetik.	42
2.5.	Aufbau der FTIR-Spektroskopieanlage.	43
2.6.	Entstehung eines Interferogramms.	44
2.7.	Vom Interferogramm zum Transmissionsspektrum.	46
2.8.	Entstehung eines Differenzabsorptionsspektrums.	47
2.9.	Temperature Derivative Spectroscopy (TDS).	50
2.10.	Entstehung eines 2D-TDS-Diagramms.	51
3.1.	4 K-Photolyse-Differenzspektren von iNOS _{oxy} -CO.	55
3.2.	TDS-Diagramme von iNOS _{oxy} -CO nach kurzer Beleuchtung bei 4 K.	58
3.3.	TDS-Diagramme von iNOS _{oxy} -CO nach dem slow-cool-Protokoll.	60

3.4.	4 K-Photolyse-Differenzspektren von $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$	64
3.5.	TDS-Diagramme von $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ nach kurzer Beleuchtung bei 4 K.	66
3.6.	Zeitliche Entwicklung der $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ -Banden.	68
3.7.	Fe-N-O-Bindungswinkel der verschiedenen $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ -Spezies.	70
4.1.	Absorptionsspektren der Deoxy-, $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ - und $\text{iNOS}_{\text{P420}}$ -Spezies.	71
4.2.	CO-Rückbindungskinetik der $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ -Spezies.	72
4.3.	Deoxy- und CO-Spektrum einer iNOS_{oxy} -Probe mit starker $\text{iNOS}_{\text{P420}}$ - Population.	73
4.4.	Wellenlängenabhängigkeit der CO-Rückbindung von iNOS_{oxy}	75
4.5.	CO-Rückbindungskinetiken und Ratenverteilungsfunktionen von $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ mit Substrat oder Intermediat.	77
4.6.	CO-Rückbindungskinetiken und Ratenverteilungsfunktionen von $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ mit Kofaktor und Substrat.	78
4.7.	Substrattitration bei $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$	80
4.8.	Zeitlicher Verlauf der Proteinpopulationen nach einmaliger Substrat- zugabe.	82
4.9.	Bestimmung der Substrat-Dissoziationskonstanten.	83
4.10.	Substrattitration bei $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$	84
4.11.	Modellsystem der Substratbindung der P450^{S} -Spezies.	85
4.12.	Fit von k_{App} an experimentell ermittelte Daten.	90
4.13.	Der apparente Ratenkoeffizient k_{App} bei variierender CO-Konzentration.	91
4.14.	Vergleich zwischen allgemeiner Lösung und Näherungsverfahren.	92
4.15.	Darstellung einer $\text{iNOS}_{\text{P450}}/\text{iNOS}_{\text{P420}}$ -Konversionskinetik.	95
4.16.	Konversionskinetiken ohne Substrat.	96
4.17.	Fitparameter der Konversionskinetiken ohne Substrat.	97
4.18.	Vierzustandssystem von $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ und $\text{iNOS}_{\text{P420}}$	99
4.19.	$\text{P450}^{\text{I}}/\text{P450}^{\text{S}}$ -Populationen zu verschiedenen Zeitpunkten.	100
4.20.	Konversionskinetiken mit Substrat.	101
4.21.	Fitparameter der Konversionskinetiken mit Substrat.	102
4.22.	Konversionskinetiken mit Urea.	104
4.23.	Fitparameter der Konversionskinetiken mit Urea.	105

Tabellenverzeichnis

3.1. IR Schwingungsbanden von iNOS _{oxy} -CO.	57
3.2. IR Schwingungsbanden von iNOS _{oxy} -NO.	63
4.1. Fitparameter der CO-Rückbindungskinetiken bei [CO] = 1 mM.	81
4.2. Fitparameter der Konversionskinetiken ohne Substrat.	98
4.3. Fitparameter der Konversionskinetiken mit Substrat.	103
4.4. Fitparameter der Konversionskinetiken mit Urea.	106

1. Einleitung

1.1. Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

1.1.1. Hämproteine

Proteine machen die Arbeiterklasse im Körper aller Lebewesen aus. Die Evolution hat ein breites Spektrum an unterschiedlichen Proteinen geschaffen, jedes mit seiner eigenen Aufgabe. Was all diesen hochspezialisierten Maschinen gemein ist, ist ihr Aufbau aus einer Kette aus Aminosäuren. Die individuelle Sequenz der Aminosäuren wird als primäre Struktur des Proteins bezeichnet. Durch Wasserstoffbrückenbindungen untereinander ordnen sich die Aminosäuren in wiederkehrenden Formen an. Die daraus entstehenden Strukturen lassen sich in die Kategorien α -Helix, β -Faltblatt und β -Schleife einordnen, sie bestimmen die Sekundärstruktur des Proteins. Eine weitere Stufe darüber folgt die Tertiärstruktur. Hier handelt es sich um die Organisation der Sekundärstrukturen durch Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken, hydrophobe oder Van-der-Waals-Kräfte. Einige der Biomassen bestehen nicht nur aus einer einzigen Kette von Aminosäuren, sondern lagern mehrere Ketten in einer Quartärstruktur an. Dabei kann es sich sowohl um homogene Kombinationen aus gleichen Untereinheiten, als auch um heterogene Kombinationen aus unterschiedlichen Untereinheiten handeln. Der gesamte Prozess von Synthese der Aminosäurekette bis zur Anordnung in der Tertiär- oder Quartärstruktur wird als Proteinfaltung bezeichnet.

Hämproteine bilden eine Unterklasse der Proteinfamilie. Sie binden das Molekül Häm als prosthetische Gruppe. Häm ist ein in einem Ringsystem organisierter Farbstoff (Porphyrin) mit einem zentral gebundenen Eisenatom. Am Eisen können kleine Liganden wie Sauerstoff (O_2), Stickstoffmonoxid (NO) oder Kohlenstoffmonoxid (CO) binden [1]. Die prominentesten Vertreter der Hämproteine sind das Hämoglobin und Myoglobin. Hämoglobin transportiert O_2 von der Lunge zum Gewebe und gibt den roten Blutkörperchen ihre Farbe [2]. Hämoglobin mit gebundenem O_2 erscheint hellrot (arterielles Blut), ligandenfreies Hämoglobin dunkelrot (venöses Blut). Myoglobin lagert den von Hämoglobin gelieferten Sauerstoff im Muskelgewebe und erklärt somit die rötliche Farbgebung der Muskeln [3]. Neben Transport- und Lagerungsproteinen gibt es viele weitere Unterklassen an Hämproteinen. Sie erfüllen ihre Rolle als Elektronentransferproteine [4, 5], als Sensorproteine für Gasmoleküle [6, 7] oder als Biokatalysatoren. Beispiele für Biokatalysatoren sind die Enzyme Cytochrom P450 [8],

Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) [9], Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) [10] und die in dieser Arbeit untersuchte Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) [11].

1.1.2. Die Rolle der NOS im menschlichen Körper

In den frühen 1980er Jahren machte Furchgott während seiner Forschungsarbeit an Medikamenten zur Behandlung von Blutgefäßkrankheiten eine interessante Entdeckung [12]. Er fand einen vom Endothel, der inneren Gewebeschicht der Blutgefäße, abgesonderten Botenstoff, der für die Absenkung des Blutdrucks durch Entspannung der Gefäßwände sorgte (Vasodilatation). Die Identität des Botenstoffs konnte er noch nicht bestimmen und nannte ihn vorerst EDRF (*Endothelium-derived Relaxing Factor*). Wenige Jahre später kamen Furchgott [13] und Ignarro [14] unabhängig voneinander zu dem Ergebnis, dass es sich bei EDRF um NO handelt. Die Öffentlichkeit nahm diese Meldung mit großer Skepsis auf, ehe Moncada [15] 1987 die Diskussion durch seine Forschungsarbeiten endgültig beenden konnte und somit Tür und Tor für ein spannendes Forschungsgebiet öffnete. 1998 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Arbeiten über die Rolle von Stickstoffmonoxid als Botenstoff im Herz-Kreislauf-System zu gleichen Teilen an Furchgott, Ignarro und Murad verliehen.

Mittlerweile ist weitaus mehr über NO im menschlichen Körper bekannt. Seine Bildung wird durch die Enzymfamilie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) katalysiert. Aus am Hämeisen gebundenem O₂ und der Aminosäure L-Arginin entsteht NO und das Abfallprodukt L-Citrullin. Die Synthesereaktion benötigt den Kofaktor (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin (H4B), sowie die Koenzyme Nicotinamidadenin dinucleotidphosphat in reduzierter Form (NADPH), Flavinmononucleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als Elektronendonatoren [16] (Unterabschnitt 1.1.3).

Die Familie der NOS in Säugetieren umfasst drei Isoformen, die sich durch den Ort ihres Vorkommens, Einsatzzweck des produzierten NO und Art der Expression unterscheiden (Abb. 1.1) [11]. Die eNOS findet sich in den Endothelzellen der Blutgefäße und synthetisiert das von Furchgott entdeckte NO als Botenstoff zur Vasodilatation [13]. Neben seiner Rolle als Botenstoff zur Vasodilatation, fungiert NO außerdem als Neurotransmitter im Gehirn, synthetisiert durch die nNOS in Neuronen [17, 18]. Der Bedarf des menschlichen Körpers an eNOS und nNOS ist fortwährend, folglich werden beide Arten konstitutiv exprimiert. Bei der dritten Isoform des Enzyms handelt es sich um die induzierbare NOS (iNOS). Das von ihr hergestellte NO agiert als Zytotoxin in der Immunabwehr [19]. Die Expression der iNOS ist nicht wie bei der eNOS und nNOS lokal und konstitutiv, sondern wird bei Bedarf überall im Körper in Makrophagen, den Polizisten des Immunabwehrsystems, induziert [20–22]. Die iNOS steht stark im Fokus der Forschung, denn das, bei krankhafter Überexpression, synthetisierte NO findet sich in der Pathogenese vieler Krankheiten wie Diabetes, Arthritis, Multiple Sklerose oder bei einem septischen Schock [23–27]. Das Interesse an geeigneten Inhibitoren, die imstande sind, die Aktivität der iNOS gezielt zu regulieren und somit der Zerstö-

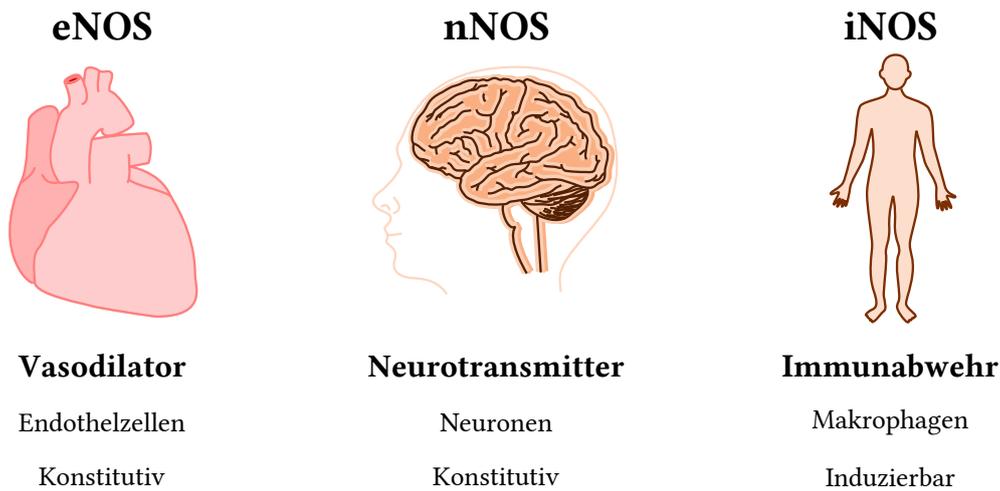


Abbildung 1.1: Die drei Mitglieder der NOS Familie. eNOS und nNOS werden konstitutiv in Endothelzellen beziehungsweise Neuronen exprimiert. Das von ihnen produzierte NO agiert als Botenstoff zur Vasodilatation und als Neurotransmitter. Die induzierbare NOS spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und wird nach Bedarf in Makrophagen im ganzen Körper exprimiert.

Die Erhaltung der Funktion gesunden Gewebes durch das hochreaktive NO Einhalten zu gebieten, ist folglich sehr groß [28, 29].

1.1.2.1. Struktur der iNOS, Domäneninteraktion

Die iNOS ist ein 130 kDa schweres und 1144 Aminosäuren langes Polypeptid [30], das, wie alle drei Mitglieder der NOS-Familie, in seiner aktiven Form ein Homodimer bildet [31]. Der Aufbau des Enzyms in dimerer Form, die Quartärstruktur, sowie der Monomere, die Tertiärstruktur, ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

Das Monomer ist in drei Domänen unterteilt. Am N-Terminus, der Seite des Polypeptids mit freier Aminogruppe, befindet sich die sogenannte Oxygenase Domäne (iNOS_{oxy}, Aminosäuren 1 – 498, 56 kDa) [32, 33]. Sie beinhaltet das katalytische Zentrum der NO Synthese mit Bindungsstellen für Häm, Substrat Arginin, sowie Kofaktor H4B [34–39]. Am C-Terminus, der Seite des Polypeptids mit freier Carboxygruppe, befindet sich die Reduktase Domäne (iNOS_{red}, Aminosäuren 531–1144, 74 kDa). Sie bietet Bindungsstellen für die drei Koenzyme NADPH, FMN und FAD. Oxygenase und Reduktase sind durch eine kurze Calmodulin-bindende Domäne miteinander verbunden (Aminosäuren 499 – 530).

Struktur und Funktion der NOS sind eng miteinander verknüpft. Noch vor der Bestimmung der Struktur durch Röntgenkristallographie konnte gezeigt werden, dass die NO Synthese der NOS nur in dimerisierter Form möglich ist [34]. Ein Grund dafür ist die Elektronenversorgung der Synthesereaktion in NOS_{oxy} durch die in NOS_{red} gebundenen Koenzyme. Der Elektronentransfer findet nicht zwischen den Domänen des

selben Monomers statt, sondern jeweils von NOS_{red} des einen Monomers zu NOS_{oxy} des anderen Monomers (Abb. 1.2) [31, 40, 41].

Bei Experimenten zur Spaltung der einzelnen Domänen durch Trypsin zeigte sich, dass NOS_{oxy} auch in isolierter Form dimerisiert und alle strukturellen sowie spektroskopischen Eigenschaften konserviert bleiben. Dieser NOS_{oxy} Dimer ist trotz ausreichender Versorgung von H4B und freiem NADPH nicht in der Lage, NO aus Arginin und Sauerstoff zu bilden, kann aber NO und Citrullin in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aus NOHA bilden [42]. Zwar bewahrt auch NOS_{red} Struktur und Funktion als Elektronenquelle, bleibt allerdings als Monomer zurück [43]. Diese Ergebnisse zeigten die Unabhängigkeit der Domänen und führten zu dem bis heute anerkannten Modell der NOS-Struktur (Abb. 1.2). Zwei NOS_{oxy} bilden das Dimer, während sich NOS_{red} als unabhängige Erweiterung des Proteins in nächster Nähe zu NOS_{oxy} des anderen Monomers anlagert (englisch: *domain swapping*) und so den interstrukturellen Elektronentransfer ermöglicht [31]. Es sei angemerkt, dass aktuell nur Strukturen aus Röntgenstrukturanalysen der einzelnen Domänen (aller drei NOS) bestimmt werden konnten; Strukturen des gesamten Dimers jedoch nicht [30, 44–46].

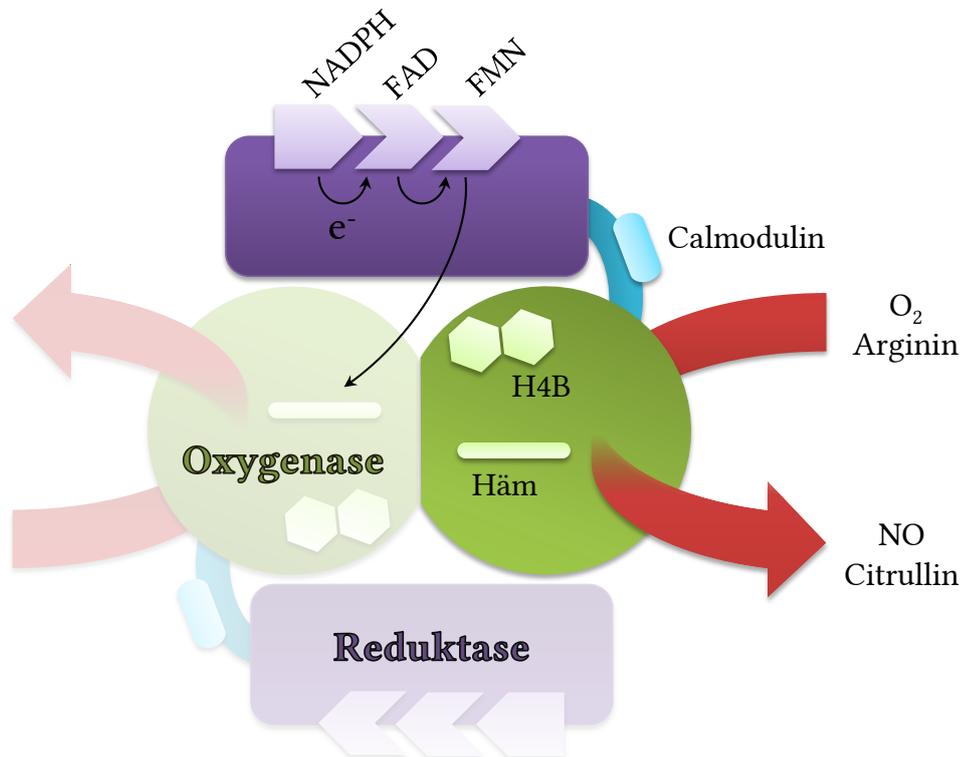


Abbildung 1.2: Schema der Geometrie eines NOS Homodimers. Zwei NOS_{oxy} Domänen bilden das Dimer. Die über eine Calmodulin-bindende Sequenz verbundene NOS_{red} -Domäne des einen Monomers liefert jeweils Elektronen zur NOS_{oxy} -Domäne des anderen Monomers [31].

1.1.2.2. Struktur des iNOS_{oxy} Dimers

Die Rolle der Dimerisierung der Oxygenase Domäne in Hinsicht auf die NO Synthese, sowie der Dimerisierungsprozess selbst, sind bis heute nicht in vollem Umfang verstanden. Zur Untersuchung der Dimerisierung stellten Ghosh et al. 1997 [47] vom N-Terminus ausgehend verkürzte Varianten von iNOS_{oxy} her. Die Variante $\Delta 65$ (durch Gendeletion um die ersten 65 Aminosäuren verkürzt) zeigte sich in ihren Eigenschaften noch identisch zum iNOS_{oxy} Wildtyp. Allerdings hatte weitere Verkürzung ($\Delta 114$ und $\Delta 117$) einen dramatischen Effekt auf Struktur und Funktion des Enzyms. Beide Varianten befanden sich ausschließlich im monomeren Zustand und waren unfähig, H4B oder Arginin zu binden (und somit unfähig zur NO Synthese).

1998 gelang es Crane et al. [30], die Struktur der dimerisierten $\Delta 65$ iNOS_{oxy} Variante mit Kofaktor und Substrat röntgenkristallographisch zu bestimmen (PDB Code: 1NOD). Sie zeigte deutliche Unterschiede zur im Jahr zuvor bestimmten Struktur des $\Delta 114$ iNOS_{oxy} Monomers (PDB Code: 1NOC, 1NOS) [28]. Einige mobile und exponierte hydrophobe Regionen arrangieren sich im Dimer um, stabilisieren den 30 Å tiefen Substratbindungskanal in das aktive Zentrum von iNOS_{oxy} (Vergleich Monomer: 10 Å) und bilden die Bindungsstellen für H4B und Arginin. Gebundenes H4B befindet sich dabei im Zentrum der Dimerschnittstelle und bildet Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren beider Monomere [48].

Die 49 Aminosäuren lange Sequenz 66 – 114, die die beiden Varianten unterscheidet, besteht aus einem haarnadelförmigen Haken aus zwei β -Faltblättern, einem Zinkbindenden Segment, sowie einem H4B-bindenden Segment. Crane et al. [49] konnten an einer weiteren $\Delta 65$ iNOS_{oxy} Struktur zeigen, dass die Haken zwei verschiedene Konformationen einnehmen können (PDB Codes: 1DF1, 1QOM). Die linke Spalte von Abbildung 1.3 zeigt die sogenannte *unswapped* Struktur; die haarnadelförmigen Haken interagieren mit der eigenen Proteinuntereinheit. Im Zentrum des Dimers befindet sich ein Zinkatom, das tetraedrisch von vier Cysteinen (zwei pro Monomer) ligiert ist. Die rechte Spalte zeigt die *swapped* Struktur; die Haken überlappen mit der jeweils anderen Proteinuntereinheit und maximieren dadurch die Berührungsfläche des Dimers und damit auch dessen Stabilität. Statt des Zinkatoms findet sich eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen. Die Funktion dieser beiden möglichen Strukturen konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Es wird vermutet, dass die *unswapped*-Struktur in Lösung hauptsächlich im monomeren Zustand auftritt, um die für die Dimerisierung wichtige Sequenz 66 – 114 vor zellulärem Abbau zu schützen, während die *swapped*-Struktur zur Stabilisierung der Struktur im dimerisierten Zustand auftritt [50].

Neben diesen beiden Strukturen trifft man in der Literatur auf zwei weitere. Es handelt sich dabei um die gängige Bezeichnung der iNOS_{oxy} Dimerstruktur als *tight* und *loose*. Das katalytische Zentrum der *loose* Struktur ist, im Vergleich zur *tight* Struktur, dem Lösungsmittel gegenüber eher exponiert [51]. Die *tight* Struktur ist außerdem widerstandsfähiger gegenüber erzwungener Monomerisierung [52], sowie der Zerstörung

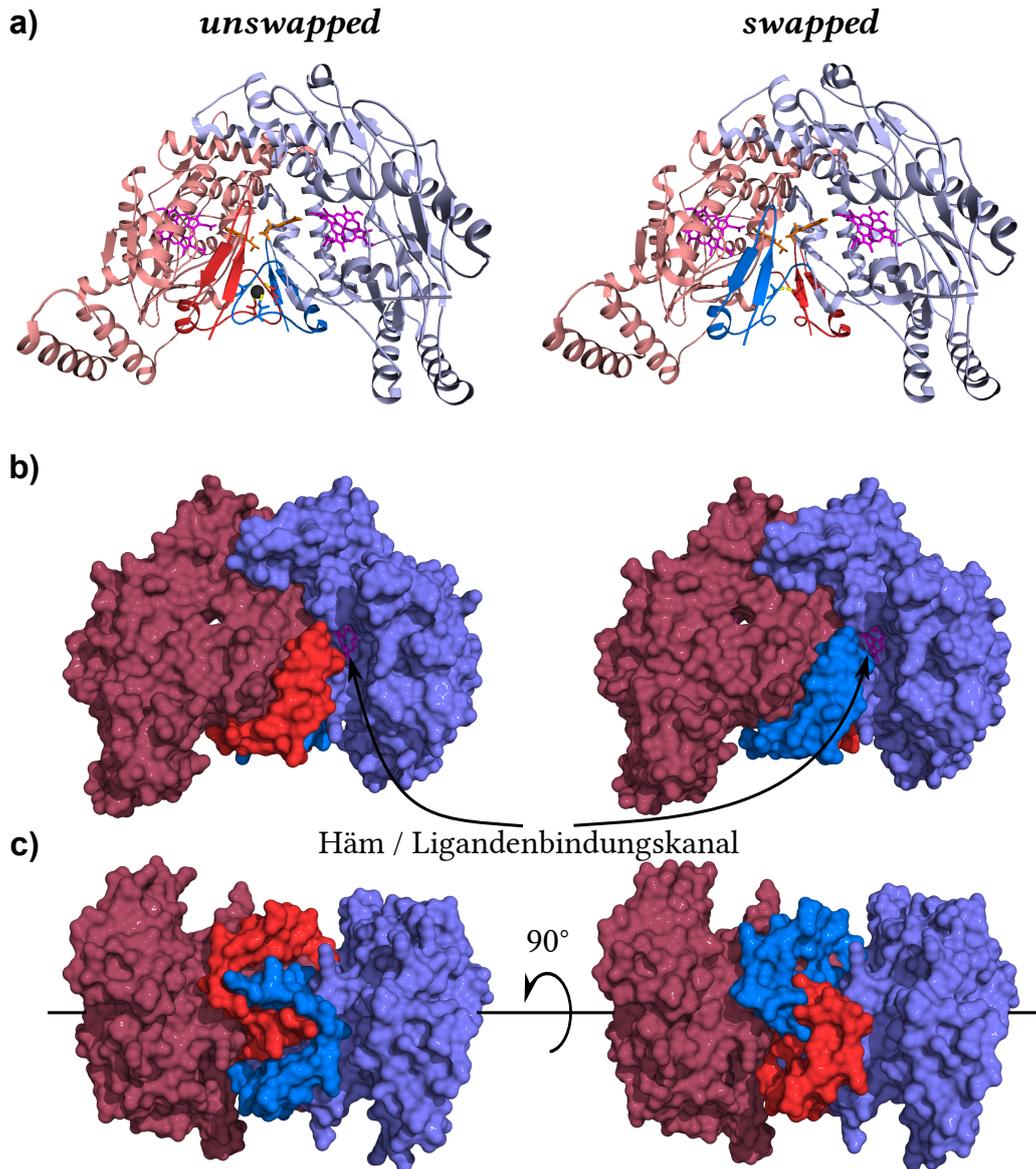


Abbildung 1.3: Struktur der *unswapped/swapped* Zustände von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ (aus [49], PDB Codes: 1DF1, 1QOM). **a)** Die beiden Haken sind in akzentuiertem Rot und Blau dargestellt. In der *unswapped* Struktur wechselwirken sie hauptsächlich mit der eigenen $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ Untereinheit. In der *swapped* Struktur wechselwirken die Haken stark mit der gegenüberliegenden $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ Untereinheit und vergrößern somit die Dimerschnittstelle. In beiden Strukturen ist der Kofaktor H4B nahe der Dimerschnittstelle gebunden. Das in Magenta gefärbte Häm im Inneren des Enzyms ist durch einen Tunnel in der Struktur zu erkennen. **b)** Oberfläche beider Strukturen. **c)** Blick auf die Struktur aus b) von „unten“. Wieder sind die Haken zur besseren Sichtbarkeit in Rot und Blau akzentuiert.

des Enzyms durch Proteolyse [47]. Es wird angenommen, dass $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ frei von Substrat und Kofaktor eher in Richtung *loose* Struktur tendiert, während nach Zugabe von Substrat und Kofaktor die *tight* Struktur eindeutig präferiert wird. Die Stabilität der *tight* Dimerstruktur nimmt durch Zugabe von Substrat und Kofaktor in folgender Reihenfolge zu: Arg > H4B > Arg + H4B [48, 53, 54].

Wang et al. [55] konnten die beiden Strukturen bei der CO-ligierten P450-Spezies (siehe Unterabschnitt 1.1.4) von $n\text{NOS}$ durch Raman-Spektroskopie nachweisen. Bei substrat- und kofaktorfremem Protein fanden sie ähnlich große Populationen beider Strukturen, nach Zugabe von Substrat nur noch die *tight* Struktur. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich bei kristallographischen Untersuchungen der NOS des Heubazillus ($bs\text{NOS}$, *Bacillus subtilis*) [56] und Untersuchungen von $i\text{NOS}$ mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung [57]. Die *loose* Struktur des $bs\text{NOS}$ wies einen um 10% größeren Streumasseradius als die *tight* Struktur auf. Sowohl bei $bs\text{NOS}$, als auch bei $i\text{NOS}$ waren die Proteinpopulationen vor Zugabe von Substrat und/oder Kofaktor ungefähr gleich auf beide Strukturen verteilt. Eine umfassende Interpretation der beiden Konformationen steht weiterhin aus.

1.1.2.3. Struktur des katalytischen Zentrums von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$

Die Struktur des katalytischen Zentrums von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ ist in Abbildung 1.4 dargestellt [30]. Das Häm ist auf proximaler Seite axial von der Thiolatgruppe eines Cysteins (C194) ligiert. Zwischen der Thiolatgruppe und den Aminosäuren Tryptophan 188 (W188), Isoleucin 195 (I195) und Glycin 196 (G196) erstreckt sich ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückennetzwerk. Das Indolringsystem von W188 ist parallel zum Ringsystem des Häms ausgerichtet und weist dadurch eine stabilisierende Wirkung auf die Struktur auf (englisch: π stacking). Auf distaler Seite des Häms findet sich die Ligandenbindungsstelle (O_2 , NO, CO etc.) und direkt darüber die Bindungsstelle für das Substrat Arginin. Der Kofaktor H4B befindet sich mit etwas größerem Abstand seitlich des Häms und zu diesem orthogonal orientiert. Substrat und Kofaktor sowie Häm und Kofaktor sind durch Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren des Proteinerückgrats verbunden [36]. Wie in Abbildung 1.3 a zu erkennen ist, bietet ein Tunnel in der Struktur Zugang zum katalytische Zentrum des Enzyms.

1.1.3. Mechanismus der NO Synthese

Wie bereits erwähnt wurde, dient die Aminosäure L-Arginin als Substrat für die NO Synthese, deren Mechanismus bei allen drei Isoformen der NOS gleich ist. L-Arginin ist eine der 20 proteinogenen Standardamino-säuren und ist semi-essentiell für den menschlichen Körper. Die grundlegend identische Struktur dieser Aminosäuren ist in Abbildung 1.5 am Beispiel von L-Arginin demonstriert. Das sogenannte C_{α} -Atom trägt eine Aminogruppe, eine Carboxygruppe, ein Wasserstoffatom und eine organi-

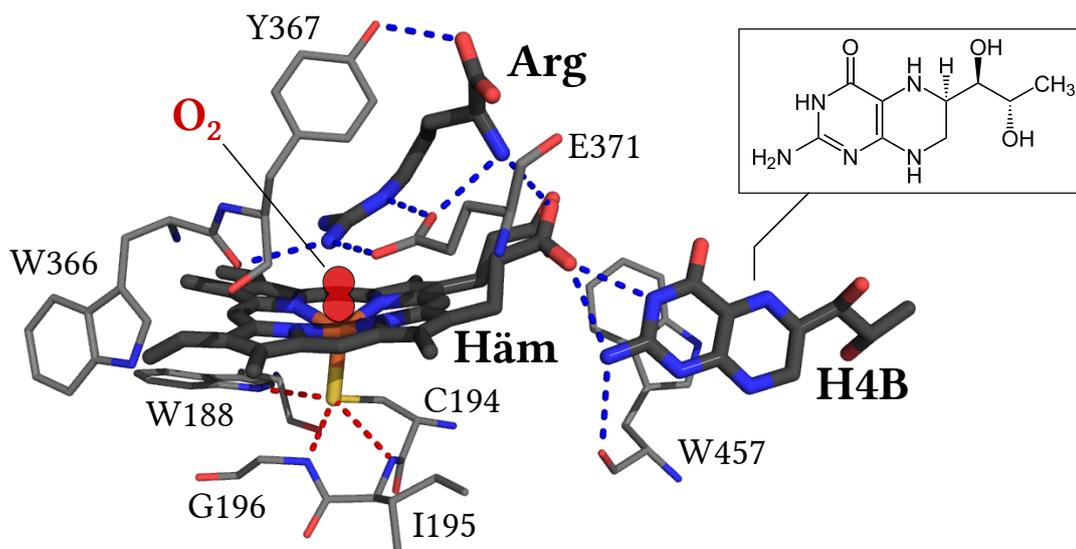


Abbildung 1.4: Katalytisches Zentrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$. Gezeigt sind die wichtigsten Aminosäuren, das heterozyklische H4B und, durch gestrichelte Linien, deren Wasserstoffbrückennetze auf distaler (blau) und proximaler (rot) Seite des Häms [30, 36]. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode gekennzeichnet. Die Zahl hinter dem Buchstaben gibt die Position in der Polypeptidkette an. Farbcode der Atome: Kohlenstoff (C) grau, Stickstoff (N) blau, Sauerstoff (O) rot, Schwefel (S) gelb, Hämeisen (Fe) orange. Das durch zwei rote Kugeln dargestellte Sauerstoffmolekül ist nicht Teil der Kristallstruktur (PDB-code: 1NOD), sondern wurde zur Veranschaulichung der Ligandenbindung am Hämeisen nachträglich eingefügt.

sche Seitenkette, durch die sich die Aminosäuren unterscheiden. Die Seitenkette von L-Arginin endet mit einer Guanidinogruppe. Das C_{α} -Atom ist ein chirales Zentrum. Ist die Aminogruppe in der Fischer-Projektion nach links ausgerichtet, so handelt es sich um die L-Form der Aminosäure (*levo*, links), ist die Aminogruppe nach rechts ausgerichtet, so handelt es sich um die D-Form (*dextro*, rechts). Die beiden Strukturen sind sogenannte Enantiomere, sie lassen sich nur durch Spiegelung ineinander überführen. Natürliche Proteine bestehen fast ausschließlich aus den L-Aminosäuren. Da in dieser Arbeit nur mit L-Arginin gearbeitet wurde, wird das vorangestellte L im Folgenden oftmals weggelassen. Als Bezeichnung wird außerdem der Dreibuchstabencode Arg und der Einbuchstabencode R benutzt.

Bei der NO Synthese handelt es sich um einen zweistufigen Oxidationsprozess eines Stickstoffatoms der Guanidinogruppe der Seitenkette von Arginin im katalytischen Zentrum des Enzyms [19]. Sie ist in komprimierter Form in Abbildung 1.6 dargestellt. Im ersten Schritt des zweistufigen Prozesses wird das Substrat Arginin zum Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) hydroxyliert. Dabei wird ein O_2 und ein NADPH (Elektronendonator) verbraucht. Im zweiten Schritt wird das Zwischenpro-

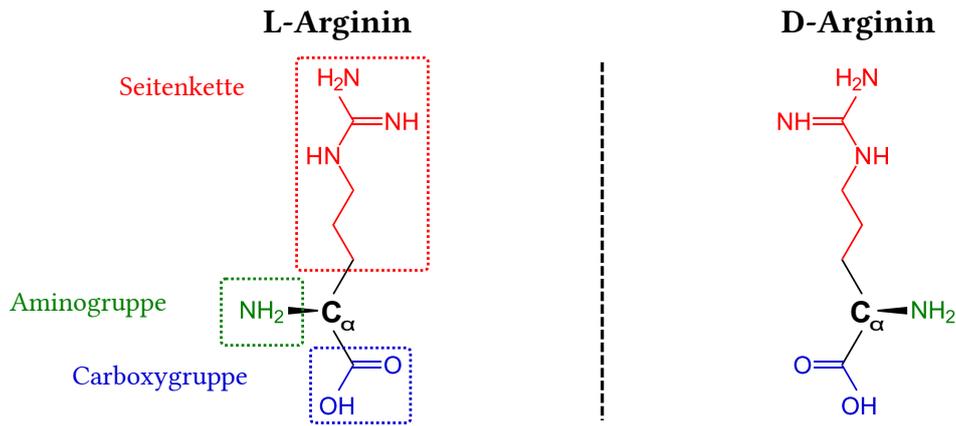


Abbildung 1.5: Struktur der Aminosäure Arginin in der Fischer-Projektion. Die Aminogruppe, die Carboxygruppe und die organische Seitenkette am C_α-Atom sind farbig umrandet. Links die L-Form, rechts die D-Form, dazwischen (gestrichelt) die Spiegelebene.

dukt NOHA, unter Verbrauch eines weiteren O₂ und 0,5 NADPH, zum Abfallprodukt L-Citrullin und NO oxidiert [30, 72–74].

Der ausführliche Reaktionsweg der Synthese ist sehr viel komplexer und noch nicht vollends verstanden. Besonders die einzigartige Rolle des Kofaktors H4B, der sowohl als Elektronendonator, als auch als Elektronenakzeptor fungiert, wirft weiterhin Fragen auf [75–80]. Nach aktuellem Wissenstand wird die Arg Hydroxylierung durch einen Elektronentransfer von NADPH initiiert (Abb. 1.7 a) [16]. Das Elektron reduziert das Hämeisen und befähigt es somit Sauerstoff zu binden ($\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) [18, 19, 73]. Anschließend liefert H4B ein weiteres Elektron und bildet die aktivierte Peroxy-Spezies, die in zwei Zwischenreaktionen zwei Protonen aufnimmt, ein Wassermolekül produziert und im sogenannten Compound I Zustand zurückbleibt [81]. Diese Spezies hydroxyliert das Substrat Arg zu NOHA. Es konnte gezeigt werden, dass H4B während des gesamten zweistufigen Prozesses im Protein gebunden bleibt. Das H4B Radikal muss demnach ein Elektron von NADPH aufnehmen, um in der zweiten Stufe wieder einsatzbereit zu sein.

Die zweite Stufe der Reaktion, die NOHA Oxidation (Abb. 1.7 b), durchläuft eine ähnliche Kaskade an Reaktionen, jedoch mit vereinzelt eklatanten Unterschieden. Wie in der ersten Stufe wird das Hämeisen durch ein von NADPH geliefertes Elektron reduziert und der Sauerstoff der Oxy-Spezies durch H4B aktiviert. Der aktivierte Komplex nimmt nun jedoch nur ein Proton auf und reagiert als Hydroperoxo-Spezies mit NOHA zu einer Nitroxyl-Spezies und L-Cit unter Bildung eines Wassermoleküls. Das gebildete NO Molekül ist noch am reduzierten Fe²⁺ gebunden. Die Affinität für NO in einem solchen Komplex ist im sub-nanomolaren Bereich und macht das Entkommen des NO Moleküls nahezu unmöglich [20, 82]. Aufgelöst wird diese Sackgassenreaktion durch das H4B Radikal, das ein Elektron des Fe²⁺ – NO Komplexes aufnimmt. Anschließend kann NO vom schwach NO-bindenden Fe³⁺ – NO Komplex dissoziieren.

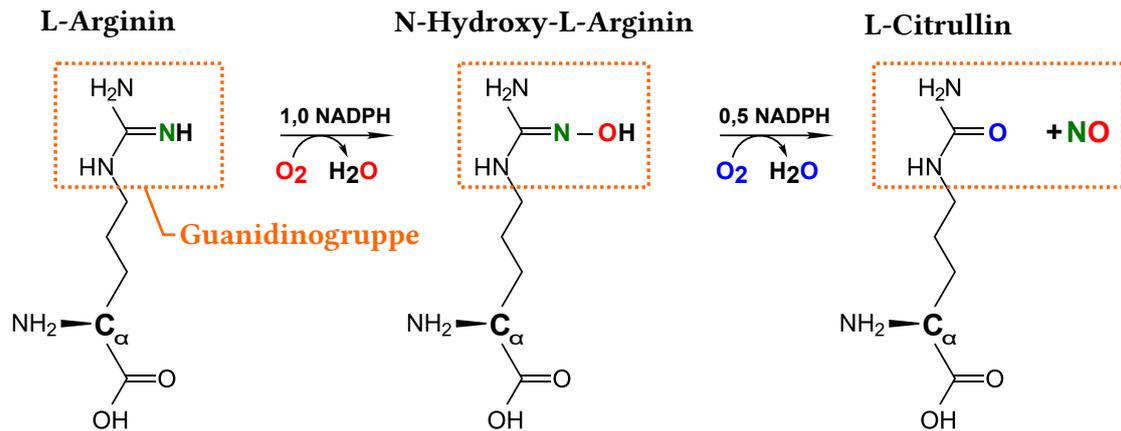
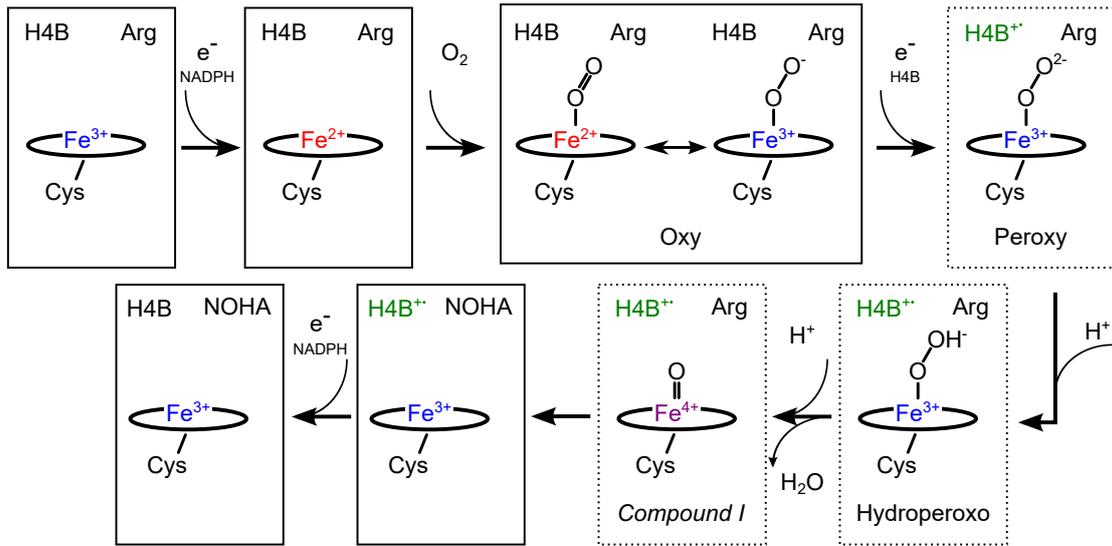


Abbildung 1.6: Zweistufige Reaktion zur Produktion von NO durch die NOS. Im ersten Schritt wird L-Arg zu NOHA hydroxyliert. Dabei wird je ein Molekül NADPH und O_2 verbraucht. Im zweiten Schritt wird NOHA unter Verwendung eines halben NADPH und eines O_2 Moleküls zu L-Cit und NO oxidiert.

Dieser Reaktionsweg wird von allen drei Isoformen der NOS durchlaufen. Ein Unterschied zeigt sich jedoch in der Regulation der NO Synthese. Bei den konstitutiven eNOS und nNOS ist die Synthese durch die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert, die bei erhöhten Konzentrationen das Binden von Calmodulin (CaM) an die NOS induziert [34, 35, 83]. CaM aktiviert den Elektronentransfer von NADPH zum Häm und ermöglicht so die NO Synthese [84, 85]. iNOS bindet CaM dagegen unabhängig von der Calciumkonzentration [86]. Die NO Synthese ist damit beständig hoch, eine Regulation findet nur auf transkriptioneller Ebene statt.

a) 1. Stufe - Arginin Hydroxylierung



b) 2. Stufe - NOHA Oxidation

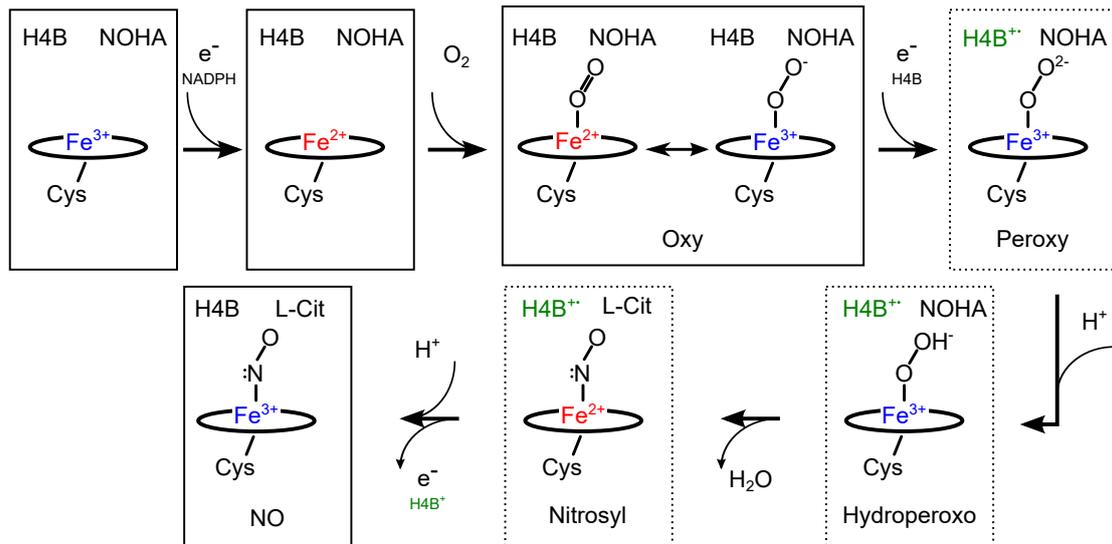


Abbildung 1.7: Vollständiger Pfad des Mechanismus der NO Synthese nach Tejero et al. [16].
a) Erste Stufe, Hydroxylierung von Arginin zu dem Zwischenzustand NOHA. **b)** Zweite Stufe, Oxidation von NOHA zu NO und dem Abfallprodukt Citrullin.

1.1.4. CO als sechster Ligand - die iNOS P450/P420-Spezies

Neben O_2 und NO als Edukt und Produkt der Synthesereaktion ist auch CO ein möglicher axialer Ligand der NOS. Kim et al. [58] bringen das Binden von CO an iNOS mit einer verminderten NO-Produktion durch CO induzierte Monomerisierung in Verbindung. CO-ligiertes $iNOS_{oxy}$ weist aufgrund der Cysteinligation des Häms eine sogenannte P450 Absorptionsbande (Soret-Bande) bei ~ 450 nm auf [59]. Die Bezeichnung P450 ist der Namensgebung des Cytochrom P450 (P wie Pigment) entliehen, das bei Bindung von CO ebenfalls eine Soret-Bande bei ~ 450 nm aufweist [60]. Die biologisch aktive P450 iNOS CO-Spezies ($iNOS_{P450}$) konvertiert nach ihrer Bildung spontan in eine inaktive P420 CO-Spezies ($iNOS_{P420}$) mit einer Soret-Bande bei ~ 420 nm [61]. Binden von Arginin oder H4B vermindert, beziehungsweise invertiert die Konversion. Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die beiden Proteinzustände P450 und P420 an die beiden *tight/loose*-Dimerstrukturen gekoppelt sind [51].

Der Mechanismus der P450 \rightarrow P420 Konversion, welcher in allen P450-artigen Proteinen existiert [51, 62], wird bis zum heutigen Tage kontrovers diskutiert [51, 63, 64]. Vieles spricht für eine Änderung des proximalen Hämliganden von Cystein zu Histidin, wie zum Beispiel die Ähnlichkeit der P420 Soret-Bande zu Soret-Banden von Histidin-ligierten Hämproteinen wie Hämoglobin und Myoglobin [65–67]. Zusätzlich konnten Raman-Banden der P420 Form von Cytochrom P450 mit Fe-Histidin Schwingungsmoden assoziiert werden [65]. Allerdings befindet sich in keiner der drei NOS Isoformen Histidin in nächster Nähe zum Hämeisen. Das Binden von CO müsste folglich eine relativ große Konformationsänderung innerhalb der NOS_{oxy} Domäne bewirken, und das trotz struktureller Unterschiede in allen drei Isoformen auf gleiche Weise.

Eine 2009 von Sabat et al. [51] veröffentlichte Studie über $iNOS_{P420}$ diskutiert eine zweite Theorie [51]. Sie schlägt vor, dass die Bindung von CO am Häm die Protonierung des proximalen Thiolats zu Thiol triggert; gleichzeitig löst sich die Wasserstoffbrücke zwischen C194 und W188 auf. In der Literatur findet sich Evidenz bei Thiolat und CO-ligierten Porphyrin-Modell-Komplexen, welche unter Protonierung des Thiolats vom P450-Typus nach P420 konvertieren [65, 68]. Zudem weist der P450 \rightarrow P420 Übergang eines Cytochroms P450 aus *Mycobacterium tuberculosis* eine mit der Theorie übereinstimmende pH-Abhängigkeit auf, bei der P420 bei niedrigem pH die favorisierte Spezies bildet [69]. Sabat fand eine übereinstimmende pH-Abhängigkeit für substratgebundene $iNOS_{oxy}$; substrat- und kofaktorfreie $iNOS_{oxy}$ konvertierte dagegen unabhängig vom pH-Wert vollständig zu $iNOS_{P420}$. Des Weiteren fand sich eine Raman-Bande bei 221 cm^{-1} , die trotz ihrer Ähnlichkeit zur Fe-Histidin-Schwingung von Myoglobin [70], aufgrund eines fehlenden H_2O/D_2O -Isotopeneffekts, mit einer durch neutrales Thiol verstärkten Häm-Schwingungsmoden assoziiert wurde. 2013 berichten Sun et al. [71] von Raman-Spektren der H93G Myoglobin-Mutante und Cytochrom P420_{cam}. Die Spektren ließen die von Sabat gefundene Bande bei 221 cm^{-1} vermissen, stattdessen konnte eine Bande bei 218 cm^{-1} mit einer Fe-Histidin-Schwingung in Verbindung gebracht werden.

Offensichtlich sind die Erkenntnisse über die P450/P420-Spezies von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ spärlich. Weder herrscht Einigkeit über die biochemischen Effekte, die die Konversionsreaktion beschreiben, noch über den Einfluss der Proteinstruktur sowie des Oligomerisierungszustands. Die im Kapitel 4 vorgestellten Messungen versuchen diesen Fragen näher zu kommen und das Bild über die $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -Spezies weiter zu komplettieren.

1.2. Protein-Liganden Interaktion

1.2.1. Gleichgewichtssituation

Das thermodynamische Gleichgewicht zwischen gebundenem Protein-Ligand-Komplex, PL, und dissoziiertem Protein, P, und Ligand, L, wird beschrieben durch



Die mikroskopischen Ratenkoeffizienten k_{on} und k_{off} geben die Geschwindigkeit der Hin- und Rückreaktion an. Das Gleichgewicht ist durch den Dissoziationskoeffizienten K_d bestimmt:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}. \quad (1.2)$$

Sei Y der Anteil der Proteine, die einen Liganden gebunden haben,

$$Y = \frac{[PL]}{[P] + [PL]} = \frac{[L]}{[L] + K_d}, \quad (1.3)$$

so zeigt sich, dass K_d der freien Ligandenkonzentration entspricht, bei der die Hälfte aller Proteine einen Liganden gebunden hat.

1.2.2. Nichtgleichgewichtssituation

Wie aus Gleichung (1.2) ersichtlich ist, liefern Messungen im thermodynamischen Gleichgewicht lediglich den Koeffizienten K_d , und damit nur das Verhältnis der mikroskopischen Ratenkoeffizienten. Zur Bestimmung der Reaktionsraten können zeitaufgelöste Nichtgleichgewichtsmessungen genutzt werden. Das Protein-Ligand-System wird durch eine Störung aus der Gleichgewichtslage gebracht und anschließend bei der Rückkehr ins Gleichgewicht beobachtet. Die Auswahl an messtechnisch möglichen Störungen ist groß, Bedingung ist jedoch stets, dass die Dauer der Störung um Größenordnungen kleiner ist als die Dauer des Relaxationsprozesses. In dieser Arbeit wurde die Methode der Blitzlichtphotolyse verwendet. Ein nur wenige Nanosekunden breiter Laserpuls deponiert eine große Menge an Energie im System und verursacht die Dissoziation der Protein-Ligand-Bindung. Als Wegbereiter dieser Technik gilt Gibson [87], der 1957 nachweisen konnte, dass die Bindung zwischen Hämeisen und CO in Myoglobin durch sichtbares Licht aufgelöst werden kann. Näheres zur Blitzlichtphotolyse wird in Abschnitt 2.4 erläutert.

1.2.2.1. Zweizustandsmodell

Einen ersten Ansatz zur Beschreibung der Ligandenbindung von Hämproteinen liefert das Zweizustandsmodell (Abb. 1.8). Zustand A beschreibt den gebundenen Zustand, B den dissoziierten Zustand. Die Zustände tauschen mit den mikroskopischen Ratenkoeffizienten k_{AB} und k_{BA} aus:



Mit dem Grad der Besetzung der beiden Zustände, $N_{A/B}$ (mit $N_A + N_B = 1$), gilt für die Gleichgewichtssituation:

$$N_A \cdot k_{AB} = N_B \cdot k_{BA}. \quad (1.5)$$

Das Gleichgewicht ist wieder durch den Koeffizienten K definiert:

$$K = \frac{N_B}{N_A} = \frac{k_{AB}}{k_{BA}}. \quad (1.6)$$

K kann ebenfalls durch die Differenz der freien (Gibbs'schen) Enthalpie, ΔG , der Zustände A und B beschrieben werden:

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}. \quad (1.7)$$

R bezeichnet die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur. Die mikroskopischen Ratenkoeffizienten sind durch die Arrhenius-Gleichung bestimmt:

$$k_{ij} = A \cdot e^{-\frac{H_{ij}}{RT}}, \quad (1.8)$$

mit dem Frequenzterm A , der Temperatur T , der allgemeinen Gaskonstanten R und der Höhe der Enthalpiebarriere zwischen Zustand i und j , H_{ij} (Abb. 1.8).

