

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5871

**TDPAC-Untersuchungen zur
Bindung von Molybdän im
Eisen-Molybdän-Cofaktor
der Nitrogenase**

C. Pohlmann
Institut für Toxikologie

März 1997

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5871

**TDPAC-Untersuchungen zur Bindung von Molybdän im
Eisen-Molybdän-Cofaktor der Nitrogenase**

C. Pohlmann

Institut für Toxikologie

**Von der Fakultät für Physik der Universität (TH) Karlsruhe
genehmigte Dissertation**

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1997

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

TDPAC-Untersuchungen zur Bindung von Molybdän im Eisen-Molybdän-Cofaktor der Nitrogenase

Abriß

Die Nitrogenase gehört zu den Molybdäenzymen und katalysiert die Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak. Das Enzymsystem der konventionellen Nitrogenase besteht aus zwei Komponenten, dem Eisen-Protein und dem Molybdän-Eisen-Protein (MoFe-Protein). Das MoFe-Protein enthält zwei Arten von Metall-Clustern. Einer dieser Cluster, der Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMo-Cofaktor), gilt als das aktive Zentrum der biologischen Stickstoff-Fixierung. Der FeMo-Cofaktor besteht aus $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$ - und $[\text{Fe}_3\text{MoS}_3]$ -Cubanfragmenten, die über drei Schwefelbrücken miteinander verbunden sind, sowie Homocitrat. Er ist in seiner Komplexität und Größe einzigartig in der Natur.

Die Bindung von Molybdän im FeMo-Cofaktor wurde mithilfe der Methode der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten γ - γ -Winkelkorrelationen (TDPAC) untersucht. Die Beobachtung der Hyperfeinwechselwirkung des Kernquadrupolmomentes von Molybdän-99 mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort liefert Informationen über die dortige Ladungsdichteverteilung und somit über die Ligandenanordnung. Die gemessenen Quadrupolparameter beschreiben neben Größe und Symmetrie des elektrischen Feldgradienten auch die Einheitlichkeit der Bindung sowie Relaxationseffekte. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Temperaturunabhängigkeit ist die TDPAC insbesondere für die Untersuchung biologischer Proben unter physiologischen Bedingungen geeignet.

Die TDPAC-Messungen an den Bakterienarten *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii* und *Klebsiella oxitoca* ergaben zwei definierte Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase. Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Methoden zeigte, daß die zwei Bindungszustände unterschiedlichen Redoxzuständen des FeMo-Cofaktors zugeordnet werden können. Zusätzlich wurde in begleitenden Experimenten die Bindung von Molybdän am Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii* untersucht. Die Ergebnisse der TDPAC-Messungen stimmen mit der Annahme überein, daß Molybdän in Form eines Polymolybdatkerns am Speicherprotein gebunden wird. In *R. capsulatus* konnten neben dem MoFe-Protein weitere Mo-bindende Proteine nachgewiesen werden, die zu einem kürzlich entdeckten Mo-Bindungs- und -Transportsystem gehören.

TDPAC-Studies on the Binding of Molybdenum in the Iron-Molybdenum-Cofactor of Nitrogenase

Abstract

The nitrogenase belongs to the molybdoenzymes and catalyses the reduction of molecular nitrogen to ammonia. The enzyme system of the conventional nitrogenase consists of two components, the iron protein and the molybdenum-iron protein (MoFe-protein). The MoFe-protein contains two kinds of metal clusters. One of them, the iron-molybdenum cofactor (FeMo-cofactor), is postulated to be the catalytic center of the biological nitrogen fixation. The FeMo-cofactor consists of $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$ - and $[\text{Fe}_3\text{MoS}_3]$ -cuban fragments bridged by three sulfur atoms and homocitrate. In its complexity and size it is unique in nature.

The binding of molybdenum in the FeMo-cofactor has been investigated using the time differential perturbed γ - γ -angular correlations (TDPAC) spectroscopy. By observing the hyperfine interaction of the nuclear quadrupole moment of molybdenum-99 with the electric field gradient at its site information about the charge density distribution and thus about the ligand field configuration can be obtained. The measured quadrupole parameters describe size and symmetry of the electric field gradient as well as the homogeneity of the binding state and relaxation effects. Because of its high sensitivity and temperature independence the TDPAC method is suitable for the investigation of biological probes under physiological conditions.

The TDPAC-measurements of the bacteria species *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii* and *Klebsiella oxitoca* yield two different Mo-binding states in the FeMo-cofactor of nitrogenase. Comparison with results of other methods has shown that the two binding states could be different redox states of the FeMo-cofactor. In further studies the binding of molybdenum at the Mo-storage protein of *A. vinelandii* has been investigated. The results of the TDPAC-measurements consist with the assumption that the storage protein contains a polymolybdate type nucleus. In addition to the MoFe-protein further Mo-binding proteins were found in *R. capsulatus*. They are part of a recently detected Mo-binding and -transport system.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Die biologische Stickstoff-Fixierung	3
2.1 Aufbau und Funktion der Mo-Nitrogenase	4
2.1.1 Der FeMo-Cofaktor	6
2.1.2 Substratreduktion durch die Nitrogenase	8
2.1.3 Substratbindung am FeMo-Cofaktor	9
2.2 Motivation für die TDPAC-Untersuchungen.	11
3. Grundlagen der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten γ-γ-Winkelkorrelationen mit ^{99}Mo.	12
3.1 γ - γ -Winkelkorrelation bei elektrischer Quadrupolaufspaltung	12
3.1.1 Statische elektrische Quadrupolwechselwirkung in polykristallinen Proben	14
3.2 Das Sondenisotop ^{99}Mo	17
4. Experimentelles	21
4.1 TDPAC-Messungen	21
4.1.1 Aufbau des Spektrometers.	21
4.1.2 Auswertung der Meßdaten.	24
4.1.2.1 Datenreduktion	24
4.1.2.2 Parametrisierung der Meßdaten	25
4.1.2.3 Fourieranalyse der Meßdaten	27
4.2 Biologische und biochemische Methoden	30
4.2.1 Bakterienstämme und Kulturbedingungen	30
4.2.2 Zellaufschluß und Proteinfractionierung	31
5. Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen	34
5.1 Ergebnisse der TDPAC-Messungen an $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -Lösungen	35
5.2 Ergebnisse der TDPAC-Messungen an intakten Zellen	38
5.3 Säulenchromatographische Untersuchungen an Rohextrakten von <i>R. capsulatus</i> , <i>A. vinelandii</i> und <i>K. oxitoca</i>	42
5.3.1 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein und Nachweis weiterer Mo-Bindungssysteme in <i>R. capsulatus</i>	43
5.3.2 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein und im Mo-Speicherprotein von <i>A. vinelandii</i>	47
5.3.3 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein von <i>K. oxitoca</i>	52

6. Diskussion der Ergebnisse	56
6.1 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase	56
6.1.1 Aufbau des FeMo-Cofaktors und Einfluß der Substratbindung auf dessen Konformation	60
6.1.2 Einfluß von Redoxübergängen des MoFe-Proteins auf die Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor	61
6.1.2.1 Der (s-r) → (r) - Prozeß	61
6.1.2.2 Der (s-r) → (ox) - Prozeß	63
6.1.3 Zusammenfassende Interpretation	64
6.2 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im Mo-Speicherprotein von <i>A. vinelandii</i>	66
6.3 Nachweis weiterer Mo-Bindungssysteme in <i>R. capsulatus</i>	68
6.4 Zuordnung von Bindungszuständen durch die Berechnung elektrischer Feldgradienten	70
7. Zusammenfassung und Ausblick	72
Anhang A: Einfluß der Frequenzverteilung δ beim Nachweis von Bindungszuständen	75
Anhang B: Test der Parametersignifikanz.	79
Anhang C: Genauigkeit in der Bestimmung von kleinen Feldgradienten	85
Anhang D: Bestimmung des Asymmetrieparameters η	87
Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

Die Beobachtung der Wechselwirkung des elektrischen Kernquadrupolmomentes eines Sondenkerns mit einem elektrischen Feldgradienten liefert Informationen über die Verteilung der Ladungsdichte am Kernort. Da die Ladungsdichteverteilung auf die Anordnung der Elektronen und Kerne in der Umgebung des Sondenatoms zurückzuführen ist, kann durch das Studium der Kernquadrupolwechselwirkung der chemische Bindungszustand des Atoms beschrieben werden. Durch die Bestimmung von Größe, Symmetrie und Orientierung des elektrischen Feldgradienten wird der Bindungszustand des Sondenatoms eindeutig charakterisiert.

Eine Methode zur Messung der Kernquadrupolwechselwirkung ist die zeitdifferentielle Beobachtung von gestörten γ - γ -Winkelkorrelationen (TDPAC-Spektroskopie, Time Differential Perturbed Angular Correlations Spectroscopy). Sie beruht auf der Messung der zeitabhängigen Winkelkorrelation zweier γ -Quanten, die über eine γ - γ -Kaskade des Sondenkerns emittiert werden. Die beobachteten Signale werden spezifischen Bindungszuständen zugeordnet und erlauben ein vergleichendes Studium unterschiedlicher Bindungsverhältnisse. Im Gegensatz zu anderen bekannten Methoden wie dem Mößbauer-Effekt oder der magnetischen Kernresonanz wird die TDPAC-Technik in der Chemie bisher nicht als Routineverfahren eingesetzt. Aufgrund des geringen Substanzbedarfs (wenige nmol) sowie der Möglichkeit, Messungen unabhängig von der Temperatur und vom Aggregatzustand der Probe durchführen zu können, ist die TDPAC-Technik jedoch in Bereichen einsetzbar, die von den üblichen Methoden, wie z.B. der Mößbauer-Methode, nicht abgedeckt werden. Da die TDPAC-Technik Messungen von flüssigen Proben bei Normaltemperatur ermöglicht, ist sie insbesondere für die Untersuchung biologischer Proben unter physiologischen Bedingungen geeignet. Als Untersuchungsgut bieten sich dabei Metallproteine an, die als Bindungs-, Transport- oder Speicherproteine sowie als Metallenzyme die TDPAC-Sondenisotope spezifisch binden.

Metallenzyme gehören zu den aktivsten und effizientesten Katalysatoren in der Natur. Die meisten biologisch relevanten Übergangsmetalle stammen aus der vierten Reihe des Periodensystems (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn). Ein Element der fünften Reihe, Molybdän (Mo), findet jedoch eine ebenso weite Verbreitung. Molybdän ist im aktiven Zentrum von mehr als 30 Enzymen vorhanden und kommt in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vor. Molybdänenzyme katalysieren eine Vielzahl von anorganischen und organischen Reaktionen und sind in entscheidender Weise am bio-geochemischen Kreislauf von Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff beteiligt [StCo93].

Im biologischen Stickstoffkreislauf wird die Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak (NH_3) bzw. zum Ammonium-Ion (NH_4^+) durch die Molybdän-Nitrogenase und die Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch die Nitrat-Reduktase katalysiert. Molybdän ist

dabei stets Teil der durch Biosynthese gebildeten aktiven Enzymzentren, den sogenannten Cofaktoren. Diese Cofaktoren bestehen aus organischen und anorganischen Komponenten und werden in zwei Gruppen eingeteilt: den Eisen-Molybdän-Cofaktor der Nitrogenase (FeMo-Cofaktor) und die Molybdän-Cofaktoren (Moco) der anderen Molybdänenzyme [Spir85].

Die durch das Enzymsystem der Nitrogenase katalysierte Stickstoff-Fixierung ist einer der grundlegenden Syntheseprozesse in der Natur. Neben Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff ist Stickstoff der am häufigsten vorkommende atomare Baustein pflanzlicher Substanz. Stickstoff bildet einen wesentlichen Baustein der Aminosäuren, Amine und Amide, ist als Bestandteil der Aminogruppe an der Peptidbindung der Proteine beteiligt und präsentiert sich in den Basen der Nukleotide und damit in den Nukleinsäuren. Obwohl sich die Erdatmosphäre zu etwa 78 % aus molekularem Stickstoff (N_2) zusammensetzt, ist Stickstoff häufig der wachstumsbegrenzende Faktor beim Anbau von Kulturpflanzen. Dies liegt darin begründet, daß Stickstoff von höheren Pflanzen nur in gebundener Form aufgenommen und in ein organisches Molekül eingebaut werden kann. Zu einer Reduktion von molekularem Stickstoff in die für Pflanzen verwertbare Form sind jedoch nur einige Bakterien und Blaualgen in der Lage. So ist eine intensive Landwirtschaft ohne die Zufuhr von gebundenem Stickstoff in Form von Düngemitteln undenkbar. Aufgrund der großen Bedeutung von gebundenem Stickstoff wird die Nitrogenase bereits über einen langen Zeitraum intensiv untersucht. Durch das Verständnis von Aufbau und Funktion dieses Enzymsystems erhofft man, in Zukunft das kostspielige Haber-Bosch-Verfahren zur industriellen Ammoniaksynthese durch einen der Natur nachempfundenen Prozeß ersetzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit werden TDPAC-Messungen am Eisen-Molybdän-Cofaktor der Nitrogenase vorgestellt. Als Sondenatom wurde das Isotop Molybdän-99 verwendet, das von den Bakterien analog zum natürlich vorkommenden Molybdän aufgenommen und in den Eisen-Molybdän-Cofaktor eingebaut wird. Durch vergleichende Messungen an *in vivo* und *in vitro* präparierten Proben sollte sowohl die Bindung von Molybdän im Eisen-Molybdän-Cofaktor charakterisiert werden als auch geklärt werden, ob diese Bindung in verschiedenen Bakterienarten identisch ist. Ziel der Untersuchungen war außerdem, weitere Mo-Bindungssysteme, die zusätzlich zur Mo-Bindung im Eisen-Molybdän-Cofaktor auftreten, nachzuweisen und anhand der Quadrupolparameter zu charakterisieren.