Befindet sich das System nach einer Störung in einem Nichtgleichgewichtszustand, so ist die Relaxation des Zustands A zurück ins Gleichgewicht durch die Differenzialgleichung

$$\frac{dN_A}{dt} = N_B \cdot k_{BA} - N_A \cdot k_{AB} \quad (1.9)$$

beschrieben. Integration dieser Gleichung ergibt die zeitabhängige Relaxationsfunktion

$$N_A(t) = N(t \rightarrow \infty) + \Delta N_A \cdot e^{-(k_{AB}+k_{BA}) \cdot t}. \quad (1.10)$$

Mit Gleichung (1.10) lässt sich die Summe der Ratenkoeffizienten aus einer Nichtgleichgewichtsmessung bestimmen. Wird zusätzlich der Koeffizient K durch eine Gleichgewichtsmessung ermittelt, so können die mikroskopischen Ratenkoeffizienten k_{AB} und k_{BA} einzeln berechnet werden.

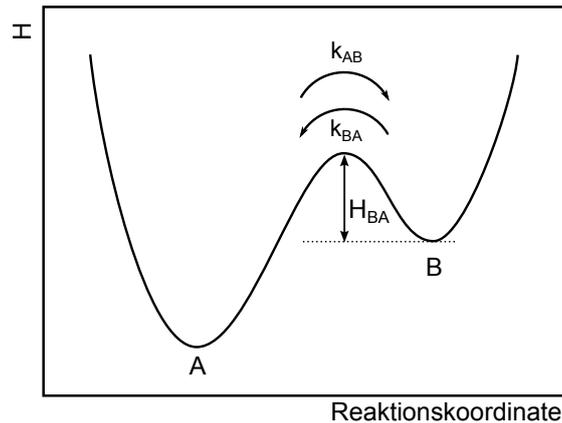


Abbildung 1.8: Das Zweizustandsmodell. Zustand A bezeichnet den gebundenen Häm-Liganden-Komplex, Zustand B den dissoziierten Komplex. Die beiden Zustände tauschen mit den Ratenkoeffizienten k_{AB} und k_{BA} aus. H_{BA} bezeichnet die Enthalpiebarriere zwischen B und A.

Hämproteine weisen üblicherweise eine sehr hohe Ligandenaffinität auf. Im Gleichgewicht ist deshalb der gebundene Zustand A gegenüber dem dissoziierten Zustand B stark favorisiert. In Raten ausgedrückt bedeutet das $k_{AB} \approx 0$ und damit auch $N_B \approx 0$ (siehe Gleichung (1.6)). Befindet sich das System aufgrund einer Störung vollständig im Zustand B (Photolyse aller Liganden), so gilt für diesen, im Vergleich zu Gleichung (1.9), die vereinfachte Differenzialgleichung

$$\frac{dN_B}{dt} = -N_B \cdot k_{BA}, \quad (1.11)$$

mit der Lösung

$$N_B(t) = e^{-k_{BA}t}. \quad (1.12)$$

1.2.2.2. Dreizustandsmodell

Dass das simple Zweizustandsmodell der Realität nicht genügt, zeigten Frauenfelder et al. [88] 1975 durch Blitzlichphotolyseexperimente an CO-ligiertem Myoglobin über einen ausgedehnten Temperaturbereich (40 – 350 K). Bei tiefen Temperaturen (< 180 K) ist der Ligand nach der Photolyse in der festgefrorenen Proteinmatrix gefangen. Der beobachtete monophasische Rückbindungsprozess ließ darauf schließen, dass es innerhalb des Proteins einen weiteren, vom Liganden besetzbaren Zustand geben muss. Allerdings handelt es sich bei diesen Rückbindungsprozessen, aufgrund der strukturellen Heterogenität des Proteins, nicht um eine exponentielle Rückbindung wie in Gleichung (1.12). Ein Protein unterliegt ständigen Strukturfluktuationen, die bei tiefen Temperaturen ausgefroren werden. Da jede Subkonformation eine leicht

verschiedene Höhe der Enthalpiebarriere zwischen den Zuständen B und A aufweist, muss Gleichung (1.12) mit der Integration über die Enthalpiebarrierenhöhenverteilungsfunktion $g(H_{BA})$ ergänzt werden:

$$N_B(t) = \int g(H_{BA}) \cdot e^{-k_{BA}t} dH_{BA}. \quad (1.13)$$

Zustand B bezeichnet keinen kovalent gebundenen Liganden. Es handelt sich um sogenannte transiente, metastabile Andockstellen innerhalb der Proteinmatrix. Der Ligand ist durch elektrostatische Wechselwirkungen nur schwach stabilisiert. Im Weiteren wird Zustand B aus Gleichung (1.13) auch als primäre Andockstelle B bezeichnet.

Bei mittleren Temperaturen (180 – 280 K) fanden sich neben Zustand B mindestens zwei weitere transiente Liganden-Zustände, für deren Population die thermische Energie bei niedrigen Temperaturen nicht ausreichend ist (Abb. 1.9 a) [89–94]. Bei hohen Temperaturen (> 280 K) kann der Ligand nach der Photolyse die nun frei bewegliche Proteinmatrix verlassen. Entsprechend fand sich ein von der Ligandenkonzentration abhängiger, exponentieller Rückbindungsprozess aus dem Lösungsmittel (Zustand S in Abbildung 1.9 a). Die Dauer eines solchen Prozesses liegt üblicherweise im Bereich von wenigen Millisekunden bis zu mehreren Sekunden. Die sequentiellen, internen Rückbindungsschritte (D→C→B→A) erscheinen aufgrund mangelnder Zeitauflösung als ein einziger Prozess bei sehr frühen Zeiten (ns–ms). Aufgrund der hohen thermischen Energie sind die Strukturfluktuationen des Proteins sehr viel schneller als die Rückbindungsprozesse. Die Liganden sehen somit nur das zeitliche Mittel der Enthalpiebarrierenhöhenverteilungsfunktion, $g(H_{BA})$, und binden exponentiell mit dem mittleren Ratenkoeffizienten $\langle k_{BA} \rangle$ zurück.

Das von Henry et al. [95] vorgeschlagene Dreizustandsmodell (Abb. 1.9 b) liefert eine korrekte Beschreibung der Rückbindungskurven bei hohen Temperaturen. Zustand A repräsentiert das ligierte Protein, welches durch Photolyse des Liganden in Zustand B übergeht. Von dort aus bindet der Ligand entweder direkt an das Hämeisen zurück, oder verlässt das Protein in das Lösungsmittel (Zustand S). Die Zustandsänderungen erfolgen jeweils mit den Ratenkoeffizienten k_{AB} , k_{BA} , k_{BS} und k_{SB} . Der interne Zustand B vereint, wie oben begründet, die Gesamtheit aller internen Andockstellen.

Direkt nach der Photolyse befinden sich alle Liganden im Zustand B. Es gelten die Startbedingungen $N_B(0) = 1$, $N_A(0) = N_S(0) = 0$. Der Anteil an ungebundenen Proteinen beträgt

$$N(t) = 1 - N_A(t) = N_B(t) + N_S(t). \quad (1.14)$$

Mit den Bedingungen $k_{AB} \approx 0$ und $k_{BA} \gg k_{SB}$, fällt die Aufstellung und Lösung des Gleichungssystems leicht. Es ergibt sich ein biphasischer, exponentieller Abfall:

$$N(t) = N_B \cdot e^{-\lambda_B t} + N_S \cdot e^{-\lambda_S t}. \quad (1.15)$$

N_B bezeichnet die Fraktion der Proteine, die ihren Liganden intern von Zustand B aus binden, N_S die Fraktion, die einen Liganden aus dem Lösungsmittel binden. Die

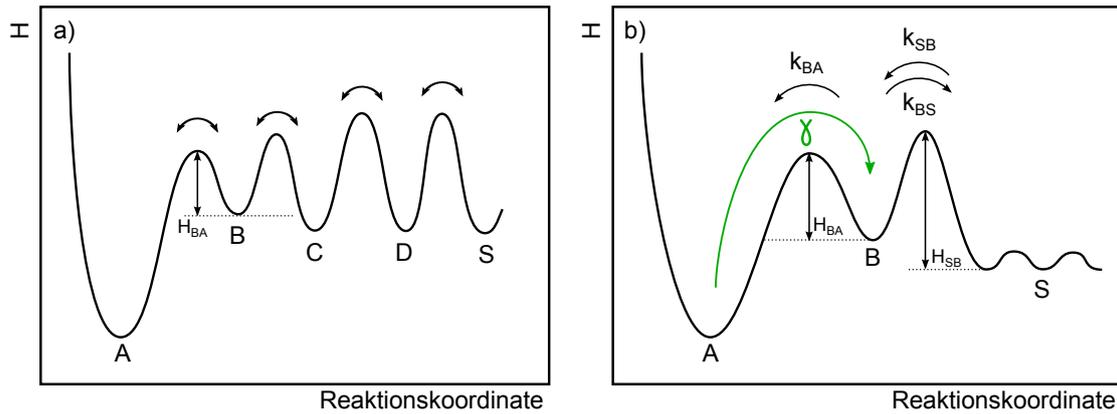


Abbildung 1.9: Energielandschaft eines Hämproteins. **a)** Interne Zustände des Proteins. A: am Häm gebundener Ligand. B (C, D): Ligand in der primären (sekundären, ...) Andockstelle innerhalb der Proteinkavität. S: Ligand im Lösungsmittel. **b)** Dreizustandsmodell. Bei hohen Temperaturen genügt die Reduktion auf eine interne Andockstelle (B) zur Beschreibung des internen Rückbindungsprozesses. S bezeichnet wieder den Liganden im Lösungsmittel.

Amplituden und die apparenten Ratenkoeffizienten λ_B und λ_S ergeben sich wie folgt aus den mikroskopischen Ratenkoeffizienten:

$$N_B = \frac{k_{BA}}{k_{BA} + k_{BS}}, \quad (1.16)$$

$$N_S = \frac{k_{BS}}{k_{BA} + k_{BS}}, \quad (1.17)$$

$$\lambda_B = k_{BA} + k_{BS} = \frac{k_{BA}}{N_B}, \quad (1.18)$$

$$\lambda_S = k_{SB} \cdot N_B = k_{SB} \cdot \frac{k_{BS}}{k_{BA} + k_{BS}}. \quad (1.19)$$

Der externe Rückbindungsprozess ist sowohl von der Ligandenkonzentration $[L]$, als auch von der Proteinkonzentration $[P]$ abhängig:

$$\frac{d[P]}{dt} = -\lambda_S \cdot [L] \cdot [P]. \quad (1.20)$$

Ist die Ligandenkonzentration sehr viel größer als die Proteinkonzentration, so kann sie trotz ablaufender Assoziations- und Dissoziationsreaktionen als konstant angenommen werden. Bei unseren Messungen beträgt die CO-Konzentration üblicherweise ~ 1 mM, die Proteinkonzentration dagegen nur ~ 10 μ M. Die somit genügend konstante freie Ligandenkonzentration kann in einem effektiven Ratenkoeffizienten absorbiert werden

$$\lambda_{\text{eff}} = \lambda_S \cdot [L], \quad (1.21)$$

was aus Gleichung (1.20) eine Reaktion (pseudo-)erster Ordnung macht.

1.3. Spektroskopie

Die wellenlängenabhängige Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischer Strahlung wird als Spektroskopie bezeichnet. Das Ergebnis einer spektroskopischen Untersuchung ist das Spektrum, ein Profil der Absorptionseigenschaft der vermessenen Probe, aufgelöst nach Wellenlänge, beziehungsweise Energie der Strahlungsquanten:

$$E = h \frac{c}{\lambda}, \quad (1.22)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum h , der Vakuum-Lichtgeschwindigkeit c und der Wellenlänge λ . Im Bereich der Infrarotspektroskopie hat sich historisch bedingt die Wellenzahl $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ mit der Einheit $[\text{cm}^{-1}]$ etabliert.

Der Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Strahlungsspektrums erstreckt sich über mehr als 18 Größenordnungen (Abb. 1.10). Angefangen bei niederenergetischen Radiowellen mit Wellenlängen von einigen Metern bis zur hochenergetischen γ -Strahlung mit nur wenigen Pikometern. Dazwischen liegen die prominentesten Vertreter; das vom Menschen sichtbare Licht (380 – 780 nm), die Infrarotstrahlung (780 nm – 1 mm), sowie die Röntgenstrahlung (1 pm – 0,25 nm). Die Unterteilung des elektromagnetischen Strahlungsspektrums ergibt sich durch die diversen physikalischen Prozesse, die hinter der Wechselwirkung stecken. Die Energien von Photonen im sichtbaren Bereich des Spektrums befinden sich in der Größenordnung elektronischer Übergänge von Atom- und Molekülzuständen, deshalb auch optische Übergänge genannt. Photonen im infraroten Bereich sind niederenergetischer und regen Rotations- und Schwingungsübergänge in Molekülen an, was sich in der Erwärmung der bestrahlten Materie äußert. Diese beiden Wechselwirkungen bilden die physikalische Grundlage der in dieser Arbeit genutzten Spektroskopiemethoden, der UV/Vis- und Infrarotspektroskopie. Die folgenden Unterabschnitte erläutern die Grundprinzipien der physikalischen Mechanismen sowie die Anwendbarkeit auf die Untersuchung von Struktur und Dynamik von Hämproteinen.

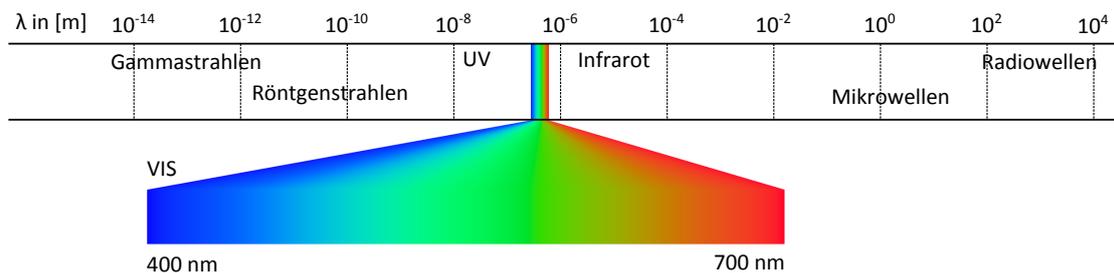


Abbildung 1.10: Wellenlängenbereiche des elektromagnetischen Spektrums. Der sichtbare Bereich macht nur eine sehr kleine Bandbreite aus.

1.3.1. Absorption

Alle Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit fußen auf dem Prinzip der Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Materie. Phänomenologisch lässt sich das Prinzip der Absorption sehr einfach beschreiben. Licht der Wellenlänge λ und Intensität I_0 falle auf eine Probe der Dicke l und Teilchenkonzentration c . Kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Strahlung und Probe, so vermindert sich die Intensität des Lichts hinter der Probe auf $I_1 < I_0$. Für die Abnahme der Intensität beim Durchgang durch die Probe gilt somit:

$$dI_1 = -I_1 \epsilon^* c dl, \quad (1.23)$$

mit der wellenlängenabhängigen Proportionalitätskonstanten ϵ^* . Umstellung und anschließende Integration dieser Gleichung liefert:

$$\frac{dI_1}{I_1} = -\epsilon^* c dl, \quad (1.24)$$

$$\ln(I_1) - \ln(I_0) = -\epsilon^* c l, \quad (1.25)$$

$$\ln\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = -\epsilon^* c l. \quad (1.26)$$

Die Definition der Absorption erfordert den Übergang zum dekadischen Logarithmus. Der daraus resultierende Faktor $\log(e)$ wird in der Proportionalitätskonstanten absorbiert, und es ergibt sich der dekadische Extinktionskoeffizient $\epsilon_\lambda = \log(e) \epsilon^*$. Damit folgt das Lambert-Beersche Gesetz der Absorption:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda c l. \quad (1.27)$$

1.3.2. UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie von Proteinen basiert auf der Anregung der Valenz-Elektronensysteme von Molekülen. Der folgende Unterabschnitt verschafft einen kurzen Überblick über das Zustandekommen typischer Hämproteinabsorptionsspektren, angefangen bei der Bildung von Molekülbindungen. Als Quelle dienten [96–99].

1.3.2.1. Entstehung von Hybrid- und Molekülorbitalen

Die Bildung des Valenz-Elektronensystems eines Moleküls kann mit der Molekülorbitaltheorie beschrieben werden [96]. Als mathematischer Ansatz dient die Idee, Molekülorbitale durch Linearkombinationen der beteiligten Atomorbitale zu berechnen

(LCAO: *Linear Combination of Atomic Orbitals*) [100]. Dabei entstehen n Molekülorbitale aus n Atomorbitalen. Die Operation für das i -te Molekülorbital ϕ_i kann wie folgt formuliert werden:

$$\phi_i = \sum_j c_{ij} \chi_j. \quad (1.28)$$

Die Koeffizienten c_{ij} beschreiben den Anteil des Atomorbitals χ_j am Molekülorbital ϕ_i . Sie können durch die Hartree-Fock-Methode bestimmt werden [101].

Ein einfaches Beispiel zur Demonstration der Molekülorbitaltheorie sind die beiden Molekülorbitale des Wasserstoffmoleküls (H_2). Aus den beiden $1s$ -Atomorbitalen der Wasserstoffatome ergeben sich durch Linearkombination die beiden Molekülorbitale

$$\phi_{g,u} = c(\chi_1 \pm \chi_2). \quad (1.29)$$

Die Indizes (g,u) stehen für die Parität der entstehenden Molekülorbitale (gerade, ungerade). Das durch Addition entstehende Molekülorbital gerader Parität weist eine erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen zwischen den Atomkernen auf (Abb. 1.11 b). Die dadurch verminderte Abstoßung der positiv geladenen Atomkerne führt zur Absenkung der Gesamtenergie und damit zur Molekülbindung (Abb. 1.11 a). Der Betrag der Absenkung ergibt sich aus dem Überlappungsintegral:

$$S_{1,2} = \int \chi_1^* \chi_2 d\vec{r}. \quad (1.30)$$

Zur Kernverbindungsachse rotationssymmetrische Bindungen dieser Art werden als σ -Bindungen bezeichnet. Die Subtraktion der Atomorbitale führt zu einer Konfiguration mit verminderter Elektronendichte zwischen den Atomkernen, und damit zu einem antibindenden Molekülorbital (σ^* , Abb. 1.11 c).

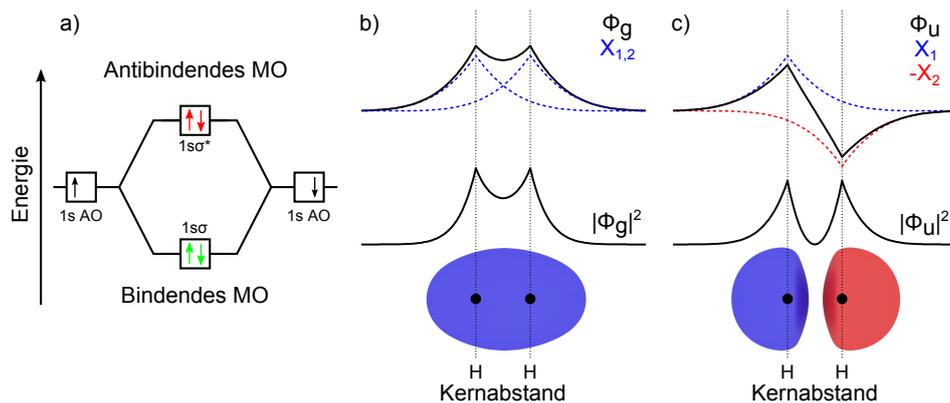


Abbildung 1.11: Molekülorbitalbildung des Wasserstoffmoleküls. **a)** Energetische Lage des bindenden und antibindenden Molekülorbitals des Wasserstoffs im Vergleich zu den $1s$ -Atomorbitalen. **b,c)** Linearkombinationen der $1s$ -Wellenfunktionen, darunter die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen und Form der Molekülorbitale, dargestellt durch Isoflächen.

Bei Molekülbildungen von Atomen mit höherer Elektronenzahl nehmen zusätzlich noch die p-Orbitale an der Molekülorbitalbildung teil. Auch hier ergibt die Linearkombination der Atomorbitale bindende und antibindende Molekülorbitale. Aufgrund der räumlichen Orientierung der p-Orbitale sind zwei Bindungsarten zu unterscheiden (Abb. 1.12). Liegt ein Überlapp in der Verbindungsachse der Atomkerne vor, so ergibt sich wieder eine zur Kernverbindungsachse rotationssymmetrische σ -Bindung ($p\sigma$, $p\sigma^*$). Der Überlapp orthogonal zur Kernverbindungsachse stehender p-Orbitale erzeugt dagegen eine Bindung, die außerhalb der Kernverbindungsachse lokalisiert ist, eine sogenannte π -Bindung ($p\pi$, $p\pi^*$).

Neben molekülorbitalbildenden Linearkombinationen von Atomorbitalen, gibt es auch Linearkombinationen von s- und p-Atomorbitalen nur eines Atoms, Hybridorbitale genannt, welche wiederum zur Molekülorbitalbildung mit anderen Atomen führen. Abb. 1.13 a zeigt das Zustandekommen der chemischen Doppelbindung von Ethen (C_2H_4) durch sogenannte sp^2 -Hybridisierung der Kohlenstoffatome. Beim sp^2 -Hybridorbital werden das 2s- und zwei $2p_{x,y}$ -Atomorbitale zu drei energetisch entarteten sp^2 -Hybridorbitalen kombiniert. Die drei Orbitale sind trigonal-planar angeordnet, die Schenkel des übrigen $2p_z$ -Atomorbitals stehen orthogonal zur Hybridisierungsebene. Durch Überlappung zweier Hybridorbitale bildet sich eine σ -Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen, die restlichen vier bilden jeweils eine σ -Bindung mit dem 1s-Atomorbital eines Wasserstoffs. Die nicht hybridisierten $2p_z$ -Atomorbitale überlappen zu einer π -Bindung und komplettieren somit die Doppelbindung der Kohlenstoffatome. Bei einer Aneinanderreihung mehrerer sp^2 -hybridisierter Atome (Konjugation) ist ein Überlapp der p-Orbitale in beide Richtungen möglich, die Doppelbindung ist nicht mehr lokalisiert. Es liegt ein sogenanntes über alle Atomrümpfe delokalisiertes Elektronensystem vor.

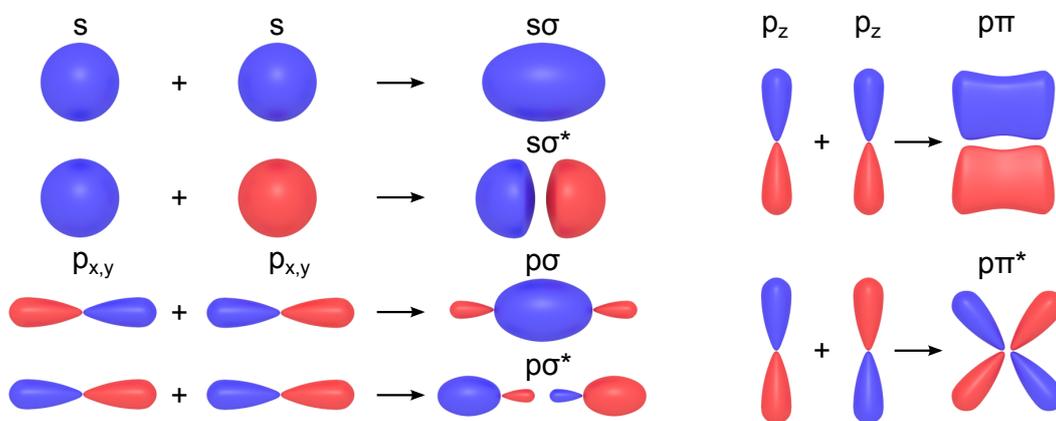


Abbildung 1.12: Molekülorbitale der s- und p-Atomorbitale. Dargestellt ist die Bildung der bindenden und antibindenden σ, π -Molekülorbitale aus Linearkombination der s- und p-Atomorbitale. Die blauen, beziehungsweise roten Isoflächen sind Flächen gleicher Elektronen-Aufenthaltswahrscheinlichkeit.

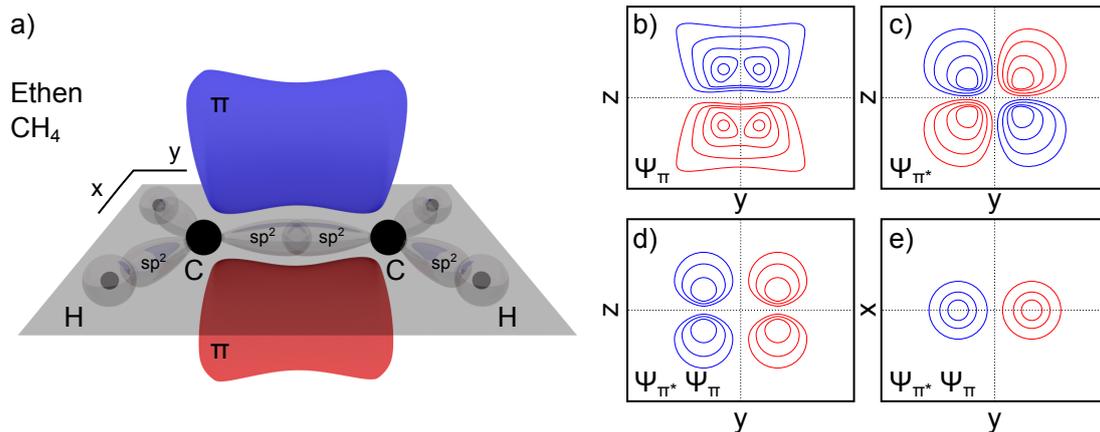


Abbildung 1.13: a) Molekülorbitalmodell des sp²-hybridisierten Ethens. Die π-Bindung zwischen den C-Atomen ist in Blau und Rot dargestellt. b) Projektion der Wellenfunktion des bindenden π-Molekülorbitals auf die yz-Ebene. c) Projektion der Wellenfunktion des antibindenden π*-Molekülorbitals auf die yz-Ebene. d,e) Produkt der bindenden und antibindenden Wellenfunktionen, projiziert auf die yz- und yx-Ebene. Gezeigt sind jeweils Schnitte durch die Isoflächen. Nach [97].

1.3.2.2. Elektronische Übergänge zwischen Molekülorbitalen

Abbildung 1.14 a zeigt qualitativ die Lage der Energieniveaus der Molekülorbitale und die möglichen elektronischen Übergänge bei resonanter Absorption von Photonen. $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge haben die größte Energiedifferenz und sind im Vakuum-UV-Bereich unter 200 nm zu beobachten. Energetisch etwas darunter liegen die $n \rightarrow \sigma^*$ - und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge isolierter π-Bindungen. Liegt ein konjugiertes π-Elektronensystem vor, so sinkt die Energiedifferenz zwischen π und π*; je länger die Bindungskette, desto langwelliger die Absorption. Dieses Phänomen ist leicht zu verstehen, wenn das Elektron im π-Elektronensystem in Analogie zum Teilchen im Kasten gesetzt wird. Ein Teilchen in einem unendlichen Potentialtopf kann die äquidistanten Energiewerte

$$E_n = \frac{h^2}{8mL^2}n^2, \quad (n = 1,2,3\dots) \quad (1.31)$$

annehmen [102]. m bezeichnet die Masse des Teilchens, L die Breite des Potentialtopfes und h das Plancksche Wirkungsquantum. Je breiter der Potentialtopf (je länger das konjugierte Molekülsystem), desto kleiner ist die Energie des Zustandes E_n (Absenkung der Molekülbindungsenergie) und desto kleiner ist die Energiedifferenz, $\Delta E = E_{n+1} - E_n$, zwischen zwei Niveaus.

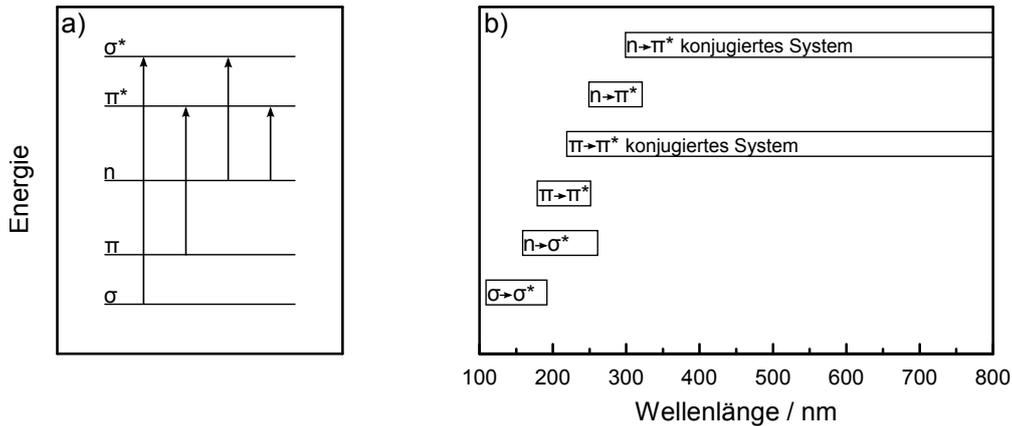


Abbildung 1.14: a) Erlaubte elektronische Übergänge zwischen Molekülorbitalen. b) Wellenlängenbereiche der Übergänge.

1.3.2.3. Erlaubte und verbotene Übergänge, Symmetrie

Der Einfluss eines elektrischen Feldes $\vec{E}(t)$ auf ein Zwei-Zustands-System mit dem Grundzustand ψ_a und dem angeregten Zustand ψ_b kann durch den Störoperator

$$V(t) = \vec{E}(t) \cdot \vec{\mu} \quad (1.32)$$

beschrieben werden [97]. Hierbei bezeichnet $\vec{\mu}$ den Dipoloperator, welcher im Falle eines Elektrons dem Produkt aus Elementarladung, e , und Ortsoperator, \vec{r} , entspricht:

$$\vec{\mu} = e\vec{r}. \quad (1.33)$$

Die Berechnung der zeitabhängigen Änderung des Zustandes $\psi(t)$ erfordert die störungstheoretische Behandlung der zeitabhängigen Schrödingergleichung (Dirac-Notation):

$$i\hbar\partial |\psi(t)\rangle = H |\psi(t)\rangle = (H_0 + V) |\psi(t)\rangle, \quad (1.34)$$

mit dem Hamiltonoperator des gestörten Systems, H , als Summe aus dem Operator des ungestörten Systems, H_0 , und dem Störoperator, V . Als Lösung ergibt sich Fermis Goldene Regel [97], laut der die Stärke der Absorption eines optischen Übergangs proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmoments, μ , ist:

$$|\vec{\mu}_{ba}|^2 = \langle \psi_b | \vec{\mu} | \psi_a \rangle^2. \quad (1.35)$$

Die exakte Berechnung ist mitunter kompliziert, allerdings kann durch einfache Symmetrieüberlegungen bestimmt werden, ob ein Übergang erlaubt oder verboten ($\vec{\mu}_{ba} = 0$) ist. Als anschauliches Beispiel soll hier der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Ethen-Moleküls dienen. Für das Übergangsdipolmoment gilt:

$$\langle \psi_{\pi^*} | \vec{\mu} | \psi_{\pi} \rangle = \langle \psi_{\pi^*} | e\vec{r} | \psi_{\pi} \rangle = e \int \psi_{\pi^*}^* \vec{r} \psi_{\pi} d^3\vec{r}'. \quad (1.36)$$

Handelt es sich beim Integrand um eine ungerade Funktion, so ergibt die Integration über den gesamten dreidimensionalen Raum den Wert 0, der Übergang wäre verboten. Vereinfachend genügt die Betrachtung der einzelnen Komponenten des Übergangsdipolmoments, $\langle \psi_{\pi^*} | \mu_{x,y,z} | \psi_{\pi} \rangle$. Abbildung 1.13 b zeigt die Projektion des Produkts der Wellenfunktionen, $\psi_{\pi^*}^* \psi_{\pi}$, in der yz - und xy -Ebene. In z -Richtung ergibt sich für $\psi_{\pi^*}^* \psi_{\pi}$ eine gerade Parität, das Vorzeichen der Funktion ist auf beiden Seiten der xy -Ebene gleich. Multiplikation mit z resultiert in ungerader Parität der Funktion $z\psi_{\pi^*}^* \psi_{\pi}$. Die Integration entlang der z -Achse ist gleich 0, und somit die gesamte z Komponente μ_z des Übergangsdipolmoments. Die gleiche Argumentationskette gilt für μ_x . Hingegen ist das Produkt $y\psi_{\pi^*}^* \psi_{\pi}$ eine Funktion gerader Parität aller Raumrichtungen. Die Integration ergibt einen Wert $\neq 0$ und somit ist der Übergang erlaubt. Da das Übergangsdipolmoment nur eine nicht verschwindende Komponente in y -Richtung hat, wird auch nur in y -Richtung polarisiertes Licht absorbiert.

1.3.2.4. Absorptionsbanden von Häm-Proteinen im UV/Vis-Bereich

Das Absorptionsspektrum einer wässrigen Proteinlösung im UV/Vis-Bereich weist mehrere Absorptionsbanden auf (Abb. 1.15). Im Bereich des Vakuum-UV und fernen UV absorbieren die Peptidbindungen des Proteinrückgrats. Die niedrigste Anregungsenergie besitzt der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang zwischen 210 und 220 nm, eine etwas höhere der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei ~ 190 nm. Die Lage der Banden ist sensibel gegenüber der Sekundärstruktur des Proteins und kann somit zur Strukturaufklärung genutzt werden. Weitere Absorptionsbanden werden durch die aromatischen Seitengruppen der drei Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan hervorgerufen. Die Benzolringe der Seitengruppen bilden ein sechsfach zyklisch konjugiertes System delocalisierter π -Elektronen, welches im Bereich des fernen und mittleren UV zwischen 230 nm und 300 nm absorbiert. Die Seitengruppen der Aminosäuren werden durch Konformationsänderungen des Proteins in ihren optischen Eigenschaften nicht beeinflusst, sie eignen sich somit zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Gl. (1.27)).

Die Familie der Hämproteine weist zusätzliche Banden im sichtbaren Bereich des Spektrums auf. Das Porphyrin der prosthetische Hämgruppe bildet, wie die Seitengruppen der aromatischen Aminosäuren, ein zyklisches System delocalisierter π -Elektronen (Abb. 1.16 a). Durch die im Vergleich zu Benzol höhere Konjugation sinkt die Anregungsenergie des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs und es entstehen die sogenannte B- oder Soret-Bande um 400 nm und zwei bis vier weitere Banden (Q-Banden) niedrigerer Intensität im Bereich um 550 nm. Die Lage der Soret-Bande kann durch einfache Überlegungen abgeschätzt werden: das π -Elektronensystem des Porphyrins wird als im Kreis rotierendes 1D-Elektronengas [98] mit der kinetischen Energie E_{rot} betrachtet,

$$E_{\text{rot}} = \frac{\vec{L}^2}{2I}. \quad (1.37)$$

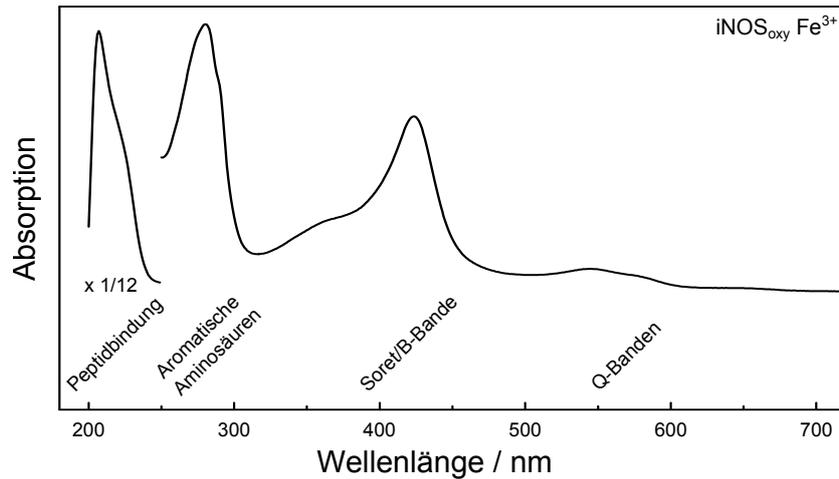


Abbildung 1.15: Absorptionsspektrum einer wässrigen $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{Fe}^{3+}$ -Probe im Met-Zustand (Fe^{3+}). Die Bande um 220 nm wurde aus anschaulichen Gründen mit dem Faktor $\frac{1}{12}$ skaliert.

\vec{L} bezeichnet den Drehimpuls eines Elektrons, I dessen Trägheitsmoment. Abbildung 1.16 a zeigt die Situation am Beispiel des Häm. Die 16 Atomzentren liefern insgesamt 18 π -Elektronen; $12 \cdot 1(\text{C}) + 4 \cdot 2(\text{N}) - 2 \cdot 1(\text{Fe}^{2+}) = 18$. Die Ringstruktur des Häm, mit Umfang L , fordert von der ortsabhängigen Elektronenwellenfunktion, $\psi(x)$, die Erfüllung der Randbedingung

$$\psi(x) = \psi(x + L). \quad (1.38)$$

Eine der Randbedingung genügende Funktion ist beispielsweise

$$\psi(x) = Ne^{\frac{2\pi ilx}{L}} \quad (1.39)$$

mit der Amplitude N , mit der Quantenzahl $l = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$. Die Molekülorbitale des Häm werden durch die 18 Elektronen wie in Abbildung 1.16 b gezeigt befüllt. Der elektronische Übergang mit der kleinsten Energiedifferenz zwischen den beteiligten Zuständen findet also zwischen dem $l = \pm 4$ HOMO (Englisch: *Highest Occupied Molecular Orbital*) und dem $l = \pm 5$ LUMO (Englisch: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) statt. Einsetzen von Gleichung (1.39) in die Schrödingergleichung

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi(x)}{dx^2} = E\psi(x), \quad (1.40)$$

liefert die Energieeigenwerte des Systems:

$$E_l = \frac{2\pi^2\hbar^2}{m_e L^2} l^2. \quad (1.41)$$

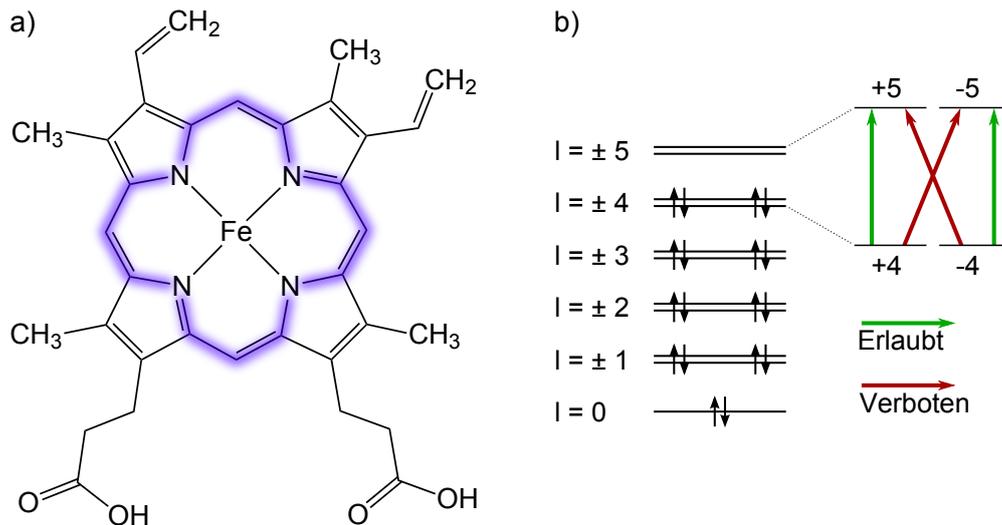


Abbildung 1.16: Das delokalisierte Elektronensystem des Häms. **a)** Häm-Molekül; die für die Soret- und Q-Banden verantwortliche zyklisch konjugierte Atomkette ist blau markiert. **b)** Elektronenkonfiguration des delokalisierten π -Elektronensystems des Häms. Die grünen Pfeile stehen für die erlaubten Übergänge mit $\Delta l = \pm 1$ (Soret-Bande), die roten Pfeile für die verbotenen Übergänge mit $\Delta l = \pm 9$ (Q-Banden). Nach [103].

Mit einem Umfang des Häms von $L = 22 \text{ \AA}$, ergibt sich die Wellenlänge einer typischen Häm-Soret-Bande aus der Energiedifferenz zwischen *HOMO* und *LUMO*:

$$\Delta E = E_5 - E_4 = \frac{hc}{\lambda}, \quad (1.42)$$

$$\lambda = \frac{m_e c L^2}{9\pi \hbar} = 440 \text{ nm}. \quad (1.43)$$

Diese einfache Abschätzung liefert eine erstaunlich gute Vorhersage der Lage für die Soret-Bande, jedoch nicht für die Q-Banden. Wie in Abbildung 1.16 b zu sehen ist, ergeben sich insgesamt vier mögliche *HOMO*→*LUMO*-Übergänge mit $\Delta l = \pm 1$ oder ± 9 . Die Auswahlregeln der Drehimpulsquantenzahl erlauben nur Übergänge mit $\Delta l = \pm 1$, sie bilden die Soret-Bande des Proteins. Die eigentlich verbotenen Übergänge mit $\Delta l = \pm 9$ bilden die Q-Banden, daher die deutlich schwächere Intensität im Vergleich zur Soret-Bande. Weiterhin unklar ist die jedoch die Aufhebung der energetischen Entartung von Soret- und Q-Banden. Sie kann mit der *Configuration Interaction*-Technik (CI) bestimmt werden. Die CI ermöglicht es, die Schrödingergleichung für ein Mehrerelektronensystem zu lösen, um so die energetische Lage der Molekülorbitale zu bestimmen. Im Falle des Häms wird die Entartung der vier Übergänge aufgehoben, die $\Delta l = \pm 1$ -Übergänge (Soret) liegen bei höheren Energien als die $\Delta l = \pm 9$ -Übergänge (Q). Was ausbleibt, ist die Erklärung der Aufspaltung innerhalb der Q-Banden. Der interessierte Leser sei an dieser Stelle auf das Studium von Goutermans *Vier-Orbital-Modell* in der Literatur verwiesen [104].

1.3.3. Infrarotspektroskopie

1.3.3.1. Modellpotentiale der Molekülschwingung

Infrarote Strahlung regt Vibrationsübergänge von Molekülen an. In erster Näherung kann die Vibration eines zweiatomigen Moleküls anhand des harmonischen Oszillators beschrieben werden [102]. Das Potential ergibt sich aus der Integration des Hooke'schen Federgesetzes zu

$$V(\tilde{R}) = \frac{1}{2}k\tilde{R}^2 = \frac{1}{2}\mu\omega^2\tilde{R}^2, \quad (1.44)$$

mit der Federkonstanten k , der Schwingungsfrequenz ω und der reduzierten Masse $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ (Abb. 1.17, rote Kurve). V ist abhängig von der Auslenkung $\tilde{R} = R - R_G$ in Bezug auf den Kernabstand im Gleichgewicht, R_G . Die Lösung der Schrödingergleichung

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2\mu}\Delta + \frac{1}{2}\mu\omega^2\tilde{R}^2\right)\psi_n(\tilde{R}) = E_n\psi_n(\tilde{R}) \quad (1.45)$$

liefert die Eigenfunktionen

$$\psi_n(\tilde{R}) = \left(\frac{\mu\omega}{\pi\hbar}\right)^{1/4} \frac{1}{\sqrt{2^n n!}} H_n\left(\sqrt{\frac{\mu\omega}{\hbar}}\tilde{R}\right) e^{-\frac{1}{2}\frac{\mu\omega}{\hbar}\tilde{R}^2}, \quad (1.46)$$

mit den Hermite-Polynomen $H_n(\tilde{R})$, sowie die äquidistanten Energieeigenwerte

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right)\hbar\omega, \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (1.47)$$

Das harmonische Potential aus Gleichung (1.44) beschreibt die Molekülschwingungen jedoch nur bei kleinen Kernausslenkungen annähernd korrekt. Das anharmonische Morse-Potential

$$V(\tilde{R}) = D\left(1 - e^{-a\tilde{R}}\right)^2, \quad (1.48)$$

mit der Dissoziationsenergie D und der Konstanten $a = \sqrt{\frac{\mu}{2D}}\omega$, liefert ein besseres Ergebnis (Abb. 1.17, schwarze Kurve). Die Energieeigenzustände sind nun nicht mehr äquidistant, sondern rücken mit steigender Energie immer näher zusammen, bis die Dissoziationsenergie D erreicht ist:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right)\hbar\omega - \left(n + \frac{1}{2}\right)^2 x_e \hbar\omega, \quad (1.49)$$

mit $x_e = \frac{\hbar a^2}{2\mu\omega}$.

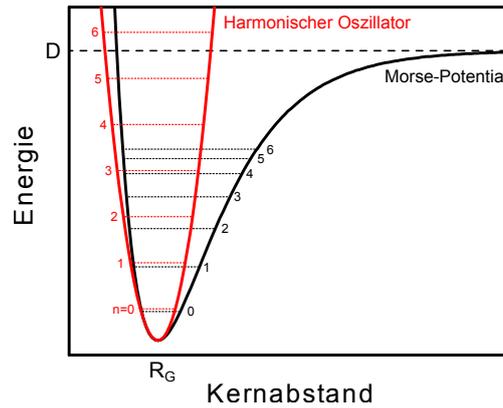


Abbildung 1.17: Modellpotentiale eines zweiatomigen Moleküls mit der Gleichgewichtsbindungslänge R_G . Die einfachste Näherung, das Potential eines harmonischen Oszillators (rot). Das Morse-Potential mit der Dissoziationsenergie D (schwarz). Angegeben sind jeweils die ersten sechs Energieniveaus.

1.3.3.2. Schwingungsübergänge

Die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei Schwingungszuständen kann wieder durch Anwenden des Übergangsdipolmoments $\vec{\mu}$ auf die Molekülwellenfunktionen $\Psi(\vec{r}, \vec{R})$ berechnet werden. \vec{r} und \vec{R} bezeichnen die Elektronen-, beziehungsweise Kernkoordinaten. Dabei wird sich die Born-Oppenheimer-Näherung zunutze gemacht [96]. Laut ihr faktorisiert die Molekülwellenfunktion aufgrund der großen Trägheit der Kerne im Vergleich zu den Elektronen in eine Kernwellenfunktion $\Theta(\vec{R})$ und eine Elektronenwellenfunktion $\Phi(\vec{r}, \vec{R})$:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \Phi(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \Theta(\vec{R}). \quad (1.50)$$

Die Elektronenwellenfunktion $\Phi(\vec{r}, \vec{R})$ ist zwar noch von der Kernposition \vec{R} abhängig, jedoch geht diese nur als Parameter ein, da die Kernposition auf der Zeitskala elektronischer Übergänge als konstant angesehen werden kann.

Für den Übergang zwischen Schwingungszustand ν und ν' ergibt sich das Übergangsdipolmoment bei stationären Kernen ($\vec{\mu}$ unabhängig von \vec{R}) zu:

$$\langle \Phi \cdot \Theta_{\nu'} | \vec{\mu} | \Phi \cdot \Theta_{\nu} \rangle = \underbrace{\langle \Phi | \vec{\mu} | \Phi \rangle}_{=0} \underbrace{\langle \Theta_{\nu'} | \Theta_{\nu} \rangle}_{=0} = 0. \quad (1.51)$$

Der erste Term verschwindet aufgrund der ungeraden Parität von $\vec{\mu}$, der zweite Term aufgrund der Orthogonalität der Kernwellenfunktionen. Es findet also kein Übergang statt. Für bewegliche Kerne kann das Dipolmoment durch Taylorentwicklung erster Ordnung um die Gleichgewichtslage R_G angenähert werden:

$$\vec{\mu}(\vec{r}, \vec{R}) = \vec{\mu}(\vec{r}, \vec{R}_G) + \left. \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial \vec{R}} \right|_{\vec{R}_G} \cdot (\vec{R} - \vec{R}_G). \quad (1.52)$$

Für den Übergang der Schwingungszustände bedeutet das

$$\langle \Phi \cdot \Theta_{v'} | \vec{\mu} | \Phi \cdot \Theta_v \rangle = \langle \Phi | \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial \vec{R}} | \Phi \rangle \cdot \langle \Theta_{v'} | \vec{R} | \Theta_v \rangle. \quad (1.53)$$

Der erste Term aus Gleichung (1.52) ergibt analog zu Gleichung (1.51) keinen Beitrag. Der zweite Term zeigt, dass ein Schwingungsübergang nur bei sich änderndem Dipolmoment stattfindet, zusätzlich muss die Auswahlregel $\Delta n = \pm 1$ erfüllt sein. Zweiatomige, homonukleare Moleküle wie O_2 und N_2 sind somit IR-inaktiv. Die einzig mögliche Schwingung entlang der Bindungsachse hat kein sich änderndes Dipolmoment zur Folge (Abb. 1.18 a). Ein anderes Verhalten zeigen das zweiatomige, heteronukleare CO sowie das dreiatomige, linear aufgebaute Kohlenstoffdioxid-Molekül (CO_2) (Abb. 1.18 b-f). Aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativität von Kohlenstoff und Sauerstoff ändert sich das Dipolmoment bei Schwingungen. Für die Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade f eines N -atomigen Moleküls gilt

$$f = 3N - 6, \quad (1.54)$$

beziehungsweise

$$f = 3N - 5 \quad (1.55)$$

für lineare Moleküle. Für das lineare CO_2 ergeben sich somit vier zulässige Schwingungsmoden (Abb. 1.18 c-f). Bis auf die symmetrische Schwingung (Abb. 1.18 c), sind alle Schwingungen IR-aktiv. Die beiden Deformationsschwingungen (Abb. 1.18 d und f) sind zudem energetisch entartet.

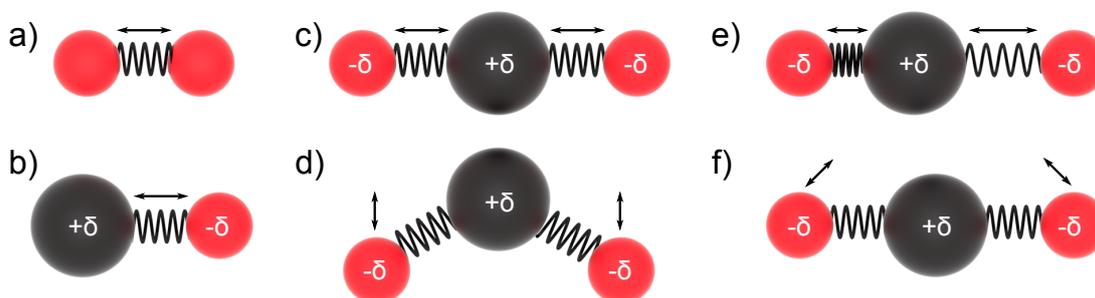


Abbildung 1.18: Beispiele für Schwingungsmoden von Molekülen. $\pm\delta$ bezeichnet die relative Ladung der Atome. **a:** Sauerstoffmolekül (O_2), IR-inaktiv. **b:** Kohlenstoffmonoxid (CO), IR-aktiv. **c-f:** Kohlenstoffdioxid (CO_2). Die symmetrische Schwingung (c) ist IR-inaktiv, die restlichen drei sind IR-aktiv. **d** beschreibt die Schwingung orthogonal zur Papierebene.

1.3.3.3. IR-Absorptionsbanden von Proteinen

Proteine weisen eine Fülle an IR-aktiven Bindungen auf. Gerade im Wellenzahlbereich von 500 cm^{-1} – 1800 cm^{-1} finden sich viele Scherschwingungsmoden. Dieser sogenannte Fingerabdruck-Bereich wird in der Analytik dazu genutzt, um die Identität

unbekannter Substanzen aufgrund charakteristischer Spektren zu bestimmen. Bei Proteinen sind vor allem die sogenannten Amid-I- und Amid-II-Banden von großem Interesse. Die Amid-I-Bande rührt hauptsächlich aus CO-Streckschwingungen der Amidgruppen des Proteinrückgrats her und liegt im Bereich von 1600 cm^{-1} – 1690 cm^{-1} [105]. Die Lage der Bande reagiert sensibel auf die Sekundärstruktur des Proteins, eine für die Strukturaufklärung von Proteinen äußerst nützliche Eigenschaft [106, 107]. Etwas tiefer, bei 1480 cm^{-1} – 1575 cm^{-1} , liegen die Amid-II-Banden, bestehend aus Scherschwingungen der NH-Gruppen, sowie Streckschwingungen der CN-Gruppen [105]. Auch sie können einen wertvollen Beitrag zur Strukturaufklärung liefern [108]. Ein großes Problem bei der IR-Spektroskopie ist die Bandenüberlagerung. Besonders kritisch in Hinsicht auf die Bestimmung der Amid-I-Bande ist die Lage der Scherschwingung von Wasser bei 1650 cm^{-1} . Da Proteinproben in wässriger Lösung präpariert werden, ist die starke IR-Absorption des Wassers ein großes Problem in der IR-Spektroskopie. Es wird versucht die relative Wasserkonzentration durch Maximierung der Proteinkonzentration klein zu halten. Zusätzlich kann Wasser (H_2O) durch D_2O ersetzt werden, was die Wasserbanden aufgrund der schwereren Deuterium Kerne verschiebt.