Im folgenden Kapitel wird das Enzymsystem der Nitrogenase vorgestellt und auf die Struktur und Eigenschaften des Eisen-Molybdän-Cofaktors der Nitrogenase eingegangen. Das dritte Kapitel beschreibt die Grundlagen der zeitdifferentiellen Beobachtung gestörter γ - γ -Winkelkorrelationen am Beispiel des Sondenisotopes ^{99}Mo . Die Probenpräparation sowie die Meßmethode und Datenreduktion werden in Kapitel vier dargelegt. Die Meßergebnisse werden in Kapitel fünf ausführlich beschrieben und anschließend in Kapitel sechs vergleichend diskutiert.

2. Die biologische Stickstoff-Fixierung

Die Fixierung von molekularem Stickstoff kann auf biotischem und abiotischem Weg erfolgen. Zur abiotischen Fixierung gehört die Oxidation von N_2 zu Nitrit und Nitrat durch elektrische Entladungen in der Atmosphäre. Die so gebundenen Stickstoffmengen sind relativ gering und liegen im gemäßigten Klima bei 1 kg Stickstoff pro Hektar und Jahr sowie bei 5 kg N/(ha·a) unter tropischen Bedingungen [Meng91]. Die ebenfalls zur abiotischen N_2 -Fixierung zählenden industriellen Verfahren zur Herstellung von stickstoffhaltigen Chemikalien binden etwa $70 \cdot 10^6$ t Stickstoff pro Jahr [GaCh87].

Die biotische Stickstoff-Fixierung beträgt das drei- bis vierfache der industriellen Fixierung. Zur Bindung von molekularem Stickstoff sind nur bestimmte Prokaryonten befähigt. Die Prokaryonten sind morphologisch wenig differenziert, weisen aber eine große stoffwechselphysiologische Vielseitigkeit auf. Bereits im Jahr 1888 sind von Hellriegel und Wilfarth die Wurzelknöllchen der Leguminosen mit der N_2 -Bindung in Zusammenhang gebracht und die zentrale Rolle der Bakterien bei der biologischen Stickstoff-Fixierung erkannt worden. Bei diesen von Hellriegel und Wilfarth untersuchten Wurzelknöllchen handelt es sich um eine Symbiose zwischen N_2 -bindenden Bakterien und höheren Pflanzen. Die symbiotische N_2 -Bindung der Leguminosen ermöglicht einen Stickstoffgewinn von 100 - 300 kg N/(ha·a) [Schl92]. Neben den in Symbiose mit höheren Pflanzen lebenden Stickstoff-fixierenden Bakterien gibt es auch freilebende N_2 -fixierende Organismen, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchten Bakterien der Gattungen *Rhodobacter*, *Azotobacter* und *Klebsiella* zählen. Durch freilebende N_2 -fixierende Mikroorganismen werden dem Boden jährlich 1 - 3 kg Stickstoff pro Hektar zugeführt [Schl92]. Aufgrund ihres hohen Stickstoffgewinns ist die biotische N_2 -Fixierung bis heute in allen naturwissenschaftlichen Disziplinen Gegenstand der Forschung.

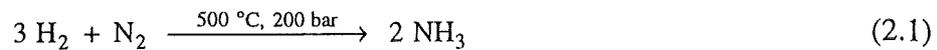
Beim industriell angewandten Haber-Bosch-Verfahren [Habe68] verläuft die Synthese von Ammoniak bei Temperaturen von 350 - 500 °C und Drücken von 200 - 400 bar (Gl. 2.1). Die biologische Stickstoff-Fixierung, die durch das Enzymsystem der Nitrogenase katalysiert wird, findet im Gegensatz dazu bei Raumtemperatur und Normaldruck statt (Gl. 2.2). Der geringe Energieaufwand und die hohe katalytische Aktivität der Nitrogenase sind die Hauptgründe für das große Interesse an der Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen des Enzymsystems.

Bis etwa 1980 war man der Auffassung, daß alle Stickstoff-Fixierer nur eine Nitrogenase, die Molybdän-Nitrogenase, enthalten. Erst mit der Arbeit von Bishop et al. [BiJa80] setzte sich die Erkenntnis durch, daß drei verschiedene Nitrogenasen existieren. Je nachdem, ob das im aktiven Zentrum vorhandene Molybdän durch Vanadium oder Eisen ersetzt wird, bezeichnet man die Nitrogenase als Mo-Nitrogenase, V-Nitrogenase [ArDo89, GaAr89] oder Fe-Nitrogenase [ChPr88]. Jedoch besitzen nicht alle Stickstoff-Fixierer diese drei

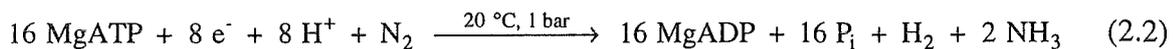
2. Die biologische Stickstoff-Fixierung

Nitrogenasen. So kommen bei *Klebsiella oxitoca* nur die Mo-Nitrogenase [Newt93], bei *Rhodobacter capsulatus* die Mo- und die Fe-Nitrogenase [ScMü91] und bei *Azotobacter vinelandii* alle drei Nitrogenasen [Eady91] vor. In Gegenwart von Molybdän wird jedoch von allen Bakterien nur die Mo-Nitrogenase gebildet [ErMü90]. Die katalytische Aktivität der Nitrogenasen ist an das Vorhandensein von MgATP, eines Reduktionsmittels sowie einer anaeroben Umgebung gebunden.

Haber-Bosch-Verfahren:



Enzysystem der Nitrogenase:



ATP	=	Adenosintri-phosphat
ADP	=	Adenosindi-phosphat
P _i	=	Phosphat, PO ₄ ³⁻

2.1 Aufbau und Funktion der Mo-Nitrogenase

Die Molybdän-Nitrogenase besteht aus zwei unterschiedlichen Proteinen (Abb. 2.1), dem Molybdän-Eisen-Protein (Dinitrogenase) [EaSm72, LuBu78] und dem Eisen-Protein (Dinitrogenase-Reduktase) [ChMu73]. In der Literatur wird die Dinitrogenase häufig auch als „Komponente 1“, die Dinitrogenase-Reduktase als „Komponente 2“ bezeichnet, da die Dinitrogenase bei der säulenchromatographischen Trennung an DEAE-Cellulose die Säule vor der Dinitrogenase-Reduktase verläßt. Nur das Zusammenwirken beider Proteine in Gegenwart von MgATP und eines Reduktionsmittels wie z.B. Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) ermöglicht die *in vitro*-Reduktion von N₂ [SmLo72, OrHa72].

Das Fe-Protein ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, die über einen [Fe₄S₄]-Cluster miteinander verbunden sind. Es besitzt zwei MgATP- bzw. MgADP-Bindungsstellen [Yate92] und fungiert als spezifischer Einelektron-Donor für das MoFe-Protein. Bisher konnte noch kein anderes Reduktionsmittel gefunden werden, das die Aufgabe des

Fe-Proteins zu übernehmen vermag. Die Struktur des Fe-Proteins von *Azotobacter vine-landii* konnte durch eine Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2.9 Å bestimmt werden [GeKo92].

Das MoFe-Protein besteht aus vier Protein-Untereinheiten, die einen $\alpha_2\beta_2$ -Komplex bilden. Spektroskopische Arbeiten haben gezeigt, daß die Metallatome im MoFe-Protein in zwei unterschiedlichen Redoxzentren, bestehend aus jeweils einem P-Cluster und einem Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMo-Cofaktor), enthalten sind (Abb. 2.1). Der Eisen-Molybdän-Cofaktor kann aus dem Protein isoliert werden [ShBr77] und gilt als das aktive Zentrum der Nitrogenase, an dem die Bindung und die Reduktion des molekularen Stickstoffs erfolgen [HaMc83]. Die Proteinumgebung des FeMo-Cofaktors wird in erster Linie durch die α -Untereinheit bestimmt. Der Cofaktor wird durch die Aminosäuren Cys ^{α 275} und His ^{α 442}

Dinitrogenase-Reduktase

Fe-Protein (α_2 -Dimer)
M ~ 65000 D

Dinitrogenase

MoFe-Protein ($\alpha_2\beta_2$ -Tetramer)
M ~ 220000 D

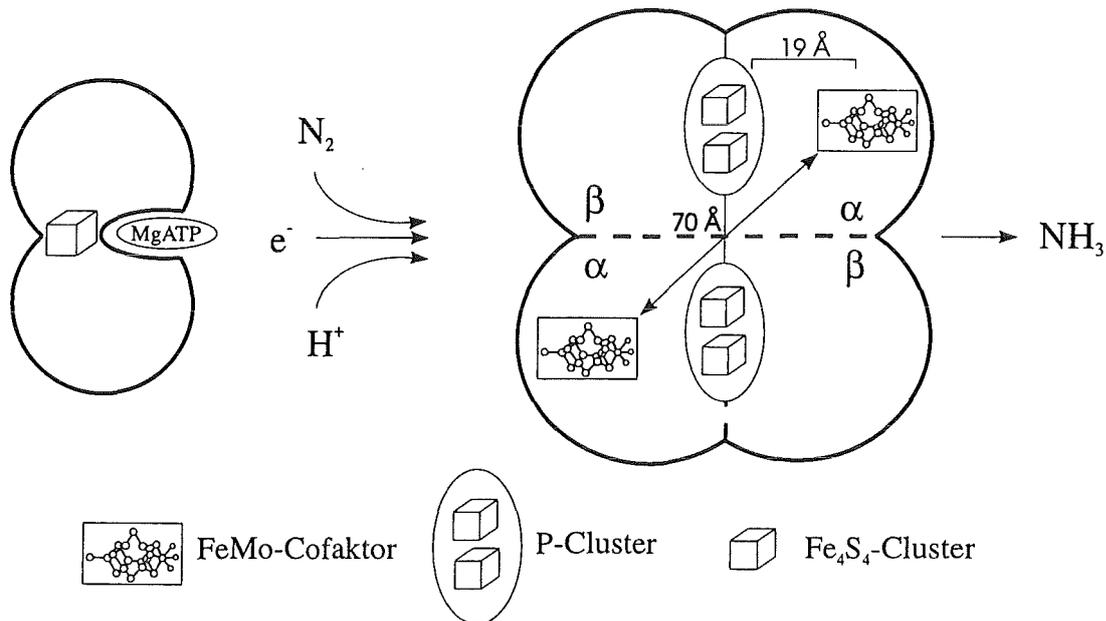


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der Mo-Nitrogenase. Das Enzymsystem wird durch jeweils ein Fe-Protein und ein MoFe-Protein gebildet. Bei der Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak werden 8 Elektronen vom Fe-Protein auf das MoFe-Protein übertragen. Die Anordnung der [FeS]-Cluster und der FeMo-Cofaktoren sowie die Bindungsstelle von MgATP wurde aus Röntgenstrukturanalysen abgeleitet.

2. Die biologische Stickstoff-Fixierung

an das Protein gebunden. Zwei weitere Aminosäuren, His^{α195} und Gln^{α191}, liegen etwa 5 Å vom Cofaktor entfernt und weisen keine Metallbindung auf. Cys^{α275}, His^{α442}, His^{α195} und Gln^{α191} konnten in allen bisher untersuchten MoFe-Proteinen nachgewiesen werden [ReKi93].

Die beiden FeMo-Cofaktoren sind etwa 70 Å voneinander entfernt und haben einen Abstand von ca. 19 Å zum nächsten P-Cluster. Die P-Cluster des MoFe-Proteins bestehen aus jeweils zwei [Fe₄S₄]-Clustern, die über Thiolatreste des Proteins (Cys^{β95} und Cys^{α88}) und eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [ChKi93]. Es wird angenommen, daß der Elektronentransfer vom Fe-Protein auf den FeMo-Cofaktor über den P-Cluster erfolgt [ReCh94, KiRe94].

Weiterhin ist bekannt, daß das isolierte MoFe-Protein in mindestens drei unterschiedlichen Redoxzuständen existiert [MoZu73, SmLo72, OrHa72]. Als nativer oder semi-reduzierter Zustand wird der Redoxzustand bezeichnet, den man bei der Isolierung des MoFe-Proteins in Gegenwart von Dithionit erhält. Dieser Redoxzustand zeigt ein charakteristisches S = 3/2 EPR-Signal (**E**lectron **P**aramagnetic **R**esonance) und kann einelektron-oxidiert bzw. -reduziert werden. Der oxidierte und der reduzierte Zustand des nativen MoFe-Proteins zeigen hingegen kein EPR-Signal. Das charakteristische Signal des Dithionit-reduzierten MoFe-Proteins ist auf den FeMo-Cofaktor zurückzuführen und wird häufig für den Nachweis des intakten Cofaktors genutzt [Burg90].

2.1.1 Der FeMo-Cofaktor

Ein Modell für den FeMo-Cofaktor wurde erstmals 1992 von Kim und Rees [KiRe92a,b] vorgeschlagen und basiert auf Röntgenstrukturanalysen des MoFe-Proteins von *Azotobacter vinelandii*. Zwar konnten aufgrund der geringen Auflösung von 2.7 Å keine einzelnen Atome identifiziert werden, doch die Kombination der experimentell ermittelten Elektronendichten mit biochemisch gesicherten Peptidsequenzen, Ergebnissen von Mutagenesestudien, spektroskopischen Resultaten, der analytisch-chemisch ermittelten Zusammensetzung des isolierten Cofaktors sowie Röntgenstrukturdaten von Modellkomplexen lieferte ein bis heute gültiges Bild des Cofaktors, das auch mit neueren Röntgenstrukturanalysen des MoFe-Proteins von *Azotobacter vinelandii* und *Clostridium pasteurianum* übereinstimmt [ChKi93, KiWo93, BoCa92]. Eine ausführliche Zusammenstellung der spektroskopischen Untersuchungen am FeMo-Cofaktor kann den Übersichtsartikeln von Burgess [Burg90], Smith und Eady [SmEa92] sowie Newton [Newt92] entnommen werden.

Der FeMo-Cofaktor besteht aus [Fe₄S₃]- und [Fe₃MoS₃]-Cubanfragmenten, die über drei Schwefelbrücken verbunden sind [Eady95]. Es wurde gezeigt, daß Homocitrat ein fester

Bestandteil des Cofaktors ist [HoIm88] und die Koordinationssphäre des sechsfach koordinierten Molybdäns vervollständigt. Der längste Metall-Metall-Abstand im Cofaktor zwischen dem außen liegenden Fe-Atom (Fe1) und dem Mo-Atom beträgt etwa 7.4 Å (Abb. 2.2). Der mittlere Fe-Fe-Abstand zweier über Schwefel verbundener Fe-Atome beträgt ca. 2.5 Å. Zwei nicht miteinander verbundene Fe-Atome liegen etwa 3.8 Å voneinander entfernt. Der Abstand vom Mo-Atom zu den drei nächsten Fe-Atomen beträgt ca. 2.7 Å und ist etwa gleich dem Abstand zwischen Fe1 und den drei Fe-Atomen des 1Mo:3Fe:3S-Fragmentes [ReCh94]. Die tetraedrische Koordinationsgeometrie für Fe1 und die oktaedrische Geometrie für das Mo-Atom sind, wie aus Untersuchungen an Modellverbindungen bekannt ist, typisch für diese Metalle [HoSi85, Holm93]. Ungewöhnlich in dem Modell des Cofaktors sind jedoch die dreifach koordinierten Fe-Atome. Allerdings konnte eine derartige Koordination auch schon in Fe-Thiolat-Verbindungen nachgewiesen werden [PoSh91].

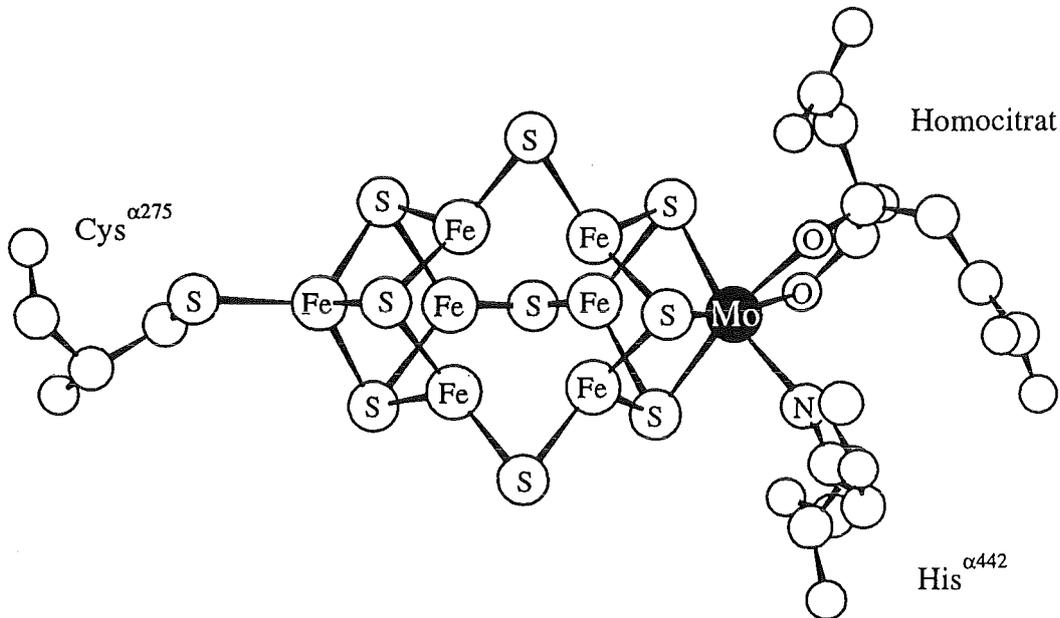


Abb. 2.2: Strukturmodell des Eisen-Molybdän-Cofaktors nach Kim und Rees [KiRe92a,b]. Atomabstände: Mo-S \approx 2.4 Å, Mo-O/N \approx 2.2 Å, Mo-Fe \approx 2.7 Å [ChCh93, ChTi95].

2.1.2 Substratreduktion durch die Nitrogenase

Die Substratreduktion durch die Nitrogenase enthält drei wesentliche Elektronentransferschritte (Abb. 2.3): (i) die Reduktion des Fe-Proteins durch die Elektronentransportproteine Ferredoxin oder Flavodoxin (*in vitro* kann auch Dithionit zur Reduktion des Fe-Proteins verwendet werden); (ii) Transfer einzelner Elektronen vom Fe-Protein zum MoFe-Protein, verbunden mit der Hydrolyse von zwei Molekülen MgATP; (iii) Abgabe von Elektronen und Protonen an das am FeMo-Cofaktor gebundene Substrat im MoFe-Protein [ReCh94].

Die Kinetik der Stickstoffreduktion wurde von Thorneley und Lowe eingehend untersucht [ThLo83, ThLo84a,b, LoTh84a,b]. Sie konnten zeigen, daß die Nitrogenase ein langsam wirkendes Enzym ist und zur Reduktion von N_2 zu NH_3 bei Raumtemperatur etwa 1.5 s benötigt. Der gesamte Prozeß der biologischen Stickstoff-Fixierung besteht aus acht Elektron-Übergängen vom Fe-Protein auf das MoFe-Protein. Die Einzelzustände des MoFe-Proteinzyklus werden mit E_n bezeichnet, wobei n die Anzahl der vom Fe-Protein übertragenen Elektronen angibt. Nach dem allgemein anerkannten Modell von Thorneley und Lowe werden die beiden ersten Elektronen zur Reduktion von zwei H^+ zu H_2 verwendet. Die folgenden sechs Elektronen dienen dann der Stickstoff-Fixierung. Molekularer Stickstoff wird vermutlich im E_3 - oder E_4 -Zustand des MoFe-Proteins unter Abgabe von H_2 gebunden. Im Anschluß an den E_5 -Zustand wird dann der reduzierte Stickstoff in Form von NH_3 freigesetzt.

Eine besonders außergewöhnliche Eigenschaft der Nitrogenase ist ihre Fähigkeit, nicht nur molekularen Stickstoff, sondern auch andere Substrate wie z.B. H^+ , N_2H_2 , C_2H_2 , C_2H_4 oder C_3H_7CN reduzieren zu können [Burg85, Burg92]. So kann zum Nachweis der enzymatischen Aktivität die Reduktion von Acetylen (C_2H_2) zu Ethylen (C_2H_4) genutzt werden [Burr75].

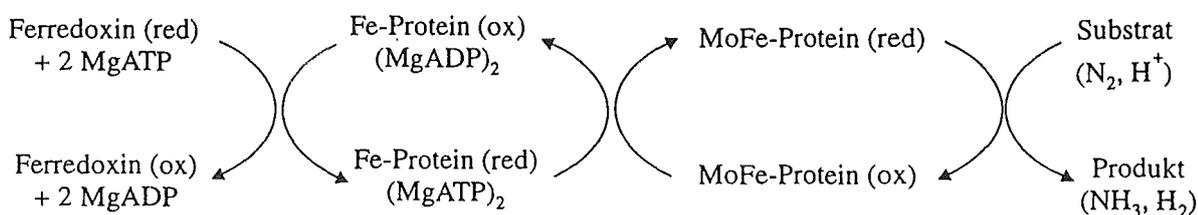


Abb. 2.3: Schematischer Reaktionsmechanismus der Substratreduktion durch das Enzymsystem der Nitrogenase. Die Reduktion des Fe-Proteins kann *in vitro* auch durch Dithionit erfolgen.

Nach wie vor sind jedoch zahlreiche Details der Substratreduktion ungeklärt. So sind Fragen nach der Wechselwirkung zwischen dem Fe-Protein und dem MoFe-Protein, dem Elektronenfluß vom Reduktionsmittel über das Fe-Protein zum MoFe-Protein und der Rolle von MgATP weiterhin offen.

2.1.3 Substratbindung am FeMo-Cofaktor

Obwohl seit 1992 ein Strukturmodell des FeMo-Cofaktors vorliegt, ist der Mechanismus der Substratbindung am Cofaktor bis heute nicht bekannt. Die Ursache für das Fehlen spektroskopischer Untersuchungen am substratgebundenen Cofaktor liegt darin, daß die Substrate nur am Cofaktor des reduzierten MoFe-Proteins, also unter "turn-over"-Bedingungen, gebunden werden. Das früher als Bindungsstelle favorisierte Mo-Atom ist mit der Entdeckung der V- und der Fe-Nitrogenase in den Hintergrund getreten, und es wird heute auch die Bindung an einem oder mehreren Fe-Atomen diskutiert [Burg92, Orme92, Sell93, ReCh94]. Dabei könnten insbesondere die in ungewöhnlicher Weise dreifach und näherungsweise trigonal-planar koordinierten Fe-Atome (Abb. 2.2) eine zentrale Rolle spielen. Weiterhin muß aufgrund der Substratvielfalt von mehreren Bindungsplätzen am FeMo-Cofaktor ausgegangen werden. So wurde vorgeschlagen, daß das N_2 -Molekül im käfigartigen Zwischenraum des Cofaktors gleichzeitig an alle sechs Fe-Atome gebunden wird (Abb 2.4a). Diese Art der Substratbindung kann jedoch nicht die Bindung von größeren Molekülen wie z.B. C_3H_7CN oder auch die Bindung von H^+ und C_2H_2 erklären. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß das N_2 -Molekül "side-on" (Abb 2.4b) oder "end-on" (Abb. 2.4c) an zwei Fe-Atome koordiniert. Ein Vorschlag für die Bindung von N_2 am Mo-Atom ist in Abb. 2.4d dargestellt. Durch eine Änderung der Oxidationszahl des Molybdänatoms von +IV im substratfreien Cofaktor auf die Oxidationszahl +II könnte der Homocitrat-Ligand dissoziieren und N_2 gebunden werden. Bei allen diesen Vorschlägen handelt es sich bisher jedoch nur um Modelle, die noch experimenteller Überprüfung bedürfen.

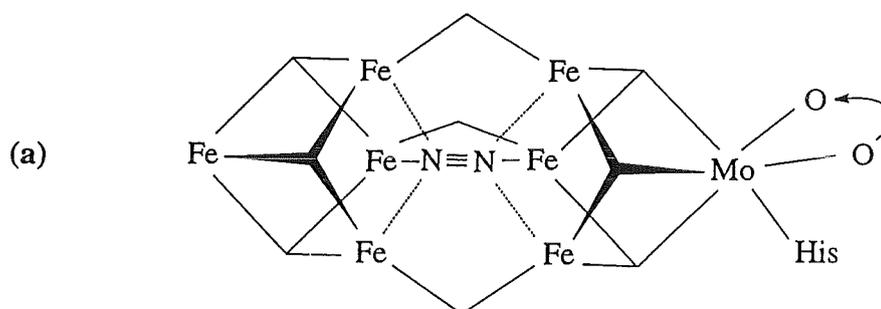


Abb. 2.4: Modelle für die Bindung von N_2 am FeMo-Cofaktor [Sell93].

(a) Bindung innerhalb des FeMo-Cofaktors

2. Die biologische Stickstoff-Fixierung

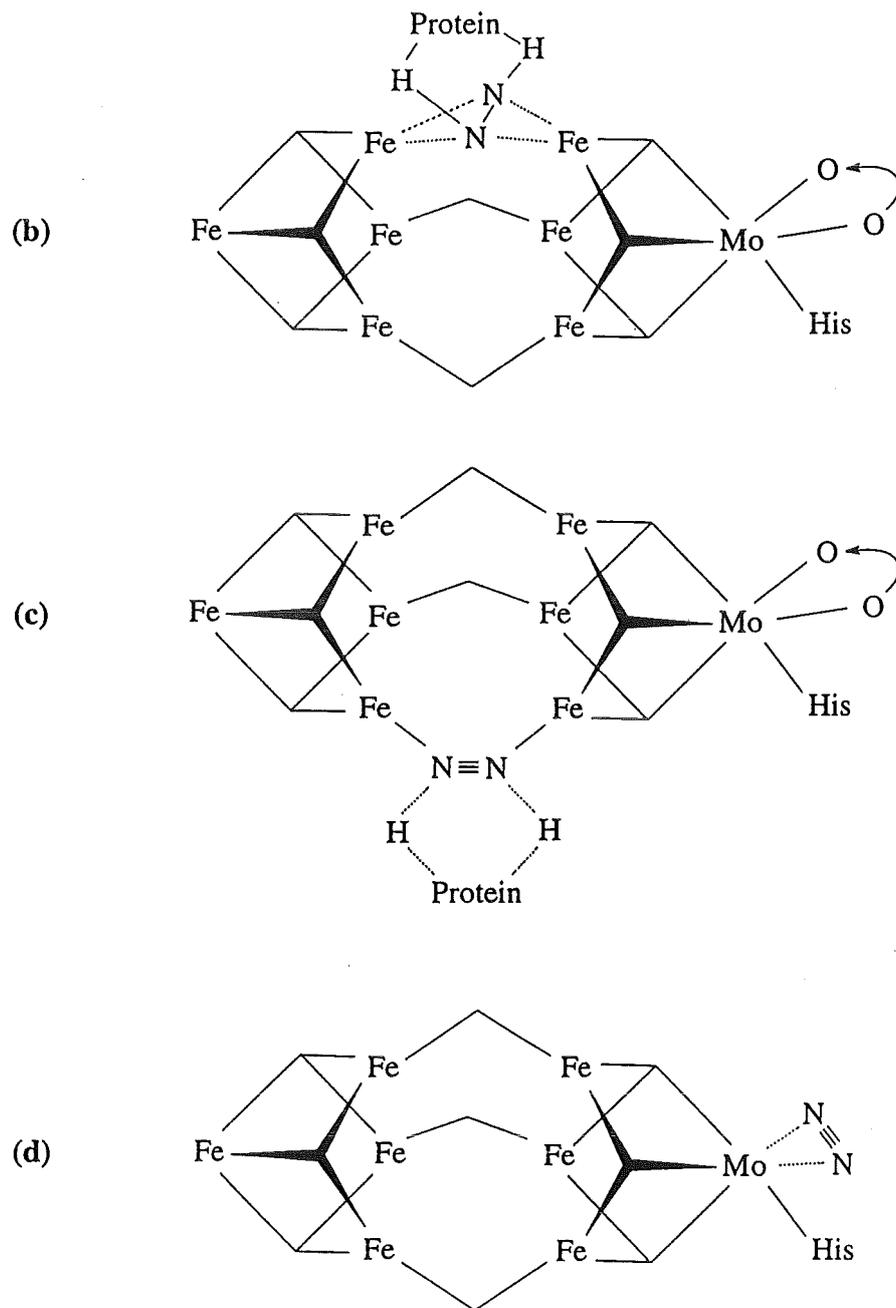


Abb. 2.4: Modelle für die Bindung von N_2 am FeMo-Cofaktor [Sell93].