Ab 2400 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} findet sich ein weiterer, hauptsächlich durch Wasserstoffstreckschwingungen stark populierter Bereich. In der Lücke zwischen 1800 cm^{-1} und 2400 cm^{-1} finden sich hauptsächlich Schwingungsmoden kleinerer Moleküle, wie zum Beispiel des Hämliganden CO. Die 10 Valenzelektronen des CO-Moleküls füllen die bindenden σ -, $p\sigma$ - und $p_{x,y}\pi$ -Molekülorbitale, sowie das antibindende σ^* -Molekülorbital, das HOMO des CO. Die Netto-Bindungsbilanz von CO zeigt somit Dreifachbindungscharakter mit einer Bindungslänge von $112,8\text{ pm}$. Die Bande des $HOMO \rightarrow LUMO$ -Schwingungsübergangs ($\sigma^* \rightarrow p\pi^*$) liegt bei 2143 cm^{-1} [109, 110]. Pseudo-freies CO in der primären Andockstelle des Hämproteins unterliegt Modulationen der Elektronendichte der CO-Bindung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit der Umgebung [111]. Die entsprechenden Banden liegen zwischen 2090 cm^{-1} und 2160 cm^{-1} . Das reduzierte Hämeisen (Fe^{2+}) bindet CO kovalent durch eine sogenannte σ -Hinbindung/ π -Rückbindung-Wechselwirkung [110, 112]. Die zwei Elektronen des $HOMO$ (σ^*) des CO-Moleküls bilden mit dem $3d_{x^2-y^2}$ -Orbital des Eisens eine σ -Hinbindung. Der Ladungsüberschuss im Eisen wird durch Interaktion der vollen $3d_{xy,xz}$ -Orbitale des Eisens mit den leeren $LUMO$ ($p\pi^*$) des CO-Moleküls kompensiert (Abb. 1.19). Es handelt sich dabei um einen synergetischen Effekt, je stärker die σ -Hinbindung, desto stärker die π -Rückbindung. Die Verstärkung der FeC-Bindung schwächt die CO-Molekülbindung, die Übergangsenergien der Schwingungsmoden sinken folglich ab und liegen im Bereich von 1870 cm^{-1} – 2000 cm^{-1} [110, 113].

Negative oder positive Ladungen in nächster Nähe zum gebundenen Liganden modulieren die Hin- und Rückbindung von Elektronen [114, 115]. Eine positive Ladung in der Nähe des Sauerstoffatoms zieht Elektronen an und reduziert die CO Bindungsordnung als Folge einer weniger ausgeprägten σ -Hinbindung und stärker ausgeprägten π -Rückbindung - die Absorptionsbande schiebt entsprechend zu kleineren Frequenzen. Den gegenteiligen Effekt erzeugt eine negative Ladung. Die Bindungsordnung erhöht sich, was sich in einer Absorptionsbande bei höheren Frequenzen äußert. Die

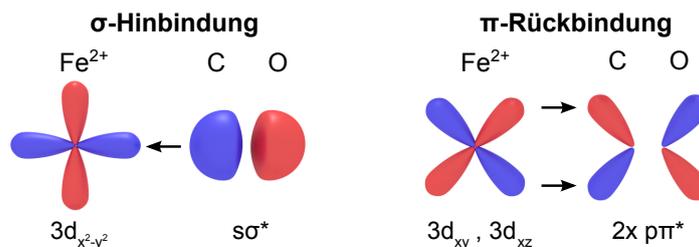


Abbildung 1.19: σ -Hinbindung und π -Rückbindung. Bei der σ -Hinbindung agiert CO als Elektronendonator. Elektronen fließen vom σ^* -Orbital in das leere $3d_{x^2-y^2}$ -Orbital. Bei der π -Rückbindung wird der Elektronenüberschuss am Eisen durch Rückfluss der Elektronen der vollen $3d_{xy,xz}$ -Orbitale in die leeren $\pi\pi^*$ -Orbitale des CO kompensiert.

in Hinsicht auf Ligation und elektrostatischer Umgebungswchselwirkung sehr sensible Absorptionsbande von CO macht es zu einer exzellenten Sonde zur Untersuchung der Proteinkavität.

Der physiologische Ligand NO kann im Gegensatz zu CO sowohl mit Fe^{2+} , als auch mit Fe^{3+} eine Bindung eingehen. Die elektronische Struktur des Fe^{3+} -NO-Komplexes kann durch $\text{Fe}^{2+}\text{NO}^+$ beschrieben werden [116]. Dieser Komplex ist isoelektronisch zu Fe^{2+} -CO und weist deshalb recht ähnliche spektroskopische Eigenschaften auf. NO bindet wie CO in einer linearen Fe-N-O-Geometrie und geht eine stärkere σ -Hinbindung/ π -Rückbindung-Wechselwirkung als CO ein. Die NO-Schwingungsbanden finden sich um 1900 cm^{-1} [117]. Die Unterschiede zwischen CO und NO zeigen sich allerdings bei der Bindung eines sechsten Liganden am Häm, gegenüber (*trans*) des NO/CO-Liganden. Im Falle von CO stärkt die Bindung zwischen Häm und axialem *trans*-Liganden sowohl die Bindung zwischen Hämeisen und *trans*-Liganden, als auch die Fe-CO-Bindung. Im Gegensatz dazu schwächt NO die Bindung zwischen Hämeisen und *trans*-Ligand und *vice versa* [118]. Neben der σ -Hinbindung/ π -Rückbindung-Wechselwirkung spielt bei NO der sogenannte repulsive *trans*-Effekt eine wichtige Rolle [117]. Bei Hämproteinen zeigt er sich sehr deutlich bei der Koordinierung des Häms durch einen proximalen Thiolat-Liganden, wie zum Beispiel bei iNOS. Das anti-bindende σ^* -Orbital des Fe-N-O-Komplexes wird aufgrund der hohen σ -Donorstärke des Thiolat-Schwefels durch Elektronen aus dessen p_z -Orbital besetzt, was in einer Schwächung der Fe-NO- und N-O-Bindung folgt. Strukturell äußert sich der *trans*-Effekt durch Abwinkelung des vorher linearen Fe-N-O-Komplexes. Es ergibt sich ein Winkel von $\angle(\text{Fe-N-O}) \sim 160^\circ$ und eine abgesenkte NO-Schwingungsfrequenz von $\tilde{\nu}_{\text{NO}} \sim 1850\text{ cm}^{-1}$ [117]. Der sehr stabile Fe^{2+} -NO-Komplex zeigt eine noch stärkere Abwinkelung der Fe-N-O-Bindung auf $\sim 140^\circ$ mit deutlich tieferen NO-Schwingungsbanden bei $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ [119].

2. Materialien und Methoden

2.1. Proteinpräparation und Aufreinigung

Zur Expression der um die ersten 65 Aminosäuren reduzierten $\Delta 65$ iNOS_{oxy}-Domäne wurden entsprechende Plasmide (pCWori) in kompetente *Escherichia coli* Zellen transformiert (Stamm BL21). Die Zellen wurden auf 390 μ M Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) enthaltendem Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine der gewachsenen Kolonien wurde 150 mL *Terrific Broth*, supplementiert mit 390 μ M Ampicillin, hinzugefügt und für 12 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. 10 mL dieser Zellkultur wurden zu 1,5 L *Terrific Broth*, wieder 390 μ M Ampicillin enthaltend, gegeben und so lange bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm \sim 1 betrug. Daraufhin wurde die Temperatur auf 30 °C gesenkt und δ -Aminolävulinsäure (44 μ M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sowie Hämin (8 μ M, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Die Expression des Proteins wurde anschließend durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (100 μ M, Carl Roth) induziert. Die Zellen wurden nach 48 h (Ampicillin wurde alle 16 h zugegeben) durch Zentrifugation bei 4 °C und 2000 rpm (Ausschwingrotor, 4 – 16 K, Sigma, Osterode, Deutschland) geerntet. Das Lysat wurde in einem Lysispuffer (40 mM HEPES, 10% Glycerin (Vol.), 200 mM NaCl, pH 7,6, Carl Roth) resuspendiert und mit 2 mg DNase (Sigma-Aldrich) gemischt. Um die Zellwände zu zerstören und somit das Protein freizusetzen, wurde das Lysat dreimal für 2 min mit einem *BeadBeater* (Biospec, Bartlesville, USA), befüllt mit Zirconia/Silizium Kügelchen, behandelt. Die Kügelchen wurden durch einen Glasfilter abgetrennt und die Lösung durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 2000 rpm von Zellresten befreit. Der proteinhaltige Überstand wurde auf eine Nickel-Chelat-Säule (Ni Sepharose 6 FastFlow, GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) gegeben. Das Säulenmaterial wurde zuvor mit Lysispuffer equilibriert. Die am Nickel-Chelat gebundenen Proteine wurden mit Lysispuffer mit steigenden Imidazolkonzentrationen (0, 10, 40 mM, Sigma-Aldrich) gewaschen und schließlich mit 160 mM Imidazol enthaltendem Puffer eluiert. Schlussendlich wurde das Eluat mit Zentrifugen-Konzentratoren (Vivaspin Turbo 15, 10 kDa, Sartorius, Göttingen, Deutschland) gegen Wasser dialysiert, höchstmöglich konzentriert und in einem finalen Schritt lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Protein wurde bei –20 °C aufbewahrt.

2.2. Probenpräparation

2.2.1. UV/Vis-Spektroskopie

Proben für Experimente im UV/Vis-Bereich wurden in einer $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ großen Borosilikatglasküvette (Hellma, Müllheim, Deutschland) hergestellt. Die Küvette wurde mit $\sim 1200 \mu\text{L}$ 100 mM Kaliumphosphatpuffer befüllt, der pH-Wert, bei der die jeweilige Messung durchgeführt wurde, wird im Folgenden stets angegeben. Anschließend wurde die Küvette mit einem Septum verschlossen und die Pufferlösung für $\sim 15 \text{ min}$ per Durchfluss mit einem Gas aus einer Gasflasche gesättigt. Zu Verfügung standen 100% CO, eine 5%/95% CO/N₂-Mischung sowie 100% NO und 100% N₂. Nach der Sättigung der Lösung mit dem gewünschten Gas wurden wenige Microliter einer hochkonzentrierten iNOS_{oxy} Lösung mit einer Hamiltonspritze hinzugegeben, sodass sich eine finale Proteinkonzentration von rund $10 \mu\text{M}$ einstellte. Für die Messung der Spektren von Deoxy- und CO-Spezies wurde das Protein durch die Zugabe von $1 \mu\text{L}$ einer 1 M, sauerstofffrei angefertigten Natriumdithionit-Lösung reduziert. Waren Messungen mit Substrat L-Arg, Zwischenprodukt NOHA oder Kofaktor H4B (Sigma-Aldrich) vorgesehen, so wurden diese entweder direkt in gewünschter Menge im Puffer in der Küvette gelöst oder gesondert in einer weiteren Küvette auf gleiche Weise wie der Probenpuffer präpariert und dann zur Probe titriert. Die Herstellung einer H4B-Lösung geschah anaerob, da Sauerstoff zur Oxidation von H4B zu H2B führt, erkennbar an zunehmend gelblicher Färbung der anfangs farblosen H4B-Lösung.

Eine selbst gebaute Hochdruckküvette erlaubte Messungen bei erhöhtem Gasdruck innerhalb der Probenkammer bis zu 35 bar. Die Probe wurde wie gerade beschrieben hergestellt und in die luftdicht schließende Hochdruckküvette gegeben. Anschließend konnte der Druck stufenlos erhöht werden.

Tieftemperaturproben mussten bei der Herstellung leicht modifiziert werden. Statt des Puffers wurde eine Kryolösung bestehend aus 75% Glycerin und 25% Kaliumphosphatpuffer verwendet. Die Lösung weist einen Glasübergang bei Temperaturen unter 180 K auf. Als Probenhalter diente eine eigens angefertigte Einwegküvette mit einem Volumen von $0,2 \text{ cm}^3$ bei einer optischer Weglänge von 1 cm.

2.2.2. FTIR-Spektroskopie

Für die Herstellung CO-ligierter iNOS_{oxy}-FTIR-Proben wurde wahlweise L-Arg oder NOHA zu einer Endkonzentration von 200 mM und/oder H4B zu einer Endkonzentration von 100 mM in $40 \mu\text{L}$ Kryolösung (75%/25% Glycerin/100 mM Kaliumphosphatpuffer (V/V), pH 7.4) gelöst. Anschließend wurden $\sim 12 \text{ mg}$ gefriergetrocknetes iNOS_{oxy} behutsam hinzugegeben und gelöst. Daraufhin wurde die Probe abgedichtet und unter 1 atm CO für 60 min gerührt. Während dieser Zeit wurde die Atmosphäre oberhalb der Probe mehrmals ausgetauscht. Der CO-gesättigten Proteinprobe wurde $1 \mu\text{L}$ der

Natriumdithionitlösung zugegeben. Um ungelöstes Protein zu entfernen, wurde die Probe für 10 min bei 13 400 rpm zentrifugiert (Minispin Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Wenige μL dieser so angefertigten Probe wurden mit einer Hamiltonspritze auf den Probenhalter gegeben.

NO-ligierte Fe^{3+} -Proben wurden auf ähnliche Weise hergestellt. Allerdings wurde die Proteinlösung nicht durch Natriumdithionit reduziert und auch nicht direkt mit NO gesättigt, sondern zuerst mit N_2 vorequilibriert. Anschließend wurde gasförmiges NO in Microliter-Schritten hinzugegeben und die Bindung von NO an das Hämeisen durch Messung der Soret-Bande verifiziert. Das NO-Gas wurde zuvor per Durchfluss durch eine KOH-Lösung (5 M) von ungewünschten Stickoxiden befreit.

2.3. UV/Vis-Spektroskopie

Zur Messungen von Proteinspektren im UV/Vis Bereich wurde das Zweistrahl-Absorptionsspektrometer Varian Cary 100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Der Messbereich des Spektrometers geht von von 200 – 800 nm, die übliche Auflösung beträgt 1 nm. Um die Proben temperatur bei längeren Messungen konstant zu halten oder definierte Temperaturen zwischen 4 °C und 30 °C anzufahren, wurde das Spektrometer durch einen selbstgebauten Probenhalter mit angeschlossenem Wasserbad (Neslab RTE7, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) ergänzt. Ein direkt unter der Probe angebrachter Temperatursensor gibt die Proben temperatur an.

2.4. Zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse

2.4.1. Grundlagen der Blitzlichtphotolyse

Bei der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse handelt es sich um eine optische Spektroskopiemethode, die zur Messung der Ligandenbindung von Hämproteinen genutzt werden kann. Ein kurzer Laserpuls photodissoziiert die am Hämeisen gebundenen Liganden, deren Rückkehr anschließend mit hoher zeitlicher Auflösung gemessen werden kann.

Die Absorptionseigenschaften des Häms reagieren sehr sensibel auf die Bindung eines Liganden am zentralen Hämeisen. Abbildung 2.1 a zeigt die Absorptionsspektren von $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ und unligiertem $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-Deoxy}$, den Zuständen direkt vor beziehungsweise direkt nach der Photolyse der Liganden. Das zeitabhängige Absorptionssignal $A(t)$ nach der Photolyse spiegelt die Regeneration des $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ Spektrums wider, also die Rückbindung der Liganden. Üblicherweise erfolgt die Darstellung der Rück-

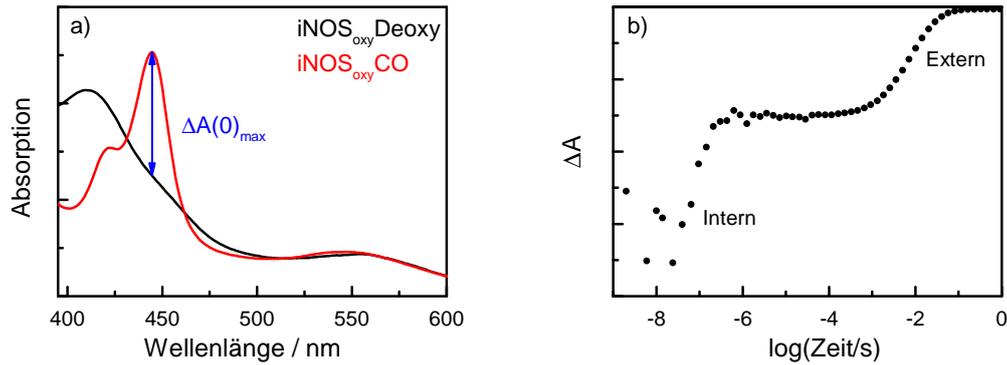


Abbildung 2.1: a) Absorptionsspektren von iNOS_{oxy}-CO und iNOS_{oxy}-Deoxy. Das maximale Differenzabsorptionssignal ist durch einen blauen Pfeil bei ~ 444 nm markiert. b) Die zeitliche Änderung der Differenzabsorption $\Delta A(t)$. Die erste, schlecht aufgelöste Stufe bei frühen Zeiten repräsentiert die interne CO-Rückbindung, die zweite Stufe die externe CO-Rückbindung aus dem Lösungsmittel.

bindungskinetik als Differenzsignal bei einer bestimmten Wellenlänge λ , wobei die CO-ligierte Probe als Referenz dient:

$$\Delta A(t) = -\log\left(\frac{I(t)}{I_{CO}}\right). \quad (2.1)$$

$I(t)$ bezeichnet die gemessene Intensität bei der Wellenlänge λ nach der Photolyse, I_{CO} den Wert vor der Photolyse. Die Wellenlänge λ wird so gewählt, dass $\Delta A(0)$ maximal ist. Aufgrund der sich in der Zeit über mehrere Größenordnungen erstreckenden Rückbindungsprozesse erfolgt die Darstellung der Kinetiken üblicherweise auf einer logarithmischen Zeitskala (Abb. 2.1 b).

Da die Absorption bei der Wellenlänge λ nach Lambert-Beer proportional zur Proteinkonzentration c und somit zur Teilchenzahl N ist, gleicht die Messung von $\Delta A(t)$ einer Rückbindungskinetik der Art von Gleichung (1.15). Die Amplitude des Differenzsignals zum Zeitpunkt $t = 0$ (blauer Pfeil in Abbildung 2.1 a) setzt sich aus den intern (N_B) und extern (N_S) zurückbindenden Liganden zusammen. Die internen Rückbindungsprozesse sind jedoch für gewöhnlich sehr schnell im Vergleich zur Abtastrate der Messapparatur und gehen somit zum großen Teil im Rauschsignal verloren (Abb. 2.1 b).

2.4.2. Aufbau der Blitzlichtphotolyseanlage

Der Aufbau der Blitzlichtphotolyseanlage ist in Abbildung 2.2 zu sehen. Im Zentrum befindet sich der Probenhalter, passend für Küvetten mit einer Grundfläche von $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Bei Tieftemperaturmessungen kann der Probenhalter durch einen evakuierbaren und mit Fenstern versehenen Taucherhelm ersetzt werden. Der Taucherhelm

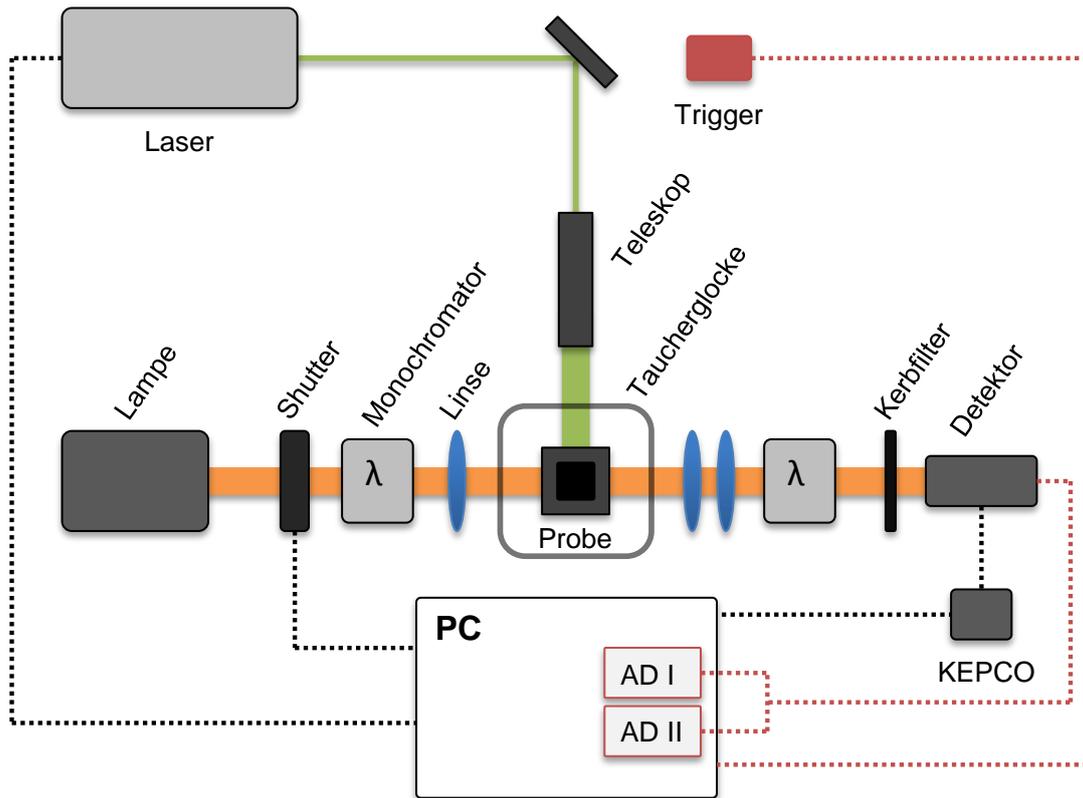


Abbildung 2.2: Aufbau der Blitzlichtphotolyseanlage. Bei den gestrichelten Linien handelt es sich um Signal- beziehungsweise Datenleitungen.

umschließt den Kaltfinger eines Kryostaten, an dem die Probe in einer Einwegküvette angebracht wird.

Die Probe wird durch einen Laserpuls des frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Surelite II, Continuum, Santa Clara, CA, USA) photolysiert. Der Laser emittiert Pulse mit einer Halbwertsbreite von 4 – 6 ns und einer Wellenlänge von 532 nm. Die Energie eines Pulses beträgt 300 mJ. Ein Teleskop im Strahlengang des Lasers weitet den Puls auf, um sicherzustellen, dass die gesamte Probe ausgeleuchtet wird. Das Licht einer Wolframglühlampe fungiert als Messstrahl und passiert die Probe senkrecht dazu. Die Auswahl der Wellenlänge erfolgt durch zwei Monochromatoren vor und hinter der Probe. Weiterhin passiert der Strahl einen Shutter, ein System aus Linsen und einen 532 nm-KerbfILTER, bevor er auf einen Photodetektor trifft. Bei dem Detektor handelt es sich um einen Photoelektronenvervielfacher (Englisch: *PMT*, *photomultiplier tube*), der durch ein Netzteil (KEPCO Power Supply, APH 1000M, NY, USA) mit Hochspannung versorgt wird. Das Signal des Detektors wird mit zwei Analog-Digital-Wandlern in verschiedenen Zeitdomänen vom Messrechner aufgenommen. Ein Phototrigger detektiert Streulicht des Laserpulses und löst die Datenaufnahme aus.

2.4.3. Datenaufnahme

Vor jeder Messung wird das Spannungssignal des Detektors als Offset bei offenem (U_o) und geschlossenem (U_g) Shutter bestimmt. Für die Transmission der Probe ergibt sich somit:

$$T(t) = \frac{I(t)}{I_{CO}} \Leftrightarrow T(t) = \frac{U(t) - U_g}{U_o - U_g}. \quad (2.2)$$

Und für das Differenzabsorptionssignal mit Gleichung (2.1):

$$\Delta A(t) = -\log(T(t)) = -\log\left(\frac{U(t) - U_g}{U_o - U_g}\right). \quad (2.3)$$

Die Auftragung der Daten auf logarithmischer Zeitskala erfordert zu Beginn der Messung eine sehr hohe Abtastrate. Mit voranschreitender Messzeit würden so jedoch redundant viele Datenpunkte erzeugen werden. Abhilfe schafft ein zweistufiges Datenaufnahmesystem, bestehend aus zwei AD-Wandlern mit unterschiedlichen Abstraten. AD-Wandler I (NI-PCI 5114, National Instruments, Austin, TX, USA) zeichnet Daten im Bereich von 2 ns – 2 ms mit einer Abtastrate von $250 \frac{MS}{s}$ auf ($\frac{S}{s}$: Samples pro Sekunde), AD-Wandler II (NI-PCI 6221, National Instruments) setzt mit einer niedrigeren Abtastrate von $250 \frac{kS}{s}$ bei 2 μ s ein und zeichnet bis zu mehreren Sekunden auf. Die Datenpakete beider AD-Wandler werden zunächst getrennt gespeichert.

2.4.4. Datenverarbeitung

Die Datenmenge pro Zeiteinheit ist trotz des zweistufigen Messverfahrens, vor allem bei späten Zeiten, immer noch ohne Mehrwert. Statt überflüssige Datenpunkte zu verwerfen, wird ein logarithmisches Mittelungsverfahren verwendet. Abbildung 2.3 a demonstriert dieses Verfahren. Die zeitlich linearen Datenpunkte werden in Perioden unterteilt. Mit jeder Periode wird die Anzahl der darin enthaltenen Punkte verdoppelt. Die Datenpunkte jeder Periode werden dann zu vier Datenpunkten mit zeitlich linearen Abständen zusammengefasst (horizontale Mittelung). Die erste Periode enthält die ersten vier ungemittelten Datenpunkte. Nach diesem Algorithmus werden die Datenpakete beider Zeitperioden getrennt voneinander komprimiert.

In einem zweiten Mittelungsverfahren werden die beiden Datenpakete weiter reduziert und zu einem finalen Datenpaket zusammengefasst (vertikale Mittelung, Abbildung 2.3 b). Üblicherweise werden mehrere direkt nacheinander gemessene Kinetiken ($\sim 10 - 100$) zu einer Kinetik zusammengefasst, um das Signal-Rausch-Verhältnis bei frühen Zeiten zu verbessern.

Steuerung der Messung, Datenaufnahme sowie das erste (horizontale) Mittelungsverfahren (Abb. 2.3 a)) werden von einem LabView-Programm direkt nach der Messung erledigt. Das Resultat wird als ASCII-Datei abgespeichert. Das zweite (vertikale) Mittelungsverfahren wird gesondert durchgeführt.

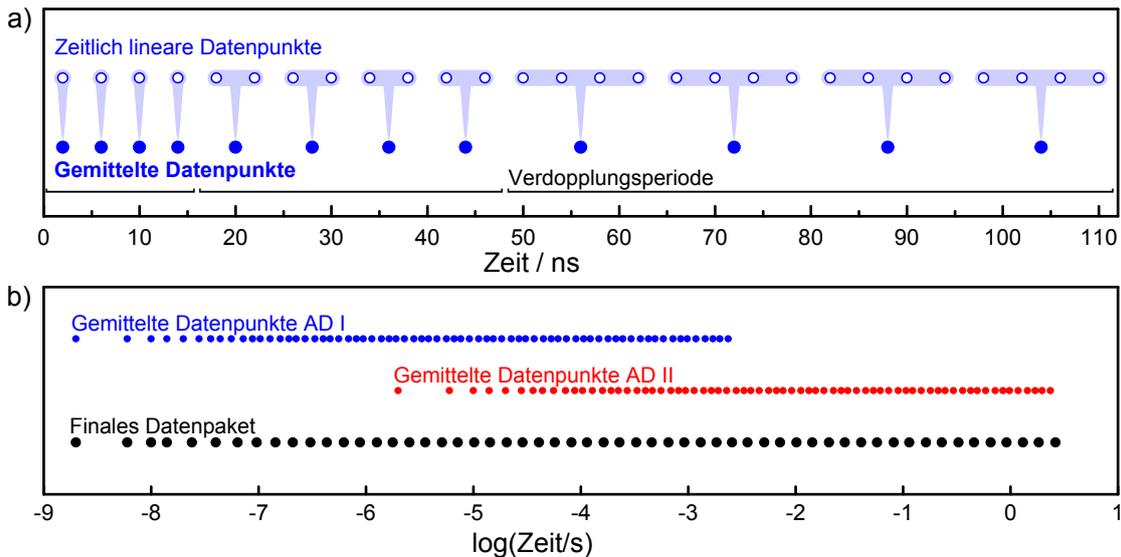


Abbildung 2.3: Schrittweise Verarbeitung der Daten von Rückbindungskinetiken. **a)** die zeitlich linearen Datenpunkte (hier AD I von 2 ns – 110 ns) werden horizontal logarithmisch gemittelt. Mit jeder Periode (schwarze Klammer) wird die Anzahl an Datenpunkten verdoppelt. Die Punkte werden zu je vier Datenpunkten pro Periode zusammengefasst. **b)** die zwei nach dem Schema aus a) gemittelten Datensätze werden vertikal gemittelt und ergeben so einen finalen Datensatz.

2.4.5. Methoden zur Datenanalyse

2.4.5.1. Exponentielle Abfälle

Bei der einfachsten und oft ausreichenden Methode handelt es sich um die Anpassung der Messdaten durch einen exponentiellen Abfall, beziehungsweise, im Falle von mehreren Rückbindungsprozessen, durch eine Summe exponentieller Abfälle:

$$N(t) = \sum_i N_i(0) \cdot e^{-k_i t}. \quad (2.4)$$

$N_i(0)$ bezeichnet die Amplitude des jeweiligen Abfalls mit dem Ratenkoeffizienten k_i .

Ist die Energielandschaft des Proteins sehr heterogen (Enthalpiebarrierenverteilung, Kap. 1.2.2.2) kann die CO-Rückbindungskinetik nicht mehr durch einen einfachen exponentiellen Abfall beschrieben werden. Dies kann in Gleichung (2.4) durch Integration über die Ratenkoeffizientenverteilungsfunktion $h(k)$ korrigiert werden. Somit ergibt sich für einen einphasigen Rückbindungsprozess:

$$N(t) = \int h(k) \cdot e^{-kt} dk. \quad (2.5)$$

Die Verteilungsfunktion $h(k)$ kann durch die im nächsten Unterabschnitt erläuterte Maximum-Entropie-Methode (MEM) bestimmt werden.

Phänomenologisch lässt sich die Heterogenität eines Ratenprozesses durch eine gestreckte Exponentialfunktion beschreiben (Abb. 2.4 a) [120, 121]:

$$f(t) = e^{-\left(\frac{t}{t_0}\right)^\beta}. \quad (2.6)$$

Für Werte des Streckparameters β zwischen 0 und 1 ist die Kurve im Vergleich zur normalen Exponentialfunktion ($\beta = 1$) gestreckt, für $\beta > 1$ komprimiert. Die mittlere Abklingzeit $\langle \tau \rangle$, beziehungsweise der mittlere Rückbindungskoeffizient $\langle k \rangle$, der gestreckten Exponentialfunktion ergibt sich durch Integration zu:

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{\langle k \rangle} = \int_0^\infty e^{-\left(\frac{t}{t_0}\right)^\beta} dt = \frac{t_0}{\beta} \Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right), \quad (2.7)$$

mit der Gammafunktion:

$$\Gamma(u) = \int_0^\infty x^{u-1} e^{-x} dx. \quad (2.8)$$

Von der Bestimmung der Ratenkoeffizienten von CO-Rückbindungsprozessen durch diese Methoden wird in dieser Arbeit allerdings weitgehend abgesehen. Die im nächsten Unterabschnitt vorgestellte Maximum-Entropie-Methode erweist sich als ein geeigneteres Werkzeug.

2.4.5.2. Maximum-Entropie-Methode

Bei Gleichung (2.5) handelt es sich aus mathematischer Sicht um eine Laplace-Transformation. Die Umkehr einer solchen ist schlecht konditioniert und liefert somit keine eindeutige Lösung [122]. Es bleibt nur die Möglichkeit, $h(k)$ über numerische Inversion zu berechnen. Da sich Rückbindungsprozesse über mehrere Größenordnungen erstrecken, erweist es sich als nützlich, zu einer logarithmischen Ratenskala überzugehen. Mit $h(k)dk = f(k)d \log(k)$ ergibt sich

$$N(t) = \int d \log(k) f(k) e^{-kt}. \quad (2.9)$$

Ein Rückbindungsexperiment erzeugt einen Datensatz $\mathfrak{J}^{exp}(t_i)$ mit Gaußischem Fehler und Standardabweichung $\sigma(t_i)$. Die $d \log(k)$ -Achse sei äquidistant in J Abschnitte unterteilt, was die kontinuierliche Funktion $f(k)$ zu einer diskreten Funktion $f(k_j)$ macht. Die MEM besagt nun, dass sich die beste Anpassung an I Datenpunkte $\mathfrak{J}^{exp}(t_i)$ durch Maximierung der Bayesschen A-posteriori-Wahrscheinlichkeit, $\wp = \exp(\alpha S - I\chi^2/2)$, ergibt [123]. α ist ein dimensionsloser Koeffizient, χ^2 gibt an, wie gut ein Probesatz von Daten $\mathfrak{J}^{fit}(t_i)$ das Experiment beschreibt,

$$\chi^2 = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I \left[\frac{\mathfrak{J}^{fit}(t_i) - \mathfrak{J}^{exp}(t_i)}{\sigma(t_i)} \right]^2. \quad (2.10)$$

Bei S handelt es sich um die zu maximierende Shannon-Jaynes Entropie,

$$S = - \sum_{j=1}^J f(k_j) \left[\ln \frac{f(k_j)}{F(k_j)} - 1 \right], \quad (2.11)$$

mit der Funktion $F(k_j)$, die alles a priori Wissen über die Form von $f(k_j)$ beinhaltet. Ohne vorheriges Wissen wird $F(k_j)$ als konstant angenommen, um keine Strukturen einzuführen, die nicht in den Daten vorhanden sind [123]. Eine einfache Methode, \wp zu maximieren, besteht darin, die gleichwertige Funktion

$$Q = S - L_0 \chi^2 \quad (2.12)$$

zu maximieren. Bei L_0 handelt es sich um einen Lagrangemultiplikator, der so gewählt wird, dass $\chi^2 \cong 1$. Setzt man $\frac{\partial Q}{\partial f(k_i)} = 0$, so ergibt sich

$$f(k_i) = F(k_i) \exp \left(L \sum_{i=1}^I \frac{\mathfrak{J}^{fit}(t_i) - \mathfrak{J}^{exp}(t_i)}{\sigma(t_i)} e^{-k_i t_i} \right), \quad (2.13)$$

wobei jegliche Koeffizienten in L absorbiert sind. Gleichung (2.13) repräsentiert ein System aus J gekoppelten nichtlinearen Gleichungen, die iterativ gelöst werden (üblicherweise $J = 100$). Die Parameter werden während der Iterationen so angepasst, dass sich χ^2 einem Wert um 1 annähert, während ein Konvergenztest, $TEST = \frac{1}{2} \left| \frac{\nabla S}{|\nabla S|} - \frac{\nabla \chi^2}{|\nabla \chi^2|} \right|^2$, simultan gegen 0 geht.

Abbildung 2.4 b demonstriert das Ergebnis der MEM-Analyse einer Rückbindungskurve von teilweise H4B-gebundenem iNOS_{oxy}-CO und zeigt den großen Vorteil der MEM gegenüber der Anpassung mit exponentiellen Abfällen. Die Rückbindungskurve in der Zeitdomäne vermittelt den Eindruck, nur einem einzelnen Rückbindungsprozess zu unterliegen. Die durch die MEM-Analyse berechnete Ratendistributionsfunktion zeigt hingegen, dass die Rückbindung aus zwei sich überlappenden Prozessen besteht. In Abbildung 2.4 b wurde den Ratendistributionen für bessere optische Darstellung eine Gauß-Funktion angepasst:

$$h(\log(k)) = \frac{1}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{\log(k) - \log(k_c)}{w}\right)^2}, \quad (2.14)$$

mit der Lage des Maximums k_c und der Breite w auf der logarithmischen Skala. Dieses Vorgehen wird in der weiteren Arbeit beibehalten. Wird der explizite Wert eines Ratenkoeffizienten k einer Spezies angegeben, so handelt es sich um die Lage des Maximums der Gauß-Funktion k_c , also das Maximum der Ratendistribution $h(k)$.

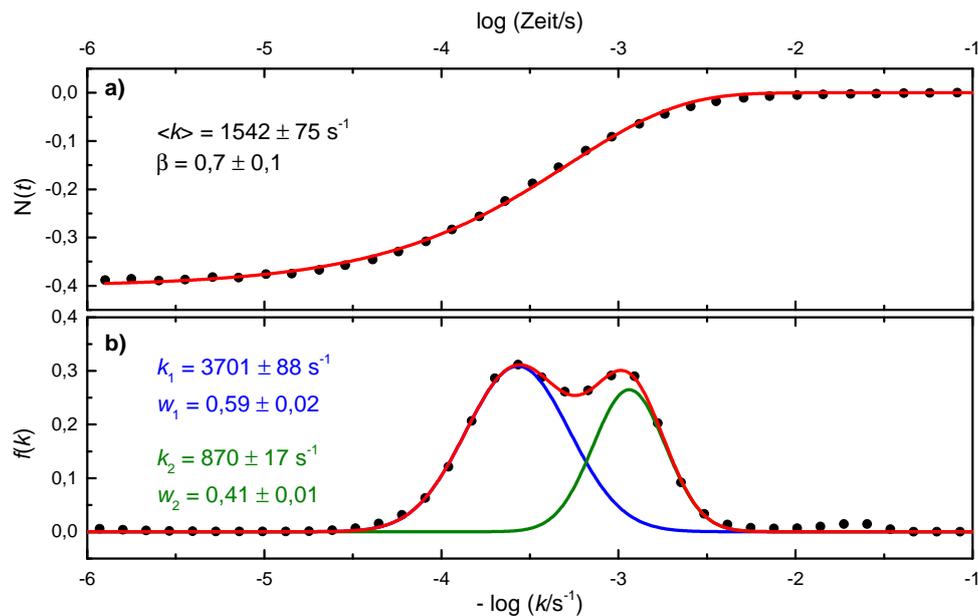


Abbildung 2.4: Anwendung der MEM auf eine CO-Rückbindungskinetik einer teilweise mit H4B-gebundenen iNOS_{oxy}-CO-Probe (2,6 μM H4B in Lösung). **a)** CO-Rückbindungskinetik mit Fit einer gestreckten Exponentialfunktion. **b)** Ergebnis der MEM-Analyse und Fit zweier Gauß-Funktionen (rot und grün).

2.5. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)

2.5.1. Aufbau der FTIR-Spektroskopieanlage

Der Aufbau der Anlage zur Messung von IR-Spektren (Abb. 2.5) basiert auf einem Vertex 80v FTIR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland). Das Licht einer IR-Quelle (Global) durchläuft ein Michelson-Interferometer und wird anschließend aus dem Gehäuse ausgekoppelt. Der ausgekoppelte Messstrahl wird über zwei Spiegel durch die Probe auf einen Detektor geführt. Als Detektoren kommen, je nach Messbereich, zwei mit flüssigem Stickstoff gekühlte Halbleiterdetektoren zum Einsatz: InSb (1700 – 2300 cm^{-1}), MCT (1100 – 2300 cm^{-1}). Der gesamte externe Strahlengang befindet sich in einer Plexiglasskiste, die mit trockener Luft ventiliert ist, um Absorption der IR-Strahlung durch Luftfeuchtigkeit zu vermeiden.

Der Probenhalter besteht aus sauerstofffreiem, hochleitendem Kupfer und wird am Kühlfinger eines Kryostaten (Model F-50, Sumitomo, Tokyo, Japan) angebracht. Eine dünne Schicht Goldpaste zwischen Kühlfinger und Probenhalter sorgt für optimale thermische Leitfähigkeit. Wenige Mikroliter der nach Abschnitt 2.2 angefertigten Probenflüssigkeit werden zwischen zwei Calciumfluoridfenstern geschichtet und im

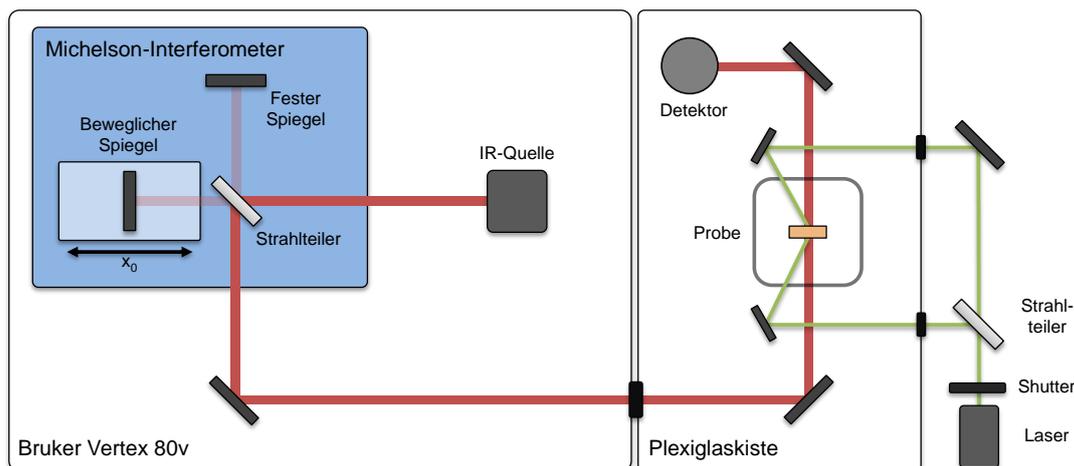


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau der FTIR-Spektroskopieanlage. Das Michelson-Interferometer ist blau hinterlegt.

Probenhalter verschraubt. Ein Ring aus Mylar-Polyesterfolie (CO-Probe: 75 μm , NO-Probe: < 5 μm) dient als Abstandshalter zwischen den Fenstern.

Nach der Anbringung der Probe wird der Kühlfinger mit einer Taucherglocke abgedichtet. Da der Probenhalter nicht gasdicht schließt, kann die Taucherglocke erst unter der Glasübergangstemperatur der Probenlösung ($\sim 180\text{ K}$) evakuiert werden. Die feuchte Luft innerhalb der Glocke wird deshalb zu Beginn durch Stickstoff ausgetauscht. Eine am Kühlfinger angebrachte Siliziumdiode erlaubt es, in Kombination mit einem Temperaturregler (Model 336, Lake Shore Cryotronics, Westerville, OH, USA), gezielt Temperaturen im Bereich von 4 – 320 K anzufahren und zu halten. Ein frequenzverdoppelter Dauerstrich-Nd-YAG-Laser (Samba, Cobolt, Solna, Schweden) ermöglicht die Ligandenphotolyse. Der Laser emittiert bis zu 300 mW bei einer Wellenlänge von 532 nm. Um die Probe homogen zu beleuchten, wird der Strahl durch einen 50/50-Strahlteiler aufgespalten und beidseitig auf die Probe fokussiert.

2.5.2. Michelson-Interferometer

Herkömmliche optische Spektrometer erzeugen nach Wellenlänge aufgelöste Strahlung durch Beugung am Gitter oder Brechung am Prisma. Eine Probe kann somit durch Drehung des Gitters beziehungsweise des Prismas wellenlängenabhängig auf ihre Absorption untersucht werden. Eine weitaus effizientere Methode bietet die Nutzung eines Michelson-Interferometers, das Herz jedes FTIR-Spektrometers [124]. Der Aufbau des Michelson-Interferometers gestaltet sich äußerst simpel (Abb. 2.5, blau hinterlegt). Der kollimierte Strahl einer polychromatischen IR-Quelle fällt auf einen Strahlteiler. Einer der beiden Teilstrahlen wird an einem festen Spiegel, der andere Teilstrahl an einem fahrbaren Spiegel reflektiert. Bei der Zusammenführung der Teilstrahlen ergibt

sich aufgrund des fahrbaren Spiegels eine Weglängendifferenz zwischen den Strahlen und somit ein von der Spiegelposition x abhängiges Interferogramm, $I(x)$ (Abb. 2.6). Dieses kann durch Fouriertransformation in ein Transmissionsspektrum, $T(\tilde{\nu})$, transformiert werden. Die konkreten Vorteile der FTIR-Spektroskopie gegenüber der dispersiven Spektroskopie lauten:

1. **Jaquinot-Vorteil:** da keine dispersiven Elemente (Gitter, Spalt,..) genutzt werden, trifft eine höhere Lichtmenge auf den Detektor.
2. **Fellgett-Vorteil:** alle Wellenlängen werden gleichzeitig gemessen, die Probe wird nicht abgerastert. Das Spektrum liefert eine Momentanaufnahme der Probe.
3. **Connes-Vorteil:** die Spiegelposition und somit die Wellenzahlachse ist durch Referenzmessung mit einem Helium-Neon-Laser (HeNe) sehr genau bestimmt.

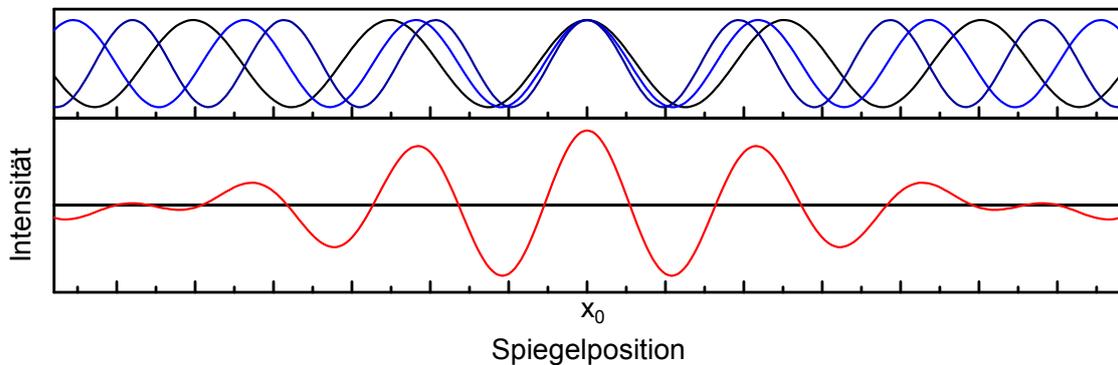


Abbildung 2.6: Drei Wellenzüge unterschiedlicher Wellenlänge überlagern sich in Abhängigkeit von der Spiegelposition x zu einem Interferogramm (rote Kurve). Bei gleichen Weglängen der beiden Teilstrahlen ($x = x_0$) kommt es zur konstruktiven Interferenz.

2.5.3. Fouriertransformation

Ausgehend von einer ebenen elektromagnetischen Welle

$$E(x', t) = e^{2\pi i(\tilde{\nu}x' - \nu t)} \quad (2.15)$$

mit der Frequenz ν und Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ergibt sich für die beiden interferierenden Teilstrahlen bei Vernachlässigung der Zeitabhängigkeit:

$$E(x, \tilde{\nu}) = \frac{1}{2} \left(e^{2\pi i\tilde{\nu}x_0} + e^{2\pi i\tilde{\nu}(x_0+x)} \right) = \frac{1}{2} e^{2\pi i\tilde{\nu}x_0} \left(1 + e^{2\pi i\tilde{\nu}x} \right). \quad (2.16)$$

x bezeichnet die Auslenkung des Spiegels aus der Gleichgewichtslage x_0 , bei der die Weglängendifferenz 0 beträgt. Die am Detektor gemessene Intensität zeigt eine kosinusförmige Oszillation:

$$I(x, \tilde{\nu}) = E^*(x, \tilde{\nu})E(x, \tilde{\nu}) = \frac{1}{2} (1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)). \quad (2.17)$$

Im FTIR-Spektrometer werden die Nulldurchgänge des kosinusförmigen Intensitätssignals eines monochromatischen HeNe-Lasers dazu genutzt, das Interferogramm zu digitalisieren und die Spiegelposition genau zu bestimmen (Connes-Vorteil).

Im allgemeinen Fall einer polychromatischen IR-Quelle ergibt sich die Intensität als Integral über alle abgestrahlten Frequenzen zu

$$I(x) = \int_0^{\infty} I(x, \tilde{\nu}) B(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = \underbrace{\frac{1}{2} \int_0^{\infty} B(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}_{I_0} + \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu}, \quad (2.18)$$

mit der Intensitätsverteilungsfunktion $B(\tilde{\nu})$, die die Absorptionseigenschaft der Probe beschreibt. Der konstante Term I_0 kann vernachlässigt werden, da die gesamte Information im sich periodisch ändernden zweiten Term von Gleichung (2.18) steckt:

$$I'(x) = \int_0^{\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu}. \quad (2.19)$$

Die Fourierkorrespondenz zu Gleichung (2.19) liefert das gewünschte Spektrum der Transmission, $B(\tilde{\nu})$:

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I'(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx. \quad (2.20)$$

In der Realität begrenzt der endliche Spiegelweg x_{Max} die Integrationsgrenzen von Gleichung (2.20):

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-x_{\text{Max}}}^{x_{\text{Max}}} I'(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx. \quad (2.21)$$

Der Begrenzung des Integrationsfensters kann mit einer Fensterfunktion $D(x)$ begegnet werden:

$$D(x) = 1 \text{ für } x \leq |x_{\text{Max}}| \quad (2.22)$$

$$D(x) = 0 \text{ für } x \geq |x_{\text{Max}}|. \quad (2.23)$$

Gleichung (2.21) wird damit zu:

$$B'(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I'(x) D(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx. \quad (2.24)$$

Die Fouriertransformation des Produkts zweier Funktionen entspricht nach dem Faltungstheorem der Faltung der einzeln transformierten Funktionen. Das errechnete Spektrum $B'(\tilde{\nu})$ entspricht also dem Produkt aus dem eigentlichen Spektrum $B(\tilde{\nu})$ und der Fouriertransformierten der Fensterfunktion $D(x)$:

$$B'(\tilde{\nu}) = B(\tilde{\nu}) \int_{-\infty}^{\infty} D(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx = B(\tilde{\nu}) f(\tilde{\nu}). \quad (2.25)$$

Die Kardinalsinusform der Funktion $f(\tilde{\nu})$,

$$f(\tilde{\nu}) = 2x_{\text{Max}}\text{sinc}(2\pi\tilde{\nu}x_{\text{Max}}), \quad (2.26)$$

führt zu unerwünschten Seitenbanden im Interferogramm. Um diese Seitenbanden zu unterdrücken, wird die Fensterfunktion durch eine sogenannte Apodisationsfunktion ersetzt [124]. Eine solche Funktion verringert die Gewichtung der seitlichen Flanken des Interferogramms. In dieser Arbeit wurde die drei-termige Blackman-Harris-Fensterfunktion benutzt [125].

Abbildung 2.7 zeigt ein typisches Interferogramm und das daraus resultierende Transmissionsspektrum einer iNOS-CO Probe. Ein solches Transmissionsspektrum repräsentiert üblicherweise das Mittel aus ~ 1000 Spiegelscans.

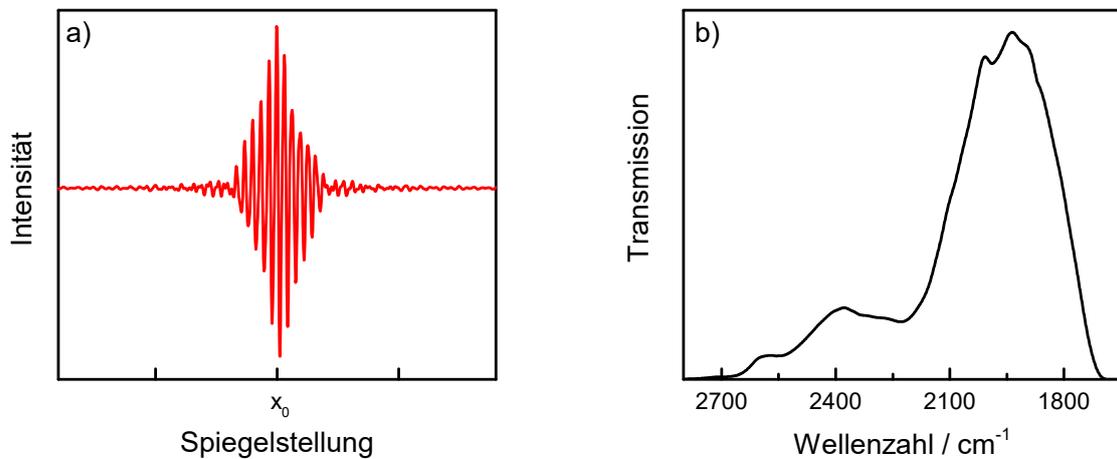


Abbildung 2.7: **a)** Interferogramm einer iNOS-CO Probe. **b)** Das durch Fourier-Rücktransformation berechnete Transmissionsspektrum der Probe.

2.5.4. Messmethoden

2.5.4.1. Differenz-Absorptionsspektroskopie

Die Form eines Transmissionsspektrums wie in Abbildung 2.7 b ist diktiert von dem Emissionsspektrum der IR-Quelle sowie den Absorptionseigenschaften der Optik und des Detektors. Die für diese Arbeit interessanten Signale, die Schwingungsbanden der Hämiliganden CO und NO, beschränken sich auf vergleichsweise kleine Signale in einem engen Wellenzahlfenster. Die Differenzabsorptionsspektroskopie vereinfacht die Interpretation der Transmissionsspektren, indem der Informationsgehalt allein auf die Unterschiede zwischen zwei Spektren reduziert wird. Ein Differenzabsorp-

tionsspektrum wird als negativer dekadischer Logarithmus des Verhältnisses zweier Transmissionsspektren $T_{1,2}$ berechnet:

$$\Delta A = -\log\left(\frac{T_1}{T_2}\right). \quad (2.27)$$

Wird zum Beispiel je ein Transmissionsspektrum vor (T_{Dunkel}) und nach (T_{Hell}) der Photolyse des Liganden vom Häm Eisen gemessen, so ergibt sich das Differenzabsorptionsspektrum

$$\Delta A = -\log\left(\frac{T_1}{T_2}\right) = -\log\left(\frac{T_{\text{Dunkel}}}{T_{\text{Hell}}}\right). \quad (2.28)$$

Abbildung 2.8 zeigt die Transmissionsspektren und das Differenzabsorptionsspektrum von $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/Arg}$ bei 4 K. Der Effekt des am Häm gebundenen, beziehungsweise photolysierten CO im Transmissionsspektrum (Abb. 2.8 a) ist nur schwer zu erkennen. Das Differenzabsorptionsspektrum (Abb. 2.8 b) betont die Unterschiede und zeigt somit nur Banden der gebundenen CO-Liganden im Bereich von $1900 - 1950 \text{ cm}^{-1}$ und die Banden der photolysierten Liganden im Bereich von $2100 - 2150 \text{ cm}^{-1}$. Letztere werden üblicherweise aufgrund des geringeren Extinktionskoeffizienten zur besseren Betrachtung mit dem Faktor 10 skaliert. Das Vorzeichen der Banden ergibt sich aus der Wahl des Nenners und Zählers in Gleichung (2.28). Die Schwingungsbanden der gebundenen Liganden, auch A-Banden genannt, fehlen nach der Photolyse und weisen deshalb negative Absorption auf. Die Banden der nun photolysierten Liganden, B- oder Photoproduktbanden, erscheinen und zeigen daher ein positives Absorptionssignal.

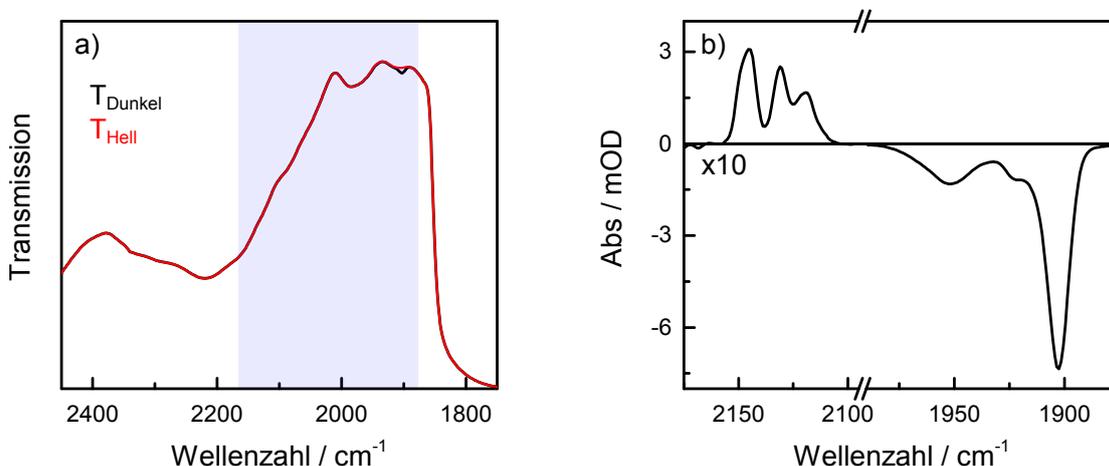


Abbildung 2.8: a) Transmissionsspektren von $\text{iNOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/Arg}$ vor und nach der Photolyse der Liganden bei 4 K. Der interessante Bereich ist blau hinterlegt. b) Differenzabsorptionsspektrum, berechnet aus den Spektren aus a). Links die positiven und mit Faktor 10 skalierten Photoproduktbanden, rechts die negativen A-Banden.

2.5.4.2. Isotherme Kinetik

Bei einer isothermen Kinetik wird die Evolution der A-Banden und Photoproduktbanden bei konstanter Temperatur zeitaufgelöst gemessen. Dazu muss der Rückbindungsprozess der Liganden langsam im Vergleich zur Photolyse sein. Gleichzeitig muss die Photolyse langsam genug sein, um eine gute Zeitauflösung der Messung zu garantieren. Da der Ratenkoeffizient der Photolyse, k_{AB} , proportional zur Laserintensität ist, muss diese ausreichend niedrig gewählt werden. Üblicherweise wird der 300 mW starke Laser durch einen 3 OD-Filter um den Faktor 1000 abgeschwächt. Vor Beginn der Photolyse wird ein Referenzspektrum der Probe gemessen. Sobald sich der Shutter öffnet und der Laser die Probe beleuchtet, werden Transmissionsspektren in logarithmischen Zeitabständen aufgenommen. Die Messdauer beträgt üblicherweise $\sim 15\,000$ s.

2.5.4.3. Temperaturlaufgelöste Messungen

Dieser Unterabschnitt beschreibt eine Methode zur Untersuchung thermisch aktivierter Ratenprozesse, die *Temperature Derivative Spectroscopy* (TDS) [126–128]. Sie erlaubt Rückschlüsse über die Enthalpiebarrierenverteilungsfunktion, $g(H)$, eines Proteins (Unterabschnitt 1.2.2.2). Die TDS löst die Rückbindungsprozesse sowohl nach Wellenzahl, als auch nach Temperatur auf und ist somit ein äußerst nützliches Werkzeug zur Charakterisierung der beobachteten Populationen.

Die Probe wird bei der Starttemperatur T_i vollständig photolysiert. Anschließend wird die Relaxation zurück ins Gleichgewicht durch Initialisierung einer Temperaturrampe mit der Heizrate β beobachtet (Abb. 2.9 a):

$$T(t) = T_i + \beta t. \quad (2.29)$$

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, kann die Rückbindung der Liganden durch eine Ratengleichung erster Ordnung beschrieben werden (Abb. 2.9 c):

$$\frac{dN}{dt} = -kN. \quad (2.30)$$

N bezeichnet dabei die Population der photolysierten Liganden, die mit dem Ratenkoeffizienten k zurückbinden. Die Temperaturabhängigkeit des Ratenkoeffizienten sei wieder durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben:

$$k = A \left(\frac{T}{T_r} \right) e^{\left(\frac{H}{RT} \right)}, \quad (2.31)$$

mit dem Vorfaktor A , der Referenztemperatur T_r (üblicherweise 100 K), der Höhe der Enthalpiebarriere H und der universalen Gaskonstanten R . Nach Substitution der Zeit durch die Temperatur nach Gleichung (2.29) und Integration von Gleichung (2.30), ergibt sich (Abb. 2.9 d):

$$\frac{dN}{dT} = \frac{-N_i}{\beta} \cdot k \cdot e^{-\int_{T_i}^T \frac{k}{\beta} dT'} = \frac{-N_i}{\beta} \cdot k \cdot e^{-\Theta}. \quad (2.32)$$

N_i bezeichnet die initiale Population der photolysierten Liganden. $k \cdot e^{-\Theta}$ bezeichnet die Auflösungsfunktion einer TDS-Messung. Θ kann mit Gleichung (2.31) spezifiziert werden:

$$\Theta = \frac{AT_r}{\beta} \left[\left(\frac{T}{T_r} \right)^2 \cdot E_3 \left(\frac{H}{RT} \right) - \left(\frac{T_i}{T_r} \right)^2 \cdot E_3 \left(\frac{H}{RT_i} \right) \right], \quad (2.33)$$

mit der Integraleponentialfunktion dritter Ordnung,

$$E_3(x) = \int_1^{\infty} \frac{e^{(-xt)}}{t^3} dt. \quad (2.34)$$

Die Analyse der Gleichungen (2.32) bis (2.34) liefert die intrinsische Linienform der TDS. Für eine Enthalpiebarriere der Höhe H ergibt sich eine Glockenkurve, mit einem Maximum bei der Temperatur T_p . Die Breite der Kurve gibt die Grenze für die Energieauflösung des Experiments an, sie hängt ab von der Enthalpie H , dem Vorfaktor A und der Heizrate β . Es kann gezeigt werden, dass die Beziehung zwischen der Temperatur T_p und der Enthalpie H annähernd linear ist [126]:

$$T_p = \frac{H}{R \ln(AT_c)}, \quad (2.35)$$

mit der für die TDS-Messung charakteristischen Zeit

$$\tau_c = \frac{RT_p^2}{\beta(H + RT_p)} \left(\frac{T_p}{T_r} \right). \quad (2.36)$$

Für ein Proteinensemble muss Gleichung (2.32) durch die Enthalpiebarrierenverteilungsfunktion, $g(H)$ (Abb. 2.9 d), ergänzt werden:

$$\frac{dN}{dT} = -\frac{N_i}{\beta} \int_0^{\infty} k e^{-\Theta} g(H) dH. \quad (2.37)$$

Die Populationsänderung, $\frac{dN}{dT}$, ist also proportional zur Verteilungsfunktion der Barrierenhöhe, $g(H)$, verbreitert durch die Auflösungsfunktion der TDS, $k \cdot e^{-\Theta}$. Ist die Breite der Verteilungsfunktion groß im Vergleich zur Breite der Auflösungsfunktion und gilt Gleichung (2.35), so ist die Auftragung von $\frac{dN}{dT}$ gegen T der Auftragung von $g(H)$ gegen H äquivalent (Abb. 2.9 b und d).

Anwendung der TDS

Der TDS-Messalgorithmus liefert ein Differenzabsorptionsspektrum bei der konstanten Starttemperatur T_i , welches die photolysierte Ligandenpopulation N_i definiert. Anschließend startet die Temperaturrampe (Gleichung (2.29)) und die Relaxation der Liganden wird durch die Messung eines Transmissionsspektrums pro 1 K erfasst. Die Messzeit eines Transmissionsspektrums ist durch die Heizrate β definiert:

$$t_{\text{Spek}} = \frac{1 \text{ K}}{\beta}. \quad (2.38)$$

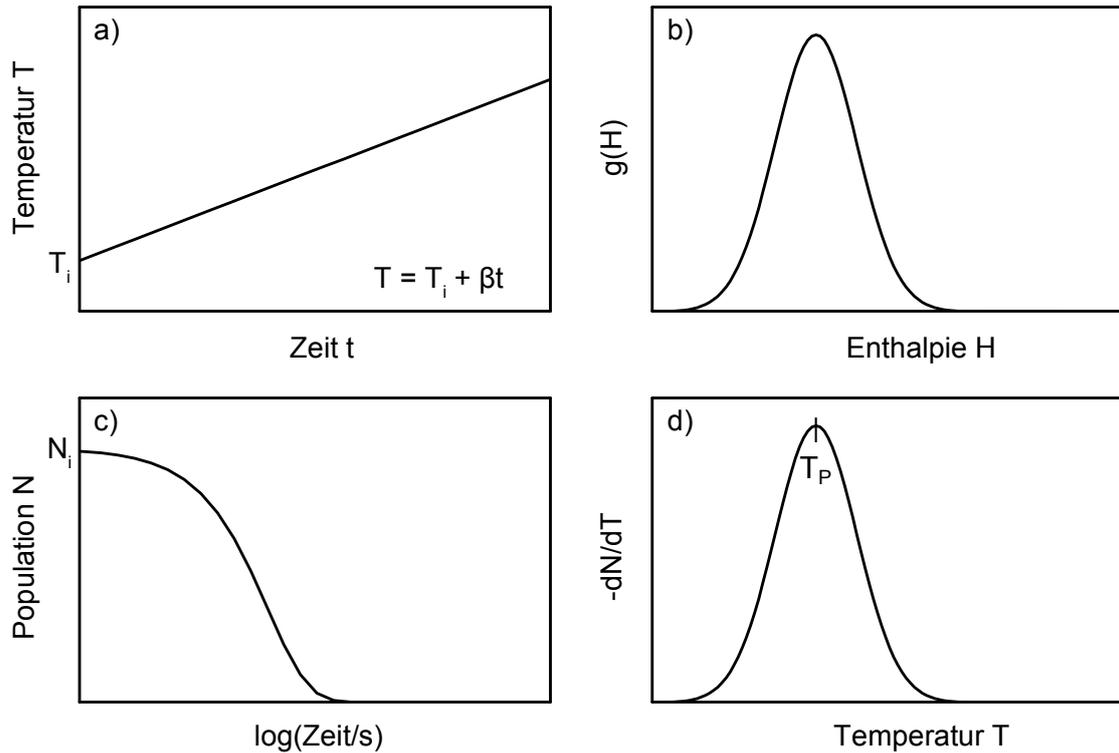


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der TDS. **a)** Temperaturrampe mit der Heizrate β . **b)** Verteilungsfunktion der Enthalpiebarrieren eines Proteinensembles. **c)** Rückbindung der Liganden mit der Anfangspopulation N_i . **d)** Änderung der Ligandenpopulation in Abhängigkeit von der Temperatur. Äquivalent zur Darstellung der Barrierenhöhenverteilungsfunktion, $g(H)$, in b).

Bei einer Heizrate von $\beta = 0,3 \frac{\text{K}}{\text{min}}$, einer Spiegelgeschwindigkeit von $\nu_{\text{Spiegel}} = 60 \text{ Hz}$ (Frequenz der Nulldurchgänge der kosinusförmigen Intensität des Eichlasers) und einer Auflösung von $\delta\tilde{\nu} = 2 \text{ cm}^{-1}$, ergibt sich eine Scan-Anzahl pro Spektrum von 400. Dem Spektrum wird der Mittelwert aus Start- und Endtemperatur der Messung zugeordnet. Zur Berechnung der Differenzabsorptionsspektren kann das bei T_i bestimmte Referenzspektrum vor der Photolyse genutzt werden. Allerdings kann die Lage der Banden eine Temperaturabhängigkeit aufweisen, was zu ungewollten Pseudo-Differenzsignalen führen würde. Daher empfiehlt es sich, die selbe Temperaturrampe nochmals zu durchfahren, ohne die Liganden zuvor zu photolysieren. So steht jedem Transmissionsspektrum ein ergänzendes Spektrum der unphotolysierten Probe bei gleicher Temperatur gegenüber.

Wie in Unterabschnitt 1.2.2.2 erwähnt kann es neben der Andockstelle B noch weitere Andockstellen geben (Abb. 1.9 a). Eine Photolyse bei 4 K populierte allerdings nur Stelle B, ein Übergang von zum Beispiel B nach C ist, sofern C vorhanden ist, aufgrund der geringen thermischen Energie nicht möglich. Um auch diese Zustände zu bevölkern und mit der TDS analysieren zu können, kann alternativ zur Photolyse bei 4 K die Temperaturrampe in umgekehrter Richtung von hohen zu tiefen Temperaturen

durchfahren werden, während der Laser die Liganden über die gesamte Dauer photolysiert. Bei den anfänglich hohen Temperaturen können photolysierte Liganden in B weiter zur Stelle C migrieren, da die thermische Energie $k_B T$ größer ist als die Enthalpiebarriere H_{BC} . Aufgrund der kontinuierlichen Abkühlung der Probe bleibt ein Teil der Liganden dort gefangen, sobald die thermische Energie nicht mehr ausreichend ist um die Enthalpiebarriere H_{CB} zu überwinden. Dieses Messprotokoll trägt den Namen *slow-cool*-Protokoll.

Abbildung 2.10 a zeigt beispielhaft das Ergebnis einer TDS-Messung. Die über der Temperatur aufgefächerten Differenzabsorptionsspektren zeigen zwei verschwindende Populationen. Die Populationsänderung $\frac{dN}{dT}$ (Abb. 2.10 b) wird durch konsekutive Differenzen aufeinanderfolgender Spektren bestimmt. TDS Diagramme werden üblicherweise als 2D-Konturdiagramme präsentiert (Abb. 2.10 c). Dies entspricht einer zur Wellenzahl-Temperatur-Ebene orthogonalen Projektion des Diagramms aus Abbildung 2.10 b. Die Höhenlinien sind logarithmisch dargestellt, um kleine Merkmale nicht zu unterdrücken.

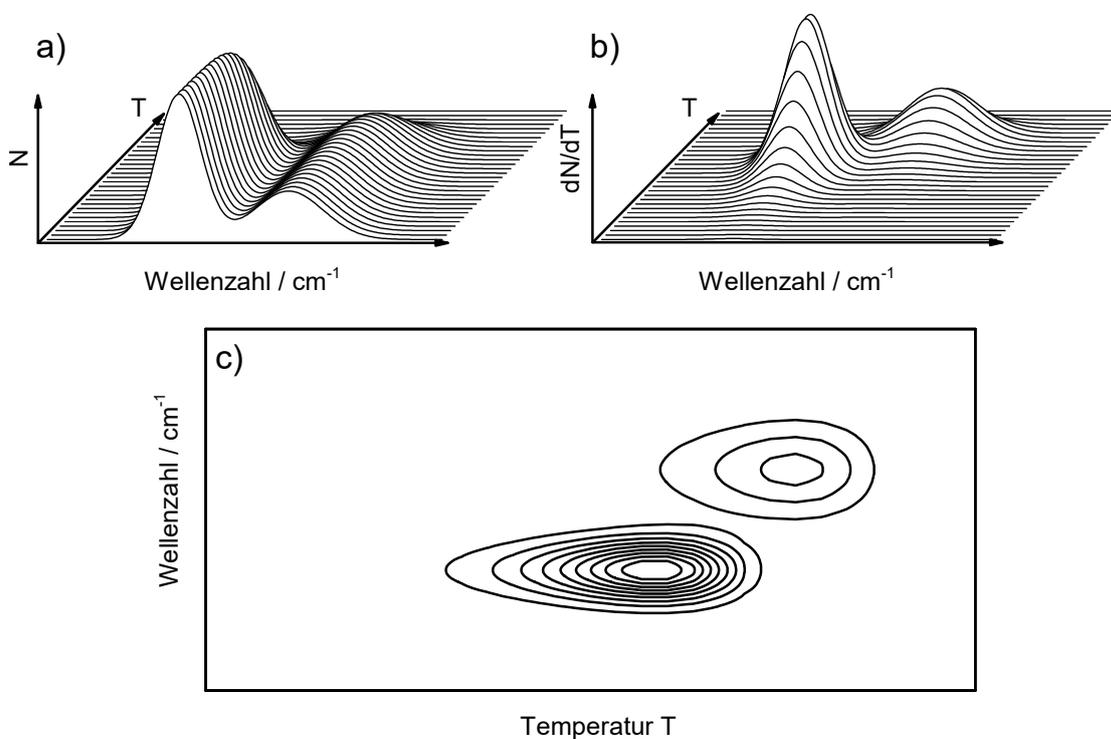


Abbildung 2.10: Darstellung eines 2D-TDS-Diagramms. **a)** Über der Temperatur aufgefächerte Differenzabsorptionsspektren. **b)** Populationsänderung durch konsekutive Differenzbildung. **c)** 2D-Konturdiagramm der Abbildung aus b).

3. FTIR-Spektroskopie an iNOS_{oxy}-CO und iNOS_{oxy}-NO

Das von der iNOS-Isoform synthetisierte NO findet sich in der Pathogenese vieler Krankheiten [23–27]. Die Nachfrage nach geeigneten Inhibitoren zur Regulation des Enzyms ist groß. Aufgrund dessen herrscht starkes Interesse an der Erforschung des Prozesses der NO-Synthese durch iNOS [28, 29].

Die zweistufige Synthese-Reaktion erfordert das Binden von O₂-Liganden am Hämeisen, das Binden von Substrat L-Arg, Zwischenprodukt NOHA und Kofaktor H4B im katalytischen Zentrum des Proteins, sowie die Freisetzung des synthetisierten NO [19]. Das gezielte Design eines Inhibitors macht die Untersuchung der Interaktionen zwischen Liganden, Substrat, Zwischenprodukt und Kofaktor und der umgebenden Proteinmatrix unumgänglich. Im diesem Kapitel wurden diese Interaktionen an CO- und NO-ligiertem iNOS_{oxy} durch FTIR-Spektroskopie der Schwingungsfrequenzen der Liganden untersucht. CO und NO gelten als exzellente IR-Sonden. Die im Vergleich zu dem physiologischen (aber IR-inaktiven) Liganden O₂ ähnliche Größe lässt auf vergleichbare Ergebnisse in Hinsicht auf Ligandendynamik innerhalb des Proteins schließen. Vor allem CO hat sich, aufgrund seiner im mittleren IR Bereich liegenden Streckschwingungsfrequenzen, in der Erforschung von Hämproteinen als sehr attraktiver Ligand erwiesen. Die Banden können mit äußerst hoher Empfindlichkeit und Präzision gemessen werden. Die Lage der Banden reagiert sehr sensibel auf elektrostatische Interaktionen und dient somit als Spiegelbild der Ligandenumgebung (Unterabschnitt. 1.3.3.3).

Anders als CO, das nur an Hämeisen im Fe²⁺-Zustand binden kann, ist NO zusätzlich dazu in der Lage, Verbindungen mit dem oxidierten Fe³⁺ einzugehen. FTIR-Untersuchungen des NO-ligierten iNOS_{oxy} sind aufgrund der niedrigeren intrinsischen IR-Absorption rar. Zusätzlich erschweren extrem schnelle Rekombination des photolytierten Fe²⁺-NO-Komplexes sogar bei tiefen Temperaturen und die spektrale Überlappung mit den Amid-Banden die Messungen. Aus diesem Grund, und weil es sich bei Fe³⁺-gebundenem NO um den physiologischen relevanten Zustand nach Beendigung des katalytischen Prozesses handelt, wurde sich bei den Messungen auf Fe³⁺-gebundenes NO beschränkt.

Der erste Abschnitt behandelt die Erkenntnisse aus FTIR-Untersuchungen mit dem Liganden CO, der zweite Abschnitt die Erkenntnisse mit dem Liganden NO. Die Messungen wurden jeweils bei kryogenen Temperaturen durchgeführt, um die Liganden-

rückbindung zu verlangsamen. So ergibt sich eine lange Lebenszeit der durch die Photolyse entstandenen Banden, die anschließend durch Differenzspektroskopie ausgewertet werden können. Zudem frieren alle Proteinstrukturfluktuationen bei kryogenen Temperaturen aus. Alle Beobachtungen des Liganden beschränken sich somit auf das Innere des Proteins. Zur Entwirrung der Photolyse-induzierten Absorptionsänderungen wurde die FTIR-Spektroskopie mit der temperaturlösten TDS-Methode kombiniert. Die Ergebnisse wurden in Horn et al. [129] veröffentlicht.

3.1. FTIR-Spektroskopie an *i*NOS_{oxy} mit CO als Ligand

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie an CO-ligiertem *i*NOS_{oxy} dargestellt. Es wurden Messungen an leerem, L-Arg-, NOHA- oder H4B-gebundenem *i*NOS_{oxy}-CO durchgeführt. Im ersten Unterabschnitt wird die Auswirkung der Bindung von Substrat, Zwischenprodukt oder Kofaktor auf die stationären 4 K-Photolyse-Differenzspektren der A-Banden und Photoproduktbanden von *i*NOS_{oxy} diskutiert. Im zweiten Unterabschnitt erfolgt ein Einblick in die thermisch aktivierten Rückbindungsprozesse innerhalb des Proteins. Die 2D-TDS-Diagramme liefern Informationen zur Assoziation von A-Banden und Photoproduktbanden sowie zum Einfluss von Substrat, Zwischenprodukt und Kofaktor auf die Rückbindungsprozesse. Zusätzliche Informationen finden sich in Jung et al. [130] und Lis et al. [131].

3.1.1. 4 K-Photolyse-Differenzspektren

3.1.1.1. A-Banden

Die 4 K-Photolyse-Differenzspektren von *i*NOS_{oxy}-CO zeigen zwei breite, sich stark überlappende A-Banden bei 1945 cm⁻¹ und 1959 cm⁻¹ (Abb. 3.1 a). Die beiden Banden repräsentieren zwei Subkonformationen des Proteins, die Breite deutet auf starke intrinsische strukturelle Heterogenität der Konformationen hin. Wird der Probe der Kofaktor H4B zugefügt, so zeigen sich nur relativ kleine Änderungen im Spektrum; statt der beiden stark überlappenden Banden bei leerem *i*NOS_{oxy}-CO zeigt sich nur noch eine, sehr ausgeprägte Bande bei 1951 cm⁻¹, sowie eine kleinere Bande bei 1924 cm⁻¹ (Abb. 3.1 a). Die nur marginalen Änderungen des Erscheinungsbildes des Spektrums sind nicht weiter überraschend. H4B bindet nicht in unmittelbarer Nähe des am Hämeisen gebundenen Liganden, sondern in einiger Entfernung, neben dem Häm (Abschnitt 1.1, Abb. 1.4). Da es so nicht zur direkten Wechselwirkung zwischen Kofaktor und Ligand kommen kann, ist mit einer starken Verschiebung der Schwingungsbanden des Liganden auch nicht zu rechnen. Im krassen Gegensatz dazu steht der Effekt von L-Arg auf das Spektrum. Die dominante Bande verschiebt hin zu tiefe-

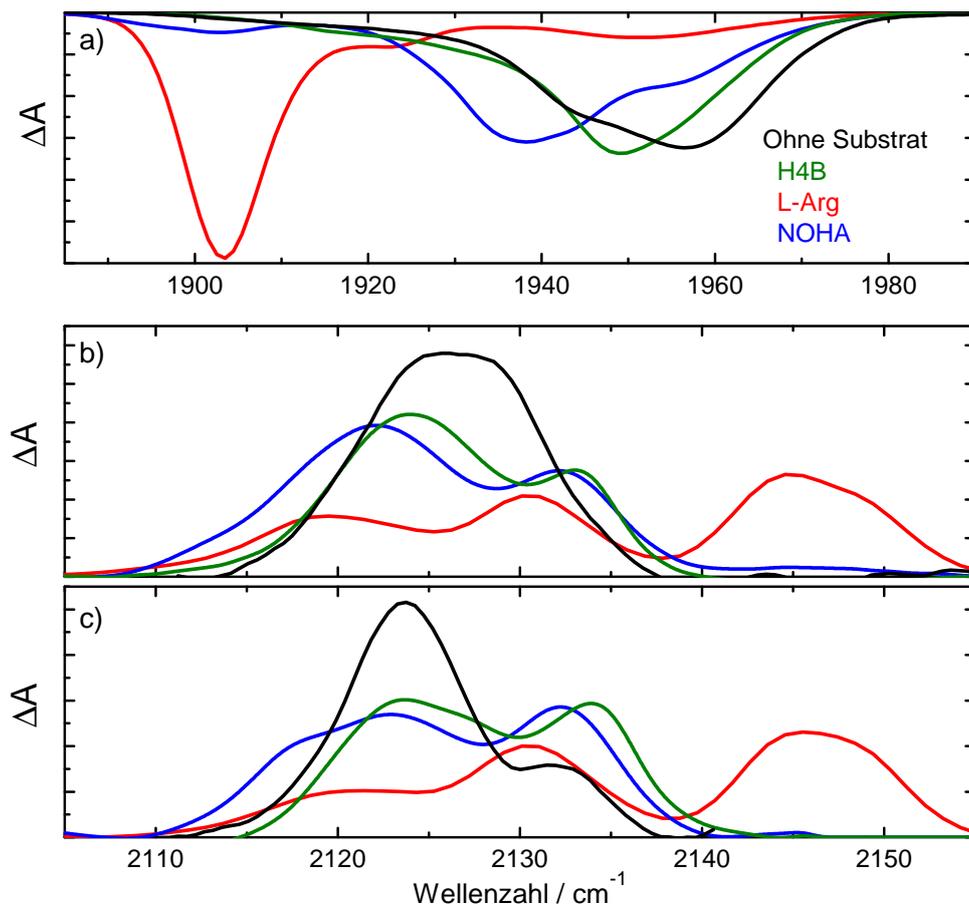


Abbildung 3.1: 4 K-Photolyse-Differenzspektren von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$. **a)** Absorptionsbanden des hämgebundenen CO. **b)** Photoproduktbanden nach Beleuchtung für 10 s bei 4 K. **c)** Photoproduktbanden nach zeitlich ausgedehnter Beleuchtung während langsamer Abkühlung von 160 K auf 4 K.

ren Wellenzahlen, das Maximum der Bande liegt bei 1904 cm^{-1} ; des Weiteren finden sich zwei deutlich kleinere Banden bei 1921 cm^{-1} und 1951 cm^{-1} (Abb. 3.1 a). Die starke Rotverschiebung von A_{1904} findet ihre Ursache im Elektronen-abziehenden Effekt der terminalen, positiv geladenen NH_2^+ -Gruppe der L-Arg Seitenkette nahe des Sauerstoffatoms des gebundenen CO [30]. Die positive Ladung zieht Elektronendichte aus der CO-Bindung in Richtung des Sauerstoffatoms. Die daraus resultierende Abschwächung der CO-Molekülbindung spiegelt sich im Absinken der Schwingungsfrequenz ν_{CO} wider (Unterabschnitt 1.3.3.3). Die Position von A_{1921} deutet aufgrund der im Vergleich zu A_{1904} schwächeren Rotverschiebung auf eine elektrostatische Wechselwirkung des CO-Dipols mit einer weniger starken positiven Partialladung hin, höchstwahrscheinlich die neutrale terminale Aminogruppe der L-Arg Seitenkette.

Auch das Reaktionszwischenprodukt NOHA zeigt eindeutige Wechselwirkungen mit CO. Es lassen sich drei A-Banden unterscheiden; bei 1903, 1937 und 1956 cm^{-1} (Abb. 3.1a). Die Kristallstruktur von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/NOHA}$ zeigt, dass gebundenes NOHA die gleiche Orientierung in der aktiven Stelle des Proteins einnimmt wie L-Arg [132]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass A_{1937} diejenigen $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/NOHA}$ repräsentiert, bei denen es zu einer Wasserstoffbrücken-Interaktion zwischen der Hydroxygruppe der NOHA Seitenkette und dem Liganden CO kommt. Bei A_{1903} handelt es sich höchstwahrscheinlich um $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/NOHA}$, in denen NOHA Moleküle binden, deren terminales Amin der Seitenkette im protonierten Zustand vorliegt ($\text{pK} = 8,1$ [133]) und in Richtung des CO zeigt. Der Effekt der positiven Ladung äußert sich dann ähnlich wie bei L-Arg. Es wird vermutet, dass es sich beim protonierten NOHA um das katalytisch aktive Zwischenprodukt handelt [134, 135].

3.1.1.2. Photoproduktbanden

Die Absorptionsspektren der Photoprodukte, also die Schwingungsfrequenzen ν_{CO} der photolysierten CO-Liganden, sind in Abbildung 3.1 b und 3.1 c aufgetragen. Erstere entstammen einer Messung mit kurzer Beleuchtungsdauer von 10 s bei 4 K, letztere einer Messung mit dem *slow-cool*-Protokoll. Die Bandenpositionen sowie deren Flächen (normiert auf die integrierte Absorption des jeweiligen Spektrums) sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Das Verhältnis zwischen integrierter Absorption der A-Banden und der Photoproduktbanden beträgt ~ 20 [136].

Die Photoproduktspektren nach kurzer Beleuchtungsdauer bei 4 K (Abb. 3.1 b) weisen allesamt Banden im Bereich zwischen 2120 cm^{-1} und 2130 cm^{-1} auf. Das Spektrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ besteht aus zwei Banden bei 2124 cm^{-1} und 2129 cm^{-1} . Binden des Kofaktors H4B hat offenbar einen Einfluss auf die Schwingungsfrequenz des CO-Moleküls in der Andockstelle B; die Banden tauchen bei 2124 cm^{-1} und 2133 cm^{-1} auf. In Anwesenheit des Substrats L-Arg zeigen sich zwei Banden bei 2120 cm^{-1} und 2131 cm^{-1} ; zusätzlich entstehen zwei weitere Banden bei etwas höheren Wellenzahlen, 2144 cm^{-1} und 2150 cm^{-1} . Aufgrund der erhöhten Schwingungsfrequenz der beiden Banden kann auf eine Wasserstoffbrücken-Interaktion zwischen dem Kohlenstoffatom des CO und der terminalen Aminogruppe des L-Arg geschlossen werden [137]. Mit gebundenem NOHA entstehen zwei Banden bei 2122 cm^{-1} und 2133 cm^{-1} . Die sehr kleine Bande bei 2145 cm^{-1} kann mit CO-Molekülen assoziiert werden, die von der A_{1903} -Konformation von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/NOHA}$ photolysiert wurden.

Vergleicht man die nach kurzer Beleuchtungszeit bei 4 K gemessenen Photoproduktspektren (Abb. 3.1 b) mit den nach dem *slow-cool*-Protokoll bei 4 K gemessenen Spektren (Abb. 3.1 c), so zeigen sich nur geringfügige Unterschiede. Es scheint demnach nicht möglich zu sein, weitere Andockstellen, sofern vorhanden, in einem signifikanten Ausmaß zu populieren. Das leere $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ weist den größten Unterschied zwischen beiden Spektren auf. Statt des stark überlappenden Bandenpaars, zeigen sich nach dem *slow-cool*-Protokoll zwei gut separierte Banden bei 2124 cm^{-1} und 2134 cm^{-1} .

Darüber hinaus taucht bei iNOS_{oxy}-CO/NOHA eine zusätzliche Schulter bei 2117 cm⁻¹ auf.

Tabelle 3.1: Positionen und prozentuale Flächenanteile der IR-Schwingungsbanden hämgebundener und photolysierter CO-Liganden in iNOS_{oxy} bei 4 K, basierend auf Abbildung 3.1. Die experimentellen Fehler betragen jeweils ±0,5 cm⁻¹ und ±3%.

	Häm-gebundenes CO		Photolysiertes CO (10 s @ 4 K)		Photolysiertes CO (Slow cool)	
	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
Ohne Substrat	1921	9	2124	55	2124	85
	1945	40	2129	45	2132	15
	1959	51				
L-Arg	1904	60	2120	28	2120	20
	1921	13	2131	28	2131	34
	1951	18	2144	32	2145	30
			2150	12	2150	16
NOHA	1903	13	2122	75	2117	20
	1937	57	2133	19	2124	44
	1956	30	2145	6	2133	36
H4B	1924	18	2124	75	2122	10
	1951	82	2133	25	2126	61
					2134	29

3.1.2. Thermisch aktivierte CO-Rückbindungsprozesse

Um weitere Informationen über die Banden der Photolysespektren zu erhalten, wurden TDS-Messungen im Bereich von 4 K bis 160 K sowohl nach einer kurzen Beleuchtungsdauer von 10 s bei 4 K, als auch nach dem *slow-cool*-Protokoll aufgenommen. Abbildung 3.2 zeigt die 2D-Konturdiagramme der Absorptionsänderungen in den A-Banden (linke Spalte) und in den Photoproduktbanden (rechte Spalte) nach der kurzen Beleuchtung bei 4 K.

In den Diagrammen aller Proben ist erkennbar, dass die Rückbindung der CO-Liganden in einem einzigen Schritt erfolgt. Es scheint sich also um nur einen möglichen kinetischen Zustand des photolysierten Protein-Ligandend-Komplexes zu handeln. Die Aufspaltung in mindestens zwei Banden lässt auf unterschiedliche Orientierung des Liganden in der Andockstelle schließen. Die geringe Breite der Photoproduktbanden (Abb. 3.1 b) lässt zusätzlich darauf schließen, dass die photolysierten Liganden in den transienten Andockstellen in einer definierten Orientierung gefangen sind. Im substratfreien iNOS_{oxy}-CO findet sich das Maximum der CO-Rückbindung bereits bei 4 K

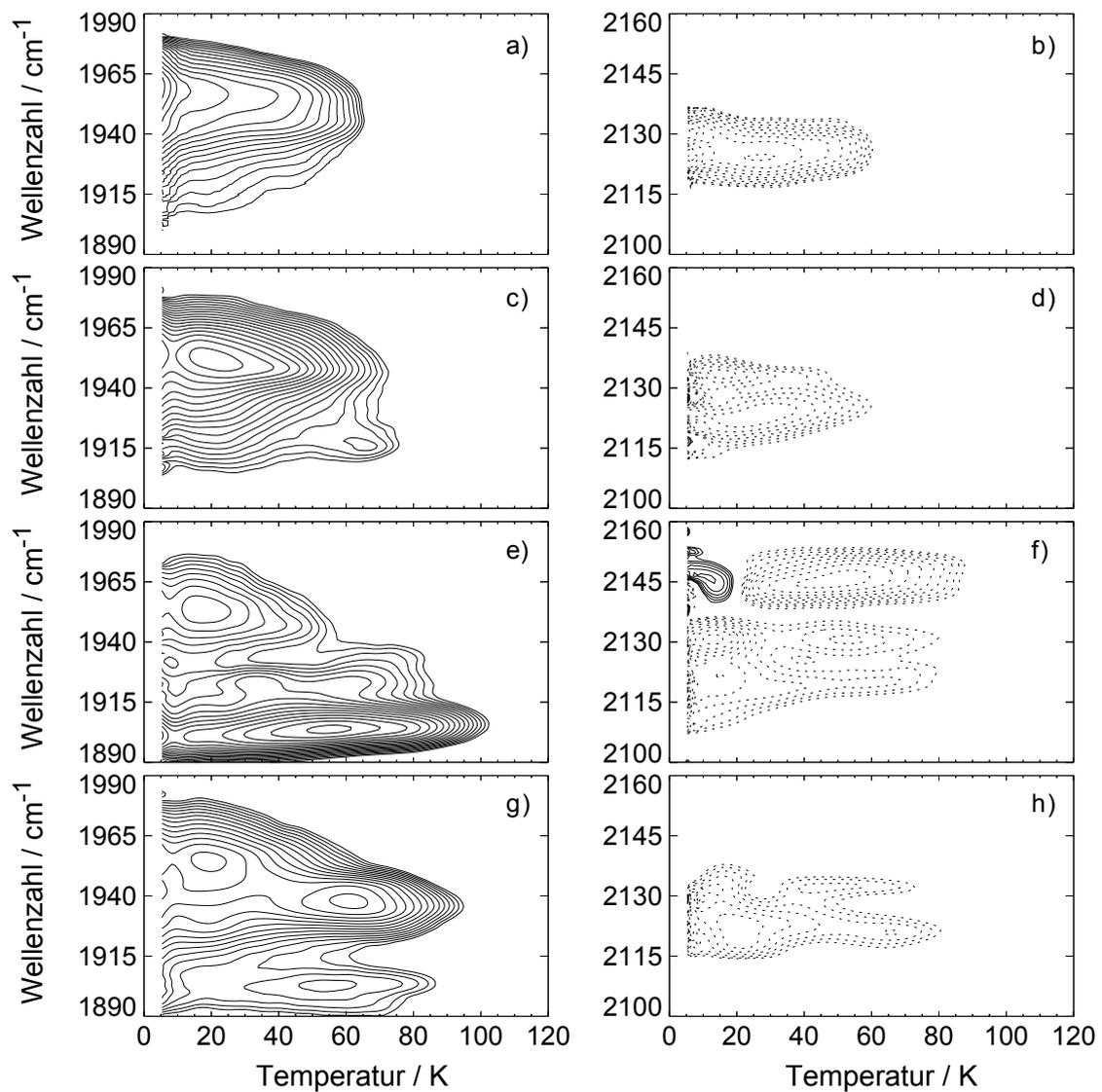


Abbildung 3.2: TDS-Konturdiagramme von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ nach einer Beleuchtungsdauer von 10 s bei 4 K. Linke Spalte: Absorptionsänderungen der A-Banden. Rechte Spalte: Absorptionsänderungen der Photoproduktbanden. Die Konturlinien sind in logarithmischen Abständen aufgetragen; durchgezogene (gepunktete) Linien bezeichnen positive (negative) Absorptionsänderung. $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ (a,b) ohne Substrat; (c,d) mit H4B; (e,f) mit L-Arg; (g,h) mit NOHA.

(Abb. 3.2 a, b), was auf eine sehr kleine Enthalpiebarriere zwischen dem ungebundenen und gebundenen Zustand hindeutet. Der Rückbindungsprozess erstreckt sich bis zu einer Temperatur von ~ 70 K. Bei gebundenem H4B zeigt sich das Maximum der CO-Rückbindung in den dominanten A_{1951} -Zustand erst bei 20 K; wie in $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ hält die Rückbindung bis zu einer Temperatur von ~ 70 K an. Der kleinere A_{1924} -Zustand weist im Gegensatz zu A_{1951} eine fokussiertere Rückbindung mit einem Maximum bei ~ 60 K auf (Abb. 3.2 c). Das Diagramm der Photoproduktzustände liefert keine zusätzlichen Informationen. Binden von L-Arg oder NOHA schiebt die CO-Rückbindung zu höheren Temperaturen, was darauf hindeutet, dass der Ligand in der Andockstelle durch Wasserstoffbrücken-Interaktion stabilisiert wird und somit eine höhere Enthalpiebarriere überwinden muss (Abb. 3.2 e, g). Die maximale CO-Rückbindung in A_{1903} und A_{1937} von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/NOHA}$ findet bei $\sim 50 - 60$ K statt (Abb. 3.2 g). Die zugehörigen Photoproduktbanden bei 2122 cm^{-1} und 2133 cm^{-1} sind in Abbildung 3.2 h zu sehen. Die Rückbindung in den gering ausgeprägten A_{1956} -Zustand bei ~ 20 K (Abb. 3.2 g) repräsentiert Reste NOHA-freien Proteins. L-Arg-gebundenes $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ zeigt ähnlich wie $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO/NOHA}$ ein Maximum der Ligandenrückbindung bei $\sim 50 - 60$ K (Abb. 3.2 e). Die korrespondierenden Photoproduktbanden bei $2150, 2144, 2131$ und 2120 cm^{-1} verlieren damit einhergehend an Intensität, es handelt sich also um Banden von Liganden, die sich in direkter Nähe des Substrats befinden (Abb. 3.2 f). Zusätzlich weist das Diagramm bei ~ 12 K spiegelbildlich gestrichene und durchgezogene Konturen bei 2131 und 2144 cm^{-1} auf. Da die Spektren im Dunkeln aufgenommen wurden, kann das Wachstum der Banden bei 2144 cm^{-1} nicht auf die Photolyse hängender Liganden zurückgeführt werden. Es muss sich um einen dynamischen Populationsaustauschprozess innerhalb der Photoproduktbanden handeln. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesem Prozess um eine thermisch aktivierte Umverteilung der Ausrichtung der CO-Moleküle, resultierend in einer Drehung der Moleküle um 180° [94, 113, 138, 139].

Die nach dem *slow-cool*-Protokoll gemessenen TDS-Diagramme (Abb. 3.3) zeigen nur marginale Unterschiede im Vergleich zu den Diagrammen, die nach kurzer Beleuchtung bei 4 K aufgenommen wurden (Abb. 3.2). Das spricht für die These, dass die photolysierten Liganden in $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ nur eine einzige Andockstelle bevölkern. Allerdings fällt auf, dass die Temperatur maximaler Ligandenrückbindung nach der ausgedehnten Beleuchtung durch das *slow-cool*-Protokoll generell leicht höher liegt als nach kurzer Beleuchtung. Eine mögliche Ursache sind kleinere strukturelle Änderungen in der näheren Umgebung des aktiven Zentrums des Proteins. Diese führen zu einer etwas erhöhten Enthalpiebarriere und bedingen folglich eine höhere thermische Aktivierungsenergie des Ligandenrückbindungsprozesses. Ein ähnlicher Effekt nach langen Beleuchtungszeiten bei tiefen Temperaturen konnte bereits bei CO-ligiertem Myoglobin [128] und sowohl NO- als auch CO-ligiertem Nitrophorin 4 [140] beobachtet werden.

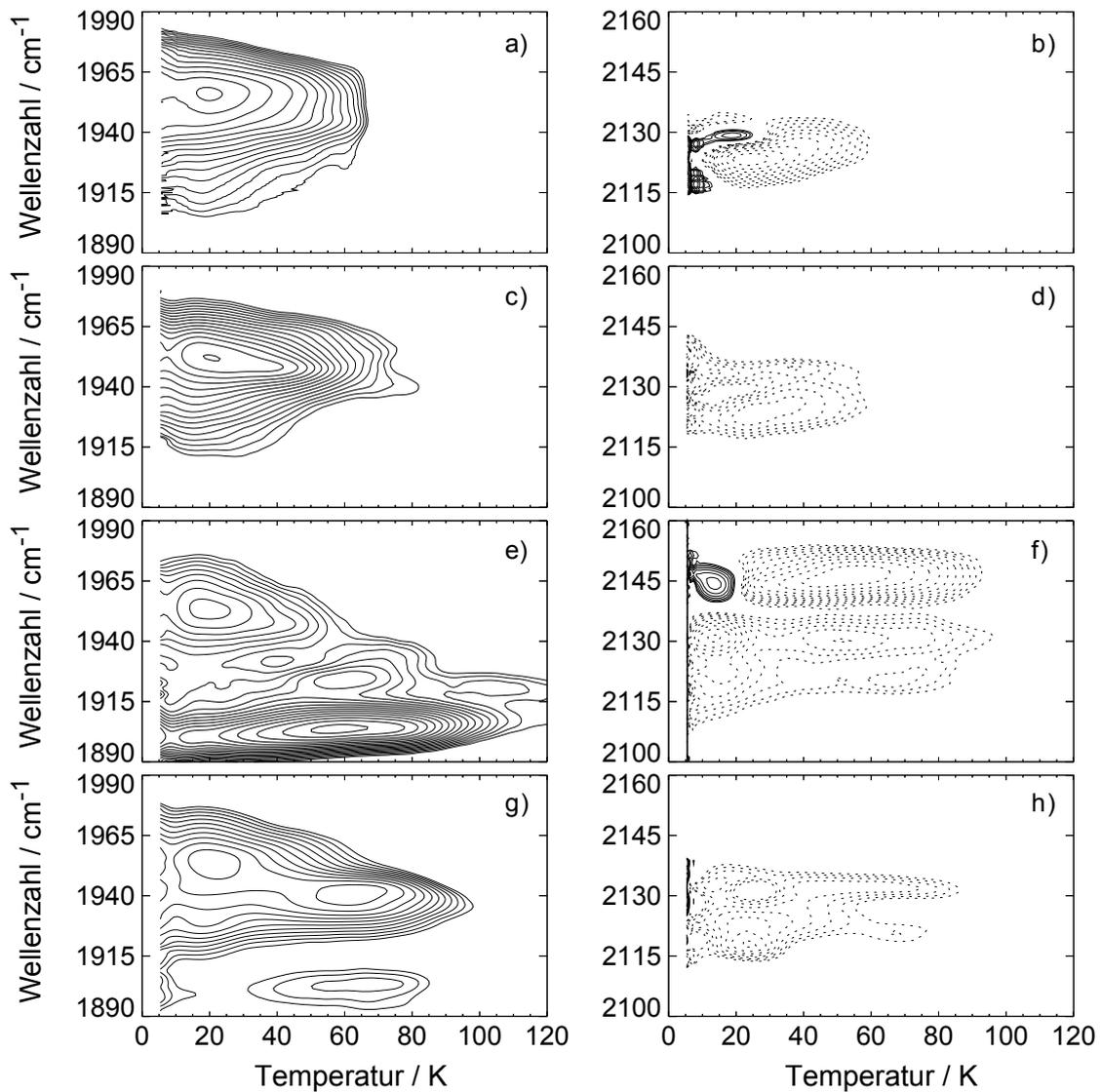


Abbildung 3.3: TDS-Konturdiagramme von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ nach konstanter Beleuchtung während langsamer Abkühlung von 160 K auf 4 K. Linke Spalte: Absorptionsänderungen der A-Banden. Rechte Spalte: Absorptionsänderungen der Photoproduktbanden. Die Konturlinien sind in logarithmischen Abständen aufgetragen; durchgezogene (gepunktete) Linien bezeichnen positive (negative) Absorptionsänderung. $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$ (a,b) ohne Substrat; (c,d) mit H4B; (e,f) mit L-Arg; (g,h) mit NOHA.

3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die primäre Andockstelle B ist ein unentbehrliches strukturelles Merkmal typischer, in Ligandentransport oder Speicherung involvierter Hämproteine. Erst durch sie wird effiziente Ligandenbindung am Hämeisen, sowie das Entkommen der Liganden aus der Proteinmatrix überhaupt möglich [141]. Von außen kommende Liganden werden vor der eigentlichen Bindung am Hämeisen in der Andockstelle eingefangen [94, 142]. Thermisch vom Hämeisen dissoziierte Liganden können dagegen in der Andockstelle verweilen, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit, der Proteinmatrix zu entkommen, erhöht. Ohne die Andockstelle würden die dissoziierten Liganden instantan wieder eine Bindung mit dem Hämeisen eingehen. Ein solches Verhalten konnte in NO-transportierendem Nitrophorin [140] und modifiziertem Cytochrom c [143] beobachtet werden.

Die katalytische Reaktion von $i\text{NOS}$ erfordert die sequentielle Bindung zweier O_2 -Moleküle sowie die Freisetzung des synthetisierten NO-Moleküls am Ende der Katalyse. Die Andockstelle B erfüllt somit zwei Funktionen. Einerseits führt sie die Bindung der O_2 -Moleküle am Hämeisen durch vorheriges Einfangen in der Andockstelle herbei. Andererseits ermöglicht sie die Freisetzung des Produktes NO. Durch die Messungen an CO-ligiertem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ konnte gezeigt werden, dass die Andockstelle für vom Hämeisen photolysierte Liganden sehr leicht zugänglich ist, sowohl in leerem, als auch in L-Arg, NOHA oder H4B gebundenem Protein. Das Substrat L-Arg und das Zwischenprodukt NOHA stabilisieren den Liganden in der Andockstelle durch Wasserstoffbrücken. Die kleine A_{1924} -Subpopulation des H4B-gebundenen $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ zeigt eine ähnliche stabilisierende Wirkung auf den photolysierten Liganden. Vermutlich ist eine kleine Fraktion von H4B-Molekülen in einer leicht unterschiedlichen Geometrie angeordnet und kann so direkt mit dem Liganden durch Wasserstoffbrücken interagieren.

3.2. FTIR-Spektroskopie an $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ mit NO als Ligand

Dieser Abschnitt diskutiert die Ergebnisse der Messungen an NO-ligiertem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$. Wie bei CO wurden FTIR-Spektroskopiemessungen an leerem, L-Arg-, NOHA- oder H4B-gebundenem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ durchgeführt, sowohl isotherm bei 4 K, als auch mit der TDS-Methode.

3.2.1. 4 K-Photolyse-Differenzspektren

3.2.1.1. A-Banden

Abbildung 3.4 zeigt die 4 K-Photolyse-Differenzspektren des NO-ligierten $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ mit dem Hämeisen im Fe^{3+} -Zustand. Zu sehen sind die Spektren des leeren $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$, sowie mit gebundenem L-Arg, NOHA und H4B. Die Bandenmaxima und die normierten Flächenanteile der Banden sind in Tabelle 3.2 vermerkt. Die meisten Spektren weisen eine A-Bande im Bereich um $\sim 1870\text{ cm}^{-1}$ auf, die mit der Schwingungsmode des Fe^{3+} gebundenen NO in leerem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ assoziiert werden kann. Im Spektrum des leeren $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ handelt es sich bei A_{1870} um eine eher breite Bande, was auf eine beträchtliche strukturelle Heterogenität des katalytischen Zentrums dieser Proteinspezies hinweist. Auffällig ist die Ähnlichkeit des Spektrums der NOHA-gebundenen Spezies. Auch dieses Spektrum wird von einer A_{1870} -Bande dominiert, zeigt jedoch eine kleine zusätzliche Schulter bei 1851 cm^{-1} auf der Flanke von A_{1870} . Der Vergleich der Spektren von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ und $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/NOHA}$ lässt vermuten, dass nur eine kleine Fraktion der Proteine NOHA gebunden hat, repräsentiert durch A_{1851} . Im Gegensatz dazu scheint eine deutlich größere Fraktion an Proteinen das Substrat L-Arg gebunden zu haben. A_{1870} ist zwar immer noch existent, jedoch weitaus weniger dominant. Als Effekt der Bindung von L-Arg zeigen sich zwei zusätzliche Banden bei 1847 und 1829 cm^{-1} . Überraschenderweise fanden Rousseau et al. [36] in ihren Resonanz-Raman-Spektren keine Änderung der $\text{Fe}^{3+}\text{-N}$ -Schwingungsmode bei Zugabe von L-Arg und vermuteten deshalb das Ausbleiben der Bindung zwischen Protein und Substrat. Das Binden von H4B äußert sich in einer leicht verschobenen, dominanten Bande bei 1872 cm^{-1} , sowie einer weiteren Bande bei 1890 cm^{-1} .