- (b) "side-on"-Bindung und (c) "end-on"-Bindung an zwei Fe-Atome
- (d) Bindung am Mo-Atom unter Dissoziation von Homocitrat

2.2 Motivation für die TDPAC-Untersuchungen

Das gegenwärtig allgemein anerkannte Strukturmodell des FeMo-Cofaktors basiert auf einer Kombination von Röntgenstrukturanalysen des proteingebundenen Cofaktors und Ergebnissen biochemischer und spektroskopischer Untersuchungen am isolierten und proteingebundenen Cofaktor. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, Röntgenstrukturanalysen des isolierten Cofaktors mit atomarer Auflösung durchzuführen. Weiterhin sind auch die Biosynthese und die Redoxeigenschaften des Cofaktors sowie die Substratbindungsstelle am Cofaktor noch nicht vollständig geklärt.

Die TDPAC-Methode kann insbesondere zur Aufklärung der Biosyntheseschritte und zum Verständnis der Redoxeigenschaften des Cofaktors einen wichtigen Beitrag liefern. Mit ^{99}Mo steht ein TDPAC-Isotop zur Verfügung, das von den Bakterien in den Mo-Bindungsplatz des FeMo-Cofaktors eingebaut wird. Durch die Beobachtung der Wechselwirkung zwischen dem Kernquadrupolmoment des Sondenkerns und dem elektrischen Feldgradienten am Kernort können somit unterschiedliche Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor, wie sie z.B. bei Redoxübergängen oder in Vorstufen des FeMo-Cofaktors auftreten, nachgewiesen werden.

Für weiterführende Untersuchungen ist es jedoch zunächst erforderlich, den Mo-Bindungszustand im FeMo-Cofaktor anhand der Quadrupolparameter eindeutig zu charakterisieren. Diese Parameter können dann als "finger-print" für den Mo-Bindungszustand im FeMo-Cofaktor verwendet werden. Zur Aufklärung der Biosynthese könnten Mutanten eingesetzt werden, bei denen die an der FeMo-Cofaktorsynthese beteiligten Gene Deletionen enthalten. Durch einen Vergleich der Quadrupolparameter für die jeweils in den Mutanten akkumulierten Vorstufen des FeMo-Cofaktors mit den Parametern chemisch synthetisierter Mo-Modellverbindungen sollte es dann möglich sein, den Ablauf der Biosynthese des Cofaktors aufzuklären.

Da die TDPAC-Technik die Messung biologischer Proben unter physiologischen Bedingungen ermöglicht, kann sie zur Untersuchung der Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor während der Substratreduktion ("turn-over"-Bedingungen) eingesetzt werden. Anhand eines Vergleiches der Quadrupolparameter definierter Redoxzustände des FeMo-Cofaktors mit den unter "turn-over"-Bedingungen bestimmten Parametern können dann Aussagen zum Redoxverhalten des Cofaktors während der Substratreduktion getroffen werden.

3. Grundlagen der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten γ - γ -Winkelkorrelationen mit ^{99}Mo

Die Methode der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten γ - γ -Winkelkorrelationen (Time Differential Perturbed Angular Correlations Technique: TDPAC) ist eine kernspektroskopische Meßmethode, bei der die Wechselwirkung eines angeregten Atomkerns mit elektrischen oder magnetischen Feldern gemessen wird (Hyperfeinwechselwirkung). Ohne das Anlegen externer Felder werden diese Felder nur von den Elektronen und Atomrümpfen in der Kernumgebung hervorgerufen. Die Störung der Winkelkorrelation zeigt sich in einer zeitlichen Änderung der γ -Ausstrahlcharakteristik. Durch die Beobachtung dieser Störung kann die Feldverteilung am Kernort charakterisiert werden.

Grundlegende Voraussetzung für die Messung von gestörten Winkelkorrelationen ist eine anisotrope Emission von γ -Quanten. Da aufgrund der Drehimpulserhaltung die Emissionswahrscheinlichkeit eines γ -Quants mit der Orientierung des Kernspins gekoppelt ist, kann bei vorhandener Kernspinausrichtung (Alignment) eine anisotrope Winkelverteilung der emittierten γ -Quanten beobachtet werden. Die ungleiche Besetzung der m -Unterzustände wird durch den Nachweis des ersten γ -Quants einer Zerfallskaskade erreicht. Mit dieser Beobachtung wird aus dem Ensemble der beliebig orientierten Kerne ein Unterensemble ausgewählt. Durch eine Koinzidenzmessung wird erreicht, daß nur die zu der Zerfallskaskade gehörenden γ -Quanten detektiert werden.

Da die in dieser Arbeit untersuchten Proben keine meßbaren inneren Magnetfelder besitzen, soll im folgenden nur die beobachtete elektrische Quadrupolwechselwirkung zwischen dem Kernquadrupolmoment und dem elektrischen Feldgradienten diskutiert werden. Eine ausführliche Darstellung der Theorie kann den Arbeiten von Frauenfelder und Steffen [FrSt65] sowie Schatz und Weidinger [ScWe92] entnommen werden.

3.1 γ - γ -Winkelkorrelation bei elektrischer Quadrupolaufspaltung

Ausgangspunkt der Winkelkorrelationsmessung ist ein angeregter Kern, der über eine γ - γ -Kaskade in einen energetisch niedrigeren Zustand übergeht. Der Anfangszustand $|I_i, m_i\rangle$ zerfällt unter Emission von γ_1 in den Zwischenzustand $|I, m\rangle$, der anschließend unter Emission von γ_2 in den Endzustand $|I_f, m_f\rangle$ übergeht (Abb. 3.1). Die dabei auftretenden Übergangsamplituden enthalten das Matrixelement $\langle I, m, \vec{k}_1, \sigma_1 | H_1 | I_i, m_i \rangle$ für den Übergang vom Anfangs- in den Zwischenzustand unter Emission von γ_1 in die Richtung \vec{k}_1 mit der Polarisation σ_1 sowie das Matrixelement $\langle I_f, m_f, \vec{k}_2, \sigma_2 | H_2 | I, m \rangle$ für den Übergang vom

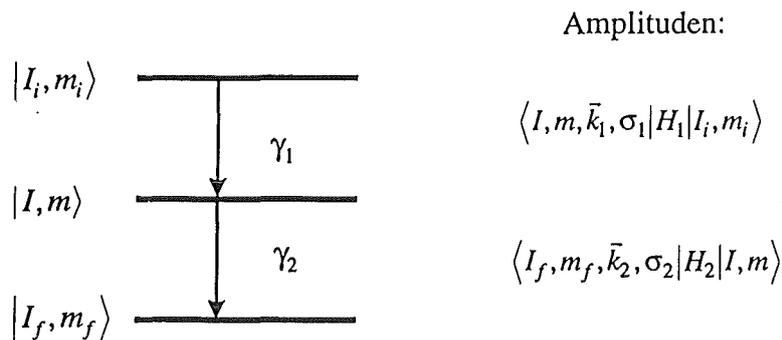


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer $\gamma\text{-}\gamma$ -Kaskade mit Übergangsamplituden. \vec{k}_i und σ_i bezeichnen Emissionsrichtung und Polarisation des γ -Quants i ($i = 1, 2$) [ScWe92].

Zwischen- in den Endzustand, wobei γ_2 in die Richtung \vec{k}_2 mit der Polarisation σ_2 emittiert wird. Die Operatoren H_1 und H_2 sind die Wechselwirkungsoperatoren für die Emission von γ_1 bzw. γ_2 . Die Berechnung der Matrixelemente und die Summation über alle Anfangs- und Endzustände sowie die Polarisation führen zu folgendem Ausdruck für die Winkelverteilung:

$$W(\vec{k}_1, \vec{k}_2) = W(\Theta) = \sum_{k=0}^{k_{\max}} A_{kk} \cdot P_k(\cos \Theta) \quad (3.1)$$

wobei P_k die Legendre-Polynome der Ordnung k und A_{kk} die Anisotropiekoeffizienten sind. Der Summationsindex k ist durch den Kernspin I des Zwischenzustandes und die Multipolaritäten L_1 und L_2 der Übergänge gegeben:

$$0 \leq k \leq \text{Min}(2I, 2L_1, 2L_2) \quad (3.2)$$

wobei k nur gerade Werte annimmt, wenn keine zirkulare Polarisation gemessen wird.

Θ gibt den Winkel zwischen den Emissionsrichtungen von γ_1 und γ_2 an. Die Koeffizienten A_{kk} beschreiben die Anisotropie und hängen nur von den Spins, den Multipolaritäten und den Mischungsraten der Übergänge ab. Berechnete Werte für A_{kk} liegen tabelliert vor (z.B. [App68]).

Betrachtet man einen Kern mit nichtverschwindendem Quadrupolmoment Q , der sich in einem Zwischenzustand mit endlicher Lebensdauer befindet, so übt ein von den Elektronen und Atomrümpfen erzeugter elektrischer Feldgradient (EFG) am Kernort ein Drehmoment

aus, das zu einer "Präzession" der Winkelkorrelation führt. Im quantenmechanischen Bild führt diese Wechselwirkung zu einer Aufhebung der m -Entartung.

Die Winkelkorrelation für Proben mit statistisch verteilten Orientierungen des elektrischen Feldgradienten (polykristalline Proben) kann wie folgt dargestellt werden:

$$W(\Theta, t) = \sum_{k=0}^{k_{\max}} A_{kk} \cdot G_{kk}(t) \cdot P_k(\cos \Theta) \quad (3.3)$$

Die Störfunktion $G_{kk}(t)$ enthält direkt die Übergangsfrequenzen der Niveaufspaltung und die Übergangsamplituden der γ -Übergänge.

3.1.1 Statische elektrische Quadrupolwechselwirkung in polykristallinen Proben

Der elektrische Feldgradient ist ein spurfreier symmetrischer Tensor zweiter Stufe und kann als zweifache vektorielle Ableitung des Potentials dargestellt werden. Im Hauptachsensystem verschwinden die Nichtdiagonalelemente, und die drei Diagonalelemente werden dem Betrag nach geordnet:

$$|V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}| \quad (3.4)$$

Da es sich beim Tensor des Feldgradienten um einen spurfreien Tensor handelt, kann er durch zwei Parameter beschrieben werden: durch die Größe V_{zz} , vereinfacht auch als Feldgradient bezeichnet, und den wie folgt definierten Asymmetrieparameter η :

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}, \quad \text{mit } 0 \leq \eta \leq 1 \quad (3.5)$$