Die meisten der spektralen Verschiebungen der A-Banden können auf den in Unterabschnitt 1.3.3.3 beschriebenen π -Rückbindungseffekt zurückgeführt werden [144]. Wie dort bereits erörtert, gelten für $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ die selben Prinzipien wie für $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$, erkennbar an der alternativen Beschreibung des $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ -Komplexes, $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}^+$, der isoelektronisch zum $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ -Komplex ist [117]. Häm-gebundenes NO absorbiert, wie in Abbildung 3.4 zu sehen, bei 1870 cm^{-1} . Die Verschiebung von A_{1829} und A_{1847} hin zu niedrigeren Frequenzen, als Folge der Bindung von L-Arg, lässt sich auf Interaktionen zwischen dem Liganden NO und der positiv geladenen sowie neutralen terminalen

Tabelle 3.2: Positionen und prozentuale Flächenanteile der IR Schwingungsbanden des häm-gebundenen und photolysierten NO Liganden in iNOS_{oxy} bei 4 K, basierend auf Abbildung 3.4. Die experimentellen Fehler betragen jeweils $\pm 0,5 \text{ cm}^{-1}$ und $\pm 3\%$.

	Häm-gebundenes NO		NO Photoprodukt	
	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
Ohne Substrat	1870	100	1814	23
			1818	77
L-Arg	1829	56	1814	13
	1847	16	1822	87
	1870	28		
NOHA	1851	15	1814	30
	1870	85	1818	70
H4B	1872	82		
	1890	18		

Aminogruppe der L-Arg Seitenkette zurückführen. Wie schon bei CO, ist auch bei NO der Effekt der Bindung von NOHA geringer als der Effekt von L-Arg; gebundenes NOHA äußert sich in verschobenen A-Bande bei 1851 cm^{-1} . Was jedoch überrascht, ist der Einfluss von H4B auf die Banden. Einerseits schiebt die dominante Bande zu leicht höheren Wellenzahlen, 1851 cm^{-1} , andererseits vermindert sich auch die Breite der Bande. Letzteres lässt entweder auf eine homogenere Struktur des katalytischen Zentrums, oder auf eine Einschränkung der Bewegungsfreiheit des NO durch die Bindung von H4B schließen [140, 145]. Rousseau et al. [36] berichten von einer bei H4B-Bindung erscheinenden Raman-Bande, die der Fe-N-O-Schwingungsmode, $\delta_{\text{Fe-N-O}}$, des Fe³⁺-NO-Komplexes zugewiesen werden konnte und einer recht homogenen Winkelverteilung des gebogenen NO entspricht. In Thiolat-ligierten Fe³⁺-NO-Komplexen findet sich typischerweise ein Fe-N-O-Winkel von 160° (Abb. 3.7 a) [146–152]. Da H4B nicht in nächster Nähe zu NO bindet, ist keine sterische Interaktion zwischen H4B und NO, die zur Änderung des Winkels führen könnte, zu erwarten. Allerdings hat die Bindung von H4B eine Krümmung der Hämebene zur Folge und könnte somit eine Reduktion der Beweglichkeit des NO-Moleküls um seinen Bindungswinkel herbeiführen [153, 154]. Die zusätzliche Bande bei 1890 cm^{-1} ist möglicherweise das Ergebnis einer Besetzung des katalytischen Zentrums durch ein Wassermolekül [148].

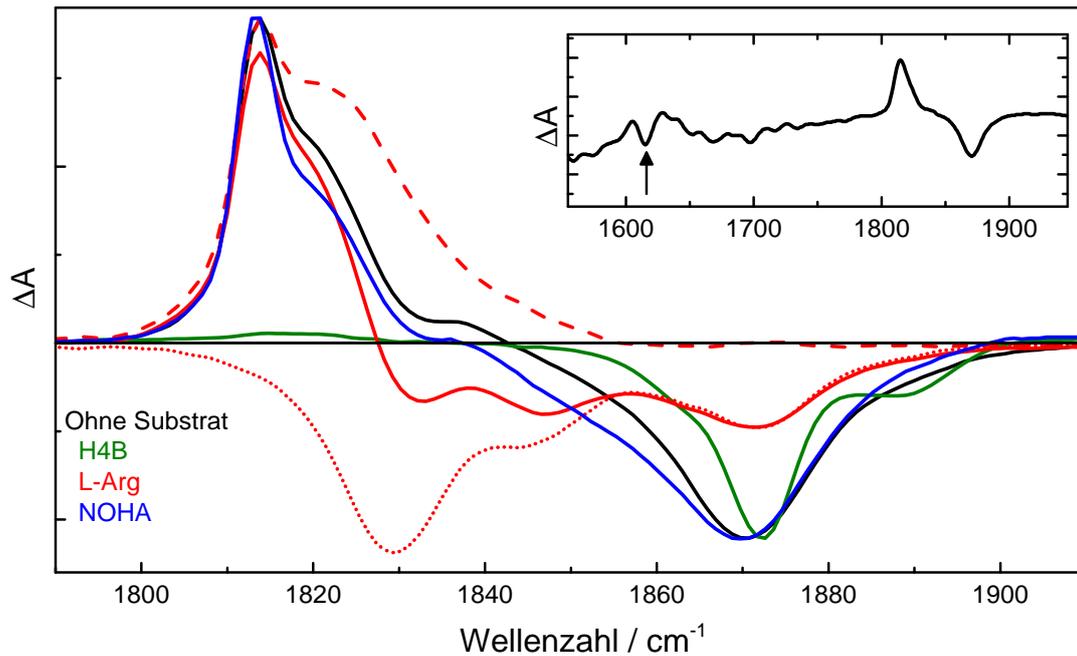


Abbildung 3.4: 4 K-Photolyse-Differenzspektren von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$. Die Banden des Häm-gebundenen NO (NO nach Laserbeleuchtung bei 300 mW) sind mit negativer (positiver) Amplitude aufgetragen. Die A-Banden des $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/NOHA}$ -Spektrums wurden unabhängig von den Photoproduktbanden, zum besseren Vergleich mit den anderen A-Banden, skaliert (Faktor 2,07). Die gepunktete Linie spiegelt das Spektrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$ nach Beleuchtung bei einer verminderten Laserleistung von 0,3 mW wider. Die gestrichelte Linie gibt das Photoproduktspektrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$ an. Es wurde als Differenz zwischen durchgezogenem und gepunktetem Spektrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$ berechnet. Der Einsatz zeigt das erweiterte Spektrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$.

3.2.1.2. Photoproduktbanden

Die ebenfalls in Abbildung 3.4 dargestellten Photoproduktbanden mit positiven Amplituden im Bereich $1810 - 1830 \text{ cm}^{-1}$, sind im Vergleich zu den A-Banden der Häm-gebundenen NO-Liganden nur um rund 50 cm^{-1} rotverschoben. Bei $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$ überlappen die Photoproduktbanden sogar mit den A-Banden. Spektrale Zerlegung der überlappenden Banden liefert eine schmale Bande bei 1814 cm^{-1} und eine breitere Bande bei 1822 cm^{-1} . $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ und $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/NOHA}$ weisen jeweils zwei Banden bei 1814 und 1818 cm^{-1} auf. Sehr auffällig ist die relative Größe der Photoproduktbanden im Vergleich zu den A-Banden. Die ähnlich starke Absorption lässt vermuten, dass es sich bei den Photoproduktbanden nicht um photolytierte NO-Liganden in transienten Andockstellen handelt, sondern um ebenfalls Häm-gebundene Liganden mit eingeschränkter Bewegungsfreiheit und folglich verschobenen Schwingungsmoden.

Im Gegensatz zu allen anderen Proben zeigt H4B gebundenes $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ nur eine sehr kleine, aber breite Bande um 1818 cm^{-1} . Eine mögliche Erklärung sind photoly-

sierte NO, die sich nicht in wohldefinierten Orientierungen befinden. Als Folge verbreitert sich die Verteilung der Schwingungsmoden des NO sehr stark und die resultierende Bande ist nur schwerlich von der Nulllinie des Spektrums zu unterscheiden. Ein ähnlicher Effekt konnte bei NO Banden der primären Andockstelle B von Myoglobin im Fe^{3+} -Zustand beobachtet werden [155].

3.2.2. Thermisch aktivierte NO-Rückbindungsprozesse

Um weitere Informationen über die Herkunft und Identität der sonderbaren NO-Photoproduktbanden zu erlangen, wurden TDS-Messungen nach Beleuchtung der NO-li-gierten Proben bei 4 K durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt die Absorptionsänderungen in den A-Banden und Photoproduktbanden als durchgezogene, beziehungsweise gepunktete Linien. Die durch das *slow-cool*-Protokoll erzeugten Konturdiagramme zeigen keine nennenswerte Unterschiede, auf die Darstellung wird deshalb verzichtet.

Im leeren $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -NO beginnt die Rückbindung der Liganden in A_{1870} , wie auch bei CO, schon bei den niedrigsten Temperaturen (Abb. 3.5 a). Die Ausläufer der Rückbin-dung dehnen sich bis zu einer Temperatur von ~ 90 K aus. Erstaunlicherweise befindet sich das Maximum des Abfalls der Photoproduktbanden zwischen 80 und 120 K. Sie können also nicht mit vom Fe^{3+} -NO-Komplex (A_{1870}) photolysierten NO-Liganden in Verbindung gebracht werden, da diese bereits bei 90 K rekombiniert sind. Scheinbar erzeugt die Beleuchtung durch die Laserstrahlung Photoproduktbanden einer weite-ren NO-Spezies, deren Schwingungsbanden nicht im beobachteten spektralen Bereich liegen. Die TDS-Diagramme von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -NO/NOHA (Abb. 3.5 d) sind im Grunde iden-tisch. Hier ist die Unvereinbarkeit der A-Banden und der Photoproduktbanden noch deutlicher; die NO-Rückbindung in A_{1870} ist unter 80 K komplett abgeschlossen, das Maximum des Abfalls der merkwürdigen Photoproduktbanden findet sich jedoch wieder erst im Bereich 80 – 120 K. In $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -NO/H4B (Abb. 3.5 b) beginnt die Rückbin-dung in die dominante A-Bande ebenfalls schon bei 4 K und findet ihr Maximum bei ~ 65 K; die kleine Seitenbande bei 1890 cm^{-1} zeigt ein ähnliches Temperaturverhal-ten wie die Hauptbande. Die Rückbindung von A_{1829} und A_{1847} von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -NO/Arg ist bereits unter 30 K vollständig abgeschlossen, in diesem Fall jedoch in Übereinstim-mung mit dem Abfall der Photoproduktbanden (Abb. 3.5 c). Die Rückbindung in A_{1870} zeigt die gleiche Charakteristik wie in leerem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -NO, die frühere Zuordnung dieser Bande zu L-Arg freiem Protein erweist sich also als korrekt. Das scheinbare Maximum bei 1850 cm^{-1} und ~ 15 K ist nur der Überlagerung der unabhängigen A-Banden und Photoproduktbanden geschuldet (Abb. 3.4).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, wie bei CO, auch die Rückbindung von NO an Hämeisen im Fe^{3+} -Zustand in $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ ein einstufiger Prozess ist. Die korre-spondierenden Photoproduktbanden konnten nicht gefunden werden. Möglicherwei-se interagiert das photolysierte NO nur sehr schwach in kaum definierter Orientierung mit dem Protein, ohne weitere Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken-Interaktion mit Substrat, oder Kofaktor. Als Folge ist die Verteilung der NO-Schwingungsmoden

zu breit, als dass sie vom Hintergrundsignal unterscheiden werden könnte. Sollte ihre Existenz nur durch die rätselhaften Photoproduktbanden der weiterhin unbekanntenen NO-gebundenen Proteinspezies verschleiert sein, so sollten sie doch zumindest bei $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/H4B}$ sichtbar sein (Abb. 3.4).

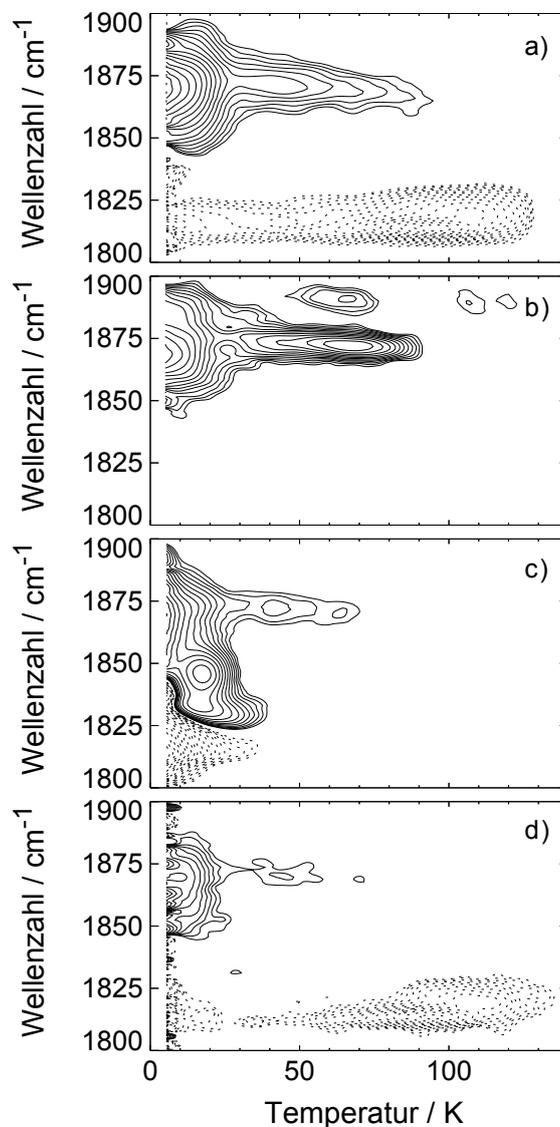


Abbildung 3.5: TDS-Konturdiagramme von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ nach einer Beleuchtungsdauer von 30 min bei 4 K. $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ **a)** ohne Substrat; **b)** mit H4B; **c)** mit L-Arg; **d)** mit NOHA. Die Konturlinien sind in logarithmischen Abständen aufgetragen, durchgezogene (gepunktete) Linien bezeichnen zunehmende (abnehmende) Absorptionsänderung.

3.2.2.1. Identifikation des iNOS_{oxy}-NO-Photoprodukts

Die TDS-Messungen (Abb. 3.5) zeigen sehr klar, dass die starken Banden bei einer Wellenzahl von $\sim 1820 \text{ cm}^{-1}$ nicht durch Photolyse der an Fe^{3+} -gebundenen NO-Liganden bei $\sim 1870 \text{ cm}^{-1}$ entstehen. Auf der Suche nach dem unphotolysierten Gegenstück dieser sonderbaren Photoproduktbanden, wurde der spektrale Bereich auf $1100 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ erweitert. Bei der Überprüfung konnte eine Bande bei 1616 cm^{-1} gefunden werden (Abb. 3.4, Einsatz), die vorläufig mit sechsfach-koordiniertem (6C) Fe^{2+} -gebundenem NO assoziiert wird. Diese Bandenzuteilung findet durch die Schwingungsbande des 6C Fe^{2+} -P450_{cam}-NO bei einer ähnlichen Frequenz, 1591 cm^{-1} , Unterstützung [156]. Außerdem berechneten Praneeth et al. [119] NO-Schwingungsfrequenzen für Thiophenolat- und Akythiolat-Hämkomplexe von je $\tilde{\nu}_{\text{NO}} = 1617 \text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu}_{\text{NO}} < 1600 \text{ cm}^{-1}$. Als Modell für ihre Dichtefunktionalberechnungen nutzten sie einen Thiolat-koordinierten Fe^{2+} -Porphyrin-Komplex.

Der Mischzustand aus Fe^{3+} -NO- und Fe^{2+} -NO-Spezies der Proben ist nicht weiter überraschend. Fe^{3+} -iNOS_{oxy}-NO ist instabil und konvertiert spontan in eine 6C Fe^{2+} -iNOS_{oxy}-NO-Spezies. Das Beladen des Probenhalters und die Kühlung der FTIR-Probe auf 4 K benötigt üblicherweise $\sim 2 \text{ h}$, 2 h in denen die Konversion unbeobachtet ablaufen kann. In der Literatur wird von einer weiteren möglichen Konversion in Abhängigkeit des Oligomerisierungszustandes, hin zu einer fünffach-koordinierten Fe^{2+} -Spezies durch Dissoziation des Häms vom Thiolat-Liganden, berichtet [53, 59, 153, 157]. Diese Konversion kann allerdings ausgeschlossen werden, da in keinem der Spektren die charakteristische Bande dieser Spezies um $\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ gefunden werden konnte [141].

Photodissoziation des NO vom 6C Hämeisen resultiert allerdings nicht in Photoproduktbanden mit ähnlicher Intensität wie die entsprechende A_{1616} -Bande. Die richtige Bande ist also noch immer nicht gefunden. In Anbetracht des sehr starken Transseffekts des NO in einem 6C Fe^{2+} -Komplex [152], ist es denkbar, dass das Photoprodukt durch Dissoziation der Fe-S-Bindung, statt der Fe-NO-Bindung entsteht. Tatsächlich entdeckten Ibrahim et al. [158] während ihrer Raman-Messungen, dass Laserlicht den gegenüber von NO liegenden axialen Thiolat-Liganden eines 6C Fe^{2+} -Porphyrin-Modellkomplexes photodissoziieren kann [159]. Dort konnte der Prozess durch eine auf 77 K herabgesenkte Temperatur und niedrigere Laserleistung unterdrückt werden. Dementsprechend wurden am Beispiel von iNOS_{oxy}-NO/Arg Messungen mit einer von 300 mW auf 0,3 mW verminderten Laserleistung durchgeführt (Abb. 3.4, gestrichelt). Die Leistung war immer noch ausreichend, um NO vom 6C Fe^{3+} -Komplex zu photolysieren, allerdings blieb die Bildung der Photoproduktbanden bei $\sim 1820 \text{ cm}^{-1}$ aus. Demnach kann vermutet werden, dass es sich auch bei den hier gemessenen Photoproduktbanden um die Folge der laserinduzierten Auflösung der Bindung zwischen Hämeisen und proximalem C194-Thiolat handelt; zurück bleibt eine fünffach-koordinierte (5C) iNOS_{oxy}-NO-Spezies. Dass NO immer noch am Häm gebunden ist, erklärt auch die zu anderen A-Banden vergleichbar starke Intensität die-

ser Banden um 1820 cm^{-1} [111, 160]. Die Position der Bande verrät, dass es sich um einen Fe^{3+} -koordinierten NO-Liganden handeln muss, sodass das C194-Schwefelatom nach der Photodissoziation negativ geladen sein muss. In der Literatur finden sich Berichte über ähnliche NO-Schwingungsfrequenzen eines isolierten, 5C Häm-Nitrosyl-Komplexes ($\tilde{\nu}_{\text{NO}} = 1842\text{ cm}^{-1}$) [161] und eines NO-ligierten Porphyrins mit an der vierten Mesoposition substituiertem Phenyl ($\tilde{\nu}_{\text{NO}} = 1825\text{ cm}^{-1}$) oder Pentafluorophenyl ($\tilde{\nu}_{\text{NO}} = 1859\text{ cm}^{-1}$) [162]. Ist die Laserleistung ausreichend hoch (300 mW), so ist es sogar möglich, NO vom 5C Fe^{3+} -NO-Komplex zu photodissoziieren. Es bleibt ein vierfach-koordiniertes „nacktes“ Häm als „zweites Photoprodukt“ (Abb. 3.6 a).

Bindung von L-Arg im katalytischen Zentrum des Proteins verringert das Ausmaß der laserinduzierten Konversion zum 5C Fe^{2+} -NO-Komplex (Abb. 3.6 a, c) und fördert die Wiederherstellung des 6C Fe^{3+} -NO-Komplexes nach Abschaltung des Lasers (Abb. 3.6 b, d). Dieser Effekt könnte eine Folge des Wettbewerbs zwischen dem Liganden NO und dem gegenüberliegenden Thiolat um den σ -Ladungsübertrag zum Hämeisen sein; je höher der Übertrag, desto stärker ist die Bindung zwischen Ladungs-Donor und Hämeisen, und desto schwächer ist die Bindung zwischen gegenüberliegenden Liganden und Hämeisen. Die σ -Donorstärke des Thiolats wird durch die Wasserstoffbrückeninteraktionen des Schwefelatoms moduliert [152].

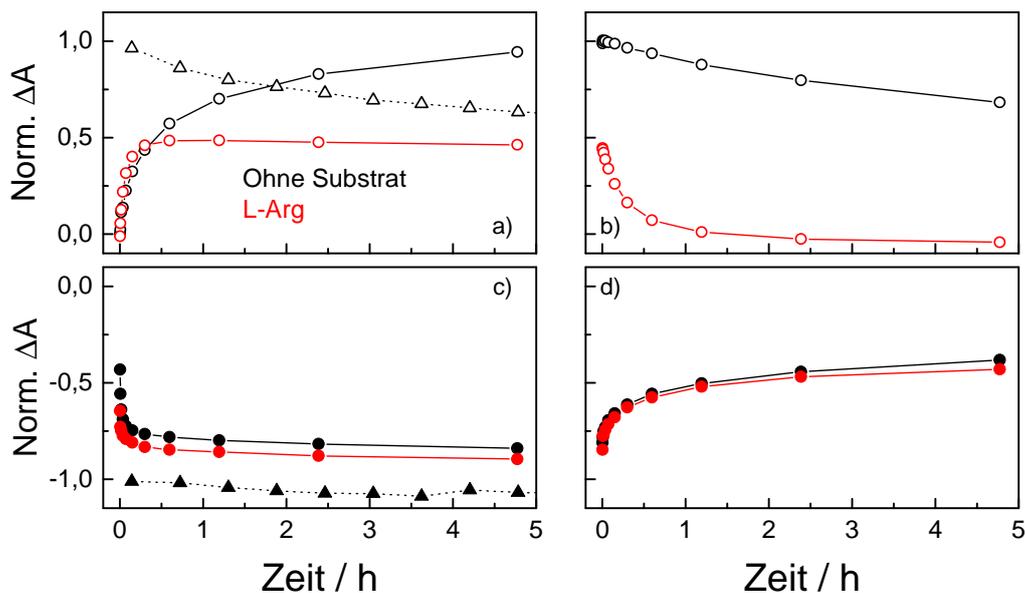


Abbildung 3.6: Zeitliche Entwicklung der integrierten Absorption der 5C Fe^{3+} - (offene Symbole) und 6C Fe^{3+} - $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ -Banden (gefüllte Symbole) (a, c) während konstanter Beleuchtung bei 4 K (Kreise: 10 mW, 532 nm; Dreiecke: 300 mW, 532 nm) und (b, d) nachdem der Laser ausgeschaltet wurde. Schwarz: $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$; rot: $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$.

Dey et al. [163] konnten durch Schwefel-K-Kanten-Röntgen-Absorptionsspektroskopie und Berechnungen nach der Dichtefunktionaltheorie zeigen, dass jede Wasserstoffbrücke die σ -Donor-Fähigkeit des Thiolat-Schwefelatoms reduziert. Die Elektronen-Donor-Fähigkeit des NO, und der damit verbundene repulsive Trans-Effekt, kann also durch Interaktionen, die Elektronendichte von NO abziehen, vermindert werden [164, 165]. Im Falle von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$ ist die Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen NO und L-Arg eine solche; die Eisen-Schwefel-Bindung des axialen Liganden wird dadurch stabilisiert. In $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/H4B}$ kann die nahezu vollständige Abwesenheit der Photoproduktbande der 6C Fe^{2+} -Spezies dadurch erklärt werden, dass diese Spezies nach ihrer Bildung spontan zur 6C Fe^{3+} -Spezies oxidiert wird (Abb. 3.4) [131].

3.2.2.2. 5C Fe^{3+} - $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$

In Hinsicht auf den Wettbewerb zwischen dem NO-Liganden und dem Thiolat-Liganden um den σ -Ladungsübertrag auf das Hämeisen ist eigentlich zu erwarten, dass die NO-Schwingungsfrequenz der 5C-Spezies im Vergleich zur 6C-Spezies aufgrund des fehlenden repulsiven Trans-Effekts blauverschoben ist. Experimentell zeigt sich allerdings das gegenteilige Verhalten (Abb. 3.4). Allerdings handelt es sich hier nur um einen scheinbaren Widerspruch. Die 5C- Fe^{3+} -Spezies entstammt der 6C- Fe^{2+} -Spezies, welche NO typischerweise in einem Winkel von $\sim 140^\circ$ bindet (Abb. 3.7 b). Zwar beträgt der Winkel der korrespondierenden 6C- Fe^{3+} -Spezies normalerweise $\sim 160^\circ$, jedoch sind die Dynamiken der Proteinmatrix bei kryogenen Temperaturen vollständig ausgefroren [166, 167]. Folglich wird das NO auch in der 5C- Fe^{3+} -Spezies in der stärker gebogenen (kleinerer Winkel) 6C- Fe^{3+} -Orientierung gehalten (Abb. 3.7 c). Linder et al. [168] berichten, basierend auf Dichtefunktionaltheorie-Berechnungen, von einem Schieben der NO-Schwingungsbande eines 5C Modell-Porphyrins von 1897 auf 1857 cm^{-1} bei Reduktion des Winkels von 160° auf 150° . Es kann daher vermutet werden, dass die niedrigere Schwingungsfrequenz der 5C-Spezies, $\tilde{\nu}_{\text{NO}}$, durch Bindung von NO in einem kleinen Winkel bedingt ist. Der Ausnahmefall der sehr ähnlichen Lage der Banden der 5C- Fe^{3+} - und 6C- Fe^{3+} -Spezies von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO/Arg}$ (Abb. 3.4) impliziert, dass das gebundene Substrat den Winkel, in dem NO bindet, kontrolliert. Scheinbar überwiegt die sterische Beschränkung in diesem Fall der Abwinkelung der Bindung durch den Trans-Effekt.

Abschließend sei angemerkt, dass die spontane Konversion der 6C- Fe^{3+} -Spezies bei physiologischen Temperaturen, im Gegensatz zur photoinduzierten 6C- $\text{Fe}^{3+} \rightarrow 5\text{C-Fe}^{3+}$ -Konversion während der FTIR-Experimente bei kryogenen Temperaturen, zwei NO-Moleküle involviert und in einer 5C- Fe^{2+} -Spezies resultiert [53, 59, 169]. Die 6C- Fe^{3+} -Spezies regiert nach dem Binden des ersten NO-Moleküls mit einem zweiten NO-Molekül zur 6C- Fe^{2+} Spezies. Diese Spezies konvertiert sofort in die 5C-Form und ein Nitrosoniumion (NO^+). Möglicherweise diffundiert das Ion zur Zinkbindungsstelle in der Dimerschnittstelle und nitrosyliert eines der vier Cysteine.

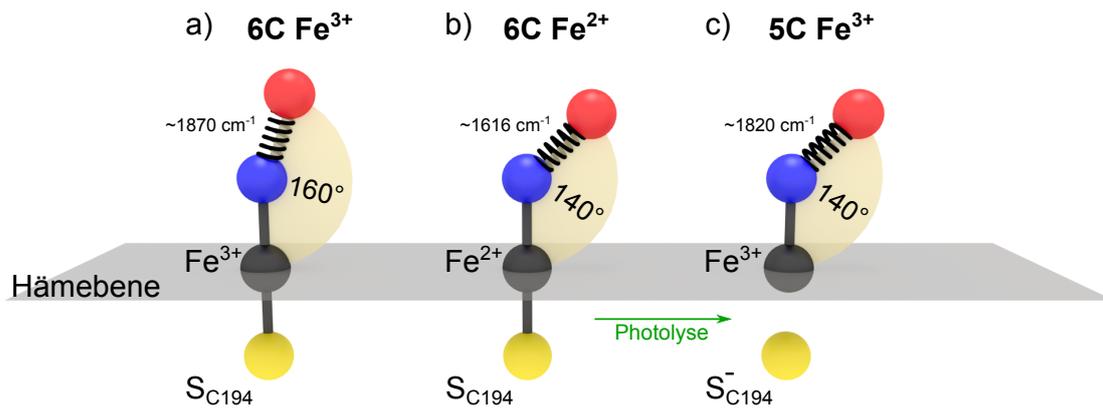


Abbildung 3.7: Fe-N-O-Bindungswinkel der verschiedenen Spezies. **a)** Die 6C- Fe^{3+} -Spezies mit einem Winkel von 160° . Es resultieren Schwingungsbanden der N-O-Bindung bei $\sim 1870\text{ cm}^{-1}$. **b)** Die 6C- Fe^{2+} -Spezies mit einem Winkel von 140° . Die Schwingungsbande findet sich bei 1616 cm^{-1} . **c)** Die 5C- Fe^{3+} -Spezies, entstanden durch photo-induzierte Auflösung der Fe-S-Bindung des proximalen Thiolat-Liganden. Aufgrund der kryogenen Temperaturen bleibt der Winkel von 140° erhalten. Die Schwingungsbanden finden sich bei $\sim 1820\text{ cm}^{-1}$.

3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie bei den Rückbindungsversuchen mit CO scheint auch der von der 6C Fe^{3+} -Spezies photolysierte Ligand NO nur eine transiente Andockstelle innerhalb des Proteins zu besetzen. Die entsprechenden Photoproduktbanden konnten nicht aufgelöst werden. Ähnliche Beobachtungen konnten schon bei Nitrophorin 4 [140] und Myoglobin [155] gemacht werden. NO scheint demnach, im Gegensatz zu CO, nicht in wohldefinierten Orientierungen in der Andockstelle gebunden zu sein. Diese Eigenschaft könnte die Freisetzung des unter physiologischen Bedingungen synthetisierten NO erleichtern.

Durch TDS- und isotherme Kinetik-Messungen zeigte sich, dass die $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-NO}$ -Proben aus einem Mix aus der 6C Fe^{3+} -Spezies und der 6C Fe^{2+} -Spezies bestehen. Die 6C Fe^{2+} -Spezies zeigt Photoproduktbanden, die nicht von photolysierten Liganden stammen. Stattdessen konnten diese Banden mit einer 5C Fe^{3+} -Spezies identifiziert werden, entstanden durch photo-induzierte Auftrennung der Bindung zwischen Hämeisen und proximalen Thiolat-Liganden. Weitere Messungen in dieser Richtung können höchstwahrscheinlich zum besseren Verständnis der funktionalen Prozesse, an denen NO beteiligt ist, beitragen.

4. UV/Vis-Spektroskopie an $i\text{NOS}_{\text{oxy}}\text{-CO}$

Dieses Kapitel behandelt die Untersuchung der beiden CO-gebundenen $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -Spezies P450 und P420 durch Absorptionsspektroskopie im UV/Vis-Bereich (Abschnitte 2.3 und 2.4). Als Werkzeug dienen die Spektren der Deoxy- und CO-Spezies von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$.

Das Spektrum einer Deoxy-Probe ist in Abbildung 4.1 a dargestellt. Neben einer breiten Soret-Bande bei 413 nm und einer Q-Bande bei 556 nm findet sich eine schwache Schulter bei 445 nm, hervorgerufen durch eine kleine Population der CO-gebundenen P450-Spezies. Durch Zugabe von CO zur Deoxy-Probe entsteht zunächst der CO-gebundene P450-Zustand, welcher eine Soret-Bande bei 445 nm und eine breite Q-Bande bei 550 nm aufweist (Abb. 4.1 b). Die Bande bei 421 nm repräsentiert eine kleine Population des P420-Zustandes, entstanden durch Konversion von Protein aus dem P450-Zustand. Dieser bisher weitgehend unverstandene Prozess beginnt mit der Herstellung der CO-Probe. Das Spektrum einer vollständig in den P420-Zustand konvertierten Probe ist in Abbildung 4.1 c dargestellt. Sie wurde durch Zugabe von 5 M Urea hergestellt (Abschnitt 4.2). Neben der Soret-Bande bei 421 nm finden sich zwei schmale Q-Banden bei 538 nm und 570 nm.

In den folgenden beiden Abschnitten werden die Spezies und ihre Konversion basierend auf der Absorptionsspektroskopie untersucht. Zuerst folgt die Untersuchung der

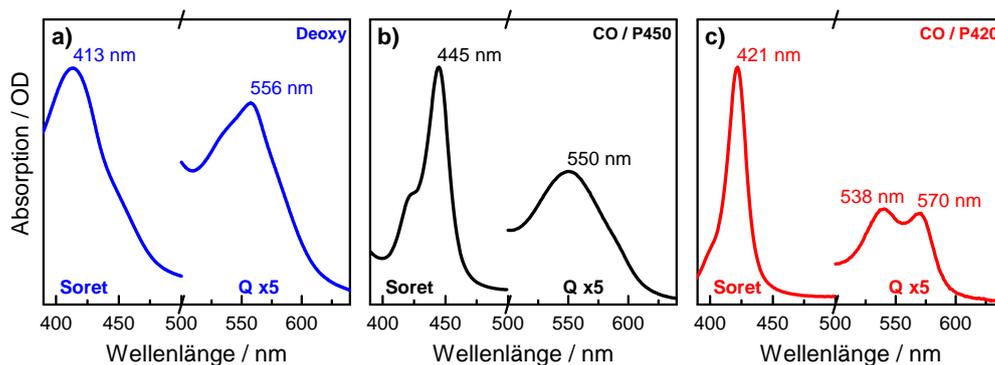


Abbildung 4.1: Absorptionsspektren der Deoxy-, $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ - und $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies. Die Q-Banden sind jeweils um den Faktor 5 vergrößert dargestellt. **a)** Deoxy-Spezies. **b)** CO-ligierte $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Spezies. **c)** CO-ligierte $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies.

CO-Ligandenbindung mit der Blitzlichtphotolysetechnik, dann die Untersuchung der Konversion zwischen den beiden Spezies durch Aufnahme von Konversionskinetiken.

4.1. Blitzlichtphotolysemessungen an iNOS_{oxy}-CO

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Blitzlichtphotolysemessungen an CO-ligiertem iNOS_{oxy} behandelt. Abbildung 4.2 a zeigt die bei 444 nm aufgenommene CO-Rückbindungskinetik einer frisch hergestellten iNOS_{oxy}-CO-Probe bei einer CO-Konzentration von 1 mM und einem pH-Wert der Probelösung von 7,1. Da die Probe zu diesem Zeitpunkt zum überwiegenden Teil (> 90%) aus der iNOS_{P450}-Spezies bestand, beschreibt die Kinetik den CO-Rückbindungsprozess eben dieser Proteinspezies.

Anhand der in Abbildung 4.2 b gezeigten Ratenkoeffizientenverteilung der Kinetik (durch MEM) lässt sich erkennen, dass die Rückbindung durch einen einzelnen Prozess beschrieben werden kann. Der Fit einer Gauß-Funktion liefert einen Ratenkoeffizienten der CO-Bindung der iNOS_{P450}-Spezies von $k_{+CO}^{P450} = 3296 \pm 23 \text{ s}^{-1}$ (Zentrum der Gauß-Funktion) und eine Breite der Verteilungsfunktion von $w = 0,48 \pm 0,01$. Bei k_{+CO}^{P450} handelt es sich um einen effektiven Ratenkoeffizienten:

$$k_{+CO}^{P450} = \hat{k}_{+CO}^{P450} \cdot [\text{CO}]. \quad (4.1)$$

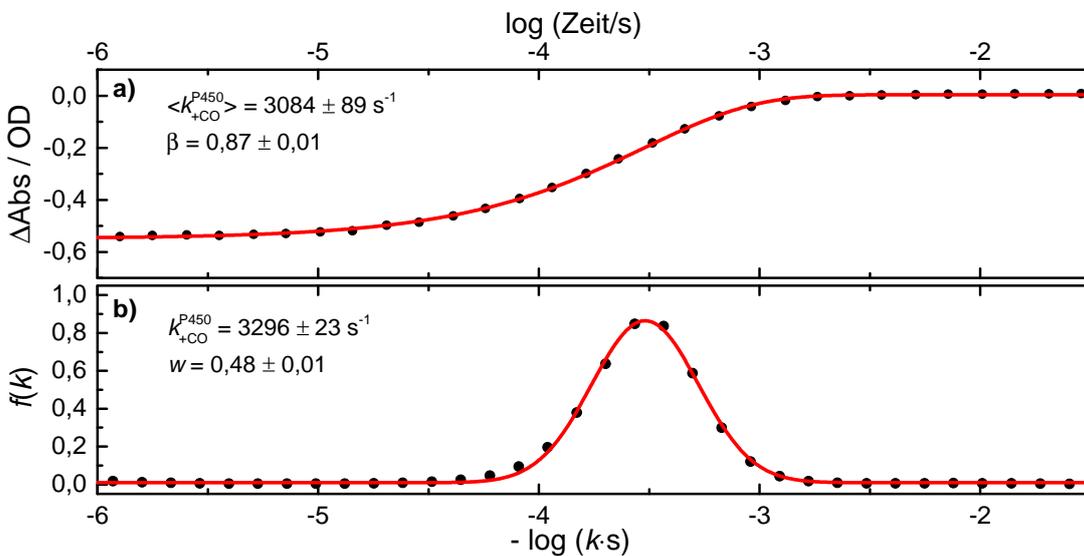


Abbildung 4.2: CO-Rückbindungskinetik der iNOS_{P450}-Spezies bei einer CO-Konzentration von 1 mM. Die Kinetik wurde bei einer Wellenlänge von 444 nm bestimmt. **a)** Datenpunkte: CO-Rückbindungskinetik. Linie: Fit einer gestreckten Exponentialfunktion. **b)** Datenpunkte: Aus der MEM-Analyse stammende Rückbindungskoeffizientenverteilung $f(k)$. Linie: Fit einer Gauß-Funktion.

Um die Kinetik der CO-Rückbindung der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies bestimmen zu können, muss die spontane Konversion des Proteins einer Probe vom $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Zustand in den $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Zustand abgewartet werden. Die Herstellung einer $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Probe gestaltete sich jedoch schwierig. Entweder konvertierte das Protein nur zu einem geringen Teil in den $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Zustand, oder die Konversion ging mit einer Denaturierung des Proteins einher, was spektroskopische Messungen aufgrund von Streueffekten unmöglich machte. Die vollständige Konversion des Proteins in den $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Zustand kann zwar ohne Proteindenaturierung durch Zugabe von Urea ausgelöst werden, allerdings geht dies mit gleichzeitiger Monomerisierung der $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -Dimerstruktur einher, die an dieser Stelle nicht behandelt werden soll. Mehr zu diesem Thema findet sich im Unterabschnitt 4.2.3.

Um dennoch eine Aussage über die CO-Rückbindung der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies des intakten Proteins machen zu können, wurde eine Probe mit einer relativ starken $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population vermessen. Abbildung 4.3 zeigt das CO-Spektrum der Probe zum Zeitpunkt der Messung, sowie das Deoxy-Spektrum einer Probe identischer Proteinkonzentration. Zwar sind die Soret-Banden der beiden CO-Spezies gut getrennt, allerdings überlappt die Bande der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies stark mit der Bande der Deoxy-Spezies. Eine bei 420 nm gemessene Kinetik beinhaltet demnach neben der CO-Rückbindung der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies auch das Signal der CO-Rückbindung der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Spezies. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde der gesamte Soret-Bandenbereich zwischen 400 nm und 450 nm vermessen (grau hinterlegter Bereich in Abb. 4.3).

Abbildung 4.4 a zeigt einige ausgewählte Kinetiken der Messreihe. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kinetik von dem Signal der CO-Rückbindung der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Spezies dominiert ist (Vergleich Abb. 4.2 a). Da es sich bei dem Messsignal um die Differenzabsorption zwischen Deoxy- und CO-Spektrum handelt (Abb. 4.3), kommt es bei abnehmender Wellenlänge zu einem Vorzeichenwechsel der Kinetik.

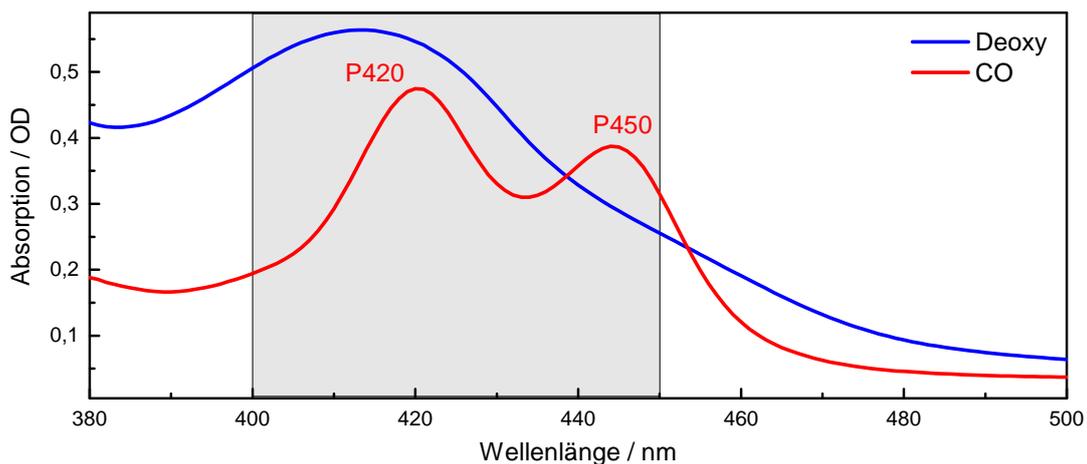


Abbildung 4.3: Deoxy-Spektrum und CO-Spektrum einer $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -Probe mit starker Population der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies.

Bei genauerem Hinsehen fällt ein weiterer, langsamerer Rückbindungsprozess ($t \approx 1$ ms) mit einer deutlich geringen Amplitude auf. Den größten Effekt auf die Kinetik hat der Prozess bei einer Wellenlänge von 420 nm. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um die CO-Rückbindung der iNOS_{P420}-Spezies handelt. Der auffällige Vorzeichenwechsel des Differenzabsorptionssignals innerhalb der Kinetik (erst positiv, dann negativ) ist eine Folge der komplexen Überlagerung der Spektren aller am Rückbindungsprozess beteiligten Spezies. Ein globaler Fit der Summe von zwei gestreckten Exponentialfunktionen an alle 25 gemessenen Kinetiken (Linien in Abb. 4.4 a) liefert mittlere Ratenkoeffizienten der CO-Rückbindungsprozesse der iNOS_{P450}-Spezies von $\langle k_{+CO}^{P450} \rangle = 2869 \pm 19 \text{ s}^{-1}$ und der iNOS_{P420}-Spezies von $\langle k_{+CO}^{P420} \rangle = 217 \pm 40 \text{ s}^{-1}$.

Bei der Betrachtung der Rückbindungsprozesse über den gesamten Wellenlängenbereich der Soret-Banden eignet sich ein Konturdiagramm der ersten zeitlichen Ableitung der Kinetiken. Es zeigt die Änderungen der Populationen in Abhängigkeit der Wellenlänge und der Zeit (Abb. 4.4 b). Bei $t \approx 0,3$ ms ist der Austausch zwischen der Deoxy-Bande (blaues Signal) und der schmaleren iNOS_{P450}-Bande (rotes Signal) zu beobachten, also die CO-Rückbindung der iNOS_{P450}-Spezies. Etwas später, bei $t \approx 3$ ms zeigt sich dann der Rückbindungsprozess der iNOS_{P420}-Spezies. Das Signal der wachsenden iNOS_{P420}-Population ist bei 420 nm (rot) konzentriert. Das entsprechende Signal der schwindenden Deoxy-Population (blau) ist aufgrund der Breite der Deoxy-Bande (Abb. 4.3) sowohl bei höheren, als auch bei tieferen Wellenlängen als 420 nm zu erkennen.

Die iNOS_{P420}-Spezies weist also ein nachweisbares CO-Rückbindungssignal auf, allerdings ist die Amplitude des Signals relativ schwach. Vergleicht man die aus den Fit stammende Amplitude des Rückbindungsprozesses der iNOS_{P450}-Spezies bei 444 nm mit der Amplitude des Rückbindungsprozesses der iNOS_{P420}-Spezies bei 420 nm, so ergibt sich nach Normierung auf die Höhe der beiden Soret-Banden eine um den Faktor 10 geringere Amplitude der iNOS_{P420}-Spezies. Da bei allen weiteren Messungen die Population der iNOS_{P450}-Spezies die der iNOS_{P420}-Spezies deutlich überwog, war das Signal der CO-Rückbindung der iNOS_{P420}-Spezies in allen Kinetiken verschwindend klein und konnte nicht quantitativ ausgewertet werden. Im Folgenden wird daher nur die CO-Rückbindung der iNOS_{P450}-Spezies behandelt. Dafür genügt die Betrachtung der Kinetik bei 445 nm; sie beinhaltet alle Informationen über die CO-Rückbindung der iNOS_{P450}-Spezies.

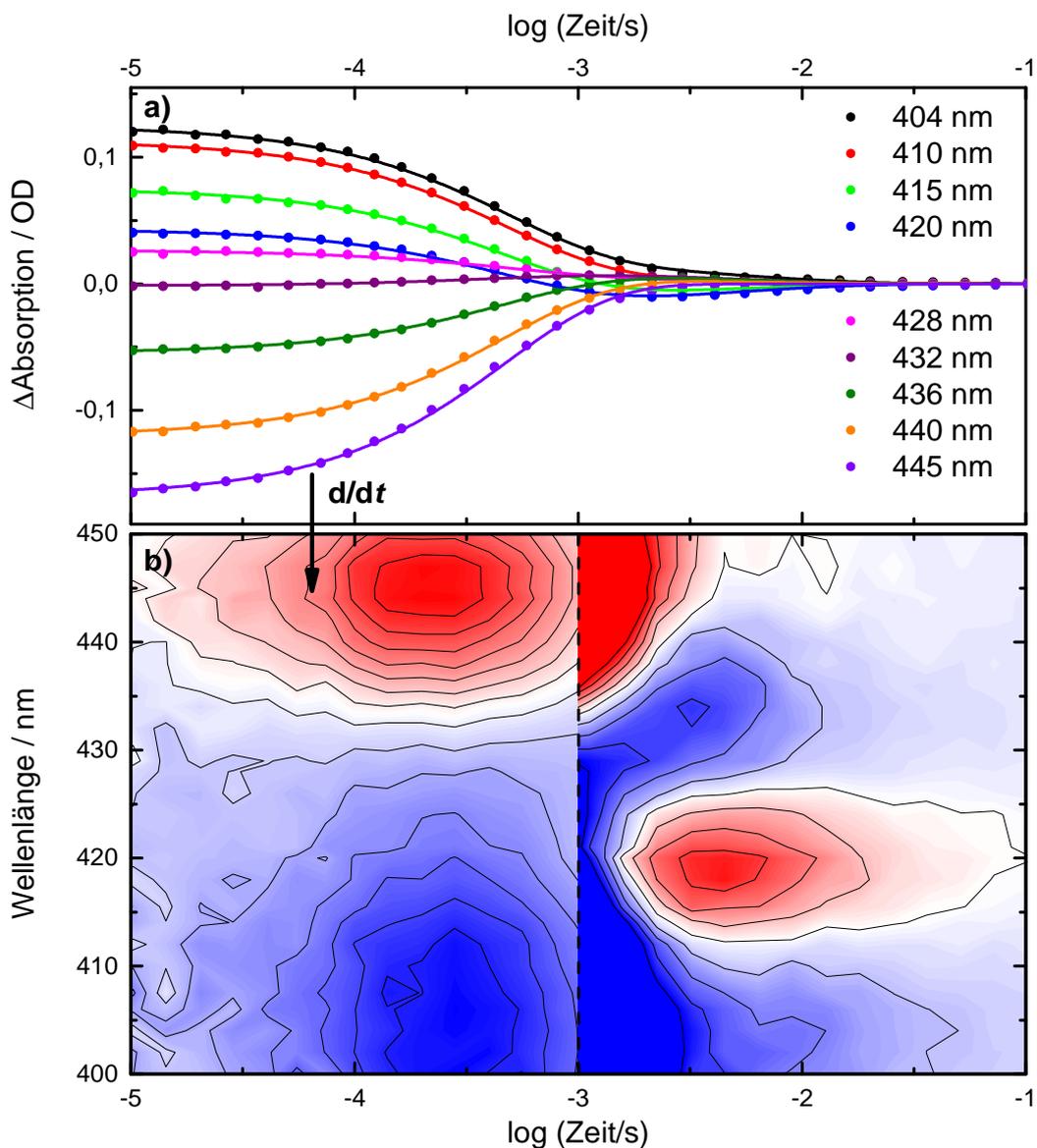


Abbildung 4.4: Wellenlängenabhängigkeit der CO-Rückbindung von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$. Die Kinetiken wurden im Abstand von $\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$ aufgenommen. **a)** CO-Rückbindungskinetiken. Datenpunkte: CO-Rückbindungskinetiken. Linien: Fits von zwei gestreckten Exponentialfunktionen. **b)** Konturdiagramm der zeitlichen Ableitung der CO-Rückbindungskinetiken. Rot: positive Populationsänderung. Blau: negative Populationsänderung. Da der langsamere CO-Rückbindungsprozess der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies eine deutlich kleinere Amplitude aufweist, wurde die Farbskala für eine deutlichere Darstellung ab $t = 1 \text{ ms}$ um den Faktor 10 eingengt.

4.1.1. CO-Rückbindungskinetiken der P450-Spezies mit Substrat, Intermediat und Kofaktor

Abbildung 4.5 zeigt die CO-Rückbindungskinetik (a) und die entsprechende Ratenkoeffizientenverteilung (b) der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Spezies bei einer CO-Konzentration der Probelösung von 0,05 mM. Aus dem Fit der Gauß-Funktion ergibt sich ein Ratenkoeffizient der CO-Rückbindung von $k_{+\text{CO}} = 154,5 \pm 1,7 \text{ s}^{-1}$ und eine Breite der Verteilung von $w = 0,43 \pm 0,01$. Die CO-Rückbindung ist somit im Vergleich zu $k_{+\text{CO}} = 3296 \pm 23 \text{ s}^{-1}$ bei 1 mM CO (Abb. 4.2) um einen Faktor von 21,3 langsamer. Ursachen für die leichte Abweichung vom erwarteten Faktor von 20 könnten unter anderem schwankende Temperaturen oder unvollständige Gassättigung der Probelösung sein.

Um den Einfluss der Substratbindung auf die CO-Rückbindung zu untersuchen, wurde der Probe anschließend Substrat in sättigender Konzentration hinzugegeben ($[\text{R}] = 62 \text{ mM} \gg K_{\text{D}} = 9,19 \mu\text{M}$ [170]). Die entsprechende Kinetik (Abb. 4.5) weist eine deutliche Verlangsamung der CO-Rückbindung auf. Anhand der Ratenkoeffizientenverteilung lässt sich außerdem erkennen, dass es sich in diesem Fall um CO-Rückbindung in zwei verschiedene Proteinspezies handeln muss, da die Rückbindung in zwei Prozesse aufgespalten ist. Die beiden Prozesse unterscheiden sich durch ihre CO-Rückbindungsrate sowie durch die Breite der Ratenkoeffizientenverteilungsfunktion. Auf die mit $k_{+\text{CO},1}^{\text{R}} = 34,4 \pm 2,8 \text{ s}^{-1}$ schneller zurückbindende Spezies mit einer Breite der Verteilungsfunktion von $w_1^{\text{R}} = 1,0 \pm 0,1$ entfallen rund 43% der Gesamtpopulation. Die restlichen 57% entfallen auf die mit $k_{+\text{CO},2}^{\text{R}} = 4,22 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ langsamer zurückbindende Spezies mit einer deutlich geringeren Breite der Verteilungsfunktion von $w_2^{\text{R}} = 0,40 \pm 0,01$.

Die unterschiedlichen Breiten der Verteilungsfunktionen spiegeln die Homogenität der Struktur der aktiven Zentren der beiden Proteinspezies wider. Die geringere Breite der Verteilungsfunktion des langsameren Prozesses spricht für eine homogenere Struktur der Spezies als die Struktur mit dem schnelleren Rückbindungsprozess. Interessanterweise konnte nach der Substratzugabe über einen Zeitraum von $\sim 2 \text{ h}$ ein vollständiger Austauschprozess zwischen den beiden Spezies – zugunsten der Spezies mit der homogeneren Struktur – beobachtet werden (Abb. 4.5). Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei Zugabe von NOHA anstelle von Substrat beobachtet werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Moleküle und Besetzung der selben Bindungsstelle innerhalb des Moleküls [30] überrascht dies wenig. Um die beiden Proteinspezies zu unterscheiden, wird an dieser Stelle die Nomenklatur P450^{I} und P450^{S} eingeführt. P450^{I} bezeichnet den instabilen, schneller zurückbindenden Zustand, P450^{S} den stabilen, langsamer zurückbindenden Zustand.

Auch bei gebundenem Kofaktor H4B ($[\text{H4B}] = 2,77 \text{ mM} \gg K_{\text{D}} = 0,25 \pm 0,04 \mu\text{M}$ [47]) zeigt sich die gleiche Charakteristik. Wieder ist die CO-Rückbindung verlangsamt – wenn auch deutlich geringer als bei Substratbindung – und besteht aus einer Überlagerung von zwei Prozessen (Abb. 4.6). Die mit $k_{+\text{CO},1}^{\text{H4B}} = 132,6 \pm 9,8 \text{ s}^{-1}$ schneller

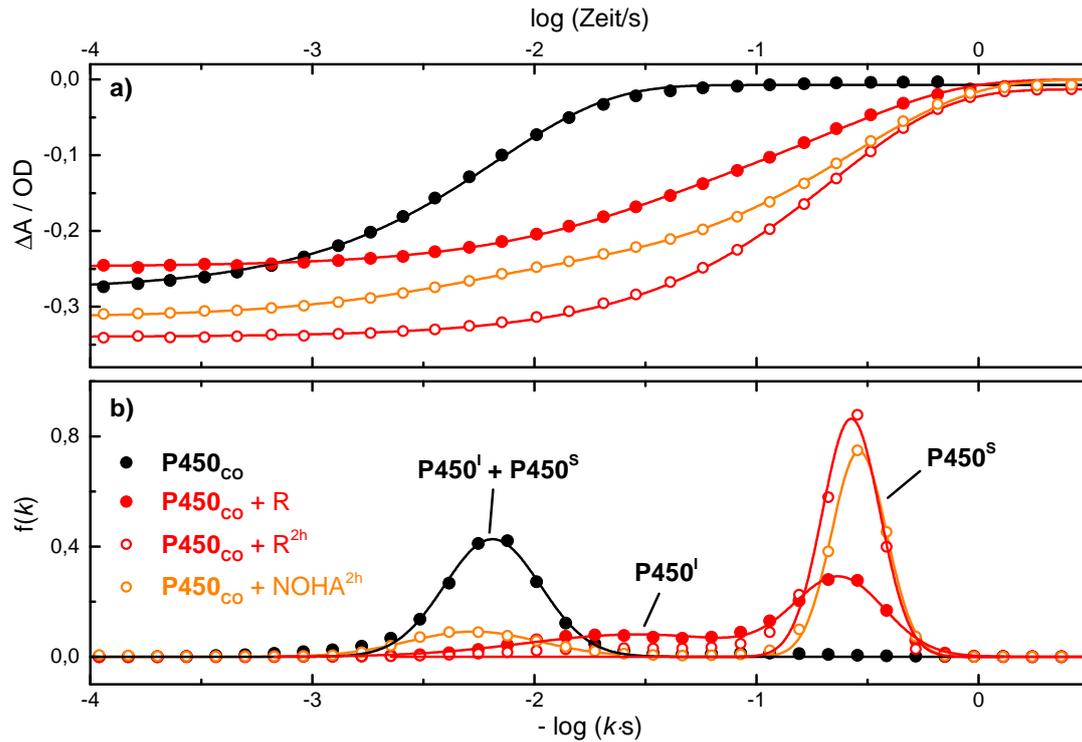


Abbildung 4.5: CO-Rückbindungskinetiken und Ratenverteilungsfunktionen von $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ mit Substrat Arg und Intermediat NOHA bei einer CO-Konzentration von 0,05 mM. **a)** CO-Rückbindungskinetiken von $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ (schwarz), direkt nach Zugabe von Substrat (rot, ausgefüllte Datenpunkte), ~ 2 h nach Substratzugabe (rot, offene Datenpunkte), sowie ~ 2 h nach Zugabe des Intermediats NOHA (orange). Linien: Fit mit einer beziehungsweise der Summe von zwei gestreckten Exponentialfunktionen. **b)** Entsprechende, durch MEM bestimmte Ratenverteilungsfunktionen. Linien: Gauß-Fits.

zurückbindende Spezies weist eine Breite von $w_1^{\text{H4B}} = 0,88 \pm 0,03$ auf und stellt rund 59% der Gesamtpopulation. Die mit $k_{+\text{CO}_2}^{\text{H4B}} = 59,7 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$ langsamer zurückbindende Spezies weist erneut eine deutlich geringere Breite von $w_2^{\text{H4B}} = 0,34 \pm 0,02$ auf und stellt die restlichen 41% der Gesamtpopulation. Ebenfalls übereinstimmend ließ sich über einen Zeitraum von ~ 2 h ein vollständiger Populationsaustausch zugunsten der langsamer zurückbindenden Spezies beobachten.

$i\text{NOS}_{\text{P450}}$ scheint also in zwei strukturell unterschiedlichen Spezies vorzuliegen (P450^{I} und P450^{S}), die sich bezüglich ihrer CO-Rückbindung erst durch Binden von Substrat, Intermediat oder Kofaktor unterscheiden lassen. Zwischen den beiden Spezies gibt es einen Konversionsprozess, der sich auf einer um mehrere Größenordnungen langsameren Zeitskala als die CO-Rückbindung abspielt. Die Spezies mit der homogeneren Struktur des aktiven Zentrums zeigt sich dabei als bevorzugte Spezies. Die These lässt sich durch Substratzugabe zu einer Probe, die durch Kofaktorbindung bereits vollständig in die homogene Spezies konvertiert war, untermauern (Abb. 4.6, rot). Wie erwartet, ist instantan nach der Substratzugabe bis auf einen geringen Rest,

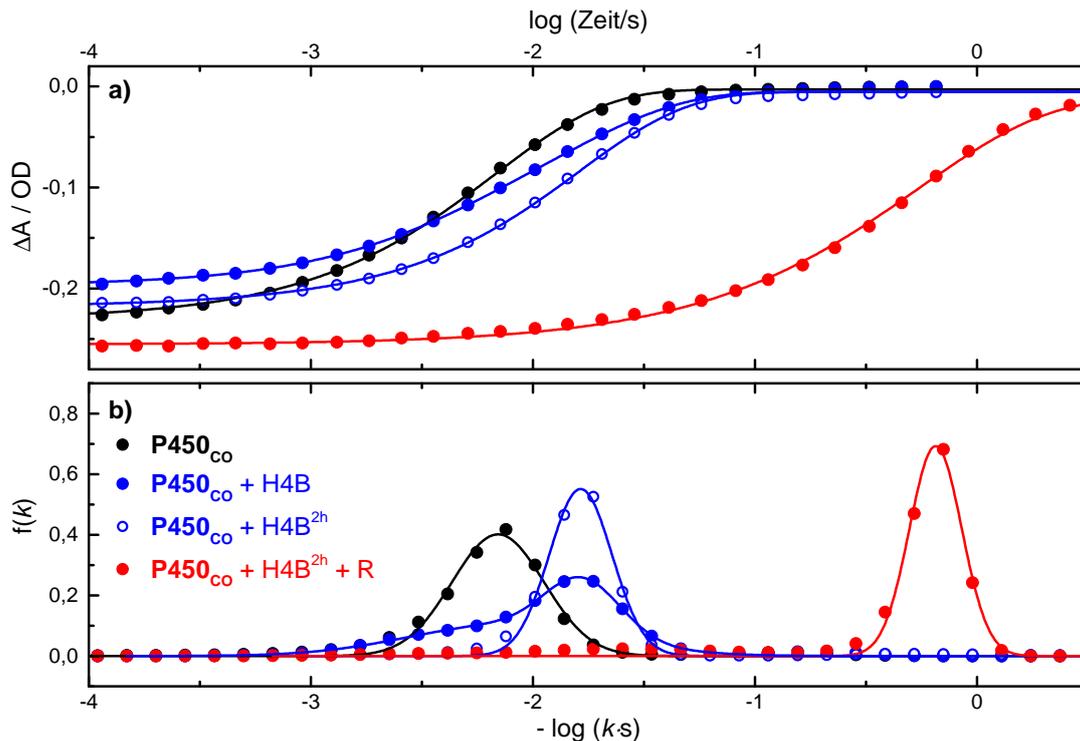


Abbildung 4.6: CO-Rückbindungskinetiken und Ratenverteilungsfunktionen von $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ mit Kofaktor H4B und Substrat bei einer CO-Konzentration von 0,05 mM. **a)** CO-Rückbindungskinetiken von $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ (schwarz), direkt nach Zugabe des Kofaktors (blau, ausgefüllte Datenpunkte), ~ 2 h nach Kofaktorzugabe (blau, offene Datenpunkte), sowie nach zusätzlicher Zugabe von Substrat (rot). Linien: Fit mit einer beziehungsweise der Summe von zwei gestreckten Exponentialfunktionen. **b)** Entsprechende, durch MEM bestimmte Ratenverteilungsfunktionen. Linien: Gauß-Fits.

hauptsächlich eine langsam zurückbindende Spezies zu beobachten, deren Population sich über Stunden hinweg stabil zeigte. Im Vergleich zur langsam zurückbindenden Spezies bei ausschließlicher Substratbindung ($k_{+\text{CO},1}^{\text{R}}$) ist die CO-Rückbindung mit $k_{+\text{CO}}^{\text{H4B,R}} = 1,54 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ um einen Faktor von $\sim 2,7$ reduziert. Dies entspricht interessanterweise in etwa dem Faktor der Verlangsamung der CO-Rückbindung bei ausschließlicher Kofaktorbindung (2,6). Die Effekte von Kofaktor und Substrat auf die CO-Rückbindungskinetiken scheinen demnach orthogonal zu sein. Weiter lässt sich festhalten, dass die Breite der Verteilungsfunktion des Ratenkoeffizienten mit $w^{\text{H4B,R}} = 0,236 \pm 0,006$ geringer ist als die Breite bei ausschließlicher Substrat- oder Kofaktorbindung. Die Struktur des aktiven Zentrums ist also bei kombinierter Bindung noch besser definiert als bei einzelner Bindung.

Was die Verlangsamung der CO-Rückbindung von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ durch Binden von Substrat und Kofaktor betrifft, so berichten Stevenson et al. [170] von ganz ähnlichen Beobachtungen. Sie fanden eine geringe Verlangsamung der CO-Rückbindung bei ausschließ-

licher Bindung des Kofaktors um den Faktor 2 (hier 2,6) sowie eine starke Verlangsamung durch Bindung von Kofaktor und Substrat um den Faktor 80 (hier 100). Sie führten den Effekt auf eine strukturelle Änderung der distalen Tasche des Proteins zurück. Eine in Abwesenheit von Kofaktor und Substrat dem Lösungsmittel gegenüber eher offene Struktur der Tasche gehe durch Binden von Substrat oder Kofaktor in eine eher geschlosseneren Struktur über. Die unterschiedliche Verlangsamung der CO-Rückbindung durch Substrat und Kofaktor wird auf deren Bindungsstellen zurückgeführt. Substrat bindet in direkter Nachbarschaft des Hämeisens, direkt über dem gebundenen CO. Der Kofaktor bindet dagegen koplanar zum Häm am Rand der distalen Tasche. Sterische Behinderung und damit stärkere Verlangsamung der CO-Rückbindung ist demnach eher von gebundenem Substrat zu erwarten. Hinweise auf die Identität der instabilen, schneller zurückbindenden Spezies finden sich in dieser Veröffentlichung keine. Sie soll im weiteren Verlauf der Arbeit tiefergehend untersucht werden.

4.1.2. Abhängigkeit der CO-Rückbindung von der Substratkonzentration

Ergänzend zu den Blitzlichtphotolysemessungen an substratfreiem und vollständig mit Substrat gesättigtem $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ wurden Messreihen bei stufenweiser Erhöhung der Substratkonzentration durchgeführt. Dabei wurden der Probelösung logarithmisch steigende Volumina einer hochkonzentrierten Substratlösung zugegeben. Die Spanne der Substratkonzentration der Probelösung umfasste einen Bereich von $0,1 \mu\text{M}$ – 370 mM . Der pH-Wert (7,1) und die CO-Konzentration ($0,05 \text{ mM}$ oder 1 mM) der Substratlösung waren identisch zur Probelösung. Die Verringerung der Proteinkonzentration in der Probelösung durch Zugabe der Substratlösung wurde im Nachhinein rechnerisch korrigiert. Die angegebenen Werte der auf Basis der Messdaten bestimmten Ratenkoeffizienten wurden aus der Position der Gauß-Fits an die durch die MEM bestimmten Ratenkoeffizientenverteilungen bestimmt.

4.1.2.1. Substrattitration bei 1 mM CO

Abbildung 4.7 zeigt eine Auswahl der Rückbindungskinetiken (a) und der entsprechenden Ratenkoeffizientenverteilungen (b) der Messreihe bei einer CO-Konzentration von 1 mM . Mit steigender Substratkonzentration wächst die Population der substratgebundenen P450^{S} -Spezies sukzessive, während die Population des substratfreien Proteins abnimmt. Die substratfreie Spezies bindet CO mit einem mittleren Ratenkoeffizienten von $k_{+\text{CO}} = 3710 \pm 16 \text{ s}^{-1}$ zurück, die substratgebundene P450^{S} -Spezies mit $k_{+\text{CO}}^{\text{R}} = 97 \pm 16 \text{ s}^{-1}$. Die Kinetik bei $[\text{R}] = 5,5 \text{ mM}$ weist eine etwas langsamere CO-Rückbindung der substratgebundenen Spezies auf ($k_{+\text{CO}}^{\text{R}}|_{[\text{R}]=5,5 \text{ mM}} = 68,0 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$).

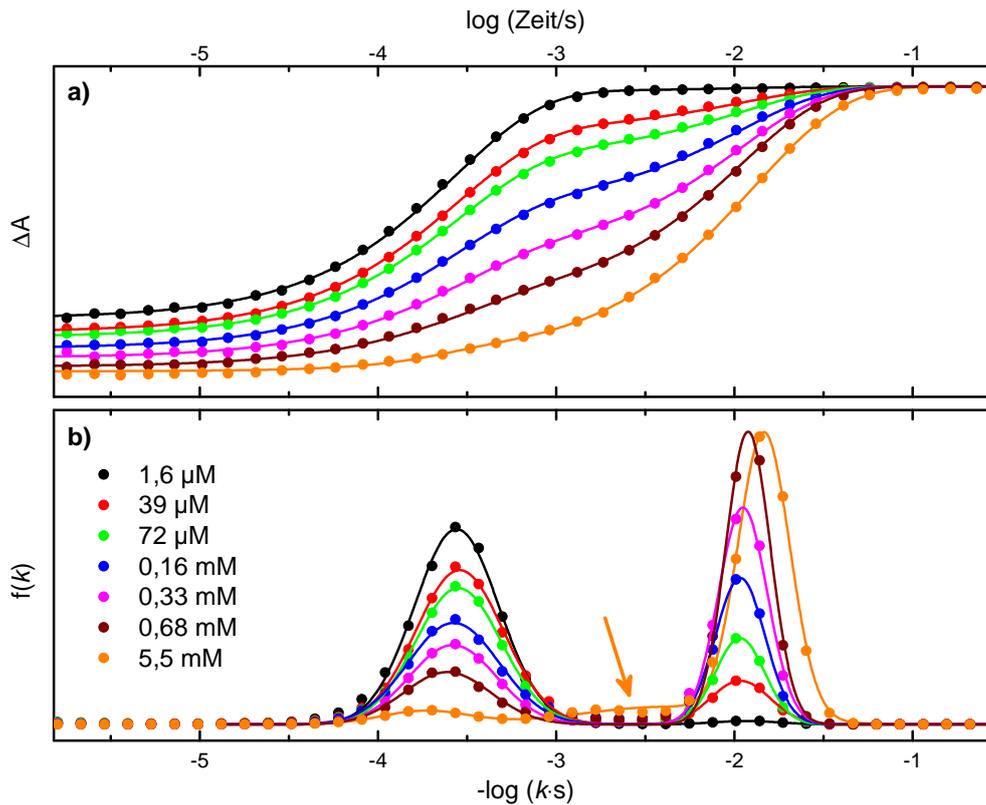


Abbildung 4.7: Substrattitration bei einer CO-Konzentration von $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$. **a)** Datenpunkte: ausgewählte CO-Rückbindungskinetiken der Messreihe. Linien: Fits der Summe von zwei gestreckten Exponentialfunktion. Die Kinetiken wurden direkt nach Substratzugabe aufgenommen. **b)** Datenpunkte: durch MEM bestimmte Rückbindungsverteilungen. Linien: Fits der Summe von zwei Gauß-Funktionen. Der orangene Pfeil verweist auf die Population der substratgebundenen P450^{I} -Spezies. Die Fitparameter finden sich in Tabelle 4.1.

Hierbei könnte es sich lediglich um die Folge von Temperaturschwankungen im Labor handeln.

Interessanterweise ist die substratgebundene P450^{I} -Spezies erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen zu beobachten ($[\text{R}] \geq 5,5 \text{ mM}$). Sie weist also eine signifikant geringere Substrataffinität als die P450^{S} -Spezies auf. Weiter fällt auf, dass die Population der substratgebundenen P450^{I} -Spezies vergleichsweise klein ist. Nach einmaliger Zugabe einer hochkonzentrierten Substratlösung war sie ähnlich groß wie die Population der substratgebundenen P450^{S} -Spezies (Abb. 4.5). Der Konversionsprozess zwischen den Spezies muss also während der Titrationsmessung abgelaufen sein, obwohl keine nachweisbare Population der substratgebundenen P450^{I} -Spezies vorhanden war.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde einer Probe einmalig Substrat ($[\text{R}] = 83 \mu\text{M}$) hinzugegeben und die zeitliche Entwicklung der Proteinpopulationen aufge-

Tabelle 4.1: Parameter der Fits einer Summe von zwei Gaußfunktionen an die Verteilungsfunktionen der CO-Rückbindungskinetiken bei $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$ (Abb. 4.7). Obere Hälfte der Tabelle: CO-Rückbindung ohne Substrat. Untere Hälfte der Tabelle: CO-Rückbindung mit Substrat.

[R]	$A_{+\text{CO}}$	$k_{+\text{CO}}$	$w_{+\text{CO}}$
μM		s^{-1}	
1,6	$0,538 \pm 0,006$	3623 ± 24	$0,474 \pm 0,006$
6	$0,503 \pm 0,007$	3669 ± 28	$0,479 \pm 0,007$
12	$0,504 \pm 0,006$	3702 ± 28	$0,504 \pm 0,006$
21	$0,509 \pm 0,007$	3733 ± 46	$0,509 \pm 0,007$
39	$0,442 \pm 0,006$	3487 ± 29	$0,492 \pm 0,007$
72	$0,383 \pm 0,006$	3542 ± 33	$0,483 \pm 0,008$
160	$0,303 \pm 0,006$	3767 ± 49	$0,512 \pm 0,01$
330	$0,225 \pm 0,006$	3803 ± 62	$0,487 \pm 0,01$
680	$0,149 \pm 0,006$	4087 ± 101	$0,490 \pm 0,02$
[R]	$A_{+\text{CO}}^{\text{R}}$	$k_{+\text{CO}}^{\text{R}}$	$w_{+\text{CO}}^{\text{R}}$
μM		s^{-1}	
1,6	$0,007 \pm 0,005$	86 ± 28	$0,4 \pm 0,3$
6	$0,025 \pm 0,009$	144 ± 78	$1,1 \pm 0,5$
12	$0,025 \pm 0,005$	90 ± 9	$0,37 \pm 0,08$
21	$0,041 \pm 0,006$	117 ± 10	$0,49 \pm 0,08$
39	$0,085 \pm 0,005$	93 ± 2	$0,33 \pm 0,02$
72	$0,139 \pm 0,004$	93 ± 1	$0,28 \pm 0,01$
160	$0,237 \pm 0,004$	$92,7 \pm 0,6$	$0,278 \pm 0,006$
330	$0,346 \pm 0,004$	$89,6 \pm 0,4$	$0,275 \pm 0,004$
680	$0,428 \pm 0,004$	$83,8 \pm 0,2$	$0,251 \pm 0,003$

nommen. Abbildung 4.8 zeigt die Evolution der Populationen der substratfreien Spezies – es handelt sich um die Summe aus substratfreiem P450^{S} und P450^{I} – und der substratgebundenen P450^{S} -Spezies. Über einen Zeitraum von mehreren Stunden kam es zu einer Angleichung der beiden Populationen durch einen Konversionsprozess.

Die Daten aus einer Titrationsreihe unterliegen demnach zwei Effekten. Zum einen kommt es nach jedem Titrationschritt zu einer schnellen Adaption des neuen Gleichgewichtszustandes zwischen Besetzung von substratfreiem und substratgebundenem P450^{S} , zum anderen findet über die gesamte Dauer der Messreihe der vergleichsweise langsame Konversionsprozess zwischen P450^{I} und P450^{S} statt.

Trägt man die Populationen der substratfreien und substratgebundenen Proteinspezies aus der Messung aus Abbildung 4.7 über der freien Substratkonzentration auf, so

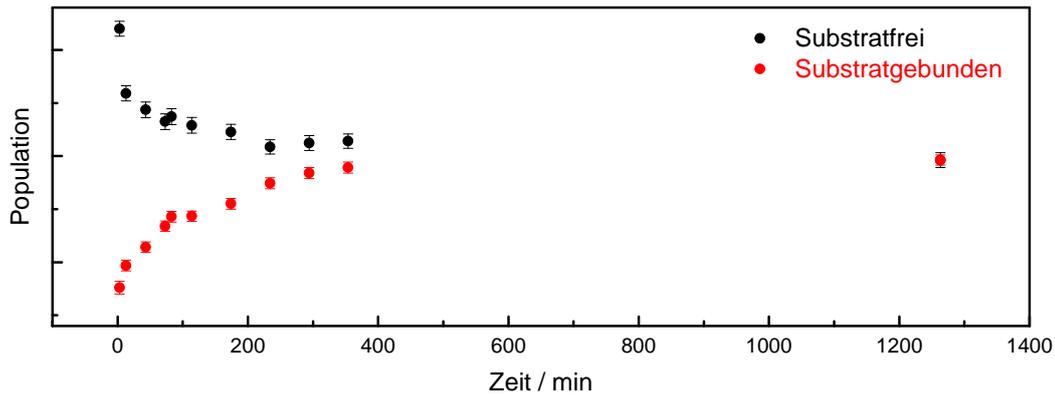


Abbildung 4.8: Zeitlicher Verlauf der Populationen der substratfreien und substratgebundenen Spezies nach einmaliger Zugabe von Substrat in einer Konzentration von $[\text{R}] = 83 \mu\text{M}$. Die Datenpunkte bezeichnen die Flächen unter den durch die MEM bestimmten Ratenkoeffizientenverteilungen, die nach Gleichung (2.5) proportional zu den Populationen der Proteinspezies sind.

ergibt sich die in Abbildung 4.9 a dargestellte Kurve. Sie besitzt den Charakter einer Bindungskurve. Der Fit einer Hill-Kurve der Form

$$y([\text{R}]) = A_0 + (A_1 - A_0) \frac{[\text{R}]^n}{[\text{R}]^n + K_D^n} \quad (4.2)$$

liefert die Größe K_D , bei der es sich um die Dissoziationskonstante der beobachteten Bindungsreaktion handelt, sowie den Hill-Koeffizienten n , der die Kooperativität der Reaktion beschreibt. Die beiden Amplituden A_0 und A_1 bezeichnen die Populationsgrößen einer Spezies zu Beginn und am Ende der Messreihe. Aufgrund der Überlagerung des Konversionsprozesses und der Substratbindungsreaktion handelt es sich bei der durch den Fit bestimmten Größe K_D um eine zeitabhängige, apparente Bindungskonstante. Je nachdem, wie viel Zeit zwischen Substratzugabe und Aufnahme der Kinetik liegt, ergeben sich unterschiedliche Populationsgrößen der Spezies (Abb. 4.8).

Bei der Messreihe aus Abbildung 4.7 wurden die Kinetiken jeweils direkt nach der Substratzugabe aufgenommen. Die beiden unabhängigen Hill-Fits an die Daten aus Abbildung 4.9 a liefern eine Dissoziationskonstante von $K_D = 183 \pm 9 \mu\text{M}$ (gewichteter Mittelwert). Abbildung 4.9 b zeigt das Ergebnis einer weiteren Titrationsreihe, bei der bei jedem Titrationschritt zwischen Substratzugabe und Aufnahme der Kinetik mindestens 2 h gewartet wurde. Wie erwartet sorgt der Konversionsprozess dafür, dass die Populationsgröße der substratgebundenen P450^{S} -Spezies während der Wartezeit wächst. Folglich liefert diese Messreihe einen deutlich kleineren Wert der apparenten Dissoziationskonstanten von $K_D = 73 \pm 8 \mu\text{M}$ (gewichteter Mittelwert). Beide Werte liegen höher als bereits veröffentlichte Werte der Substrat-Dissoziationskonstanten von $K_D = 11 \mu\text{M}$ [47] oder $K_D = 9,19 \mu\text{M}$ [170], die durch Störungs-Differenz-Spektroskopie an

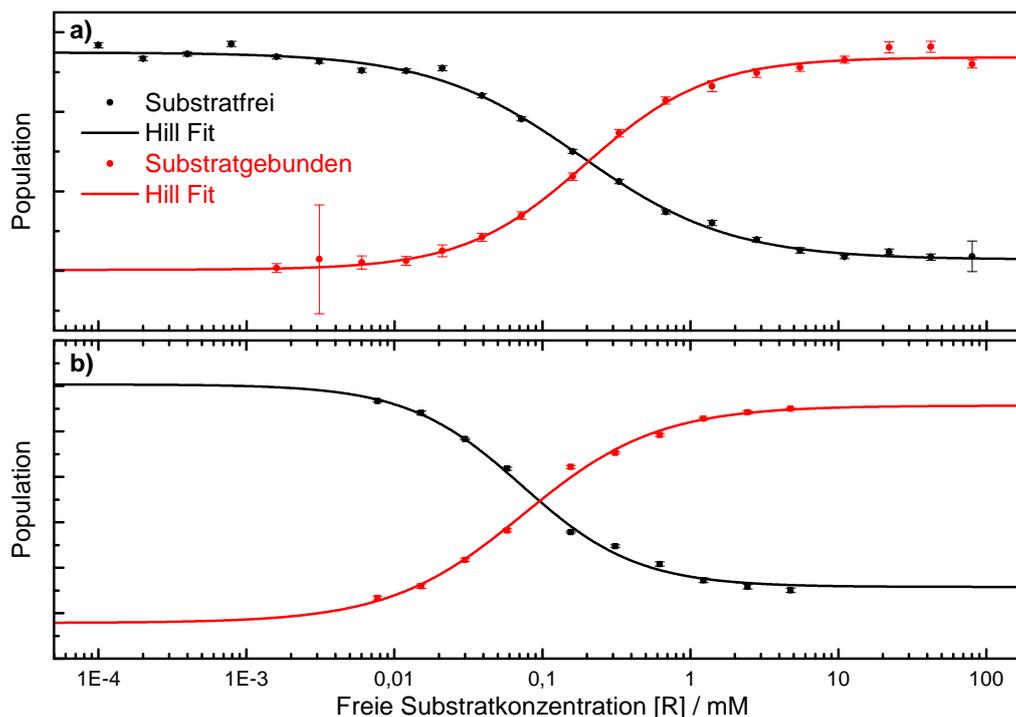


Abbildung 4.9: Bestimmung der Substrat-Dissoziationskonstanten. Datenpunkte: Populationen der substratfreien und substratgebundenen Spezies, aufgetragen über der Substratkonzentration. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration von $\sim 5 \mu\text{M}$ entspricht die absolute Substratkonzentration näherungsweise der freien Substratkonzentration. Linien: Fits der Hill-Gleichung (4.2). **a)** Titrationsmessung aus Abbildung 4.7. Die Fits liefern $K_D = 196 \pm 20 \mu\text{M}$ mit $n = 1,0 \pm 0,1$ (substratfreie Population) und $K_D = 180 \pm 10 \mu\text{M}$ mit $n = 0,85 \pm 0,05$ (substratgebundene Population). **b)** Langsame Titrationsmessung. Zwischen Substratzugabe und Aufnahme der Kinetik verging jeweils eine Zeit von $> 2 \text{ h}$. Die Fits liefern $K_D = 74 \pm 14 \mu\text{M}$ mit $n = 1,0 \pm 0,1$ (substratfreie Population) und $K_D = 73 \pm 9 \mu\text{M}$ mit $n = 1,1 \pm 0,1$ (substratgebundene Population).

imidazolgebundenem $\text{Fe}^{3+}\text{-iNOS}_{\text{oxy}}$ bestimmt wurden. Da Imidazol die Substratbindungsstelle okkupiert, könnte es sein, dass auch imidazolgebundenes $i\text{NOS}$ bevorzugt im P450^{S} -Zustand vorliegt. Bei den veröffentlichten Dissoziationskonstanten könnte es sich demnach um die vom Konversionsprozess ungestörten Werte der P450^{S} -Spezies handeln.

4.1.2.2. Substrattitration bei 0,05 mM CO

Die Substrattitrationsmessung wurde bei einer um den Faktor 20 niedrigeren CO-Konzentration der Probe von 0,05 mM wiederholt. In Abbildung 4.10 sind wieder einige CO-Rückbindungskinetiken (a) und die durch die MEM bestimmten Ratenko-

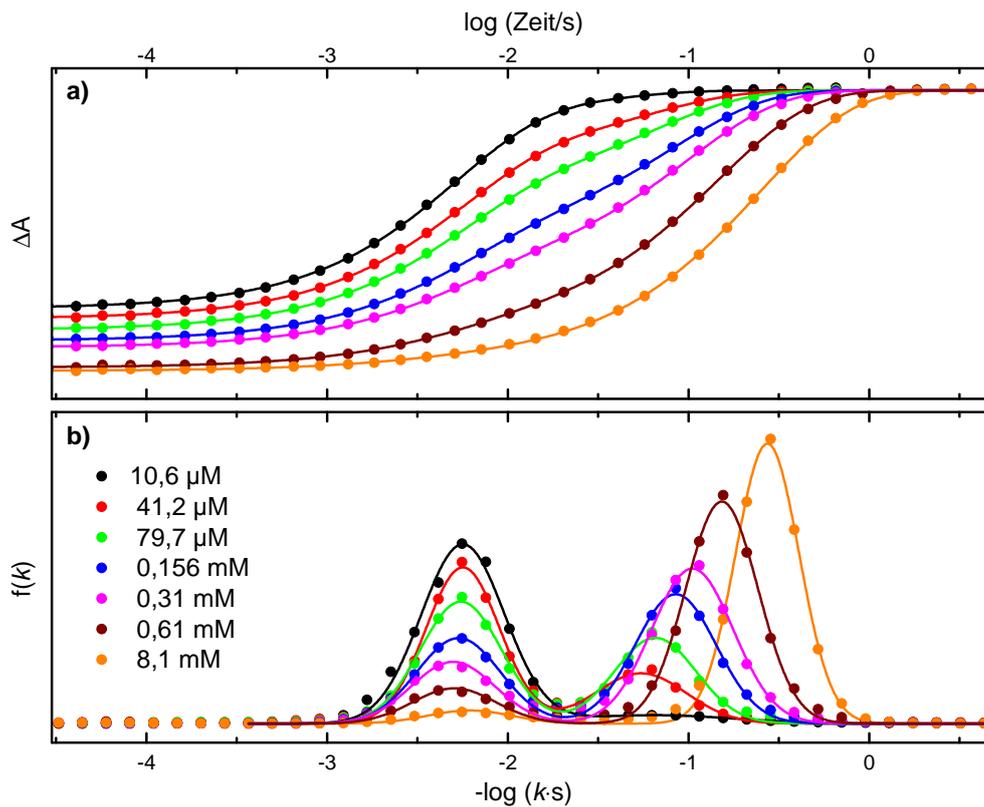


Abbildung 4.10: Substrattitration bei $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$. **a)** Datenpunkte: ausgewählte CO-Rückbindungskinetiken der Messreihe. Linien: Fits der Summe von zwei gestreckten Exponentialfunktion. Die Kinetiken wurden direkt nach Substratzugabe aufgenommen. **b)** Datenpunkte: durch MEM bestimmte Rückbindungsverteilungsfunktionen. Linien: Fits von zwei Gauß-Funktionen.

effizientenverteilungen (b) dargestellt. Die CO-Rückbindung der substratfreien Spezies läuft wie erwartet mit einem (über alle Kinetiken gemittelten) Ratenkoeffizienten von $k_{+\text{CO}} = 177 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ ab. Einen überraschenden Effekt scheint die veränderte CO-Konzentration allerdings auf die CO-Rückbindung des substratgebundenen P450^{S} -Zustands zu haben: der Ratenkoeffizient $k_{+\text{CO}}^{\text{R}}$ weist einen substratkonzentrationsabhängigen Verlauf auf. Bei niedriger Substratkonzentration ist die CO-Rückbindung zunächst schneller als erwartet, verlangsamt sich jedoch sukzessive mit jedem Titrationschritt, bis es schließlich zur Sättigung bei $k_{+\text{CO}}^{\text{R}}|_{\text{Sat.}} = 3,66 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ kommt. Die Modulation der CO-Rückbindungsgeschwindigkeit durch Änderung der Substratkonzentration erwies sich als unabhängig vom Konversionsprozess zwischen den Spezies. Dieser Prozess kann also vernachlässigt werden. Zur Analyse des Effekts genügt die Betrachtung der P450^{S} -Spezies.

Die Abhängigkeit der CO-Rückbindung von der Substratkonzentration deutet eindeutig darauf hin, dass die Prozesse der Substratbindung und Substratdissoziation die Ursache des Effekts sind. Als Grundlage zur Beschreibung der Kinetiken aus Abbildung

4.10 kann das in Abbildung 4.11 a dargestellte Modellsystem verwendet werden. Dabei gilt die folgende Nomenklatur.

Proteinzustände:

P450	Substratfreier Deoxy-Zustand
P450 _R	Substratgebundener Deoxy-Zustand
P450 ^{CO}	Substratfreier CO-Zustand
P450 _R ^{CO}	Substratgebundener CO-Zustand

Ratenkoeffizienten:

k_{+R}	Substratbindung des Deoxy-Zustandes
k_{-R}	Substratdissoziation des Deoxy-Zustandes
k_{+R}^{CO}	Substratbindung des CO-Zustandes
k_{-R}^{CO}	Substratdissoziation des CO-Zustandes
k_{+CO}	CO-Bindung des substratfreien Deoxy-Zustandes
k_{-CO}	CO-Dissoziation des substratfreien CO-Zustandes
k_{+CO}^R	CO-Bindung des substratgebundenen Deoxy-Zustandes
k_{-CO}^R	CO-Dissoziation des substratgebundenen CO-Zustandes

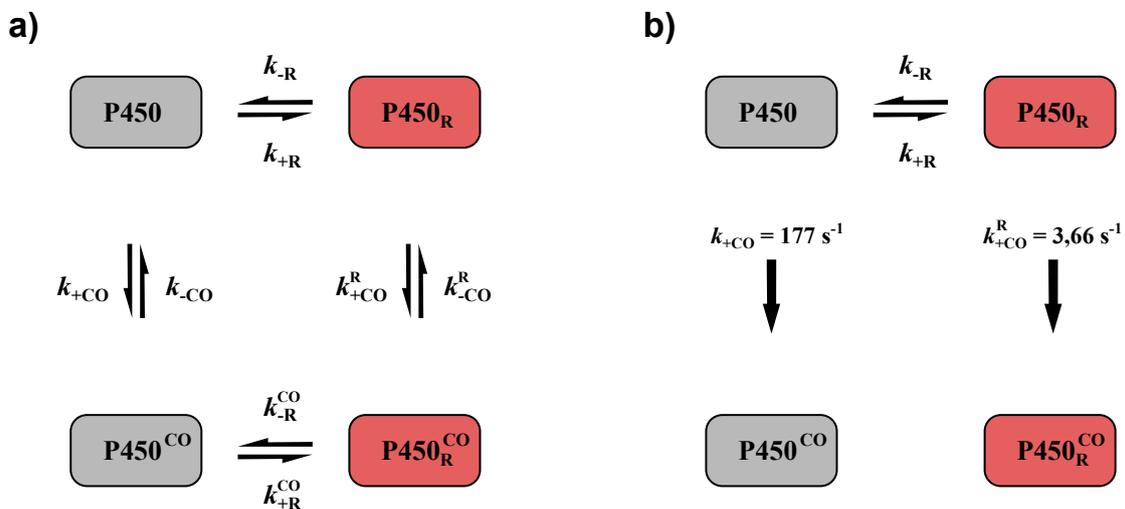


Abbildung 4.11: Modellsysteme zur Beschreibung der CO-Rückbindungskinetiken der P450^S-Spezies bei Substratbindung. Substratgebundene Zustände sind rot hinterlegt. a) Allgemeines Modellsystem. b) Reduziertes Modellsystem. Eingetragen sind die Werte der effektiven Ratenkoeffizienten k_{+CO} und k_{+CO}^R bei einer CO-Konzentration von $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$.

Die CO-Dissoziationsreaktionen (k_{-CO} und k_{-CO}^R) können aufgrund der bei Hämproteinen typischerweise sehr hohen CO-Affinität vernachlässigt werden. Infolgedessen ist auch die Substratbindung und Substratdissoziation des CO-gebundenen Proteins (k_{+R}^{CO} und k_{-R}^{CO}) ohne Einfluss auf die gemessenen Kinetiken. Das Modellsystem reduziert sich somit auf das in Abbildung 4.11 b dargestellte System. Die Substratkonzentrationsabhängigkeit des Systems steckt im effektiven Ratenkoeffizienten der Substratassoziation k_{+R} im Deoxy-Zustand.

Dieses reduzierte Modell kann in ein gekoppeltes System aus vier linearen homogenen Differenzialgleichungen erster Ordnung übersetzt werden:

$$\begin{aligned}
 \text{(i)} \quad & \frac{d}{dt} [\text{P450}](t) = -k_{+CO} \cdot [\text{P450}](t) - k_{+R} \cdot [\text{P450}](t) + k_{-R} \cdot [\text{P450}_R](t) \\
 \text{(ii)} \quad & \frac{d}{dt} [\text{P450}_R](t) = -k_{+CO}^R \cdot [\text{P450}_R](t) + k_{+R} \cdot [\text{P450}](t) - k_{-R} \cdot [\text{P450}_R](t) \\
 \text{(iii)} \quad & \frac{d}{dt} [\text{P450}^{CO}](t) = +k_{+CO} \cdot [\text{P450}](t) \\
 \text{(iv)} \quad & \frac{d}{dt} [\text{P450}_R^{CO}](t) = +k_{+CO}^R \cdot [\text{P450}_R](t).
 \end{aligned}$$

Im Folgenden wird sowohl die allgemeine Lösung des Modellsystems als auch eine Lösung durch ein Näherungsverfahren behandelt.

4.1.2.3. Allgemeine Lösung des Modellsystems

Das Gleichungssystem (i) – (iv) lässt sich mit dem Vektor

$$\vec{x}(t) = \begin{pmatrix} [\text{P450}](t) \\ [\text{P450}_R](t) \\ [\text{P450}^{CO}](t) \\ [\text{P450}_R^{CO}](t) \end{pmatrix} \quad (4.3)$$

und der Matrix der Ratenkoeffizienten

$$M = \begin{pmatrix} -(k_{+CO} + k_{+R}) & k_{-R} & 0 & 0 \\ k_{+R} & -(k_{+CO}^R + k_{-R}) & 0 & 0 \\ k_{+CO} & 0 & 0 & 0 \\ k_{+CO}^R & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (4.4)$$

darstellen als

$$\frac{d}{dt} \vec{x}(t) = M\vec{x}(t). \quad (4.5)$$

Eine Lösung von Gleichung (4.5) gelingt mit dem Exponentialansatz

$$\vec{x}(t) = e^{\lambda t} \vec{v}, \quad (4.6)$$

wobei \vec{v} der Eigenvektor der Matrix M zum Eigenwert λ ist. Die Ratenkoeffizientenmatrix besitzt die zwei nicht-trivialen Eigenwerte

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left(-\Sigma_k \pm \sqrt{\Sigma_k^2 - 4(k_{+CO}k_{-R} + k_{+CO}^R k_{+R} + k_{+CO} k_{+CO}^R)} \right), \quad (4.7)$$

mit $\Sigma_k = k_{+R} + k_{-R} + k_{+CO} + k_{+CO}^R$. Für die allgemeine Lösung von Gleichung (4.5) ergibt sich somit

$$\vec{x}(t) = c_0 + c_1 \vec{v}_1 e^{\lambda_1 t} + c_2 \vec{v}_2 e^{\lambda_2 t}. \quad (4.8)$$

Die konstanten Koeffizienten c_0, c_1, c_2 ergeben sich aus der Anfangsbedingung $\vec{x}(t_0) = \vec{x}_0$. Die Anfangsbedingung definiert sich durch die Verteilung der photolysierten Proteine auf die beiden Deoxy-Zustände P450 und P450_R, direkt nach der Photolyse. Sie ergibt sich aus dem Gleichgewichtszustand (GG) der CO-gebundenen Zustände P450^{CO} und P450_R^{CO} vor der Photolyse. Sie ist somit durch die Substrat-Dissoziationskonstante K_D charakterisiert:

$$\frac{[\text{P450}_R^{\text{CO}}]_{\text{GG}}}{[\text{P450}_R^{\text{CO}}]_{\text{GG}} + [\text{P450}^{\text{CO}}]_{\text{GG}}} = \frac{[\text{R}]}{[\text{R}] + K_D} = \Theta. \quad (4.9)$$

Nach Normierung, $[\text{P450}_R^{\text{CO}}]_{\text{GG}} + [\text{P450}^{\text{CO}}]_{\text{GG}} = 1$, gilt:

$$[\text{P450}^{\text{CO}}]_{\text{GG}} = 1 - \Theta, \quad (4.10)$$

$$[\text{P450}_R^{\text{CO}}]_{\text{GG}} = \Theta. \quad (4.11)$$

Unter Berücksichtigung eventuell unterschiedlicher Photolyseeffizienzen der beiden Zustände P450^{CO} (β) und P450_R^{CO} (β_R) ergibt sich als Anfangsbedingung

$$\vec{x}(t_0) = \begin{pmatrix} [\text{P450}]_0 \\ [\text{P450}_R]_0 \\ [\text{P450}^{\text{CO}}]_0 \\ [\text{P450}_R^{\text{CO}}]_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \beta \cdot (1 - \Theta) \\ \beta_R \cdot \Theta \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (4.12)$$

Die Eigenvektoren \vec{v}_1, \vec{v}_2 und die Koeffizienten c_0, c_1, c_2 können somit bestimmt werden. Allerdings ist die exakte Lösung des Gleichungssystems unübersichtlich und wenig intuitiv verständlich. Günstiger ist stattdessen die Anwendung eines Näherungsverfahrens.

4.1.2.4. Lösung des Modellsystems durch Näherungsverfahren

Abbildung 4.10 lässt erkennen, dass die CO-Rückbindung des substratfreien Zustands bereits abgeschlossen ist, bevor die CO-Rückbindung des substratgebundenen Zustands einsetzt. Die Rückbindungsprozesse der beiden anfänglichen Proteinpopulationen $[\text{P450}]_0$ und $[\text{P450}_R]_0$ können demnach näherungsweise getrennt voneinander behandelt werden.

Da der CO-Rückbindungsprozess der substratfreien Population $[P450]_0$ keine erkennbare Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufweist, ist davon auszugehen, dass die CO-Rückbindung mit k_{+CO} so schnell ist, dass die Assoziations- (k_{+R}) und Dissoziationsreaktionen (k_{-R}) von Substrat eine vernachlässigbare Rolle spielen. Der CO-Rückbindungsprozess kann also durch

$$[P450](t) = [P450]_0 \cdot e^{-k_{+CO}t}, \quad (4.13)$$

beziehungsweise

$$[P450^{CO}](t) = [P450]_0 \cdot (1 - e^{-k_{+CO}t}) \quad (4.14)$$

beschrieben werden.

Zum Zeitpunkt der einsetzenden CO-Rückbindung der substratgebundenen Population $[P450_R]_0$ ist die CO-Rückbindung der initialen, substratfreien Population $[P450]_0$ bereits vollständig abgeschlossen. Im Hinblick auf die CO-Rückbindung der $[P450_R]_0$ Population handelt es sich bei $[P450](t)$ somit um einen stationären Zustand:

$$\frac{d}{dt}[P450](t) = 0. \quad (4.15)$$

Nach Auflösung von Gleichung (i) nach $[P450](t)$ und Einsetzen in Gleichungen (ii) und (iii) reduziert sich das Modellsystem mathematisch auf ein Dreizustandssystem:

$$\begin{aligned} \text{(ii)*} \quad \frac{d}{dt}[P450_R](t) &= - \left(k_{+CO}^R + k_{-R} \frac{k_{+CO}}{k_{+CO} + k_{+R}} \right) \cdot [P450_R](t) \\ \text{(iii)*} \quad \frac{d}{dt}[P450^{CO}]^*(t) &= +k_{+CO} \frac{k_{-R}}{k_{+CO} + k_{+R}} \cdot [P450_R](t) \\ \text{(iv)} \quad \frac{d}{dt}[P450_R^{CO}](t) &= +k_{+CO}^R \cdot [P450_R](t). \end{aligned}$$

Die Funktion des substratfreien, CO-gebundenen Zustands $[P450^{CO}]^*(t)$ wurde mit einem Stern markiert, um sie von Gleichung (4.14) zu unterscheiden.

Mit den beiden Anfangsbedingungen $[P450_R](0) = [P450_R]_0$ und $[P450^{CO}](0) = [P450^{CO}]^*(0) = 0$ ergeben sich die Lösungen der drei Differenzialgleichungen:

$$[P450_R](t) = [P450_R]_0 \cdot e^{-k_{App}t} \quad (4.16)$$

$$[P450^{CO}]^*(t) = (1 - \gamma) [P450_R]_0 \cdot (1 - e^{-k_{App}t}) \quad (4.17)$$

$$[P450_R^{CO}](t) = \gamma [P450_R]_0 \cdot (1 - e^{-k_{App}t}). \quad (4.18)$$

Der Koeffizient k_{App} bezeichnet den substratkonzentrationsabhängigen apparenten Ratenkoeffizienten:

$$k_{App} = k_{App}([R]) = k_{+CO}^R + k_{-R} \frac{k_{+CO}}{\underbrace{k_{+CO} + k_{+R}}_{=\hat{k}_{+R} \cdot [R]}}. \quad (4.19)$$

Der ebenfalls substratkonzentrationsabhängige Faktor γ gibt die prozentuale Größe der Proteinpopulation an, die CO im substratgebundenen Zustand zurückbindet:

$$\gamma = \gamma ([R]) = \frac{k_{+CO}^R}{k_{App} ([R])}. \quad (4.20)$$

Unter Vernachlässigung der Population der P450^I-Spezies sind die CO-Rückbindungskinetiken aus Abbildung 4.10 a durch folgende Funktion beschrieben:

$$g(t) = -[P450](t) - [P450_R](t) \quad (4.21)$$

$$= -[P450]_0 \cdot e^{-k_{+CO}t} - [P450_R]_0 \cdot e^{-k_{App}t}. \quad (4.22)$$

Der apparente Ratenkoeffizient k_{App} ist intuitiv verständlich. Er setzt sich aus der Summe der Ratenkoeffizienten der beiden möglichen Reaktionspfade zusammen (Vergleich mit Abb. 4.11 b). (i) Es kommt zur direkten CO-Rückbindung mit k_{+CO}^R . (ii) Es kommt zur Dissoziation des Substrats mit k_{-R} , gefolgt von CO-Bindung mit k_{+CO} , oder Substratassoziation mit k_{+R} . Der Reaktionspfad (ii) der Substratdissoziation ist also mit der Wahrscheinlichkeit der CO-Bindung im substratfreien Zustand, $\frac{k_{+CO}}{k_{+CO} + k_{+R} \cdot [R]}$, zu gewichten. Bei einer Substratkonzentration von $[R] = 0$ liegt diese Wahrscheinlichkeit bei 1. Für k_{App} ergibt sich dann:

$$k_{App} ([R] = 0) = k_{+CO}^R + k_{-R}. \quad (4.23)$$

Bei sehr hohen Substratkonzentrationen liegt die Wahrscheinlichkeit dagegen bei 0 und k_{App} geht in den Ratenkoeffizienten k_{+CO}^R über:

$$k_{App} ([R] \rightarrow \infty) = k_{+CO}^R. \quad (4.24)$$

Die maximale Änderung von k_{App} , Δk_{App} , entspricht also genau dem Ratenkoeffizienten der Substratdissoziation:

$$\Delta k_{App} = k_{App} ([R] = 0) - k_{App} ([R] \rightarrow \infty) = k_{-R}. \quad (4.25)$$

4.1.2.5. Auswertung der Messdaten

Die Näherungslösung, Gleichung (4.22), gilt nur für die P450^S-Spezies. Die Messdaten aus den Abbildungen 4.7 und 4.10 beinhalten jedoch zusätzlich und untrennbar die P450^I-Spezies und deren Konversionsprozess in die P450^S-Spezies. Eine allumfassende Beschreibung der Messdaten durch die Näherungslösung ist somit nicht möglich. Allerdings ist der apparente Ratenkoeffizient k_{App} unabhängig vom Konversionsprozess und kann den Messdaten entnommen werden.

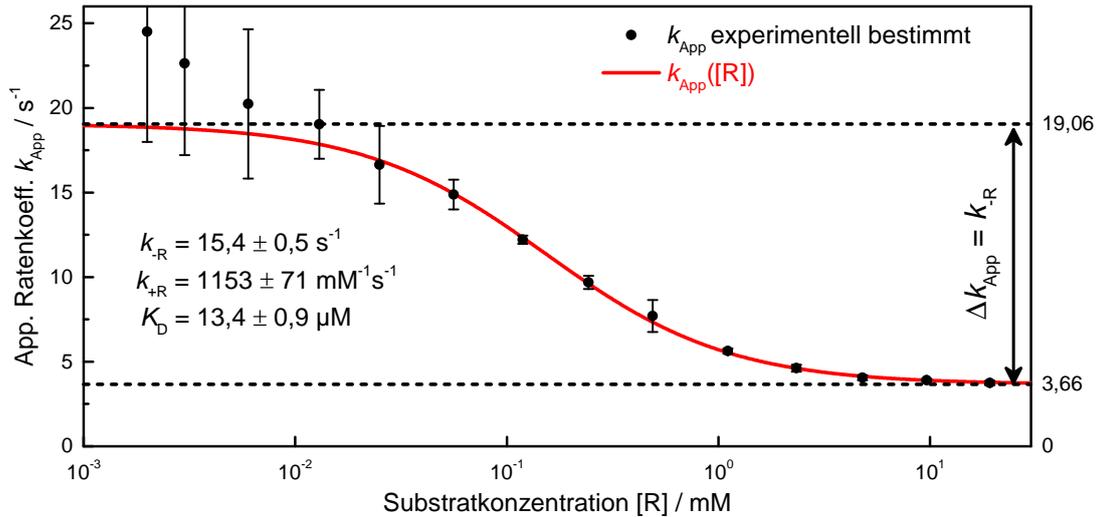


Abbildung 4.12: Fit von Gleichung (4.19) an experimentell ermittelte Werte von k_{App} . Es handelt sich um die Mittelwerte aus vier unabhängig durchgeführten Titrationsmessungen. Die Werte unterhalb einer Substratkonzentration von $10 \mu\text{M}$ haben aufgrund der noch sehr kleinen Populationen einen sehr großen Fehler. Die maximale Änderung k_{App} entspricht dem Wert des Ratenkoeffizienten k_{-R} .

Die Titrationsmessung bei einer CO-Konzentration von $0,05 \text{ mM}$ wurde unabhängig voneinander viermal durchgeführt. Die Werte von k_{App} wurden durch Fits der Gauß-Funktion und die Ratenkoeffizientenverteilungsfunktionen aus der MEM bestimmt. Die über alle vier Messreihen gemittelten Werte von k_{App} sind in Abbildung 4.12 in Abhängigkeit der Substratkonzentration aufgetragen. Die rote Linie bezeichnet den Fit von Gleichung (4.19) an die Daten. Die bereits bekannten Ratenkoeffizienten der CO-Rückbindung von $k_{+\text{CO}} = 177 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ und $k_{+\text{CO}}^{\text{R}} = 3,66 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ wurden als konstante Parameter eingesetzt.

Der Fit liefert die Ratenkoeffizienten der Substratdissoziation und Substratassoziation und somit auch den Wert der Dissoziationskonstanten:

$$\begin{aligned}
 k_{-R} &= 15,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}, \\
 \hat{k}_{+R} &= 1153 \pm 71 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}, \\
 K_{\text{D}} &= \frac{k_{-R}}{\hat{k}_{+R}} = 13,4 \pm 0,9 \mu\text{M}.
 \end{aligned}$$

Bei K_{D} handelt es sich um die Dissoziationskonstante der Deoxy-Spezies von $i\text{NOS}_{\text{P450}}$. Aufgrund des Konversionsprozesses zwischen den Spezies kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob sie sich von der Dissoziationskonstanten der CO-Spezies unterscheidet.