Die Größe des Asymmetrieparameters ist ein Maß für die Abweichung des Feldgradienten von der Axialsymmetrie. Für kugelsymmetrische Ladungsverteilungen gilt $V_{zz} = V_{yy} = V_{xx} = 0$, und es findet keine Quadrupolwechselwirkung statt. Für den Fall eines axialsymmetrischen Feldgradienten ($V_{xx} = V_{yy}$, d.h. $\eta = 0$) können die Übergangsenergien zwischen zwei Unterzuständen m_1 und m_2 wie folgt berechnet werden:

$$\begin{aligned}
 \Delta E_Q(m_1 \rightarrow m_2) &= E_Q(m_1) - E_Q(m_2) \\
 &= |m_1^2 - m_2^2| \cdot \frac{3eQV_{zz}}{4I \cdot (2I-1)} \\
 &= 3 \cdot |m_1^2 - m_2^2| \cdot \hbar \omega_Q
 \end{aligned} \tag{3.6}$$

wobei $\hbar = h/2\pi$ (h = Plancksches Wirkungsquantum) und die Quadrupolfrequenz ω_Q eingeführt wurden:

$$\omega_Q = \frac{eQV_{zz}}{4I \cdot (2I-1) \cdot \hbar} \tag{3.7}$$

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird eine von der Quadrupolfrequenz abgeleitete, drehimpulsunabhängige Größe, die Quadrupolkopplungskonstante ν_Q , verwendet:

$$\nu_Q = \frac{eQV_{zz}}{h} \tag{3.8}$$

Für den Fall des TDPAC-Isotopes ^{99}Mo mit dem Kernspin $I = 5/2$ im Zwischenzustand ergibt sich somit für die Quadrupolaufspaltungsenergien E_Q :

$$\begin{aligned}
 E_Q &= -\frac{1}{5} eQV_{zz} && \text{für } m = \pm 1/2 \\
 E_Q &= -\frac{1}{20} eQV_{zz} && \text{für } m = \pm 3/2 \\
 E_Q &= +\frac{1}{4} eQV_{zz} && \text{für } m = \pm 5/2
 \end{aligned} \tag{3.9}$$

wobei aufgrund der m^2 -Abhängigkeit in Gl. 3.6 eine energetische Entartung für $\pm m$ erhalten bleibt. Man spricht in diesem Fall von einem Alignment. Für einen axialsymmetrischen Feldgradienten ($\eta = 0$) ergeben sich folgende Übergangsfrequenzen:

$$\begin{aligned}
 \omega_1 &= 6 \cdot \omega_Q && \text{für } m = \pm 3/2 \leftrightarrow m = \pm 1/2 \\
 \omega_2 &= 12 \cdot \omega_Q && \text{für } m = \pm 5/2 \leftrightarrow m = \pm 3/2 \\
 \omega_3 &= 18 \cdot \omega_Q && \text{für } m = \pm 5/2 \leftrightarrow m = \pm 1/2
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

Die Übergangsfrequenzen stehen in einem Verhältnis von $\omega_1:\omega_2:\omega_3 = 1:2:3$. Für nicht axialsymmetrische Feldgradienten ($\eta \neq 0$) ist eine einfache Berechnung der Matrixelemente für E_Q nicht mehr möglich. Ganzzahlige Verhältnisse der Übergangsfrequenzen treten erst wieder für einen Wert von $\eta = 1$ auf. Die Energieaufspaltung als Funktion des Asymmetrieparameters ist in Abb. 3.2 dargestellt.

Unter der Annahme eines zeitlich konstanten Feldgradienten ergibt sich für die in Gl. 3.3 eingeführte Störfunktion $G_{kk}(t)$ folgender Ausdruck:

$$G_{kk}(t) = s_{k0}(\eta) + \sum_{n=1}^3 s_{kn}(\eta) \cdot \cos(\omega_n(\eta)t) \quad (3.11)$$

Das bedeutet, daß die Winkelkorrelation mit den Frequenzen ω_1 , ω_2 und ω_3 oszilliert und jede Frequenz mit dem Gewicht $s_{kn}(\eta)$ ($n = 1, 2, 3$) vorkommt.

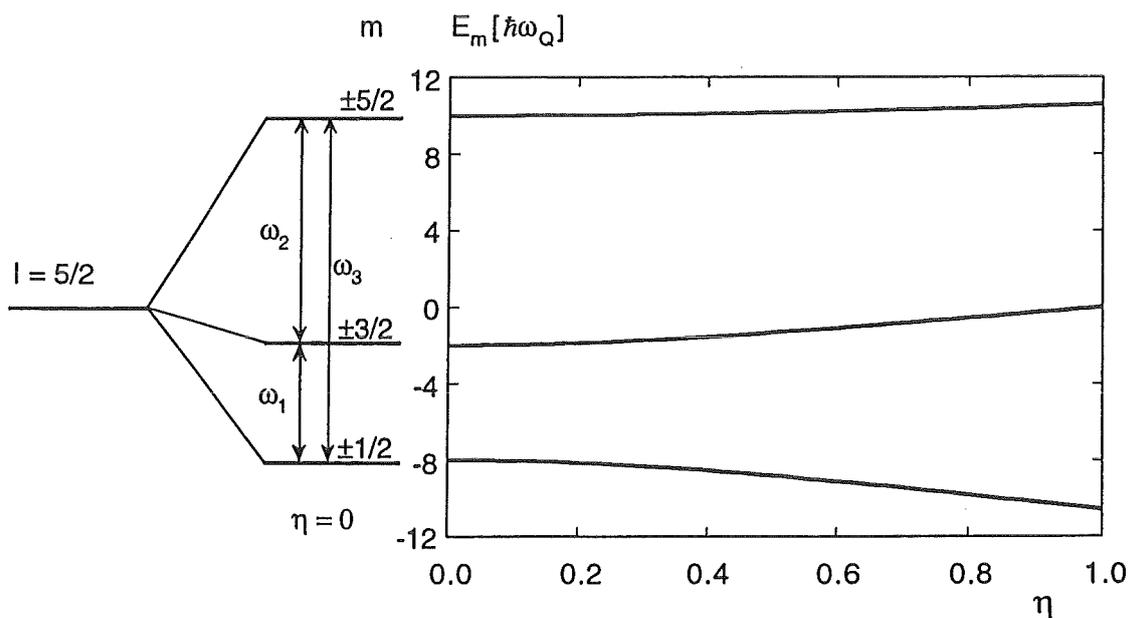


Abb. 3.2: Energieaufspaltung für einen Kern mit Kernspin $I = 5/2$ als Funktion des Asymmetrieparameters η ($V_{zz} = \text{const.}$) [Schw91].

3.2 Das Sondenisotop ^{99}Mo

Das Mutterisotop Molybdän-99 zerfällt mit einer Halbwertszeit von 66 Stunden durch β^- -Zerfall in Technetium-99. Mit einer relativen Wahrscheinlichkeit von 82 % wird durch diesen β^- -Übergang der metastabile Zwischenzustand $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($T_{1/2} = 6 \text{ h}$) besetzt, welcher seinerseits unter Emission eines 143 keV γ -Quants in den Grundzustand übergeht. Das für die Messung der gestörten Winkelkorrelationen geeignete Startniveau der γ - γ -Kaskade wird beim β^- -Zerfall von ^{99}Mo mit einer relativen Wahrscheinlichkeit von 17 % besetzt. Dieser angeregte Kernzustand geht unter Emission von zwei γ - γ -Kaskaden, 740 keV - 181 keV (58 %) und 740 keV - (40 keV -) 141 keV (42 %), in den Grundzustand über. Die Quadrupolwechselwirkung wird für den angeregten ^{99}Tc -Zwischenzustand ($T_{1/2} = 3.6 \text{ ns}$) mit Kernspin $I = 5/2$ beobachtet. Beide Zerfallskaskaden können für die Messung von gestörten Winkelkorrelationen verwendet werden, wobei die 40 keV γ -Quanten der Tripelkaskade nicht detektiert werden. Ein vereinfachtes Zerfallsschema von ^{99}Mo ist in Abb. 3.3 dargestellt. Das Zwischenniveau und die für die Winkelkorrelationsmessung wesentlichen γ -Quanten sind hervorgehoben.

Der maximale Summationsindex k_{max} , der durch den Kernspin des Zwischenzustandes und die Multipolaritäten der γ -Übergänge gegeben ist, wird nach Gl. 3.2 zu $k_{\text{max}} = 4$ bestimmt. Für den Spezialfall des Sondenkerns ^{99}Mo können die Terme vierter Ordnung vernachlässigt werden [Reis94]. Die Winkelverteilung $W(\Theta, t)$ erhält damit folgende Form:

$$W(\Theta, t) = 1 + A_{22} \cdot G_{22}(t) \cdot P_2(\cos \Theta) \quad (3.12)$$

Der Anisotropiekoeffizient A_{22} ist für die 740 keV - 181 keV Kaskade positiv (+ 10.3 %) und nimmt für die Tripelkaskade 740 keV - (40 keV -) 141 keV einen negativen Wert (-16.1 %) an [Reis94].

Die Eignung bestimmter Isotope für die TDPAC-Spektroskopie ist an bestimmte Kriterien gebunden: eine lange Lebensdauer des Mutterisotopes, eine große Anisotropie, ausreichend hohe γ -Energien (zur Vermeidung von Selbstabsorption in der Probe), eine genügend lange Lebensdauer des Zwischenzustandes und ein großes Kernquadrupolmoment im Zwischenzustand. ^{99}Mo bzw. ^{99}Tc erfüllen diese Bedingungen nur bedingt. Zwar ist die Halbwertszeit des Mutterisotopes ^{99}Mo mit 66 Stunden bei nicht allzu langwierigen Probenpräparationen ausreichend, dennoch können nur zwei bis drei Proben pro Versuch aufbereitet und mit ausreichender Statistik gemessen werden.

Desweiteren setzt das Auftreten von zwei γ - γ -Kaskaden mit unterschiedlichen Vorzeichen der Anisotropie eine exakte energetische Trennung der gemessenen γ -Energien voraus. Dies wird dadurch erschwert, daß die Stopquanten mit γ -Energien von 141 keV und

3. Grundlagen der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten $\gamma\text{-}\gamma$ -Winkelkorrelationen mit ^{99}Mo

181 keV energetisch sehr nahe beieinander liegen und zusätzlich durch den 143 keV-Übergang des metastabilen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in den Grundzustand (rel. Wahrscheinlichkeit von 82 %) überlagert werden. Der Einfluß dieses Zerfallskanals auf das γ -Energiespektrum von ^{99}Mo wird in Abb. 3.4 dargestellt. In einer von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gereinigten ^{99}Mo -Probe können die drei relevanten γ -Energien von 141 keV, 181 keV und 740 keV aufgelöst werden. Innerhalb von 24 Stunden wird jedoch bereits soviel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nachgebildet, daß die 181 keV γ -Emissionslinie durch die deutlich dominierende 143 keV Linie unterdrückt wird und eine eindeutige Energiediskriminierung nicht mehr möglich ist. Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit bestimmten Quadrupolparameter über die Beobachtung der Tripelkaskade gewonnen.

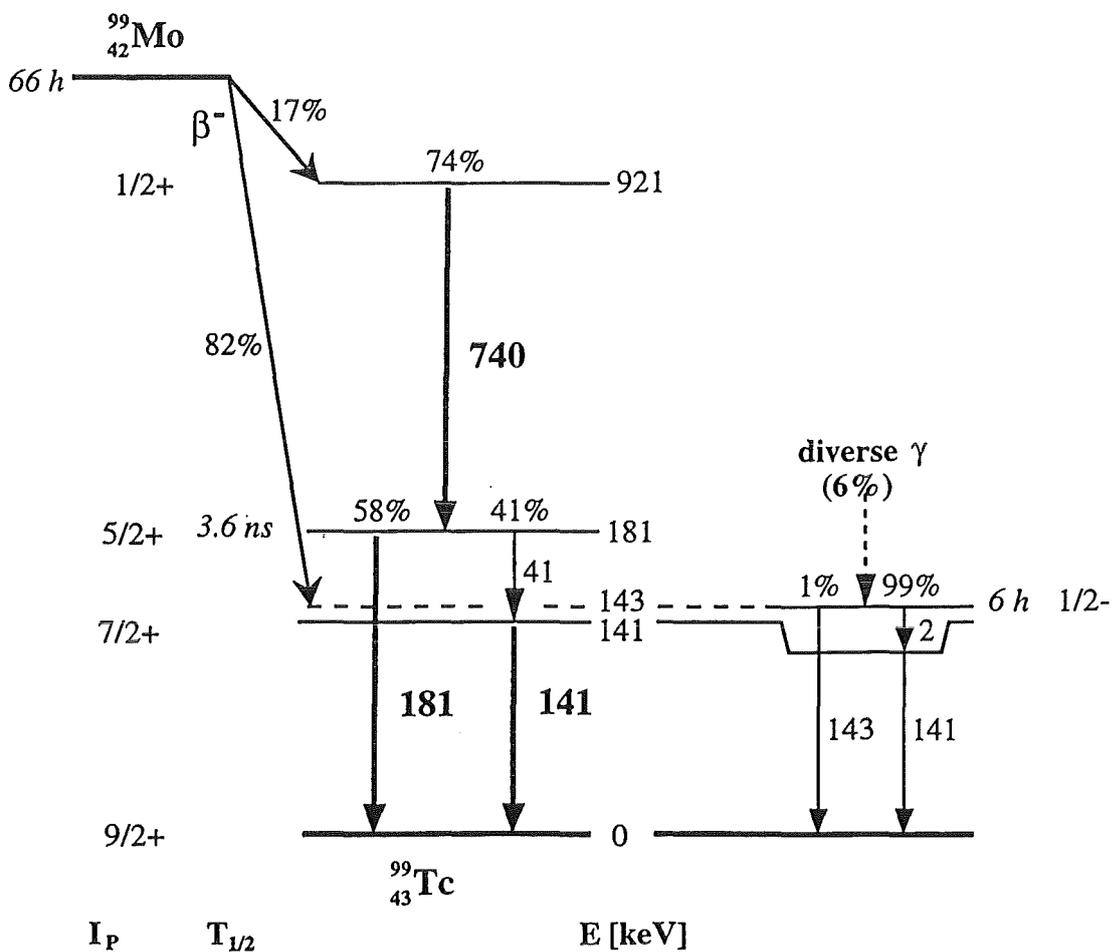


Abb. 3.3: Vereinfachtes Zerfallsschema von ^{99}Mo [MüCh86].

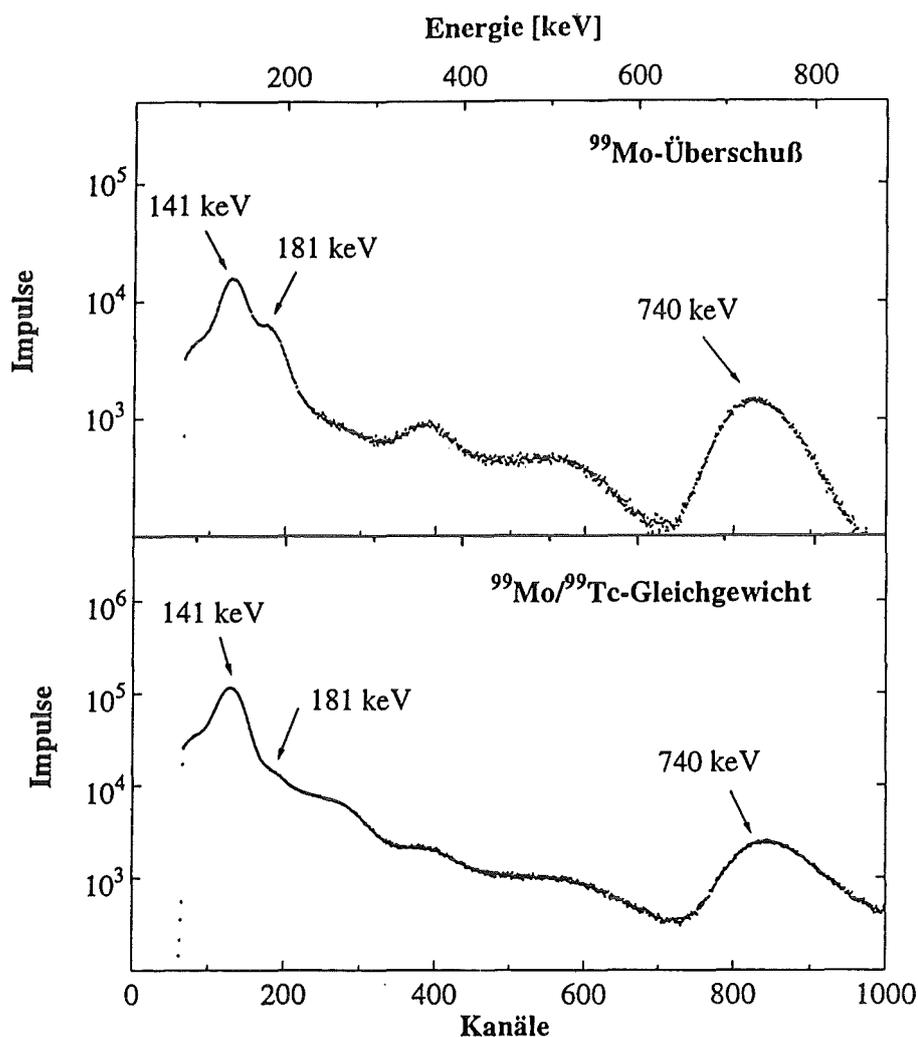


Abb. 3.4: Mit einem BaF_2 -Detektor gemessenes γ -Energiespektrum einer $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -Lösung.

Oben: direkt nach dem Abtrennen von $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Unten: beim Vorliegen eines $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$ -Gleichgewichtes

Ein weiteres Kriterium für die Eignung von Isotopen für TDPAC-Messungen ist die Größe des Kernquadrupolmomentes. Das Quadrupolmoment wurde für den Zwischenzustand $I = 5/2$ von ^{99}Tc bisher nicht bestimmt. Der Technetiumkern weist jedoch im Grundzustand ein verhältnismäßig kleines Quadrupolmoment von -0.129 barn auf [Ragh89]. Es kann davon ausgegangen werden, daß der Kern auch im Zwischenzustand ein Quadrupolmoment gleicher Größenordnung besitzt. Da die Quadrupolfrequenz durch das Produkt aus dem elektrischen Feldgradienten und dem Kernquadrupolmoment bestimmt wird (Gl. 3.7), werden mit ^{99}Mo in der Regel nur sehr kleine Übergangsfrequenzen beobachtet. Diese Eigenschaft, in Verbindung mit der kurzen Halbwertszeit des Zwischenzustandes von nur 3.6 ns,

3. Grundlagen der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten $\gamma\text{-}\gamma$ -Winkelkorrelationen mit ^{99}Mo

führt im allgemeinen zur Beobachtung von weniger als einer Schwingungsperiode im verfügbaren Zeitfenster, das durch die Halbwertszeit von 3.6 ns auf etwa 30 ns begrenzt ist.

Obwohl die Verwendung des TDPAC-Isotopes ^{99}Mo mit Schwierigkeiten verbunden ist, konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, daß das Isotop zur Charakterisierung von Mo-Bindungen geeignet ist (z.B. [BuVo89]).

4. Experimentelles

4.1 TDPAC-Messungen

4.1.1 Aufbau des Spektrometers

In Kap. 3 wurde gezeigt, daß die Winkelkorrelation zwischen zwei γ -Quanten im allgemeinen nicht konstant ist, sondern eine zeitliche Entwicklung erfährt, die mit der Störfunktion (Gl. 3.11) beschrieben werden kann. Diese Störfunktion enthält die gesamte Information über die Wechselwirkung, so daß mit der Messung dieser Größe auch die Wechselwirkung vollständig beschrieben ist.

Anschaulich bedeutet eine zeitliche Änderung der Winkelkorrelation eine Drehung der Ausstrahlcharakteristik mit Frequenzen, die durch die Wechselwirkung bestimmt sind. Für die Messung gestörter γ - γ -Winkelkorrelationen ist es somit notwendig, die Zeitdifferenz der zu einer γ - γ -Kaskade gehörenden γ -Quanten unter verschiedenen Winkeln zu messen. Ein solches Koinzidenzspektrum zeigt aufgrund der Quadrupolwechselwirkung im Zwischenzustand eine zeitlich modulierte Exponentialfunktion mit der Lebensdauer des Zwischenzustandes als Zeitkonstante.

Das Blockschaltbild des in dieser Arbeit verwendeten TDPAC-Spektrometers ist in Abb. 4.1 dargestellt. Das Spektrometer besteht aus vier BaF_2 -Detektoren (\varnothing 40 mm x 40 mm) in ebener $90^\circ / 180^\circ$ -Anordnung [Then86]. Es werden vier 90° -Spektren (Detektorkombinationen 4-1, 2-3, 1-4, 3-2) und vier 180° -Spektren (Detektorkombinationen 4-3, 2-1, 3-4, 1-2) gemessen, wobei jeder der vier Detektoren als Start- (Nachweis von γ_1) und Stopzähler (Nachweis von γ_2) eingesetzt wird. Die Verarbeitung der Detektorsignale erfolgt nach dem sog. "fast-slow"-Prinzip, d.h. die Energieselektion und die Messung der Zeitdifferenz zwischen der Emission von γ_1 und γ_2 werden getrennt durchgeführt.

Als Zeitsignal steht die 220 nm-Komponente im Szintillationslicht der BaF_2 -Detektoren zur Verfügung. Zum Nachweis des γ -Emissionszeitpunktes wird das Anodensignal des nachgeschalteten Photomultipliers (XP2020Q der Firma VALVO mit einem Quarzeintrittsfenster) genutzt und mittels Constant-Fraction-Triggern (CFT) in einen Standardimpuls umgewandelt. Im nachgeschalteten Zeit-Impulshöhen-Konverter (TPC) wird die Zeitdifferenz zwischen Start- und Stoppsignal (Fensterbreite 100 ns) in ein analoges Signal überführt, dessen Höhe proportional zur Zeitdifferenz ist. Dieses Signal wird an einen Analog-Digital-Konverter weitergeleitet und nach der Signalthöhe in einem Vielkanalanalysator sortiert, wenn am sogenannten Strobe-Eingang des TPC ein gültiges Koinzidenzsignal des langsamen Kreises anliegt.

4. Experimentelles

Für den langsamen Kreis stehen die Signale an der 6. Dynode des Photomultipliers zur Verfügung. Die Impulshöhe dieser Signale ist proportional zur Energie der detektierten γ -Quanten. Nach einer Signalverstärkung findet mittels Einkanaldiskriminatoren (TSCA) eine Zuordnung bezüglich des Start- ($E_\gamma = 740$ keV) und des Stoppsignals ($E_\gamma = 141$ keV) statt. Die so ausgewählten Signale werden dann mithilfe von Koinzidenzeinheiten den entsprechenden Detektorkombinationen zugeordnet.

Im Blockschaltbild des TDPAC-Spektrometers (Abb. 4.1) treten folgende Abkürzungen auf:

Amp:	Verstärker
TSCA:	Einkanaldiskriminator
Coinc:	Koinzidenzeinheit
MCA:	Vielkanalanalysator
CFT:	Constant-Fraction-Trigger
Delay:	Verzögerungseinheit
TPC:	Zeit-Impulshöhen-Konverter
ADC:	Analog-Digital-Konverter

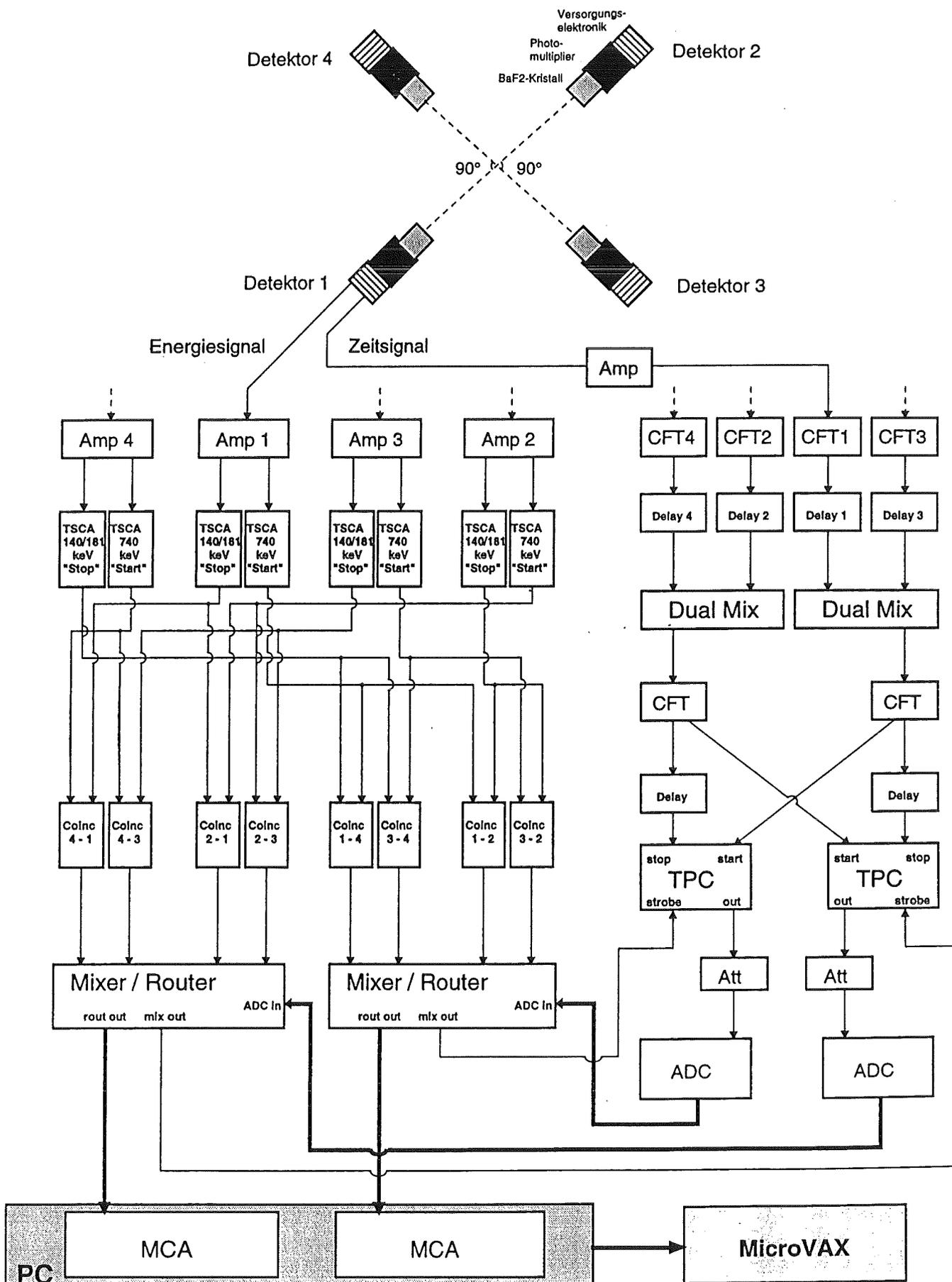


Abb. 4.1: Blockschaltbild des TDPAC-Spektrometers.