Da die Annahmen des Näherungsverfahrens unabhängig von der CO-Konzentration gültig sind, bleibt an dieser Stelle die Frage, wieso die Substratkonzentrationsabhän-

gigkeit von k_{App} nur bei einer CO-Konzentration von 0,05 mM beobachtet werden konnte, nicht jedoch bei 1 mM. Im Gegensatz zur maximalen Änderung, $\Delta k_{\text{App}} = k_{-\text{R}}$, ist der Ratenkoeffizient selbst aufgrund der effektiven Ratenkoeffizienten der CO-Bindung abhängig von der CO-Konzentration:

$$k_{\text{App}}([R], [\text{CO}]) = \hat{k}_{+\text{CO}}^{\text{R}} \cdot [\text{CO}] + k_{-\text{R}} \frac{\hat{k}_{+\text{CO}}}{\hat{k}_{+\text{CO}} + \hat{k}_{+\text{R}} \frac{[R]}{[\text{CO}]}}. \quad (4.26)$$

Abbildung 4.13 a demonstriert den Verlauf von k_{App} für $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$ und $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$. Die charakteristische Form der Kurve ist aufgrund der halblogarithmischen Auftragung unabhängig von der CO-Konzentration erhalten. Die Kurve ist lediglich entlang der y-Achse entsprechend der CO-Konzentration und entlang der x-Achse um $\log\left(\frac{1 \text{ mM}}{0,05 \text{ mM}}\right)$ verschoben. Abbildung 4.13 b zeigt, wieso die Änderung von k_{App} bei $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$ in Abbildung 4.7 dennoch nicht aufgefallen war. Die absolute Änderung von k_{App} ist zwar konstant, allerdings sinkt die relative Änderung im Vergleich zu $k_{+\text{CO}}^{\text{R}}$ mit steigender CO-Konzentration. Auf logarithmischer Skala ist Δk_{App} somit bei hohen CO-Konzentrationen weniger ausgeprägt als bei niedrigen CO-Konzentrationen. Bei $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$ wirkt Δk_{App} ungefähr 9 mal breiter als bei $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$:

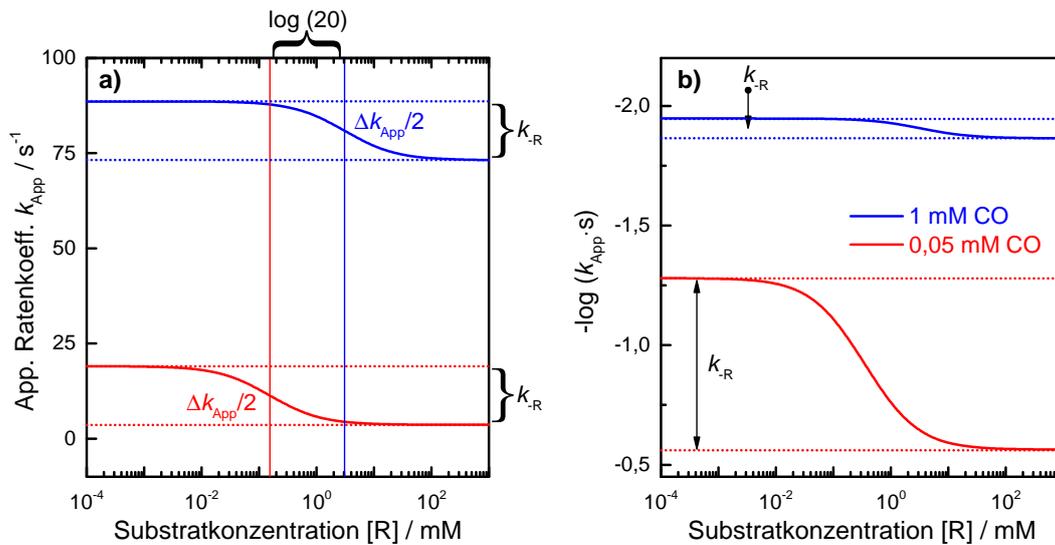


Abbildung 4.13: a) Der apparente Ratenkoeffizient k_{App} bei $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$ und $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$. b) Bei logarithmierter y-Achse wird offensichtlich, warum die Änderung von k_{App} bei $[\text{CO}] = 1 \text{ mM}$ in den Messdaten geringer erscheint als bei $[\text{CO}] = 0,05 \text{ mM}$. Für die simulierten Kurven wurden für $k_{+\text{CO}}$ und $k_{+\text{CO}}^{\text{R}}$ die selben Parameter benutzt wie in Abbildung 4.12 und für $k_{-\text{R}}$ und $\hat{k}_{+\text{R}}$ die durch den Fit ermittelten Werte.

$$\frac{\log\left(\frac{\hat{k}_{+\text{CO}}^R \cdot 0,05 \text{ mM} + k_{-\text{R}}}{\hat{k}_{+\text{CO}}^R}\right)}{\log\left(\frac{\hat{k}_{+\text{CO}}^R \cdot 1 \text{ mM} + k_{-\text{R}}}{\hat{k}_{+\text{CO}}^R}\right)} \approx 9. \quad (4.27)$$

Eine Verlangsamung der Rückbindung der substratgebundenen Population ist zwar in Abbildung 4.7 bei hohen Substratkonzentrationen zu erkennen, allerdings ist der Messfehler auf die ermittelten k_{App} -Werte im Vergleich zu Δk_{App} zu groß, um die Daten wie in Abbildung 4.12 auszuwerten.

4.1.2.6. Vergleich zwischen allgemeiner Lösung und Näherungslösung

Abschließend soll die allgemeine Lösung des Modellsystems, Gleichung (4.8), mit der Lösung durch Näherung, Gleichung (4.22), verglichen werden. Im direkten Vergleich zeigt sich, dass der apparente Ratenkoeffizient k_{App} in Gleichung (4.22) dem Negativen des Eigenwerts λ_1 in Gleichung (4.8) entspricht. Abbildung 4.14 a zeigt die Differenz zwischen k_{App} und $-\lambda_1$ als prozentuale Abweichung von Δk_{App} für beide CO-Konzentrationen. Die geringe Abweichung in beiden Fällen bestätigt die Gültigkeit der Annahmen, die bei der Näherung gemacht wurde.

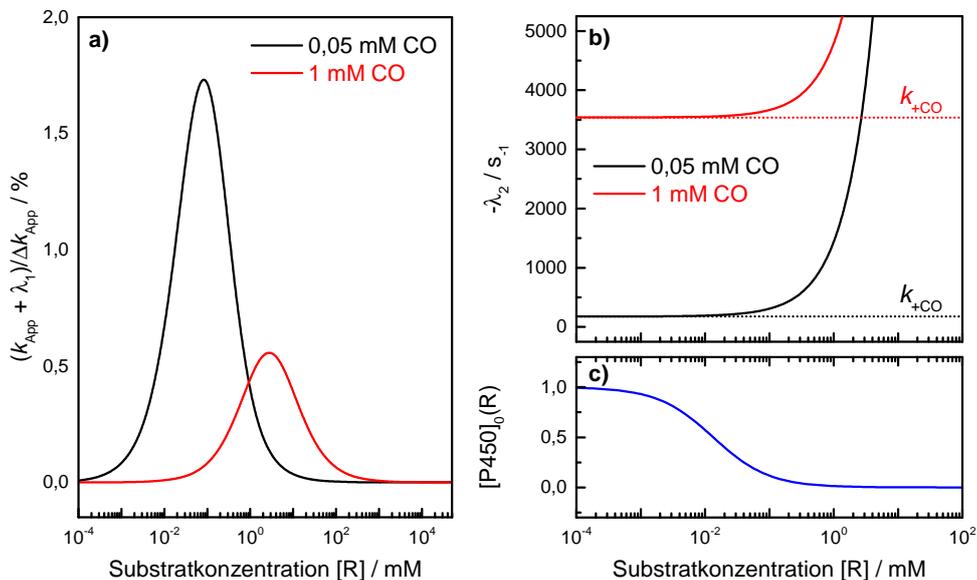


Abbildung 4.14: Vergleich zwischen allgemeiner Lösung und Näherungsverfahren. **a)** Prozentualer Fehler der Näherungslösung k_{App} im Vergleich zu $-\lambda_1$ aus der allgemeinen Lösung. **b)** Verlauf des Eigenwerts $-\lambda_2$. **c)** Auf 1 normierte Population des substratfreien Zustandes P450. Zur Simulation der Kurven wurden die aus dem Fit aus Abbildung 4.12 stammenden Werte der Ratenkoeffizienten benutzt.

Abbildung 4.14 b demonstriert den Verlauf des Eigenwerts λ_2 . Bei niedrigen Substratkonzentrationen entspricht $-\lambda_2$ dem Ratenkoeffizienten $k_{+\text{CO}}$, bis es plötzlich ab einer Substratkonzentration von $\sim 0,1$ mM zu einem starken Anstieg des Eigenwerts kommt. Der rasante Anstieg ist in der Praxis allerdings irrelevant. Er beschreibt keine messbare CO-Rückbindung mehr, sondern die linear mit der Substratkonzentration wachsende Substratassoziation mit $k_{+\text{R}}$. Wie in Abbildung 4.14 c, die den Verlauf der auf 1 normierten Population des substratfreien Zustandes P450 beschreibt, zu sehen ist, setzt das Wachstum erst ein, wenn der P450-Zustand annähernd leer ist. Das Näherungsverfahren zeigt sich also auch in diesem Fall als valide.

4.2. iNOS_{P450}/iNOS_{P420}-Konversionskinetiken

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Konversion zwischen den beiden iNOS_{oxy}-CO-Spezies iNOS_{P450} und iNOS_{P420} untersucht. Bei dem Konversionsprozess handelt es sich um einen im Vergleich zur im vorherigen Abschnitt untersuchten CO-Rückbindung sehr langsamen Prozess über mehrere Stunden. Die Messreihen wurden mit iNOS_{oxy}-CO (Unterabschnitt 4.2.1), mit iNOS_{oxy}-CO in Gegenwart von Substrat (Unterabschnitt 4.2.2), sowie mit durch Urea monomerisiertem iNOS_{oxy}-CO (Unterabschnitt 4.2.3) durchgeführt. Der zeitliche Nullpunkt einer Messung ist durch die Reduktion des Hämeisens bestimmt, also entweder durch die Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit zur Probelösung mit iNOS_{oxy} im Met-Zustand, oder durch Zugabe des Proteins im Met-Zustand zur Urea- und Natriumdithionit-haltigen Pufferlösung. Der Übergang vom Met-Zustand in den CO-gebundenen Zustand kann auf der Zeitskala der Konversionskinetiken vernachlässigt werden. Da es sich bei der iNOS_{P450}/iNOS_{P420}-Konversion nach bisherigem Wissensstand um eine (De-)Protonierung des Thiolats des proximalen Cysteins (C194) handelt [51, 59], wurden die Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Temperatur der Probe wurde jeweils konstant bei 20 °C gehalten.

Die Bearbeitung der Messdaten ist in Abbildung 4.15 demonstriert. Vor Zugabe des Proteins zur Pufferlösung wurde ein Untergrundspektrum der Küvette inklusive Pufferlösung aufgenommen, das von allen folgenden Spektren subtrahiert wurde. Da die Soret-Banden der beiden Proteinspezies gut voneinander getrennt sind und keine Veränderung der Bandenbreiten beobachtet werden konnte, ist die Absorption bei 444 nm (421 nm) näherungsweise proportional zur Population der iNOS_{P450}- (iNOS_{P420}-) Spezies (Abb. 4.15 a). Auftragung der Absorptionswerte in Abhängigkeit der Zeit resultiert in zwei komplementären Populationskinetiken (Abb. 4.15 b). Aufgrund der Komplementarität werden im weiteren Verlauf der Arbeit nur Kinetiken der iNOS_{P420}-Spezies gezeigt. Um unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben Rechnung zu tragen, wurden die Kinetiken auf die Gesamtpopulation normiert:

$$A_{P420}^{\text{Norm}}(t) = \frac{A_{P420}(t)}{A_{P420}(t) + A_{P450}(t)}. \quad (4.28)$$

Unterschiedliche Größen der Extinktionskoeffizienten aller beteiligten Proteinspezies ($\epsilon_{P450/S}$, ϵ_{P420}) spielen bei der nun folgenden qualitativen Auswertung der Messdaten eine vernachlässigbare Rolle.

4.2.1. Konversionskinetiken ohne Substrat

Die Konversionskinetiken von iNOS_{oxy}-CO wurden in einem pH-Bereich von 7,0 bis 7,6 aufgenommen. Außerhalb dieses Bereichs zeigte sich das Protein, übereinstimmend mit Berichten von Sabath et al. [51], als instabil. Auch im eigentlich stabilen pH-Bereich kam es bei einigen Proben nach einer Messzeit von mehreren Stunden zur De-

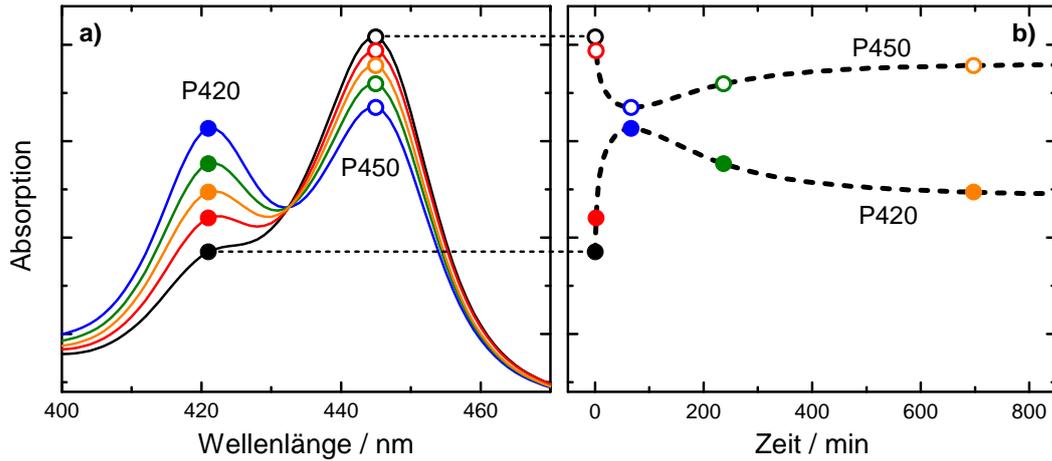


Abbildung 4.15: a) Mit zeitlichem Abstand aufgenommene Absorptionsspektren einer $i\text{NOS}_{\text{oxy-CO}}$ Probe. b) Zeitabhängige Auftragung der Absorptionsmaxima der Soret-Banden bei 444 nm und 421 nm ergeben die Konversionskinetiken der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ - und $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies.

naturierung des Proteins, was mit einem plötzlichen Anstieg der P420-Population beziehungsweise einem Abfall der P450-Population einherging. Diese Messungen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Pro pH-Wert wurden mehrere Messreihen aufgenommen. Die Kinetiken zeigten zwar stets dieselbe Grundcharakteristik, waren jedoch nie exakt deckungsgleich.

Abbildung 4.16 zeigt je eine beispielhafte Kinetik für jeden vermessenen pH-Wert. Der Verlauf der Kinetiken lässt sich in zwei Abschnitte aufteilen. Der erste Abschnitt, ein steiler Anstieg der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population, weist eine eindeutige pH-Abhängigkeit auf. Einerseits nimmt die maximal beobachtete $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population mit steigendem pH ab, andererseits nimmt die Zeit bis zum Erreichen dieser Population zu. Der zweite Abschnitt, ein langsamer Abfall der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population, weist eine andere Charakteristik auf. Von pH 7,0 bis 7,3 verlaufen die Kurven näherungsweise parallel. Der Abbau der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population scheint demnach keiner intrinsischen pH-Abhängigkeit zu unterliegen. Bei pH 7,4 kommt es zu einem Bruch der Charakteristik. Der Abbau der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population ist nun etwas geringer ausgeprägt, wobei sich bei weiter steigendem pH wieder eine Parallelität der Kurven zeigt.

Die Kinetiken lassen sich mathematisch durch eine dreifache Exponentialfunktion mit den Ratenkoeffizienten k_1 , k_2 , k_{Re} , den zugehörigen Amplituden A_1 , A_2 , A_{Re} , sowie der normierten Grundabsorption A_0 des Spektrums bei $t = 0$ beschreiben:

$$f(t) = A_1 \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-k_2 t}) + A_{\text{Re}} \cdot e^{-k_{\text{Re}} t} + A_0. \quad (4.29)$$

Die Parameter der Fits der Funktion an alle aufgenommenen Kinetiken finden sich in Tabelle 4.2 und grafisch dargestellt in Abbildung 4.17.

Der anfängliche Anstieg der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population kann durch die zwei Prozesse mit den Ratenkoeffizienten k_1 und k_2 beschrieben werden, die anschließende Abnahme

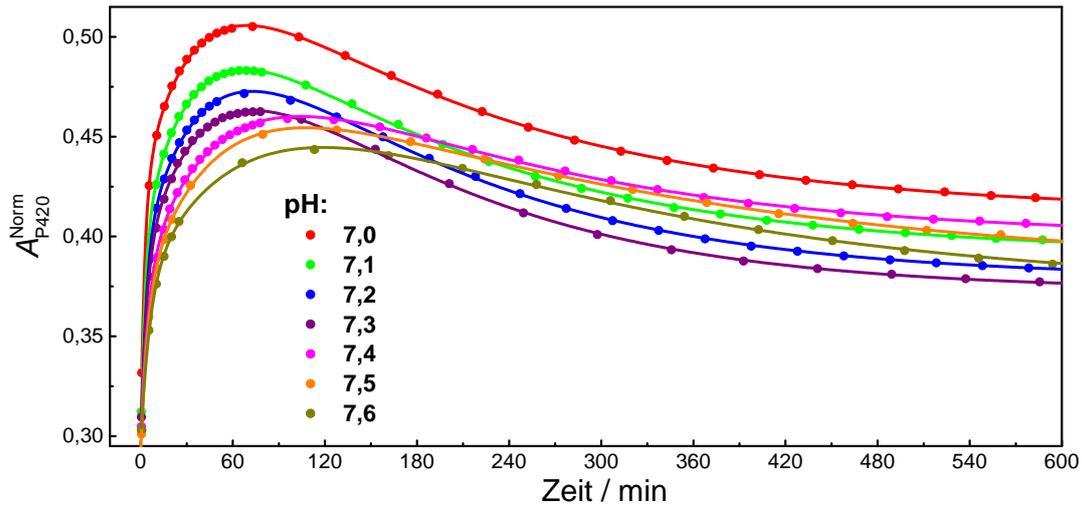


Abbildung 4.16: Ausgesuchte Konversionskinetiken der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies bei verschiedenen pH-Werten. Datenpunkte: nach Gleichung (4.28) normierte Rohdaten. Linien: Fits mit Gleichung (4.29).

der Population durch den Prozess mit dem Ratenkoeffizienten k_{Re} . Die Ratenkoeffizienten der drei Prozesse unterscheiden sich jeweils um circa eine Größenordnung ($k_1 > k_2 > k_{\text{Re}}$). Sowohl der Ratenkoeffizient k_1 als auch die Amplitude A_1 des ersten Prozesses weisen einen pH-abhängigen Trend auf. Je höher der pH, desto geringer der Ratenkoeffizient und die Amplitude. Bei dem zweiten Prozess zeigt sich dieser Trend nur am Ratenkoeffizienten k_2 , nicht jedoch an der Amplitude A_2 . Ratenkoeffizient k_{Re} und Amplitude A_{Re} des dritten Prozesses lassen keine pH-Abhängigkeit erkennen. Allerdings zeigt sich eine Korrelation zwischen den Werten der Amplituden A_2 und A_{Re} .

In Unterabschnitt 4.1.1 konnten bereits überzeugende Hinweise dafür gefunden werden, dass der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Zustand aus zwei Subzuständen besteht. Das hier beobachtete Anwachsen und anschließende Abfallen der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population beziehungsweise das komplementäre Abfallen und Anwachsen der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Population ist ein weiteres Indiz dafür. Eine Form der Kinetiken wie in Abbildung 4.16 kann keinen Äquilibrierungsprozess eines Ungleichgewichts zwischen nur zwei Zuständen darstellen. Allerdings genügt auch ein Dreizustandssystem, bestehend aus P450^{S} , P450^{I} und P420 , nicht zur Beschreibung der Kinetiken. Es muss also (mindestens) ein weiterer Zustand eingeführt werden. Aus Symmetriegründen empfiehlt sich der Ansatz, den $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Zustand ebenfalls in zwei Subzustände zu unterteilen, P420^{I} und P420^{S} . Somit ergibt sich das in Abbildung 4.18 a gezeigte Vierzustandsmodell mit acht empirisch eingeführten Ratenkoeffizienten zur Kopplung der Zustände. Das Modellsystem ist zwar mathematisch identisch zu dem System aus Abbildung 4.11 a, allerdings lassen sich in diesem Fall keine gerechtfertigten Annahmen zur Vereinfachung des Systems oder Anwendung von Näherungsverfahren finden. Es muss also versucht werden, eine abstrakte Beschreibung der Messdaten zu finden.

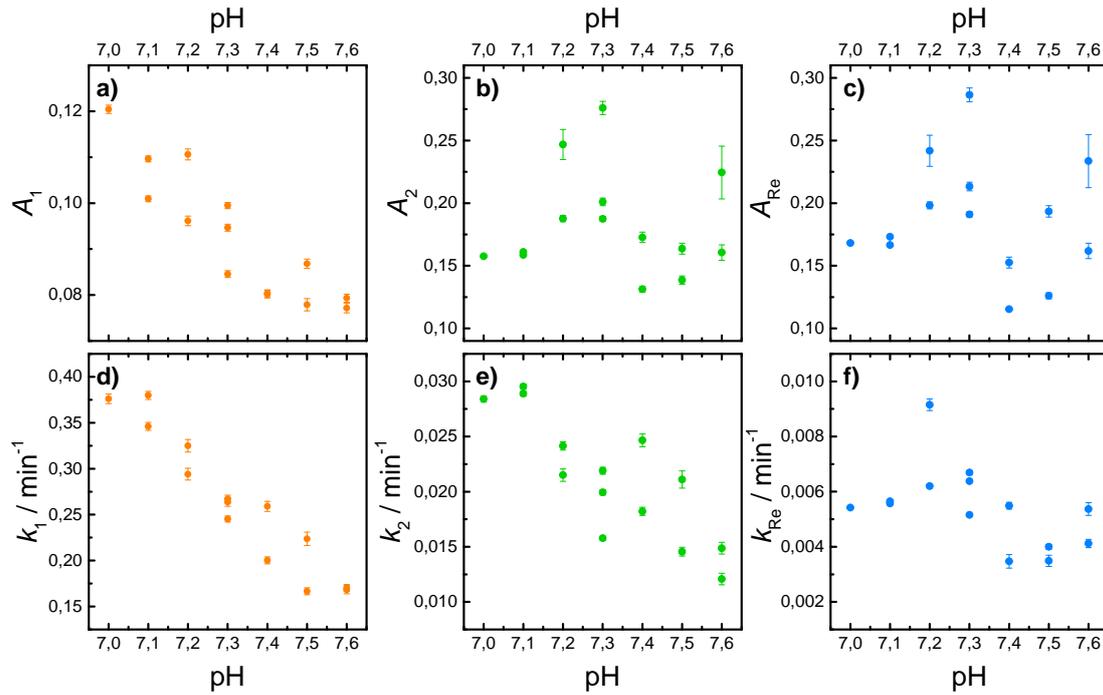


Abbildung 4.17: Amplituden und Ratenkoeffizienten aus Fits mit Gleichung (4.29) an die Konversionskinetiken. **(a, b, c)** Amplituden A_1 , A_2 und A_{Re} . **(d, e, f)** Ratenkoeffizienten k_1 , k_2 und k_{Re} .

Zum Zeitpunkt $t = 0$ befindet sich das gesamte Protein im $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Zustand, aufgeteilt auf die beiden Subzustände P450^{S} und P450^{I} . Eine naheliegende und einfache Interpretation der beiden schnellen pH-abhängigen Prozesse (k_1 , k_2) ist die Assoziation mit der Äquilibration der beiden Subgleichgewichte $\text{P450}^{\text{S}} \rightarrow \text{P420}^{\text{S}}$ und $\text{P450}^{\text{I}} \rightarrow \text{P420}^{\text{I}}$, wobei aus den Daten noch nicht hervorgeht, welches Subgleichgewicht mit welchem Prozess in Verbindung gebracht werden kann. Die Besetzung der beiden $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Subzustände muss allerdings zu einem Ungleichgewicht zwischen eben diesen Subzuständen geführt haben. Dessen Äquilierungsprozess ist ratenlimitierend für den Regenerationsprozess (k_{Re}), der erst durch erneute, dynamische Äquilibration der beiden $i\text{NOS}_{\text{P450}}/i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Subgleichgewichte in den Messdaten sichtbar wird.

Um eine Aussage darüber machen zu können, welcher der beiden $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Subzustände nach Besetzung durch die schnellen Prozesse überpopuliert ist, bietet sich wieder die Blitzlichtphotolyse an. Wie in Abbildung 4.5 zu erkennen ist, kann anhand einer CO-Rückbindungskinetik von substratgebundenem $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ zwischen den beiden $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Subzuständen unterschieden werden. Durch sofortiges Messen einer CO-Rückbindungskinetik nach Zugabe von Substrat kann demnach eine Momentaufnahme der Populationsgrößen der beiden $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Subzustände einer Probe bestimmt werden. Dies wurde bei zwei identisch hergestellten Proben (pH 7,1) an zwei verschiedenen Zeitpunkten der Konversionskinetik durchgeführt (Abb. 4.19 a). Der ersten Probe wurde Substrat während der Phase steigender $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population nach 12 min

Tabelle 4.2: Ratenkoeffizienten und Amplituden aus Fits mit Gleichung (4.29) an die Messdaten der Konversionskinetiken (Abb. 4.16). Die drei beobachteten Prozesse weisen charakteristische Zeiten von $t_1 = \frac{1}{k_1} \approx 3 - 6$ min, $t_2 = \frac{1}{k_2} \approx 35 - 70$ min und $t_3 = \frac{1}{k_3} \approx 200$ min auf.

pH	k_1	k_2	k_{Re}	
	min ⁻¹			
7,0	0,376 ± 0,005	0,0284 ± 0,0003	0,00542 ± 0,00004	
7,1	0,379 ± 0,004	0,0289 ± 0,0002	0,00557 ± 0,00002	
7,1	0,346 ± 0,004	0,0295 ± 0,0002	0,00565 ± 0,00003	
7,2	0,294 ± 0,006	0,0215 ± 0,0006	0,0092 ± 0,0002	
7,2	0,325 ± 0,007	0,0242 ± 0,0003	0,0062 ± 0,0001	
7,3	0,267 ± 0,004	0,0199 ± 0,0002	0,00516 ± 0,00004	
7,3	0,245 ± 0,003	0,0158 ± 0,0001	0,00638 ± 0,00006	
7,3	0,264 ± 0,005	0,0219 ± 0,0003	0,00669 ± 0,00007	
7,4	0,200 ± 0,004	0,0182 ± 0,0003	0,0055 ± 0,0001	
7,4	0,259 ± 0,005	0,0247 ± 0,0005	0,0035 ± 0,0002	
7,5	0,167 ± 0,004	0,0146 ± 0,0004	0,0040 ± 0,0001	
7,5	0,224 ± 0,007	0,0211 ± 0,0008	0,0035 ± 0,0002	
7,6	0,170 ± 0,004	0,0121 ± 0,0005	0,0054 ± 0,0002	
7,6	0,168 ± 0,004	0,0149 ± 0,0005	0,0041 ± 0,0002	

pH	A_1	A_2	A_{Re}	A_0
	Normierte Absorption			
7,0	0,1204 ± 0,0009	0,158 ± 0,001	0,168 ± 0,001	0,134 ± 0,001
7,1	0,1096 ± 0,0006	0,1586 ± 0,0006	0,1732 ± 0,0008	0,1172 ± 0,0009
7,1	0,1010 ± 0,0006	0,1610 ± 0,0007	0,1666 ± 0,0008	0,1297 ± 0,0009
7,2	0,096 ± 0,001	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,05 ± 0,01
7,2	0,111 ± 0,001	0,188 ± 0,003	0,191 ± 0,003	0,080 ± 0,003
7,3	0,095 ± 0,0001	0,187 ± 0,002	0,191 ± 0,002	0,106 ± 0,002
7,3	0,0995 ± 0,0007	0,276 ± 0,005	0,286 ± 0,006	0,0010 ± 0,0002
7,3	0,0846 ± 0,0007	0,201 ± 0,003	0,213 ± 0,003	0,087 ± 0,003
7,4	0,0804 ± 0,0008	0,173 ± 0,004	0,153 ± 0,004	0,147 ± 0,004
7,4	0,0802 ± 0,0008	0,131 ± 0,002	0,115 ± 0,001	0,173 ± 0,001
7,5	0,087 ± 0,001	0,164 ± 0,004	0,193 ± 0,005	0,094 ± 0,005
7,5	0,078 ± 0,001	0,139 ± 0,003	0,126 ± 0,002	0,166 ± 0,002
7,6	0,0793 ± 0,0009	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,05 ± 0,02
7,6	0,077 ± 0,001	0,161 ± 0,006	0,162 ± 0,006	0,135 ± 0,006

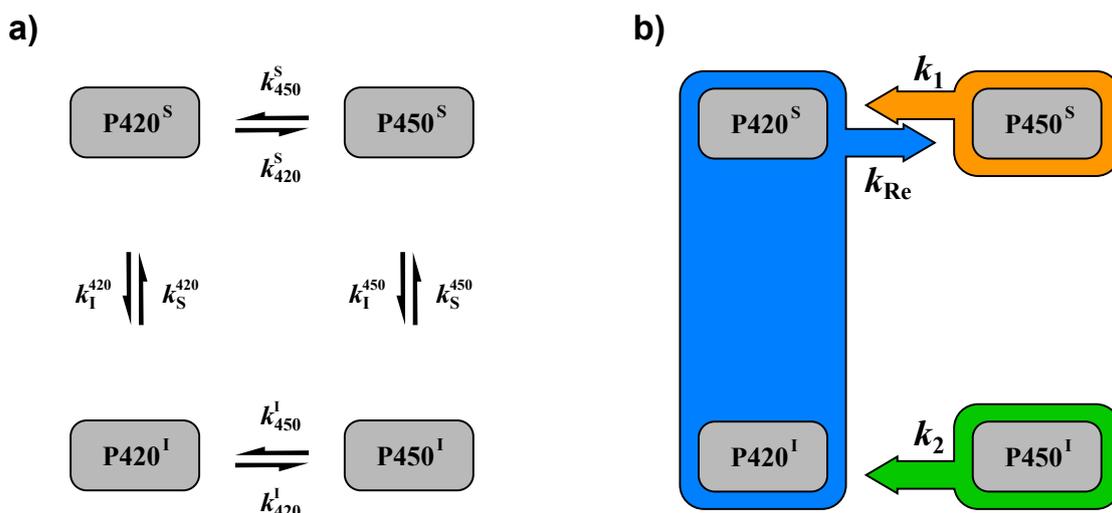


Abbildung 4.18: a) Vierzustandssystem, bestehend aus den Subzuständen P450^{S} und P450^{I} , sowie den postulierten Subzuständen P420^{S} und P420^{I} . Die Zustände sind durch acht empirisch eingeführte Ratenkoeffizienten gekoppelt. Das Ratenkoeffizientenpaar $k_{450}^{\text{S}}/k_{420}^{\text{S}}$ ($k_{450}^{\text{I}}/k_{420}^{\text{I}}$) beschreibt das horizontal dargestellte Gleichgewicht $\text{P450}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{S}}$ ($\text{P450}^{\text{I}}/\text{P420}^{\text{I}}$). Das Ratenkoeffizientenpaar $k_{\text{S}}^{450}/k_{\text{I}}^{450}$ ($k_{\text{S}}^{420}/k_{\text{I}}^{420}$) beschreibt das vertikal dargestellte Gleichgewicht $\text{P450}^{\text{S}}/\text{P450}^{\text{I}}$ ($\text{P420}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{I}}$). b) Interpretation der drei beobachteten Prozesse mit den apparenten Ratenkoeffizienten k_1 , k_2 und k_{Re} .

zugegeben, der zweiten Probe während der $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Regenerationsphase nach 3 h.

Abbildung 4.19 b zeigt CO-Rückbindungskinetiken der beiden Proben vor und nach Substratzugabe. Eine MEM-Analyse der Rückbindungskinetiken wie in Abbildung 4.5 b war nicht erfolgreich, daher wurden gestreckte exponentielle Fitfunktionen der Form $f(t) = A \cdot e^{-\left(\frac{t}{t_0}\right)^\beta}$ zur quantitativen Beschreibung der Daten benutzt (nach Gleichung (2.6), A: Amplitude).

Wie erwartet, sind die Rückbindungskinetiken vor Substratzugabe identisch; ohne Substrat kann anhand der CO-Rückbindungskinetiken nicht zwischen P450^{S} und P450^{I} unterschieden werden. Die Fits einer einfachen gestreckten Exponentialfunktion an die beiden Rückbindungskinetiken ergeben im Rahmen der Fehler identische Parameter von $A = -1,04 \pm 0,01$, $\langle k_{+\text{CO}} \rangle = 3830 \pm 56 \text{ s}^{-1}$ und $\beta = 0,82 \pm 0,01$, beziehungsweise $A = -1,03 \pm 0,01$, $\langle k_{+\text{CO}} \rangle = 3736 \pm 54 \text{ s}^{-1}$ und $\beta = 0,84 \pm 0,02$. Nach Substratzugabe weichen die Rückbindungskinetiken deutlich voneinander ab. Um die Verteilung der beiden Proteinspezies zu ermitteln, wurde eine zweifache gestreckte exponentielle Fitfunktion benutzt. Für einen stabilen Fit wurden die Ratenkoeffizienten der CO-Rückbindung von P450^{I} ($k_{+\text{CO}}^{\text{R}} = 34,4 \pm 2,8 \text{ s}^{-1}$) und P450^{S} ($k_{+\text{CO}}^{\text{R}} = 4,22 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$) aus Unterabschnitt 4.1.1 verwendet und mit einem Faktor 20 multipliziert, um die CO-Konzentration von 1 mM zu berücksichtigen. Die Streckfaktoren ($\beta_{\text{P450}^{\text{I}}} = 0,50 \pm 0,03$, $\beta_{\text{P450}^{\text{S}}} = 0,88 \pm 0,09$) wurden global an beide Kurven gefittet. Für die 12 min alte Probe ergeben sich Amplituden von $A_{\text{P450}^{\text{I}}} = -0,72 \pm 0,03$ und $A_{\text{P450}^{\text{S}}} = -0,32 \pm 0,03$,

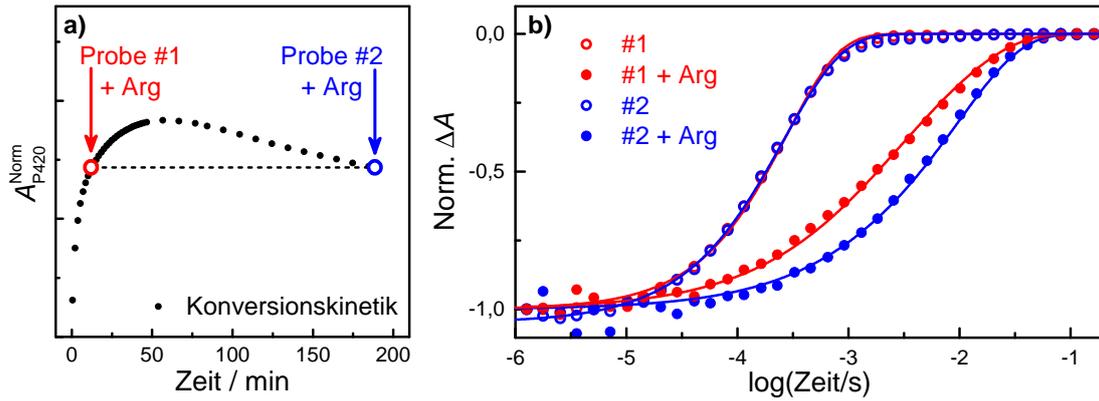


Abbildung 4.19: $P450^I/P450^S$ -Populationen zu verschiedenen Zeitpunkten einer Konversionskinetik. **a)** Zeitpunkt der Substratzugabe (1,25 mM) zu den identisch bei pH 7,1 angefertigten Proben. Probe #1 (#2) nach 12 min (3 h). **b)** Leere Datenpunkte: CO-Rückbindungskinetiken direkt vor Substratzugabe mit Fit einer gestreckten Exponentialfunktion (Linien). Gefüllte Datenpunkte: CO-Rückbindungskinetiken direkt nach Substratzugabe mit Fit einer zweifachen gestreckten Exponentialfunktion (Linien).

was einem $P450^S/P450^I$ -Verhältnis von $\sim 30/70$ entspricht. Für die 3 h alte Probe ergeben sich Amplituden von $A_{P450^I} = -0,41 \pm 0,04$ und $A_{P450^S} = -0,64 \pm 0,03$, was einem $P450^S/P450^I$ -Verhältnis von $\sim 60/40$ entspricht. Aus dem relativen Anstieg der $P450^S$ -Population lässt sich also schließen, dass der Regenerationsprozess die Folge einer Überpopulation von $P420^I$ im Vergleich zu $P420^S$ ist. Die Frage nach der Zuordnung der schnellen Prozesse (k_1, k_2) zu einem der Subgleichgewichte $P450^S/P420^S$ oder $P450^I/P420^I$ kann zwar nicht einwandfrei beantwortet werden, allerdings spricht die Korrelation der Amplituden A_2 und A_{Re} stark dafür, dass der schnellere Prozess (k_1) den Übergang zwischen $P450^S$ und $P420^S$ beschreibt und der langsamere Prozess (k_2) den Übergang zwischen $P450^I$ und $P420^I$.

Zusammenfassend ergibt sich somit die in Abbildung 4.18 b demonstrierte, stark abstrahierte Interpretation der drei beobachteten Prozesse. Motor der Prozesse ist ein globales Besetzungsungleichgewicht des Systems zum Zeitpunkt $t = 0$. Die charakteristische Form der Kinetiken ergibt sich aus den unterschiedlichen Zeitskalen, auf denen die Subungleichgewichte äquilibriert werden. Das pH-abhängige *fine tuning* ist durch die Äquilibrierung der $i\text{NOS}_{P450}/i\text{NOS}_{P420}$ -Subungleichgewichte bestimmt, die auffällige $i\text{NOS}_{P450}$ -Regeneration durch die Äquilibrierung zwischen $P420^I$ und $P420^S$. Letzteres ist allerdings auf ein bereits zum Zeitpunkt $t = 0$ bestehendes Ungleichgewicht zwischen $P450^I$ und $P450^S$ zurückzuführen. Da die Besetzung von $P450^I$ und $P450^S$ bei $t = 0$ dem Gleichgewichtszustand der Met-Spezies von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ entspricht (Zeit des Übergangs von Met-Zustand in CO-gebundenen Zustand kann vernachlässigt werden), zeigen die Kinetiken also, dass das $P450^S/P450^I$ -Subgleichgewicht im CO-gebundenen Zustand stark auf Seiten von $P450^S$ liegt. Der direkte Austauschprozess von $P450^I$ nach $P450^S$ kann zwar aufgrund identischer Soret-Banden in den Messdaten nicht nachgewiesen werden, ist aber aufgrund der Ausprägung der beiden schnellen

Prozesse (k_1 , k_2) als ähnlich langsam zu erwarten wie auf Seiten von $i\text{NOS}_{\text{P420}}$. Diese abstrakte Interpretation der Konversionskinetiken lässt erahnen, wieso die Reproduzierbarkeit der Kurven teils unbefriedigend ist. Geringe Abweichungen der Populationen von P450^{S} und P450^{I} , des pH-Werts oder Temperatur der Probe können über die gesamte Messdauer große Effekte auf die Form der Kinetik haben.

4.2.2. Konversionskinetiken mit Substrat

In einer weiteren Messreihe wurde der Einfluss von Substrat auf die Konversionskinetiken untersucht. Es wurden jeweils drei Kinetiken bei den pH-Werten 7,1, 7,3 und 7,5 aufgenommen und nach Gleichung (4.28) normiert. Abbildung 4.20 (a: pH 7,1, b: pH 7,3, c: pH 7,5) zeigt alle gemessenen Kinetiken im Vergleich zur Kinetik des substratfreien $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ bei identischem pH aus Abbildung 4.28.

Die Kinetiken konnten wieder durch eine dreifache Exponentialfunktion nach Gleichung (4.29) beschrieben werden. Die Fitparameter finden sich in Tabelle 4.3 und in Abbildung 4.21. Offenbar ändert sich der im vorherigen Unterabschnitt erörterte, den Kinetiken zugrundeliegende Mechanismus durch die Substratbindung nicht. Es scheint lediglich zu einer Modulation einiger Ratenkoeffizienten des Modellsystems aus Abbildung 4.18 b gekommen zu sein. Im direkten Vergleich der Fitparameter der drei apparenten Prozesse zwischen substratfrei und substratgebunden (Abb. 4.21) zeigt sich, dass hauptsächlich die Amplitude A_1 des schnellsten Prozesses betroffen ist. Sie ist ungefähr um einen Faktor 2 kleiner als im substratfreien Fall, was sich in den Kinetiken in einer niedrigeren maximalen $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Population äußert (Abb. 4.20). Weiter

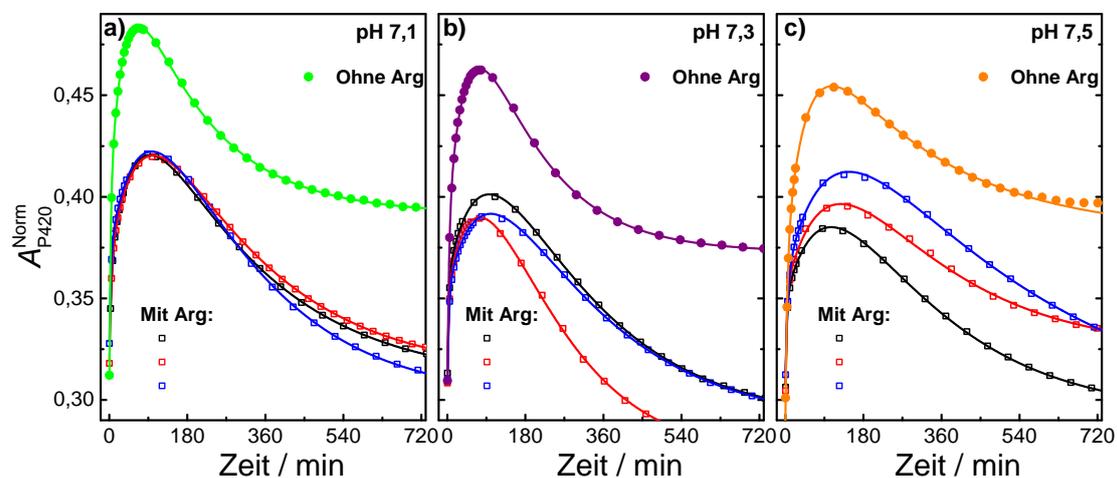


Abbildung 4.20: Konversionskinetiken der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies in Gegenwart von Substrat bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zu substratfreiem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$. Datenpunkte: nach Gleichung (4.28) normierte Rohdaten. Linien: Fits mit Gleichung (4.29). **a)** pH 7,1. **b)** pH 7,3. **c)** pH 7,5.

fällt auf, dass keine pH-Abhängigkeit des schnellsten Prozesses mehr nachweisbar ist. Der Ratenkoeffizient des zweiten Prozesses (k_2) ist tendenziell etwas geringer als bei substratfreiem Protein, alle übrigen Parameter (k_1 , A_2 , k_{Re} , A_{Re}) weisen keine erkennbaren Unterschiede auf.

Zusammenfassend scheint die Substratbindung also vorwiegend einen Einfluss auf das $\text{P450}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{S}}$ -Subgleichgewicht zu haben, das stärker in Richtung P450^{S} verschoben ist und sich weniger abhängig vom pH-Wert der Probe zeigt. Die restlichen Subgleichgewichte bleiben weitgehend unbeeinflusst. Übereinstimmend mit der Literatur [54, 55, 171] bewies sich substratgebundenes $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ stabiler in seiner Struktur als substratfreies $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$; in keiner der neun Konversionskinetiken kam es zu Denaturierungsprozessen.

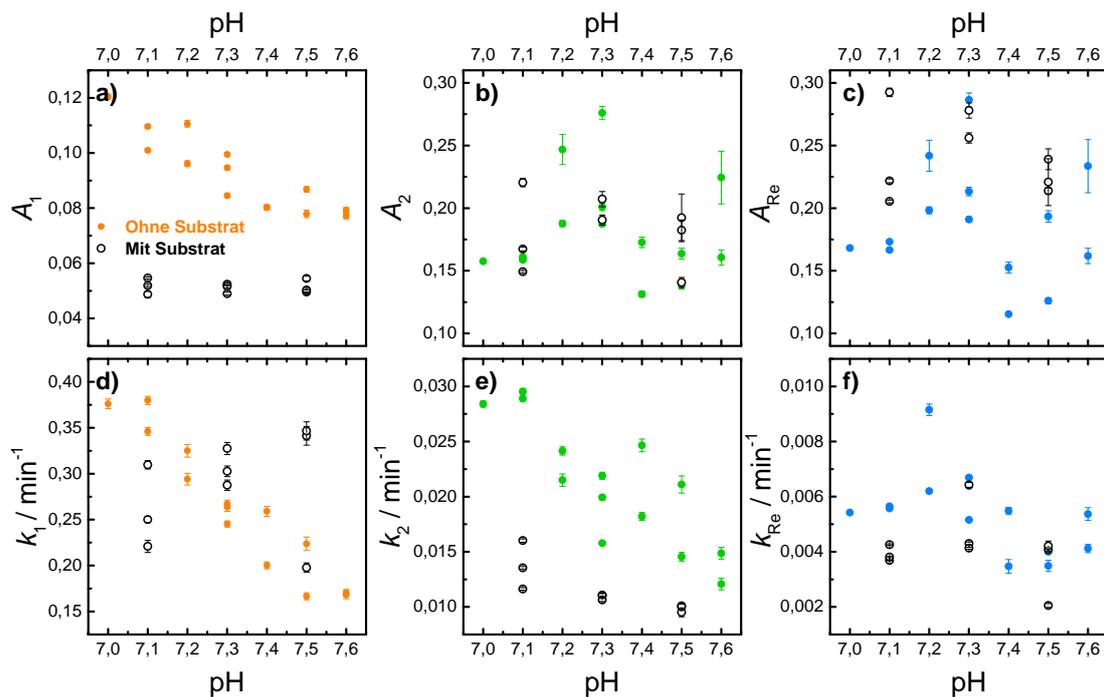


Abbildung 4.21: Amplituden und Ratenkoeffizienten aus Fits mit Gleichung (4.29) an die Messdaten der Konversionskinetiken in Gegenwart von Substrat (schwarze Datenpunkte). Zum Vergleich sind die Werte des substratfreien Proteins aus Abbildung 4.17 ebenfalls aufgetragen (farbige Datenpunkte). (a, b, c) Amplituden A_1 , A_2 und A_{Re} . (d, e, f) Ratenkoeffizienten k_1 , k_2 und k_{Re} .

Tabelle 4.3: Ratenkoeffizienten und Amplituden aus Fits mit Gleichung (4.29) an die Messdaten der Konversionskinetiken mit Substrat (Abb. 4.20).

pH	k_1	k_2	k_{Re}		
	min^{-1}				
7,1	$0,221 \pm 0,006$	$0,0160 \pm 0,0001$	$0,00369 \pm 0,00002$		
7,1	$0,250 \pm 0,002$	$0,0136 \pm 0,0001$	$0,00381 \pm 0,00002$		
7,1	$0,310 \pm 0,005$	$0,0116 \pm 0,0001$	$0,00426 \pm 0,00003$		
7,3	$0,303 \pm 0,006$	$0,0110 \pm 0,0002$	$0,00430 \pm 0,00005$		
7,3	$0,327 \pm 0,006$	$0,0111 \pm 0,0002$	$0,00643 \pm 0,00009$		
7,3	$0,288 \pm 0,006$	$0,0106 \pm 0,0001$	$0,00413 \pm 0,00003$		
7,5	$0,34 \pm 0,01$	$0,0101 \pm 0,0003$	$0,00408 \pm 0,00007$		
7,5	$0,35 \pm 0,01$	$0,0095 \pm 0,0004$	$0,0042 \pm 0,0002$		
7,5	$0,198 \pm 0,005$	$0,0100 \pm 0,0003$	$0,00205 \pm 0,00007$		
pH	A_1	A_2	A_{Re}	A_0	
	Normierte Absorption				
7,1	$0,049 \pm 0,001$	$0,1493 \pm 0,0009$	$0,205 \pm 0,001$	$0,111 \pm 0,001$	
7,1	$0,0547 \pm 0,0004$	$0,167 \pm 0,001$	$0,222 \pm 0,001$	$0,090 \pm 0,001$	
7,1	$0,0519 \pm 0,0004$	$0,220 \pm 0,003$	$0,292 \pm 0,003$	$0,028 \pm 0,003$	
7,3	$0,0524 \pm 0,0005$	$0,207 \pm 0,006$	$0,278 \pm 0,006$	$0,030 \pm 0,003$	
7,3	$0,0516 \pm 0,0005$	$0,37 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$	$-0,15 \pm 0,02$	
7,3	$0,0490 \pm 0,0005$	$0,191 \pm 0,004$	$0,256 \pm 0,004$	$0,049 \pm 0,004$	
7,5	$0,0495 \pm 0,0008$	$0,182 \pm 0,008$	$0,239 \pm 0,008$	$0,061 \pm 0,008$	
7,5	$0,0545 \pm 0,0008$	$0,19 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	
7,5	$0,0503 \pm 0,0007$	$0,141 \pm 0,004$	$0,214 \pm 0,003$	$0,095 \pm 0,003$	

4.2.3. Konversionskinetiken mit Urea

Der langsame Äquilibrierungsprozess zwischen P420^{I} und P420^{S} deutet auf eine integrale Änderung der Struktur von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ hin. Um dies weiter zu untersuchen, wurden in einer letzten Messreihe die Kinetiken von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ bei aufgebrochener Homodimerstruktur aufgenommen. Dafür wurde der Probelösung Urea in einer Konzentration von 5 M zugesetzt. Bei einer solch hohen Ureakonzentration wird das Homodimer monomerisiert, ohne dass die strukturelle Integrität der einzelnen Protomere beeinträchtigt ist [48, 57]. Die Messungen wurden wieder bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

Die nach Gleichung (4.28) normierten Kinetiken von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ in Anwesenheit von Urea finden sich in Abbildung 4.22 a. Wie sofort auffällt, lassen alle Kinetiken den $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Regenerationsprozess vermissen. Stattdessen weist jede Kinetik, unabhän-

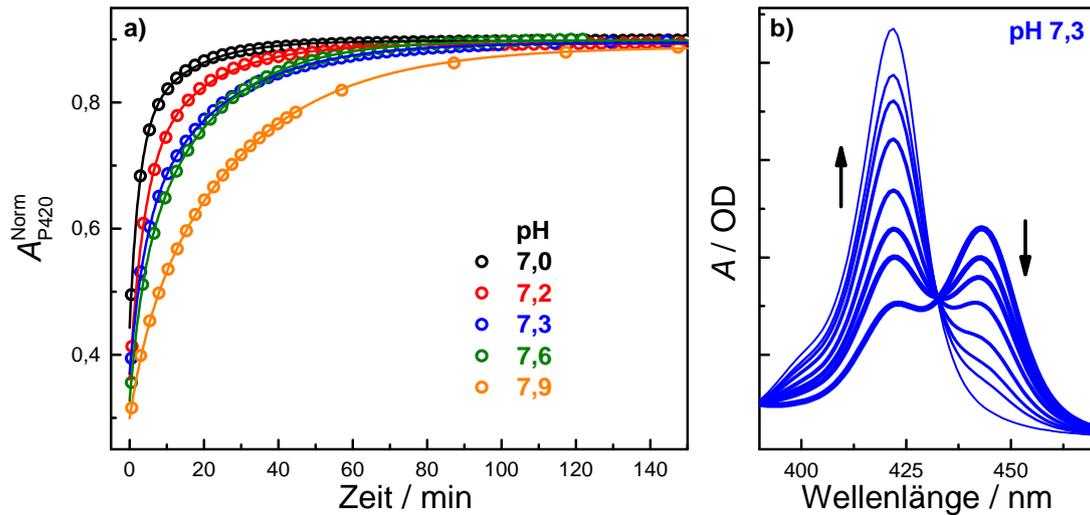


Abbildung 4.22: a) Konversionskinetiken der $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Spezies mit Urea bei verschiedenen pH-Werten. Datenpunkte: nach Gleichung (4.28) normierte Rohdaten. Linien: Fits mit Gleichung (4.30). b) Ausgewählte Absorptionsspektren einer Probe mit Urea bei pH 7,3.

gig vom pH-Wert, einen vollständigen Übergang in den $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Zustand auf. Abbildung 4.22 b zeigt dies beispielhaft anhand einiger ausgewählter Absorptionsspektren der Probe bei pH 7,3. Der fehlenden Regenerationsprozess ermöglichte es, einen etwas größeren pH-Bereich zu vermessen, da es während der kürzeren Messdauer der Kinetiken seltener zur Denaturierung des Proteins kam.

Die Kinetiken können in Anlehnung an Gleichung 4.29 durch eine zweifache Exponentialfunktion mit den Ratenkoeffizienten k_1 , k_2 und den Amplituden A_1 , A_2 und A_0 beschrieben werden:

$$f(t) = A_1 \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-k_2 t}) + A_0. \quad (4.30)$$

Die Werte der Fitparameter finden sich in Tabelle 4.4 und in Abbildung 4.23. Die Ratenkoeffizienten k_1 und k_2 sind in der gleichen Größenordnung wie bei den Kinetiken ohne Urea (Tab. 4.2, Tab. 4.3), was vermuten lässt, dass es sich um die selben Prozesse handelt (Abb. 4.18 b). Sowohl k_1 , als auch k_2 weisen eine leichte pH-Abhängigkeit auf. Mit steigendem pH-Wert verringern sich die beiden apparenten Ratenkoeffizienten. Die Amplitude A_1 des schnellen Prozesses nimmt, wie bei den substratfreien Kinetiken ohne Urea, mit steigendem pH ab. Allerdings sind die Werte der Amplituden mit Urea größer als ohne Urea. Dies spricht dafür, dass Urea das $\text{P450}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{S}}$ -Gleichgewicht, im Gegensatz zu Substrat, etwas in Richtung P420^{S} verschiebt. Deutlich interessanter ist allerdings die Amplitude A_2 . Während A_2 bei den Kinetiken ohne Urea über alle pH-Werte hinweg näherungsweise konstant war, zeigt sich mit Urea einerseits ein pH-abhängiger Anstieg, andererseits eine pH-unabhängige, vollständige Entleerung des $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Zustandes. Die beiden Beobachtungen sprechen im Kontext des Modellsystems aus Abbildung 4.18 b für einen (Urea-induzierten) direkten und vollständigen

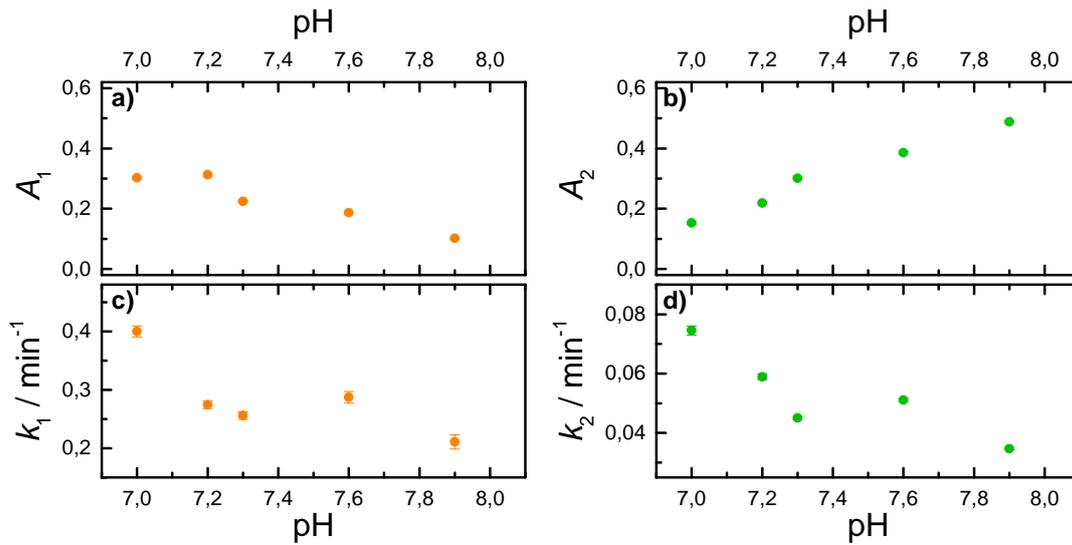


Abbildung 4.23: Amplituden und Ratenkoeffizienten aus Fits mit Gleichung (4.30) an die Messdaten der Konversionskinetiken mit Urea aus Abbildung 4.22. **(a, b)** Amplituden A_1 und A_2 . **(c, d)** Ratenkoeffizienten k_1 und k_2 .

Konversionsprozess von P450^{S} nach P450^{I} . Die pH-Abhängigkeit der Amplitude ergibt sich aus der Konkurrenz zum pH-abhängigen Konversionsprozess P450^{S} nach P420^{S} mit dem Ratenkoeffizienten k_1 . Im Anschluss kommt es zur vollständigen Entleerung des P450^{I} -Zustandes nach P420^{I} mit dem Ratenkoeffizienten k_2 . Der Einfluss von Urea verschiebt demnach auch das $\text{P420}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{I}}$ -Gleichgewicht, hier allerdings vollständig in Richtung P420^{S} .

Die Ergebnisse der Messungen mit Urea bekräftigen die Vermutung eines strukturellen Unterschieds zwischen den $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ und $i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Zuständen. Nach Monomerisierung des Proteins ist nicht mehr P450^{S} die bevorzugte Struktur, sondern P420^{I} .

Tabelle 4.4: Ratenkoeffizienten und Amplituden aus Fits mit Gleichung (4.30) an die Messdaten der Konversionskinetiken mit Urea (Abb. 4.22 a).

pH	k_1	k_2		
	min ⁻¹			
7,0	0,400 ± 0,009	0,075 ± 0,002		
7,2	0,274 ± 0,007	0,059 ± 0,001		
7,3	0,256 ± 0,006	0,0450 ± 0,0005		
7,6	0,29 ± 0,01	0,0511 ± 0,0005		
7,9	0,21 ± 0,01	0,0357 ± 0,0003		
pH	A_1	A_2	A_0	
	Normierte Absorption			
7,0	0,303 ± 0,004	0,152 ± 0,004	0,443 ± 0,003	
7,2	0,313 ± 0,005	0,219 ± 0,005	0,362 ± 0,003	
7,3	0,224 ± 0,003	0,301 ± 0,003	0,370 ± 0,002	
7,6	0,187 ± 0,004	0,386 ± 0,004	0,327 ± 0,002	
7,9	0,101 ± 0,004	0,488 ± 0,004	0,300 ± 0,002	

4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in diesem Kapitel diskutierten Experimente an der CO-ligierten Form von iNOS_{oxy} führten zu interessanten Erkenntnissen über die beiden Proteinzustände $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ und $\text{iNOS}_{\text{P420}}$. In Abschnitt 4.1 wurde die $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ -Spezies mit der Blitzlichtphotolyse-technik untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, dass $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ in zwei Subkonformationen vorliegt, P450^{S} und P450^{I} . Die beiden Subkonformationen weisen identische Absorptionsspektren auf und konnten nur durch sich unterscheidende CO-Rückbindung bei Bindung des Substrats Arginin, des Intermediats NOHA, oder des Kofaktors H4B nachgewiesen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristik der CO-Rückbindung der beiden Subkonformationen ließ sich folgern, dass P450^{S} eine deutlich homogenere Struktur des aktiven Proteinzentrums aufweist als P450^{I} . Weiter konnte über einen Zeitraum von einigen Stunden ein vollständiger Populationsaustausch zwischen den beiden Spezies zu Gunsten von P450^{S} beobachtet werden.

Bei Untersuchungen der Abhängigkeit der CO-Rückbindung von der Konzentration des Substrats Arginin konnte festgestellt werden, dass die instabile P450^{I} -Spezies neben der inhomogeneren Struktur auch eine signifikant geringere Substrataffinität aufweist als die stabile P450^{S} -Spezies. Aufgrund dessen war es möglich, die Messdaten in Hinsicht auf die Substrataffinität der P450^{S} -Spezies unabhängig von der P450^{I} -Spezies quantitativ auszuwerten. Dabei ergaben sich die mikroskopischen Ratenkoeffizienten der Substratassoziation ($k_{+\text{R}} = 1153 \pm 71 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Substratdissoziation ($k_{-\text{R}} = 15,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$) der Deoxy-Spezies von P450^{S} . Aus den beiden mikroskopischen Ratenkoeffizienten errechnet sich direkt die Dissoziationskonstante zu $K_{\text{D}} = \frac{k_{-\text{R}}}{k_{+\text{R}}} = 13,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Dieser Wert ist im Einklang mit bereits veröffentlichten Werten der Dissoziationskonstanten der Met-Spezies von iNOS_{oxy} von $K_{\text{D}} = 9,19 \mu\text{M}$ [170] oder $K_{\text{D}} = 11 \mu\text{M}$ [47], welche allerdings nur durch Störungs-Differenzspektroskopie in Anwesenheit von Imidazol bestimmt werden konnten.

Im zweiten Abschnitt 4.2 des Kapitels wurde der Konversionsprozess zwischen den beiden iNOS_{oxy} -Spezies $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ und $\text{iNOS}_{\text{P420}}$ untersucht. Eine qualitative Interpretation der Messdaten erforderte eine zu $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ analoge Unterteilung von $\text{iNOS}_{\text{P420}}$ in die zwei Subzustände P420^{S} und P420^{I} . Der Gesamtprozess der Zustandskonversion konnte auf zwei Typen von sich überlagernden Subprozessen reduziert werden. Beim ersten Typus handelt es sich um die durch CO-Bindung getriggerten $\text{P450}/\text{P420}$ -Konversionsprozesse zwischen den jeweiligen Subzustandspaaren $\text{P450}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{S}}$ und $\text{P450}^{\text{I}}/\text{P420}^{\text{I}}$. Ohne Substrat wiesen beide Subkonversionsprozesse eine deutliche pH-Abhängigkeit auf; mit steigendem pH-Wert verlangsamte sich einerseits der Konversionsprozess, andererseits verringerten sich die in die beiden Subzustände P420^{S} und P420^{I} konvertierenden Populationen. Diese Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass es sich bei der Konversion von $\text{iNOS}_{\text{P450}}$ nach $\text{iNOS}_{\text{P420}}$ um die Protonierung des Thiolats des proximalen Cysteins (C194) aufgrund einer durch CO-Bindung getriggerten Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Cystein und einem Tryptophan (W188) handelt [51]. Allerdings lässt die geringe Geschwin-

digkeit der beiden Prozesse vermuten, dass es sich bei der Konversion nicht nur um einen simplen Protonierungsprozess handelt, sondern dass mit der Protonierung des Thiolats zusätzlich eine ratenlimitierende Konformationsänderung des Proteins einher geht. Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Untersuchung der redoxabhängigen Stabilität, Protonierung und Reaktivität von Cytochrom C Mutanten aus Hefe gemacht werden [172]. Auch bei diesem Protein kam es zu auffällig langsamen Protonierungsprozessen des hängebundenen Thiolats. Die Untersuchungen der Konversionskinetiken bei Substratbindung demonstrierten den bereits bekannten Stabilisierungseffekt von Substrat auf die $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ -Spezies; im Gleichgewichtszustand lag das $i\text{NOS}_{\text{P450}}/i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Gleichgewicht (bei gleichem pH) mit Substrat deutlich stärker auf Seiten von $i\text{NOS}_{\text{P450}}$ als ohne Substrat. Die genauere Auswertung der Messdaten zeigte interessanterweise, dass sich die Verschiebung des Gleichgewichtszustands durch Substrat hauptsächlich auf das $\text{P450}^{\text{S}}/\text{P420}^{\text{S}}$ -Subgleichgewicht zurückführen ließ. Auf das $\text{P450}^{\text{I}}/\text{P420}^{\text{I}}$ -Subgleichgewicht zeigte die Substratbindung dagegen keinen erkennbaren Effekt. Zudem scheint die Substratbindung einen dämpfenden Einfluss auf die pH-Abhängigkeit der Ratenkoeffizienten der Konversionen zu haben.

Beim zweiten Subprozessstypus der Konversionen handelt es sich um die interspezifischen Konversionsprozesse zwischen P450^{S} und P450^{I} , beziehungsweise P420^{S} und P420^{I} , die sich auf unterschiedliche Gleichgewichtszustände zwischen Met- und CO-Spezies zurückführen ließen. Während die Populationen der beiden Proteinzustände bei der Met-Spezies ähnlich groß waren, lag der Gleichgewichtszustand bei der CO-Spezies nahezu vollständig auf Seiten von P450^{S} beziehungsweise P420^{S} . Aus messtechnischen Gründen war nur der Konversionsprozess von P420^{I} nach P420^{S} direkt beobachtbar. Die lange Dauer des Prozesses über einen Zeitraum von mehreren Stunden ließ vermuten, dass es sich bei der interspezifischen Konversion um eine integrale Strukturänderung des Proteins handeln muss. Wie die Blitzlichtphotolysemessungen zeigten, hat diese Strukturänderung zwar auch einen Einfluss auf das aktive Zentrum von $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$, scheint allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit der Strukturänderung des aktiven Zentrums bei der intraspezifischen $i\text{NOS}_{\text{P450}} \leftrightarrow i\text{NOS}_{\text{P420}}$ -Konversion zu stehen. Der langsame interspezifische Konversionsprozess wies im Gegensatz zu den intraspezifischen Konversionsprozessen weder eine pH-Abhängigkeit, noch eine Substratabhängigkeit auf. Untermauert wird diese These der eher globalen Strukturänderung von der Tatsache, dass die interspezifische Konversion bei monomerisiertem $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ nicht mehr beobachtet werden konnte. Die intraspezifischen Konversionen waren dagegen nur schwach moduliert.

Die Ergebnisse dieses Kapitel geben einige Hinweise darauf, dass es sich bei den beiden $i\text{NOS}_{\text{oxy}}$ -Spezies $i\text{NOS}^{\text{I}}$ und $i\text{NOS}^{\text{S}}$ um die „loose“- und „tight“-Konformationen des NOS-Homodimers handeln könnte (Unterabschnitt 1.1.2.2). Dafür sprechen die postulierten integralen Strukturunterschiede zwischen den Spezies, sowie die Inhomogenität der Struktur des aktiven Zentrums von $i\text{NOS}^{\text{I}}$ im Vergleich zur $i\text{NOS}^{\text{S}}$ [51, 56, 57]. Auch die Bevorzugung des $i\text{NOS}^{\text{I}}$ -Zustands bei Monomerisierung des Dimers durch Urea könnte ein Indiz dafür sein [47, 52, 173]. Eine Bestätigung der Assoziation zwischen $i\text{NOS}^{\text{I}}$ und $i\text{NOS}^{\text{S}}$ und den „loose“- und „tight“-Konformationen würde zu inter-

essanten neuen Erkenntnissen führen. So ließen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass die CO-Spezies von iNOS_{oxy} unabhängig davon, ob Substrat gebunden ist oder nicht, die „tight“-Konformation stark bevorzugen würde. Mit Blick darauf wären vor allem weitere Untersuchungen der Met-Spezies ratsam, um festzustellen, ob sich das beobachtete Gleichgewicht aus iNOS^{I} und iNOS^{S} unter dem Einfluss von Substrat, Intermediat oder Kofaktor in Richtung von iNOS^{S} verschieben würde, so wie sich das „loose“/„tight“-Gleichgewicht nachweislich in Richtung „tight“ verschiebt [56]. Die hier vorgestellten Spektroskopietechniken böten eine in der Durchführung sehr einfache Methode zur quantitativen Untersuchung der iNOS_{oxy} -Konformationen in ihrer natürlichen Struktur. Sie könnte als Ergänzung zu den üblichen Methoden der Strukturaufklärung dienen, wie zum Beispiel der dynamischen Lichtstreuung (DLS) [57], Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) [56], oder komplexeren Methoden wie der Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenstrahlen [56].

5. Fazit

Stickstoffmonoxid (NO) ist zwar ein unscheinbares Molekül, es spielt jedoch eine ebenso wichtige wie vielseitige Rolle in der menschlichen Physiologie und Pathologie. Seit seiner Identifizierung im Jahre 1987 ist NO bekannt als Botenstoff der Vasodilatation, der Blutdrucksenkung durch Entspannung der Gefäßwände, als Neurotransmitter im Gehirn und als Zytotoxin zur unspezifischen Immunabwehr von Bakterien. Verantwortlich für die Synthese von NO im menschlichen Körper ist die Enzymfamilie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Sie umfasst drei Isoformen, die sich durch den Ort ihres Vorkommens, Einsatzzweck des produzierten NO und Art der Expression unterscheiden. Die eNOS findet sich in den Endothelzellen auf der Innenseite der Blutgefäße. Das von ihr hergestellte NO regelt als Botenstoff der Vasodilatation den Blutkreislauf. NO als Neurotransmitter wird von der nNOS in den Neuronen synthetisiert. Da der Bedarf an eNOS und nNOS fortwährend ist, werden beide konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz dazu steht die dritte Isoform der Familie, die iNOS. Das von ihr produzierte NO dient als Zytotoxin, weshalb die Expression des Enzyms in Makrophagen, den Polizisten des Immunsystems, nur nach Bedarf induziert wird. Die NO Synthese durch die NOS läuft bei allen drei Isoformen gleich ab. Es handelt sich um einen zweistufigen Oxidationsprozess eines Stickstoffatoms der als Substrat im Enzym gebundenen Aminosäure L-Arginin. Am Ende der Gesamtreaktion, die zwei Sauerstoffmoleküle (O_2), sowie den Kofaktor (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin (H4B) als Elektronendonator verbraucht, steht das synthetisierte NO und das Abfallprodukt L-Citrullin. Eine Besonderheit der NOS ist die enge Verknüpfung zwischen der Synthesereaktion und der Struktur des Enzyms. Diese Verknüpfung spiegelt sich in der Doppelrolle von L-Arginin und H4B wieder, die nicht nur Teil der Synthesereaktion sind, sondern auch die Homodimerstruktur des Enzyms stabilisieren, ohne die die NO Synthese nicht möglich ist. Zwar ist bereits einiges über die Familie der NOS bekannt, allerdings bestehen weiterhin große Wissenslücken bezüglich ihrer Funktionsmechanismen. Da sich die krankhafte Überexpression der NOS in der Pathologie vieler Krankheiten wie Diabetes, Arthritis oder Multiple Sklerose findet, herrscht großes Interesse daran, diese Lücken zu schließen, um geeignete Inhibitoren zur Regulation der Synthese des toxischen NO entwickeln zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die induzierbare Isoform der NOS (iNOS) auf ihre Interaktion mit den Häm-gebundenen Liganden CO und NO, dem Substrat L-Arginin, dem Intermediat NOHA, sowie dem Kofaktor H4B mit Methoden der Spektroskopie erforscht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Substrat, Intermediat und Kofaktor auf das aktive Zentrum und die Proteinmatrix durch Temperatur-derivative (TDS)

Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) untersucht. Als infrarotaktive Sonden dienten dabei die Liganden CO und NO, deren Schwingungsfrequenzen ein sensibles Maß für den Bindungszustand und Einflüsse der direkten Umgebung sind. Durch Messungen an CO-ligiertem iNOS konnte demonstriert werden, dass iNOS neben der Bindungsstelle am Häm nur eine weitere Andockstelle, die primäre Andockstelle B, innerhalb der Proteinmatrix aufweist. Eine solche Andockstelle ist ein wesentliches strukturelles Merkmal vieler Hämproteine, welches effiziente Bindung des Liganden an das Häm, sowie Entkommen des Liganden aus der Proteinmatrix erst ermöglicht. Die Andockstelle von iNOS zeigte sich als sehr leicht zugänglich für vom Häm photolysierte Liganden. Substrat, Intermediat und, in einer gewissen Geometrie angeordneter Kofaktor stabilisieren den Liganden durch Wasserstoffbrücken in der Andockstelle. Im Gegensatz zu CO, das nur an Hämeisen im Zustand Fe^{2+} bindet, bindet NO sowohl an Fe^{2+} als auch an Fe^{3+} . Auch bei dem vom Hämeisen im Fe^{3+} -Zustand photolysierten NO-Liganden konnte nur eine Andockstelle innerhalb der Proteinmatrix nachgewiesen werden. Der Ligand scheint in dieser Andockstelle keine wohldefinierte Orientierung anzunehmen, was dazu dienlich sein könnte, dass das unter physiologischen Bedingungen synthetisierte NO leichter aus der Proteinmatrix entkommen kann. Die NO-ligierte Fe^{2+} -Spezies wies interessanterweise eine Photolyse der dem NO-Liganden gegenüberliegenden Bindung zwischen Hämeisen und Schwefelatom des Cysteins 194 auf statt der Photolyse des NO-Liganden. Die Bindung zwischen Hämeisen und NO konnte erst bei einer sehr hohen Leistung des Photolyselasers (300 mW) aufgetrennt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Untersuchung der beiden CO-ligierten iNOS-Spezies P450 und P420 durch optische Spektroskopie bei Raumtemperatur. Die Messungen der CO-Rückbindung von substratgebundenem iNOS im P450-Zustand nach Blitzlichtphotolyse lieferten auf Basis eines kinetischen Modellsystems die mikroskopischen Ratenkoeffizienten der Substratbindung und Substratdissoziation, sowie der Dissoziationskonstanten K_D der CO-freien P450-Spezies. Durch Aufnahme von Konversionskinetiken zwischen der P450- und P420-Spezies konnte die pH-Abhängigkeit des P450/P420-Gleichgewichts bestätigt werden, was für die Theorie spricht, dass es sich bei dem Zustandsübergang um eine Protonierung, beziehungsweise Deprotonierung des Thiolats des proximalen Cystein 194 handelt. In Kombination mit den Ergebnissen aus den Blitzlichtphotolysemessungen konnte weiter gezeigt werden, dass sowohl die beiden CO-ligierten Proteinzustände P450 und P420 als auch iNOS im Met-Zustand aus jeweils zwei Subzuständen bestehen. Während im Met-Zustand beide Subzustände ähnlich stark populiert sind, ist im CO-ligierten Zustand einer der beiden Zustände stark bevorzugt. Die sehr langsamen Konversionsprozesse zwischen den Subzuständen sprechen dafür, dass es dabei zu großen Konformationsänderungen der Proteinstruktur der iNOS kommt. Es fanden sich Hinweise dafür, dass es sich bei den beiden Proteinstrukturen um die sogenannten *loose*- und *tight*-Dimerstrukturen der iNOS handeln könnte. Erkenntnisse über diese Strukturen sind noch lückenhaft, allerdings von großem Interesse, da sie eng mit dem NO-Syntheseprozess verknüpft sind. Das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modellsystem könnte in Verbindung mit

weiteren Messungen ein Ansatzpunkt zur genaueren quantitativen Untersuchung der iNOS Substrukturen durch spektroskopische Messmethoden sein.

Literaturverzeichnis

- [1] Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Probing Heme Protein–Ligand Interactions by UV/Visible Absorption Spectroscopy. In *Methods Mol. Biol.*, Bd. 305, 215–242 (Humana Press, Totowa NJ, 2005).
- [2] Hsia, C. C. Respiratory function of hemoglobin. *N. Engl. J. Med.* **338**, 239–247 (1998).
- [3] Wittenberg, J. B. & Wittenberg, B. A. Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* **206**, 2011–2020 (2003).
- [4] Brittain, T. Intra-molecular electron transfer in proteins. *Protein Pept. Lett.* **15**, 556–561 (2008).
- [5] Lucas, M. F., Rousseau, D. L. & Guallar, V. Electron transfer pathways in cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1305–1313 (2011).
- [6] Chan, M. K. Recent advances in heme-protein sensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 216–222 (2001).
- [7] Aono, S. & Nakajima, H. Structure and function of CooA, a novel transcriptional regulator containing a b-type heme as a CO sensor. *Coord. Chem. Rev.* **190**, 267–282 (1999).
- [8] Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. & Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P 450. *Chem. Rev.* **105**, 2253–2277 (2005).
- [9] Efimov, I., Basran, J., Thackray, S. J., Handa, S., Mowat, C. G. & Raven, E. L. Structure and reaction mechanism in the heme dioxygenases. *Biochemistry* **50**, 2717–2724 (2011).
- [10] Ball, H. J., Yuasa, H. J., Austin, C. J. D., Weiser, S. & Hunt, N. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 467–471 (2009).
- [11] Ghosh, D. K. Nitric oxide synthases domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front. Biosci.* **8**, 193–209 (2003).
- [12] Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).

- [13] Furchgott, R. F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from bovine retractor penis is organic nitrite and the endothelium derived relaxing factor is nitric oxide. *Vasodilation Vasc. Smooth Muscle, Pept. Auton. Nerves Endothel.* **4**, 401–418 (1988).
- [14] Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 9265–9269 (1987).
- [15] Palmer, R. M., Ferrige, a. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).
- [16] Tejero, J. & Stuehr, D. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. *IUBMB Life* **65**, 358–365 (2013).
- [17] Garthwaite, J. & Boulton, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 683–706 (1995).
- [18] Abu-Soud, H. M., Gachhui, R., Raushel, F. M. & Stuehr, D. J. The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase: Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. *J. Biol. Chem.* **272**, 17349–17353 (1997).
- [19] Marletta, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* **268**, 12231–12234 (1993).
- [20] Stuehr, D. J., Santolini, J., Wang, Z. Q., Wei, C. C. & Adak, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* **279**, 36167–36170 (2004).
- [21] Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* **100**, 2417–2423 (1997).
- [22] Cooke, J. P. & Dzau, V. J. Nitric Oxide Synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease. *Annu. Rev. Med.* **48**, 489–509 (1997).
- [23] Bö, L., Dawson, T. M., Wesselingh, S., Mörk, S., Choi, S., Kong, P. A., Hanley, D. & Trapp, B. D. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann. Neurol.* **36**, 778–786 (1994).
- [24] Southern, C., Schulster, D. & Green, I. C. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.* **276**, 42–44 (1990).
- [25] Hoffman, R. A., Langrehr, J. M., Wren, S. M., Dull, K. E., Ildstad, S. T., McCarthy, S. A. & Simmons, R. L. Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease. *J. Immunol.* **151**, 1508–1518 (1993).

- [26] Stefanovic-Racic, M., Stadler, J. & Evans, C. H. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum.* **36**, 1036–1044 (1993).
- [27] Kröncke, K. D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **376**, 327–343 (1995).
- [28] Crane, B. R. The Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Domain and Inhibitor Complexes. *Science* **278**, 425–431 (1997).
- [29] Garcin, E. D., Arvai, A. S., Rosenfeld, R. J., Kroeger, M. D., Crane, B. R., Anderson, G., Andrews, G., Hamley, P. J., Mallinder, P. R., Nicholls, D. J., St-Gallay, S. A., Tinker, A. C., Gensmantel, N. P., Mete, A., Cheshire, D. R., Connolly, S., Stuehr, D. J., Åberg, A., Wallace, A. V., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 700–707 (2008).
- [30] Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. & Tainer, J. A. Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate. *Science* **279**, 2121–2126 (1998).
- [31] Siddhanta, U., Presta, A., Fan, B., Wolan, D., Rousseau, D. L. & Stuehr, D. J. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase: Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J. Biol. Chem.* **273**, 18950–18958 (1998).
- [32] Lyons, C. R., Orloff, J. & Cunningham, J. M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **267**, 6370–6374 (1992).
- [33] Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. & Nathan, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225–228 (1992).
- [34] Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1411**, 217–230 (1999).
- [35] Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G., Alderton, W. K., Cooper, C. E., Cooper, C. E., Knowles, R. G. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593–615 (2001).
- [36] Rousseau, D. L., Li, D., Couture, M. & Yeh, S. R. Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 306–332 (2005).
- [37] Masters, B. S. S., McMillan, K., Sheta, A., Nishimura, J. S., Roman, J. & Martasek, P. Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that

- hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal. *FASEB J.* **10**, 552–558 (1996).
- [38] Mayer, B. & Andrew, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**, 127–133 (1998).
- [39] Nicholson, S. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.* **183**, 2293–2302 (1996).
- [40] Panda, K., Ghosh, S. & Stuehr, D. J. Calmodulin Activates Intersubunit Electron Transfer in the Neuronal Nitric-oxide Synthase Dimer. *J. Biol. Chem.* **276**, 23349–23356 (2001).
- [41] Sagami, I., Daff, S. & Shimizu, T. Intra-subunit and inter-subunit electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase. Effect of calmodulin on heterodimer catalysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 30036–30042 (2001).
- [42] Pufahl, R. A., Wishnok, J. S. & Marletta, M. A. Hydrogen peroxide-supported oxidation of NG-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase. *Biochemistry* **34**, 1930–1941 (1995).
- [43] Ghosh, D. K. & Stuehr, D. J. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* **34**, 801–807 (1995).
- [44] Li, H. Y., Shimizu, H., Flinspach, M., Jamal, J., Yang, W. P., Xian, M., Cai, T. W., Wen, E. Z., Jia, Q. A., Wang, P. G. & Poulos, T. L. The novel binding mode of N-Alkyl-N'-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into NO biosynthesis. *Biochemistry* **41**, 13868–13875 (2002).
- [45] Raman, C. S., Li, H., Martásek, P., Král, V., Masters, B. S. S. & Poulos, T. L. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **95**, 939–950 (1998).
- [46] Fischmann, T. O., Hruza, A., Niu, X. D., Fossetta, J. D., Lunn, C. A., Dolphin, E., Prongay, A. J., Reichert, P., Lundell, D. J., Narula, S. K. & Weber, P. C. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 233–242 (1999).
- [47] Ghosh, D. K., Wu, C., Pitters, E., Moloney, M., Werner, E. R., Mayer, B. & Stuehr, D. J. Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry* **36**, 10609–10619 (1997).
- [48] Panda, K., Rosenfeld, R. J., Ghosh, S., Meade, A. L., Getzoff, E. D. & Stuehr, D. J. Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J. Biol. Chem.* **277**, 31020–31030 (2002).

- [49] Crane, B. R., Rosenfeld, R. J., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Ghosh, S., Tainer, J. A., Stuehr, D. J. & Getzoff, E. D. N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *EMBO J.* **18**, 6271–6281 (1999).
- [50] Ghosh, D. K., Crane, B. R., Ghosh, S., Wolan, D., Gachhui, R., Crooks, C., Presta, A., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. & Stuehr, D. J. Inducible nitric oxide synthase: role of the N-terminal beta-hairpin hook and pterin-binding segment in dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *EMBO J.* **18**, 6260–6270 (1999).
- [51] Sabat, J., Stuehr, D. J., Yeh, S.-R. & Rousseau, D. L. Characterization of the proximal ligand in the P420 form of inducible nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 12186–12192 (2009).
- [52] Abu-Soud, H. M., Loftus, M. & Stuehr, D. J. Subunit dissociation and unfolding of macrophage NO synthase: relationship between enzyme structure, prosthetic group binding, and catalytic function. *Biochemistry* **34**, 11167–75 (1995).
- [53] Li, D., Hayden, E. Y., Panda, K., Stuehr, D. J., Deng, H., Rousseau, D. L. & Yeh, S. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **281**, 8197–8204 (2006).
- [54] Nagpal, L., Haque, M. M., Saha, A., Mukherjee, N., Ghosh, A., Ranu, B. C., Stuehr, D. J. & Panda, K. Mechanism of inducible nitric-oxide synthase dimerization inhibition by novel pyrimidine imidazoles. *J. Biol. Chem.* **288**, 19685–19697 (2013).
- [55] Wang, J., Stuehr, D. J. & Rousseau, D. L. Interactions between substrate analogues and heme ligands in nitric oxide synthase. *Biochemistry* **36**, 4595–4606 (1997).
- [56] Pant, K. & Crane, B. R. Structure of a loose dimer: An intermediate in nitric oxide synthase assembly. *J. Mol. Biol.* **352**, 932–940 (2005).
- [57] Sengupta, R., Sahoo, R., Ray, S. S., Dutta, T., Dasgupta, A. & Ghosh, S. Dissociation and unfolding of inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies structural role of tetrahydrobiopterin in modulating the heme environment. *Mol. Cell. Biochem.* **284**, 117–126 (2006).
- [58] Kim, H. S., Loughran, P. A. & Billiar, T. R. Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1 β -stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* **18**, 256–265 (2008).
- [59] Abu-Soud, H. M., Wu, C., Ghosh, D. K. & Stuehr, D. J. Stopped-flow analysis of CO and NO binding to inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**, 3777–3786 (1998).
- [60] Meunier, B., de Visser, S. P. & Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947–3980 (2004).

- [61] Wang, J., Stuehr, D. J. & Rousseau, D. L. Tetrahydrobiopterin-deficient nitric oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analogue. *Biochemistry* **34**, 7080–7087 (1995).
- [62] Champion, P. M., Gunsalus, I. C. & Wagner, G. C. Resonance Raman investigations of cytochrome P450CAM from *Pseudomonas putida*. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3743–3751 (1978).
- [63] Perera, R., Sono, M., Sigman, J. A., Pfister, T. D., Lu, Y. & Dawson, J. H. Neutral thiol as a proximal ligand to ferrous heme iron: implications for heme proteins that lose cysteine thiolate ligation on reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3641–3646 (2003).
- [64] Martinis, S. A., Blanke, S. R., Hager, L. P., Sligar, S. G., Hoa, G. H. B., Rux, J. J. & Dawson, J. H. Probing the heme iron coordination structure of pressure-induced cytochrome P420(cam). *Biochemistry* **35**, 14530–14536 (1996).
- [65] Wells, A. V., Li, P., Champion, P. M., Martinis, S. A. & Sligar, S. G. Resonance Raman investigations of *Escherichia coli*-expressed *Pseudomonas putida* cytochrome P450 and P420. *Biochemistry* **31**, 4384–4393 (1992).
- [66] Nienhaus, K., Kriegl, J. M. & Nienhaus, G. U. Structural dynamics in the active site of murine neuroglobin and its effects on ligand binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 22944–22952 (2004).
- [67] Antonini, E. & Brunori, M. *Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands*, Bd. 21 (North-Holland Pub., Amsterdam, 1971).
- [68] Collman, J. P., Sorrell, T. N. & Hoffman, B. M. Models for cytochrome P-450. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 913–914 (1975).
- [69] Dunford, A. J., McLean, K. J., Sabri, M., Seward, H. E., Heyes, D. J., Scrutton, N. S. & Munro, A. W. Rapid P450 heme iron reduction by laser photoexcitation of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 and CYP51B1: Analysis of CO complexation reactions and reversibility of the P450/P420 equilibrium. *J. Biol. Chem.* **282**, 24816–24824 (2007).
- [70] Argade, P. V., Sassardi, M., Rousseau, D. L., Inubushi, T., Ikeda-Saito, M. & Lapidot, A. Confirmation of the assignment of the iron-histidine stretching mode in myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6593–6596 (1984).
- [71] Sun, Y., Zeng, W., Benabbas, A., Ye, X., Denisov, I., Sligar, S. G., Du, J., Dawson, J. H. & Champion, P. M. Investigations of heme ligation and ligand switching in cytochromes P450 and P420. *Biochemistry* **52**, 5941–5951 (2013).
- [72] Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927–930 (1994).

- [73] Griffith, O. W. & Stuehr, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707–734 (1995).
- [74] Stuehr, D. J. Structure-Function Aspects in the Nitric Oxide Synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 339–359 (1997).
- [75] Santolini, J. The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: A story of electrons and protons. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 127–141 (2011).
- [76] Daff, S. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide* **23**, 1–11 (2010).
- [77] Gorren, A. C. F. & Mayer, B. Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **1770**, 432–445 (2007).
- [78] Mayer, B., John, M., Heinzl, B., Werner, E. R., Wachter, H., Schultz, G. & Bohme, E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* **288**, 187–191 (1991).
- [79] Kwon, N. S., Nathan, C. F. & Stuehr, D. J. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**, 20496–20501 (1989).
- [80] Tayeh, M. A. & Marletta, M. A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654–19658 (1989).
- [81] Newcomb, M., Zhang, R., Chandrasena, R. E. P., Halgrimson, J. A., Horner, J. H., Makris, T. M. & Sligar, S. G. Cytochrome P450 compound I. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4580–4581 (2006).
- [82] Ost, T. W. B. & Daff, S. Thermodynamic and kinetic analysis of the nitrosyl, carbonyl, and dioxy heme complexes of neuronal nitric-oxide synthase: The roles of substrate and tetrahydrobiopterin in oxygen activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 965–973 (2005).
- [83] Shirran, S., Garnaud, P., Daff, S., McMillan, D. & Barran, P. The formation of a complex between calmodulin and neuronal nitric oxide synthase is determined by ESI-MS. *J. R. Soc.* **2**, 465–476 (2005).
- [84] Abu-Soud, H. M., Yoho, L. L. & Stuehr, D. J. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J. Biol. Chem.* **269**, 32047–32050 (1994).
- [85] Abu-Soud, H. M. & Stuehr, D. J. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10769–10772 (1993).

- [86] Cho, H. J., Xie, Q. W., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D. & Nathan, C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* **176**, 599–604 (1992).
- [87] Gibson, Q. H. & Ainsworth, S. Photosensitivity of hæm compounds. *Nature* **180**, 1416–1417 (1957).
- [88] Austin, R. H., Beeson, K. W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. & Gunsalus, I. C. Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry* **14**, 5355–5373 (1975).
- [89] Ostermann, A., Waschipky, R., Parak, F. G. & Nienhaus, G. U. Ligand binding and conformational motions in myoglobin. *Nature* **404**, 205–208 (2000).
- [90] Nienhaus, K., Deng, P., Kriegl, J. M. & Nienhaus, G. U. Structural dynamics of myoglobin: spectroscopic and structural characterization of ligand docking sites in myoglobin mutant L29W. *Biochemistry* **42**, 9633–9646 (2003).
- [91] Nienhaus, G. U., Chu, K. & Jesse, K. Structural heterogeneity and ligand binding in carbonmonoxy myoglobin crystals at cryogenic temperatures. *Biochemistry* **37**, 6819–6823 (1998).
- [92] Schlichting, I. & Chu, K. Trapping intermediates in the crystal: Ligand binding to myoglobin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 744–752 (2000).
- [93] Brunori, M., Bonaventura, J., Bonaventura, C., Antonini, E. & Wyman, J. Carbon monoxide binding by hemoglobin and myoglobin under photodissociating conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 868–871 (1972).
- [94] Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. The effect of protein internal cavities on ligand migration and binding in myoglobin. *Micron* **35**, 67–69 (2004).
- [95] Henry, E. R., Sommer, J. H., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. Geminate recombination of carbon monoxide to myoglobin. *J. Mol. Biol.* **166**, 443–451 (1983).
- [96] Demtröder, W. *Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper* (Springer, Berlin Heidelberg, 2010).
- [97] Parson, W. W. *Modern Optical Spectroscopy* (Springer, Berlin Heidelberg, 2007).
- [98] Kittel, C. *Einführung in die Festkörperphysik* (Oldenbourg, München, 2013).
- [99] Kadish, K. M., Smith, K. M. & Guillard, R. *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: spectroscopic and electrochemical characterization*, Bd. 16 (Elsevier, Amsterdam, 2003).
- [100] Lennard-Jones, J. E. The electronic structure of some diatomic molecules. *Trans. Faraday Soc.* **25**, 668–686 (1929).

- [101] Fock, V. Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. *Zeitschrift für Phys.* **61**, 126–148 (1930).
- [102] Cohen-Tannoudji, C., Diu, B. & Laloë, F. *Quantenmechanik*, Bd. 1 (Walter de Gruyter, Berlin, 2007).
- [103] Milgrom, L. R. *The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds* (Oxford University Press, Oxford, 1997).
- [104] Gouterman, M., Wagnière, G. H. & Snyder, L. C. Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. *J. Mol. Spectrosc.* **11**, 108–127 (1963).
- [105] Barth, A. & Zscherp, C. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* **35**, 369–430 (2002).
- [106] Dong, A., Huang, P. & Caughey, W. S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* **29**, 3303–3308 (1990).
- [107] Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101 (2007).
- [108] Oberg, K. A., Ruysschaert, J.-M. & Goormaghtigh, E. The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2937–2948 (2004).
- [109] Ewing, G. E. Infrared Spectra of Liquid and Solid Carbon Monoxide. *J. Chem. Phys.* **37**, 2250–2256 (1962).
- [110] Spiro, T. G. & Wasbotten, I. H. CO as a vibrational probe of heme protein active sites. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 34–44 (2005).
- [111] Kriegl, J. M., Nienhaus, K., Deng, P., Fuchs, J. & Nienhaus, G. U. Ligand dynamics in a protein internal cavity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7069–7074 (2003).
- [112] Weinhold, F. & Landis, C. R. *Valency and bonding: a natural bond orbital donor-acceptor perspective* (Cambridge University Press, Cambridge, 2005).
- [113] Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Ligand Dynamics in Heme Proteins Observed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy at Cryogenic Temperatures. *Methods Enzymol.* **437**, 347–378 (2008).
- [114] Kozłowski, P. M., Vogel, K. M., Zgierski, M. Z. & Spiro, T. G. Steric contributions to CO binding in heme proteins: A density functional analysis of FeCO vibrations and deformability. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **5**, 312–322 (2001).
- [115] Vogel, K. M., Kozłowski, P. M., Zgierski, M. Z. & Spiro, T. G. Determinants of the FeX_o (X = C, N, O) vibrational frequencies in heme adducts from experiment and density functional theory. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9915–9921 (1999).

- [116] Averill, B. A. Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem. Rev.* **96**, 2951–2964 (1996).
- [117] Praneeth, V. K. K., Paulat, F., Berto, T. C., George, S. D., Näther, C., Sulok, C. D. & Lehnert, N. Electronic structure of six-coordinate iron(III)-porphyrin NO adducts: The elusive iron(III)-NO(radical) state and its influence on the properties of these complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15288–15303 (2008).
- [118] Paulat, F. & Lehnert, N. Electronic structure of ferric heme nitrosyl complexes with thiolate coordination. *Inorg. Chem.* **46**, 1547–1549 (2007).
- [119] Praneeth, V. K. K., Haupt, E. & Lehnert, N. Thiolate coordination to Fe(II)-porphyrin NO centers. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 940–948 (2005).
- [120] Kohlrausch, R. Theorie des elektrischen Rückstandes in der Leidner Flasche. *Ann. Phys.* **91**, 56–82 (1854).
- [121] Ablonczy, Z., Lukács, A. & Papp, E. Application of the maximum entropy method to absorption kinetic rate processes. *Biophys. Chem.* **104**, 249–258 (2003).
- [122] McWhirter, J. G. & Pike, E. R. On the numerical inversion of the Laplace transform and similar Fredholm integral equations of the first kind. *J. Phys. A. Math. Gen.* **11**, 1729–1745 (1978).
- [123] Steinbach, P., Chu, K., Frauenfelder, H., Johnson, J., Lamb, D., Nienhaus, G., Sauke, T. & Young, R. Determination of rate distributions from kinetic experiments. *Biophys. J.* **61**, 235–245 (1992).
- [124] Demtröder, W. *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik* (Springer, Berlin Heidelberg, 2014).
- [125] Harris, F. J. On the use of windows for harmonic analysis with the discrete fourier transform. *Proceedings of the IEEE* **66**, 51–83 (1978).
- [126] Berendzen, J. & Braunstein, D. Temperature-derivative spectroscopy: a tool for protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1–5 (1990).
- [127] Mourant, J. R., Braunstein, D. P., Chu, K., Frauenfelder, H., Nienhaus, G. U., Ormos, P., Young, R. D., Youngil, R. D., Chu, K., Frauenfelder, H. & Nienhaus, G. U. Ligand binding to heme proteins: II. Transitions in the heme pocket of myoglobin. *Biophys. J.* **65**, 1496–1507 (1993).
- [128] Nienhaus, G. U., Mourant, J. R., Chu, K. & Frauenfelder, H. Ligand binding to heme proteins: the effect of light on ligand binding in myoglobin. *Biochemistry* **33**, 13413–13430 (1994).
- [129] Horn, M., Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Fourier transform infrared spectroscopy study of ligand photodissociation and migration in inducible nitric oxide synthase. *F1000Research* **3:290**, 1–16 (2014).

- [130] Jung, C., Stuehr, D. J. & Ghosh, D. K. FT-Infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch mode of iNOS oxygenase domain: effect of arginine and tetrahydrobiopterin. *Biochemistry* **39**, 10163–10171 (2000).
- [131] Lis, D., Stuehr, D. J., Yeh, S. & Rousseau, D. L. Heme distortion modulated by ligand-protein interactions in inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **279**, 26489–26499 (2004).
- [132] Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, S., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. & Tainer, J. A. Structures of the N(omega)-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins. *Biochemistry* **39**, 4608–4621 (2000).
- [133] Fukuto, J. M. Chemistry of N-hydroxy-L-arginine. *Methods Enzymol.* **268**, 365–375 (1996).
- [134] Tantillo, D. J., Fukuto, J. M., Hoffman, B. M., Silverman, R. B. & Houk, K. N. Theoretical studies on N-G-hydroxy-L-arginine and derived radicals: Implications for the mechanism of nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 536–537 (2000).
- [135] Labby, K. J., Li, H. Y., Roman, L. J., Martasek, P., Poulos, T. L. & Silverman, R. B. Methylated N-omega-Hydroxy-L-arginine Analogues as Mechanistic Probes for the Second Step of the Nitric Oxide Synthase-Catalyzed Reaction. *Biochemistry* **52**, 3062–3073 (2013).
- [136] Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Ligand dynamics in heme proteins observed by Fourier transform infrared-temperature derivative spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 1030–1041 (2011).
- [137] Nienhaus, K., Olson, J. S., Franzen, S. & Nienhaus, G. U. The origin of stark splitting in the initial photoproduct state of MbCO. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 40–41 (2005).
- [138] Lamb, D. C., Nienhaus, K., Arcovito, A., Draghi, F., Miele, A. E., Brunori, M. & Ulrich Nienhaus, G. Structural dynamics of myoglobin: Ligand migration among protein cavities studied by fourier transform infrared/temperature derivative spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **277**, 11636–11644 (2002).
- [139] Nienhaus, K., Lamb, D. C., Deng, P. & Nienhaus, G. U. The effect of ligand dynamics on heme electronic transition band III in myoglobin. *Biophys. J.* **82**, 1059–1067 (2002).
- [140] Nienhaus, K., Maes, E. M., Weichsel, A., Montfort, W. R. & Nienhaus, G. U. Structural dynamics controls nitric oxide affinity in nitrophorin 4. *J. Biol. Chem.* **279**, 39401–39407 (2004).

- [141] Scott, E. E., Gibson, Q. H. & Olson, J. S. Mapping the Pathways for O₂ Entry Into and Exit from Myoglobin. *J. Biol. Chem.* **276**, 5177–5188 (2001).
- [142] Nienhaus, K., Deng, P., Olson, J. S., Warren, J. J. & Nienhaus, G. U. Structural Dynamics of Myoglobin: Ligand migration and binding in valine 68 mutants. *J. Biol. Chem.* **278**, 42532–42544 (2003).
- [143] Nienhaus, K., Zosel, F. & Nienhaus, G. U. Ligand binding to heme proteins: A comparison of cytochrome c variants with globins. *J. Phys. Chem. B* **116**, 12180–12188 (2012).
- [144] Soldatova, A. V., Ibrahim, M., Olson, J. S., Czernuszewicz, R. S. & Spiro, T. G. New light on NO bonding in Fe(III) heme proteins from resonance raman spectroscopy and DFT modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4614–4625 (2010).
- [145] Batabyal, D. & Yeh, S. R. Human tryptophan dioxygenase: A comparison to indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15690–15701 (2007).
- [146] Xu, N., Powell, D. R., Cheng, L. & Richter-Addo, G. B. The first structurally characterized nitrosyl heme thiolate model complex. *Chem. Commun.* **19**, 2030–2032 (2006).
- [147] Obayashi, E., Tsukamoto, K., Adachi, S. I., Takahashi, S., Nomura, M., Iizuka, T., Shoun, H. & Shiro, Y. Unique binding of nitric oxide to ferric nitric oxide reductase from *fusarium oxysporum* elucidated with infrared, resonance raman, and X-ray absorption spectroscopies. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7807–7816 (1997).
- [148] Li, H., Igarashi, J., Jamal, J., Yang, W. & Poulos, T. L. Structural studies of constitutive nitric oxide synthases with diatomic ligands bound. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 753–768 (2006).
- [149] McQuarters, A. B., Wirgau, N. E. & Lehnert, N. Model complexes of key intermediates in fungal cytochrome P450 nitric oxide reductase (P450nor). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 82–89 (2014).
- [150] Shimizu, H., Obayashi, E., Gomi, Y., Arakawa, H., Park, S. Y., Nakamura, H., Adachi, S. I., Shoun, H. & Shiro, Y. Proton delivery in NO reduction by fungal nitric-oxide reductase. Cryogenic crystallography, spectroscopy, and kinetics of ferric-NO complexes of wild-type and mutant enzymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 4816–4826 (2000).
- [151] Pant, K. & Crane, B. R. Nitrosyl-heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. *Biochemistry* **45**, 2537–2544 (2006).
- [152] Goodrich, L. E., Paulat, F., Praneeth, V. K. K. & Lehnert, N. Electronic structure of heme-nitrosyls and its significance for nitric oxide reactivity, sensing, transport, and toxicity in biological systems. *Inorg. Chem.* **49**, 6293–6316 (2010).

- [153] Couture, M., Adak, S., Stuehr, D. J. & Rousseau, D. L. Regulation of the Properties of the Heme-NO Complexes in Nitric-oxide Synthase by Hydrogen Bonding to the Proximal Cysteine. *J. Biol. Chem.* **276**, 38280–38288 (2001).
- [154] Rousseau, D. L., Li, D., Hayden, E. Y., Deng, H. & Yeh, S. R. Ligand-protein interactions in mammalian nitric oxide synthase. In *Smallest Biomol. Diatomics their Interact. with Heme Proteins*, 465–497 (Elsevier, Amsterdam, 2008).
- [155] Nienhaus, K., Palladino, P. & Nienhaus, G. U. Structural dynamics of myoglobin: FTIR-TDS study of NO migration and binding. *Biochemistry* **47**, 935–948 (2008).
- [156] Hu, S. Z. & Kincaid, J. R. Resonance Raman-Spectra of the Nitric-Oxide Adducts of Ferrous Cytochrome P450cam in the Presence of Various Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9760–9766 (1991).
- [157] Wang, J., Rousseau, D. L., Abu-Soudtt, H. M. & Stuehr, D. J. Heme coordination of NO in NO synthase. *Biochemistry* **91**, 10512–10516 (1994).
- [158] Ibrahim, M., Xu, C. & Spiro, T. G. Differential sensing of protein influences by NO and CO vibrations in heme adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16834–16845 (2006).
- [159] Coyle, C. M., Vogel, K. M., Rush, T. S., Kozlowski, P. M., Williams, R., Spiro, T. G., Dou, Y., Ikeda-Saito, M., Olson, J. S. & Zgierski, M. Z. FeNO structure in distal pocket mutants of myoglobin based on resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **42**, 4896–4903 (2003).
- [160] Lehle, H., Kriegl, J. M., Nienhaus, K., Deng, P., Fengler, S. & Nienhaus, G. U. Probing electric fields in protein cavities by using the vibrational stark effect of carbon monoxide. *Biophys. J.* **88**, 1978–1990 (2005).
- [161] Chiavarino, B., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Lanucara, F., Lemaire, J., Maître, P. & Scuderi, D. Direct probe of NO vibration in the naked ferric heme nitrosyl complex. *ChemPhysChem* **9**, 826–828 (2008).
- [162] Lanucara, F., Chiavarino, B., Crestoni, M. E., Scuderi, D., Sinha, R. K., Maître, P. & Fornarini, S. Naked five-coordinate FeIII(NO) porphyrin complexes: Vibrational and reactivity features. *Inorg. Chem.* **50**, 4445–4452 (2011).
- [163] Dey, A., Okamura, T. A., Ueyama, N., Hedman, B., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. Sulfur K-edge XAS and DFT calculations on P450 model complexes: Effects of hydrogen bonding on electronic structure and redox potentials. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12046–12053 (2005).
- [164] Decatur, S. M., Franzen, S., DePillis, G. D., Dyer, R. B., Woodruff, W. H. & Boxer, S. G. Trans effects in nitric oxide binding to myoglobin cavity mutant H93G. *Biochemistry* **35**, 4939–4944 (1996).

- [165] Fernández, M. L., Martí, M. A., Crespo, A. & Estrin, D. A. Proximal effects in the modulation of nitric oxide synthase reactivity: A QM-MM study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 595–604 (2005).
- [166] Nienhaus, G., Heinzl, J., Huenges, E. & Parak, F. Protein crystal dynamics studied by time-resolved analysis of X-ray diffuse scattering. *Lett. to Nat.* **338**, 665–666 (1989).
- [167] Frauenfelder, H., Nienhaus, G. U. & Johnson, J. B. Rate Processes in Proteins. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **95**, 272–278 (1991).
- [168] Linder, D. P., Rodgers, K. R., Banister, J., Wyllie, G. R. A., Ellison, M. K. & Scheidt, W. R. Five-coordinate FeIII_{NO} and FeII_{CO} porphyrinates: Where are the electrons and why does it matter? *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14136–14148 (2004).
- [169] Huang, L., Abu-Soud, H. M., Hille, R. & Stuehr, D. J. Nitric oxide-generated P420 nitric oxide synthase: Characterization and roles for tetrahydrobiopterin and substrate in protecting against or reversing the P420 conversion. *Biochemistry* **38**, 1912–1920 (1999).
- [170] Stevenson, T. H., Gutierrez, A. F., Alderton, W. K., Lian, L. & Scrutton, N. S. Kinetics of CO binding to the haem domain of murine inducible nitric oxide synthase: differential effects of haem domain ligands. *Biochem. J.* **358**, 201–208 (2001).
- [171] Chen, Y., Panda, K. & Stuehr, D. J. Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism. *Biochemistry* **41**, 4618–4625 (2002).
- [172] Zhong, F., Lisi, G. P., Collins, D. P., Dawson, J. H. & Pletneva, E. V. Redox-dependent stability, protonation, and reactivity of cysteine-bound heme proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 306–315 (2014).
- [173] Rodriguez-Crespo, I., Gerber, N. C. & De Montellano, P. R. O. Endothelial Nitric-oxide Synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J. Biol. Chem.* **271**, 11462–11467 (1996).

A. Publikationen

Horn, M., Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Fourier transform infrared spectroscopy study of ligand photodissociation and migration in inducible nitric oxide synthase. *F1000Research* **3:290**, 1–16 (2014).

Weber, B., Nickel, E., Horn, M., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. Substrate inhibition in human indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J. Phys. Chem. Lett.* **5(4)**, 756-761 (2014).