4.1.2 Auswertung der Meßdaten

4.1.2.1 Datenreduktion

Die acht aufgezeichneten exponentiell abklingenden und durch eine Winkelkorrelationsfunktion modulierten Koinzidenzspektren stellen die für die Auswertung zur Verfügung stehenden Meßdaten dar. Die Koinzidenzzählrate $N_{ij}(\Theta_{ij}, t)$ für ein bestimmtes Zeitintervall t zwischen dem Eintreffen von γ_1 und γ_2 ist gegeben durch:

$$N_{ij}(\Theta_{ij}, t) = \varepsilon_{ij} \cdot e^{-t/\tau_N} \cdot W(\Theta_{ij}, t) + U_{ij} \quad (4.1)$$

mit

- ij = Detektorkombination ij
- ε_{ij} = Nachweiswahrscheinlichkeit der Koinzidenz, enthält:
 - Ansprechvermögen der Detektoren i, j
 - Raumwinkel
 - Fensterbreite des TSCA
- τ_N = mittlere Lebensdauer des Zwischenzustandes
- $W(\Theta_{ij}, t)$ = Winkelkorrelationsfunktion
- U_{ij} = Untergrundzählrate
- Θ_{ij} = Winkel zwischen den Detektoren i und j
 - $\Theta_{ij} = 90^\circ$ für $ij = 14, 41, 32, 23$
 - $\Theta_{ij} = 180^\circ$ für $ij = 12, 21, 34, 43$

Aus dem geometrischen Mittel der vier untergrundbereinigten 180° - bzw. 90° -Spektren

$$N(180^\circ, t) = \sqrt[4]{(N_{12}(t) - U_{12}) \cdot (N_{21}(t) - U_{21}) \cdot (N_{34}(t) - U_{34}) \cdot (N_{43}(t) - U_{43})} \quad (4.2)$$

$$N(90^\circ, t) = \sqrt[4]{(N_{14}(t) - U_{14}) \cdot (N_{41}(t) - U_{41}) \cdot (N_{23}(t) - U_{23}) \cdot (N_{32}(t) - U_{32})}$$

kann das folgende Zählratenverhältnis gebildet werden:

$$R(t) = 2 \cdot \frac{N(180^\circ, t) - N(90^\circ, t)}{N(180^\circ, t) + 2 \cdot N(90^\circ, t)} \quad (4.3)$$

Werden die Koinzidenzzählraten aus Gl. 4.1 und die Winkelkorrelationsfunktion aus Gl. 3.12 mit den entsprechenden Legendre-Polynomen $P_2(\cos \Theta)$ in Gl. 4.3 eingesetzt, so kürzen sich die Exponentialfunktionen und die apparativen Faktoren heraus. Das Zählratenverhältnis $R(t)$ ist somit direkt proportional zur Störfunktion, deren Parameter die elektrische Quadrupolwechselwirkung charakterisieren:

$$R(t) = A_{22} \cdot G_{22}(t) \quad (4.4)$$

4.1.2.2 Parametrisierung der Meßdaten

Zur Bestimmung der Quadrupolwechselwirkungsparameter wird eine Modellfunktion $R_{fit}(t)$ an das gemessene Zählratenverhältnis $R(t)$ angepaßt. Diese Anpassung erfolgt mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate von Gauß ("least squares fit"). Die allgemeine Form der Fitfunktion beschreibt die Wechselwirkung von statischen und zeitabhängigen elektrischen Feldgradienten mit dem Kernquadrupolmoment und wird wie folgt angegeben:

$$R_{fit}(t) = R_0 + A_{22}^{eff} \cdot \sum_{i=1}^N f_i \cdot e^{-\lambda_i t} \cdot \left(s_{20}(\eta) + \sum_{n=1}^3 s_{2n}(\eta) \cdot F_i(\sigma) \cdot F_i(\delta) \cdot \cos(\omega_{i,n}(\eta) \cdot t) \right) \quad (4.5)$$

- R_0 : Der Parameter R_0 beschreibt eine konstante vertikale Verschiebung der Spektren.
- A_{22}^{eff} : A_{22}^{eff} ist der effektive Anisotropiekoeffizient, der den endlichen Raumwinkel, der von den Detektoren erfaßt wird, berücksichtigt.
- f_i : f_i bezeichnet den relativen Anteil der Atome, die sich im Bindungszustand i mit gleichem elektrischen Feldgradienten befinden.
- λ : Der Relaxationsparameter λ berücksichtigt eine zeitliche Änderung des Feldgradienten. Relaxationen können z.B. auf die Brownsche Molekularbewegung oder auf Oszillationsbewegungen zurückgeführt werden.

4. Experimentelles

$F(\sigma)$: Die Funktion $F(\sigma)$ berücksichtigt die endliche Zeitauflösung σ des Spektrometers von etwa 700 ps und führt zu einer Dämpfung der Störfunktion. Der Dämpfungsterm hat die Form [BeBe69]:

$$F(\sigma) = \exp\left(-\frac{(\omega_n(\eta) \cdot \sigma)^2}{16 \cdot \ln 2}\right) \quad (4.6)$$

$F(\delta)$: Läßt sich der Feldgradient nicht durch eine δ -Funktion beschreiben, so kann die Frequenzverteilung des elektrischen Feldgradienten der Breite δ ($\delta = \Delta\omega/\omega$) durch eine Lorentzverteilung (Gl. 4.7) oder eine Gaußverteilung (Gl. 4.8) beschrieben werden. Die Frequenzverteilung führt zu einer Dämpfung des TDPAC-Signals:

$$F_L(\delta) = \exp(-\omega_n(\eta) \cdot \delta \cdot t) \quad (4.7)$$

$$F_G(\delta) = \exp\left[-\frac{(\omega_n(\eta) \cdot \delta \cdot t)^2}{2}\right] \quad (4.8)$$

Zur Beschreibung der Meßdaten wurde in der vorliegenden Arbeit bevorzugt die Lorentzverteilung gewählt.

Eine vertikale Verschiebung der $R(t)$ -Spektren, die durch den Parameter R_0 beschrieben wird, kann durch apparative Effekte wie z.B. die Lage der Zeitnullpunkte verursacht werden. Sie kann ihren Ursprung aber auch in physikalischen Effekten haben. So führt z.B. ein verschwindender elektrischer Feldgradient am Kernort zu einem ungestörten TDPAC-Signal, welches durch diesen Parameter beschrieben werden kann. Alle in dieser Arbeit untersuchten biologischen Proben zeigen eine derartige Verschiebung der Spektren, die auf das Auftreten eines ungestörten Signals zurückzuführen ist. Apparative Effekte können aufgrund von Voruntersuchungen ausgeschlossen werden [Reis94].

4.1.2.3 Fourieranalyse der Meßdaten

Das gemessene Zählratenverhältnis $R(t)$ enthält direkt die Störfunktion $G_{22}(t)$ und somit nach Gl. 3.11 die für die Quadrupolwechselwirkung charakteristischen Übergangsfrequenzen ω_1 , ω_2 und ω_3 . Diese Frequenzen können in der Regel über eine diskrete Fouriertransformation des Zeitsignals $R(t)$ bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Fourieranalyse über einen Meßbereich von 30 ns durchgeführt. Zur Vermeidung von Seitenbändern ("side lobes"), die bei zeitlich begrenzten Meßintervallen erzeugt werden, wurden die Spektren mit einer Fensterfunktion (Besselfunktion) gefaltet. Eine Verringerung der Linienbreite konnte durch zusätzliches Spiegeln der Meßdaten erzielt werden.

Die spektrale Auflösung $\Delta\omega$ der gemessenen Übergangsfrequenzen im Frequenzraum wird durch den zur Verfügung stehenden Meßbereich eingeschränkt. Bei einem Meßbereich von 30 ns ergibt sich für $\Delta\omega$:

$$\Delta\omega = \frac{2\pi}{\Delta T} \approx 210 \text{ Mrad/s} \quad \text{mit} \quad \Delta T = 30 \text{ ns} \quad (4.9)$$

Die Einschränkung der spektralen Auflösung wird in Abb. 4.2 anhand von simulierten $R(t)$ -Spektren dargestellt, die hinsichtlich der Quadrupolfrequenzen typisch für TDPAC-Messungen mit ^{99}Mo sind [LeBu87]. Die für die Simulationen verwendete Zählratenstatistik entspricht der Statistik, die bei einer Meßdauer von 24 Stunden erreicht wird. Den simulierten Quadrupolfrequenzen $\omega_Q = 50 \text{ Mrad/s}$, 35 Mrad/s , 25 Mrad/s und 10 Mrad/s entsprechen bei einem axialsymmetrischen Feldgradienten ($\eta = 0$) nach Gl. 3.10 die in der Tabelle 4.1 aufgeführten Quadrupolkopplungskonstanten ν_Q und Übergangsfrequenzen ω_i ($i = 1, 2, 3$).

Tabelle 4.1: Quadrupolkopplungskonstanten ν_Q und Übergangsfrequenzen ω_1 , ω_2 und ω_3 für die Quadrupolfrequenzen ω_Q von 50 Mrad/s, 35 Mrad/s, 25 Mrad/s und 10 Mrad/s.

ω_Q [Mrad/s]	ν_Q [MHz]	ω_1 [Mrad/s]	ω_2 [Mrad/s]	ω_3 [Mrad/s]
50	318.3	300	600	900
35	222.8	210	420	630
25	159.2	150	300	450
10	63.7	60	120	180

4. Experimentelles

Wie den Fourierspektren der Abb. 4.2 entnommen werden kann, können bei Quadrupolfrequenzen von 50 Mrad/s und 35 Mrad/s die drei Übergangsfrequenzen ω_1 , ω_2 und ω_3 aufgelöst werden. Beträgt die Differenz zweier gemessener Übergangsfrequenzen weniger als die spektrale Auflösung ($\Delta\omega = 210$ Mrad/s), so wird eine Überlagerung der Fourieramplituden beobachtet. Diese Überlagerung macht eine exakte Frequenzbestimmung, basierend auf einer Fouriertransformation, unmöglich. Auch andere Methoden der Frequenzanalyse, wie z.B. die autoregressive Spektralanalyse [Marp87, Achi85, Hess83], die bei der Analyse von Datensätzen mit einem kleinen Zeitfenster Vorteile gegenüber konventionellen Algorithmen der schnellen Fouriertransformation aufweist, sind nicht in der Lage, die Übergangsfrequenzen bei Quadrupolfrequenzen $\omega_Q < 30$ Mrad/s exakt zu bestimmen [Horv94]. Für Übergangsfrequenzen in diesem Bereich können die Quadrupolparameter nur über die Anpassung einer Modellfunktion an die gemessenen Spektren bestimmt werden.

Da die in dieser Arbeit gemessenen Quadrupolfrequenzen grundsätzlich weniger als 30 Mrad/s betragen und somit nur eine Überlagerung der Fourieramplituden beobachtet wurde, wird im folgenden auf die Darstellung der Fouriertransformationen der $R(t)$ -Spektren verzichtet.

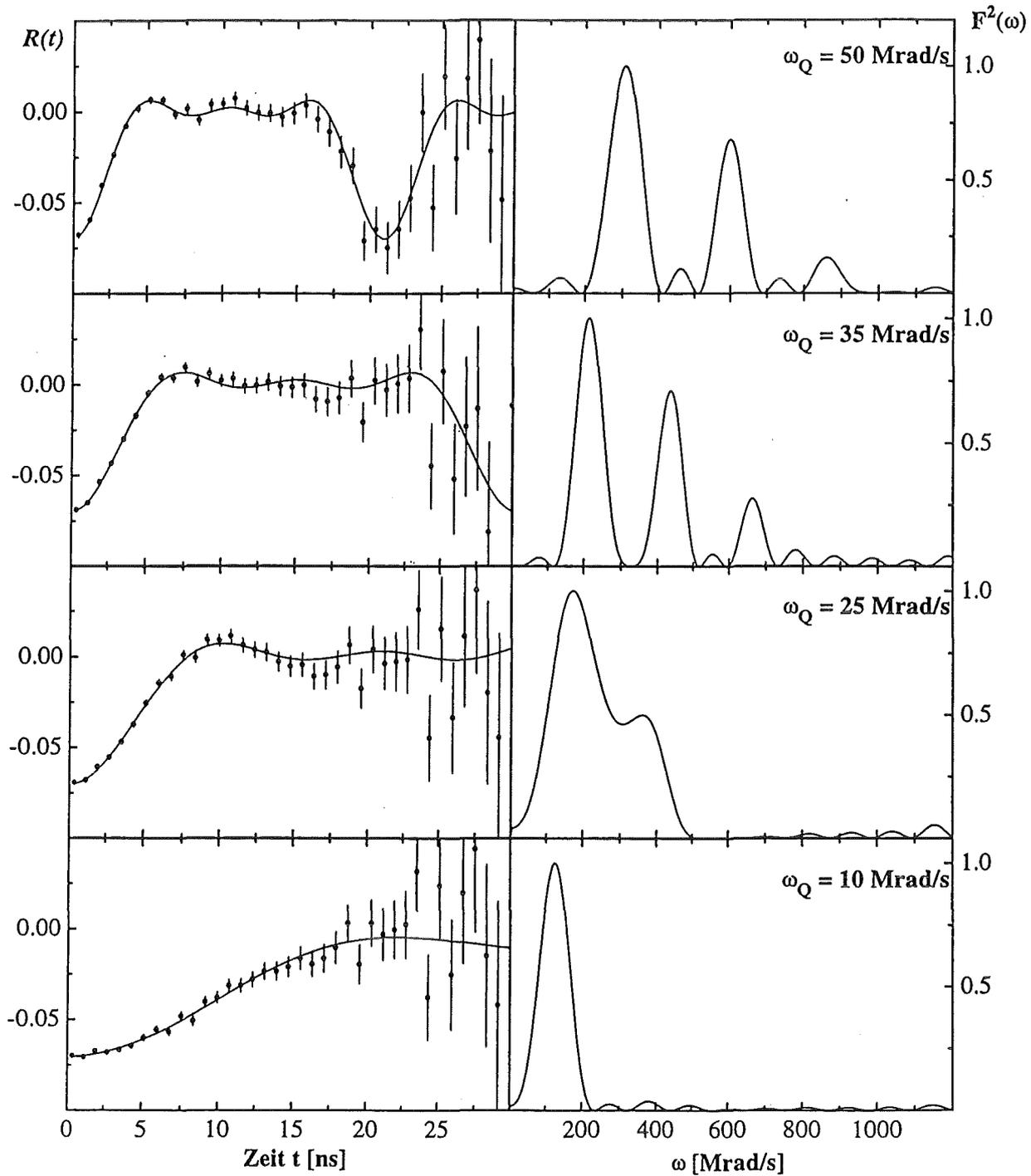


Abb. 4.2: Simulierte $R(t)$ -Spektren und angepaßte Modellfunktionen sowie die auf Eins normierten Fourieramplituden $F^2(\omega)$ für vier verschiedene Quadrupolfrequenzen $\omega_Q = 50$ Mrad/s, 35 Mrad/s, 25 Mrad/s und 10 Mrad/s bei einem axialsymmetrischen Feldgradienten ($\eta = 0$). Die Fourieranalyse wurde über einen Meßbereich von 30 ns durchgeführt.

4.2 Biologische und biochemische Methoden

4.2.1 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Für die Untersuchungen wurden drei Stickstoff-fixierende Bakterienstämme verwendet: *Rhodobacter capsulatus* (B10S) [KIMa88], *Azotobacter vinelandii* OP (DSM 366, ATCC 13705) [DSMZ89] und *Klebsiella oxitoca* (DSM 3539, frühere Bezeichnung: *Klebsiella pneumoniae*) [DSMZ89]. Im folgenden sollen die wesentlichen Schritte der Probenpräparation beschrieben werden. Eine ausführliche Beschreibung der Probenaufbereitung kann der Arbeit von Suer entnommen werden [Suer96].

Alle Zellkulturen wurden in $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -haltigen Nährmedien angezogen. Das Sondenatom ^{99}Mo wurde aus $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generatoren gewonnen, die in der Nuklearmedizin Einsatz finden. Die sogenannte Generatortechnik beruht auf der Rückhaltung eines längerlebigen Mutternuklides, in diesem Fall ^{99}Mo , an einem Ionenaustauscher und auf der Elution, d.h. dem "Herauswaschen", des nachwachsenden Tochternuklides (hier: $^{99\text{m}}\text{Tc}$). Um $^{99\text{m}}\text{Tc}$ abzutrennen, wurde der Generator zunächst mit 50 ml 0.9 mM NaCl-Lösung gewaschen. Nach erneutem Waschen mit 20 ml destilliertem Wasser wurde das am Anionenaustauscher (Al_2O_3) des Generators gebundene Molybdat mit 5 ml 1N NaOH-Lösung eluiert. Die so gewonnene $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -Lösung enthielt etwa 1 - 2 mM Aluminium. Um ein Ausfällen von $\text{Al}(\text{OH})_3$ zu vermeiden, wurde der Lösung vor dem Neutralisieren L-Lactat (Endkonzentration: 0.2 M) zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit einer 6 M HCl-Lösung auf 7.5 eingestellt.

***Rhodobacter capsulatus*:** Die Zellen wurden in 300 ml-Vakuumflaschen unter anaeroben, phototrophen Bedingungen in einem Nitrogenase-dereprimierenden Medium unter Zugabe von Serin als Stickstoffquelle (5 mM) und L-Lactat als Kohlenstoffquelle (24 mM) angezogen [ScMü91]. Als Inokulum (10 Vol.%) dienten Zellen, die unter den gleichen Bedingungen wie die Hauptkulturen angezogen wurden. Nach einer Wachstumsphase von 16 h wurden die Zellen unter anaeroben und reduzierenden Bedingungen (Zugabe von 4 mM Dithionit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zentrifugiert (Zentrifuge: SORVALL RC2-B, Rotor: GSA, 9000 rpm für 1h).

***Azotobacter vinelandii*:** Die Zellen wuchsen unter aeroben Bedingungen in einem von Strandberg und Wilson beschriebenen Nährmedium [StWi68]. Die separat von der Pufferlösung autoklavierte Minerallösung enthielt 1.6 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.4 mM NaCl, 4% Saccharose und 0.2 mM Fe-Citrat in 165 ml destilliertem Wasser. Der Puffer enthielt 12 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in 165 ml destilliertem Wasser bei einem pH-Wert von 8.8. Die Kulturen (330 ml in 1-Liter-Erlenmeyerkolben) wurden mit 5 Vol.% Vorkultur beimpft und nach 16 h Wachstum bei 9000 rpm für 30 min zentrifugiert (Zentrifuge: SORVALL RC2-B, Rotor: GSA).

***Klebsiella oxitoca*:** Zellen von *K. oxitoca* wurden in einem modifizierten, von Yoch und Pengra beschriebenen Medium [YoPe66] in 1-Liter-Vakuumflaschen unter anaeroben Bedingungen und unter Stickstoffatmosphäre angezogen. Mineral- und Pufferlösung wurden getrennt autoklaviert. Die Pufferlösung enthielt 34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 44 mM KH_2PO_4 bei einem pH-Wert von 8.0. Die Minerallösung enthielt 4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mM Fe-Citrat und 4% Saccharose. Nach dem Beimpfen (5 Vol.%) wurden die Kulturen 30 min mit N_2 begast und anschließend für 16 h in ein Schüttelbad (1200 rpm, 30°C) gestellt. Vor der Zellernte wurde den Kulturen O_2 -freier Tris/HCl-Puffer (pH 8.0) und Dithionit (Endkonzentration 4 mM) zugefügt. Die Zellen wurden bei 9000 rpm unter anaeroben Bedingungen 30 min zentrifugiert (Zentrifuge: SORVALL RC 2-B, Rotor: GSA).

Alle Präparationsschritte nach der Zellernte wurden aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Den verwendeten Lösungen wurde Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zugegeben, und sowohl Lösungen als auch Probengefäße wurden intensiv mit Argon gespült.

Zur Kontrolle und zum Nachweis weiterer Mo-Bindungssysteme wurden die Bakterien ebenfalls unter Nitrogenase-reprimierenden Bedingungen kultiviert. Die Bildung des Enzymsystems wurde dabei durch die Zugabe von NH_4^+ (20 mM) zum Nährmedium unterdrückt.

4.2.2 Zellaufschluß und Proteinfraktionierung

***Rhodobacter capsulatus*:** Das Zellpellet wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH = 8.0) resuspendiert, danach unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen bei 30°C über 30 Minuten enzymatisch aufgeschlossen [GoSc93] und anschließend in einer Ultrazentrifuge bei 4°C eine Stunde mit 45000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Beckmann L3-50, Rotor: TI-50). Der so erhaltene proteinhaltige Überstand wurde dann als Rohextrakt verwendet.

***Azotobacter vinelandii*:** Zur Steigerung der Zellaufschlußrate wurde das Zellpellet vor dem Zellaufschluß zweimal eingefroren (-20°C) und wieder aufgetaut. Das Zellpellet von *A. vinelandii* wurde unter anaeroben Bedingungen enzymatisch aufgeschlossen (siehe *R. capsulatus*). Nach dem Zellaufschluß wurde der erhaltene Zellextrakt auf zwei unterschiedliche Arten behandelt. Im ersten Fall wurde Dithionit in einer Endkonzentration von 4 mM zugegeben. Im zweiten Fall wurde dem Extrakt MgCl_2 (5 mM), jedoch kein Dithionit zugefügt. MgCl_2 bewirkt eine Stabilisierung des O_2 -toleranten Enzymaggregates, das sich aus MoFe-Proteinen, Fe-Proteinen und den sogenannten Fe/S-Proteinen zusammensetzt [HaVe77]. Der Zellextrakt wurde anschließend bei 4°C und 30000 rpm für 30 min zentrifugiert (Zentrifuge: Beckmann L3-50, Rotor: TI-50).

4. Experimentelles

Klebsiella oxitoca: Ebenso wie bei *A. vinelandii* wurden die Zellen vor dem Lysozymaufschluß einem Gefrier- und Auftauzyklus unterworfen. Der Zellaufschluß erfolgte wie bei *R. capsulatus* unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen. Der erhaltene Zellextrakt wurde bei 4°C für 15 min mit 35000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Beckmann L3-50, Rotor: TI-50).

Proteinfraktionierung an DEAE-Sephacel: Die Proteinfraktionierung der mit Dithionit behandelten Rohextrakte wurde unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit Argon begast und enthielten 4 mM Dithionit. Vor dem Auftragen des Rohextraktes wurde die DEAE-Sephacel-Säule (Ø 1.5 cm x 4.5 cm) mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7.8) äquilibriert. Die Proteinfraktionierung erfolgte dann mit diskontinuierlichen NaCl-Gradienten (50, 100, 150, 200, 280, 350, 1000 mM NaCl) in 50 mM Tris/HCl (pH = 7.8). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 1.4 ml/min. Die Proteinlösung wurde in Fraktionen von 2.7 ml in zuvor mit Argon begastem Hungates aufgefangen. Der ⁹⁹Mo-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurden über die γ - γ -Koinzidenzzählrate bestimmt.

Die DEAE-Fraktionierung des Rohextraktes, dem MgCl₂ anstelle von Dithionit zugegeben wurde, erfolgte wie die Fraktionierung unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen, jedoch enthielten alle Puffer 5 mM MgCl₂ und kein Dithionit. Die Proteinfraktionierung erfolgte ebenfalls mit einem diskontinuierlichen NaCl-Gradienten (40, 120, 340, 1000 mM NaCl).

Sephadex G-25 Gelfiltration: Zur Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen wurde der Rohextrakt der Nitrogenase-reprimierten Zellen von *A. vinelandii* unter aeroben Bedingungen gelfiltriert. Die Säule (Ø 5.0 cm x 3.0 cm) wurde mit 50 mM Tris/HCl (pH = 7.4) bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 4 ml/min äquilibriert. Die Proteine wurden mit dem Äquilibrierpuffer von der Säule eluiert (2 ml-Fraktionen). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und in einer Minicon-B15-Kammer (Amicon Corp.) auf 10 % des ursprünglichen Volumens eingeeengt.

Nachweis der Enzymaktivität: Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität der Meßproben wurde die Eigenschaft der Nitrogenase genutzt, neben molekularem Stickstoff auch Acetylen reduzieren zu können. Die Reaktion fand in gasdichten Gefäßen (5.9 ml Volumen) bei 30°C in einem Wasserbad statt. Das Reduktionsprodukt Ethylen wurde mithilfe eines Gaschromatographen quantitativ nachgewiesen [ScMü91].

Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität intakter Zellen wurden je 1 ml der Zellpellets in Testgefäße gefüllt, die Reaktion durch die Zugabe von 250 µl Acetylen (\cong 4 % der Gasphase) gestartet und nach 1 h 15 min durch die Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) gestoppt [Suer96, MüSu96].

Zur Vervollständigung des Enzymsystems wurde den durch die Proteinfractionierung gewonnenen MoFe-Proteinproben gereinigtes Fe-Protein aus *Xanthobacter autotrophicus* (Xa2) zugegeben [ScMü95]. Die Gasphase enthielt 8.5 % Acetylen in Argon. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Xa2 gestartet und nach 15 min durch die Zugabe von 100 ml TCA (0.5 M) gestoppt.

Bestimmung des Proteingehaltes: Die Proteingehalte der Rohextrakte und der DEAE-Fractionen wurden nach dem Verfahren von Bradford bestimmt, das auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA) an das Protein beruht [Brad76]. Durch die Bindung des Farbstoffes an das Protein wird das Absorptionsmaximum des Färbers von 465 nm auf 595 nm verschoben. Der Proteingehalt wurde über den Anstieg der Absorption bei 595 nm bestimmt [Suer96].

5. Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen

Ziel der Experimente war es, die spezifische Bindung von ^{99}Mo im Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMo-Cofaktor) der Nitrogenase nachzuweisen und hinsichtlich der Quadrupolparameter zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurden die Stickstoff-fixierenden Bakterien *R. capsulatus*, *A. vinelandii* und *K. oxitoca* verwendet. Die Messungen fanden an Nitrogenase-dereprimierten Zellen sowie am isolierten MoFe-Protein statt. Nitrogenase-dereprimierte Zellen besitzen das vollständig ausgebildete Enzymsystem. Sie wurden in Gegenwart von Serin (*R. capsulatus*) bzw. N_2 (*A. vinelandii*, *K. oxitoca*) als Stickstoffquelle kultiviert und werden im folgenden durch den Zusatz ($-\text{NH}_4^+$) gekennzeichnet. Zum Nachweis weiterer Mo-Bindungssysteme wurden analog dazu Untersuchungen an Nitrogenase-reprimierten Zellen durchgeführt. Bei diesen Zellen wurde die Bildung der Nitrogenase durch die Zugabe von NH_4^+ zum Nährmedium unterdrückt. Sie werden im folgenden durch den Zusatz ($+\text{NH}_4^+$) gekennzeichnet oder auch als NH_4^+ -Zellen bezeichnet.

Das in dieser Arbeit verwendete Isotop ^{99}Mo wurde aus $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generatoren eluiert. Nach Zugabe von $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ zum Nährmedium und einer anschließenden Wachstumsphase von 16 h wurden die Zellen geerntet und zentrifugiert. Die gewonnene konzentrierte Zellsuspension wurde unter kontrollierten Bedingungen mit der TDPAC-Methode gemessen oder mit Lysozym enzymatisch aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden ultrazentrifugiert und die Zellwände sowie die Zellmembranen vom proteinhaltigen Überstand getrennt. Der proteinhaltige Überstand, der im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Rohextrakt bezeichnet wird, wurde anschließend unter anaeroben Bedingungen mittels DEAE-Sephacel säulenchromatographisch fraktioniert, die Fraktionen mit hohem ^{99}Mo -Gehalt wurden mit dem TDPAC-Spektrometer gemessen. Aus den Meßdaten wurden die Quadrupolparameter über die Anpassung der Modellfunktion an die $R(t)$ -Spektren bestimmt. Um eine Überlagerung der TDPAC-Signale von Generatorlösung und Bakterienprobe zu berücksichtigen, wurden zusätzlich die Quadrupolparameter der Mo-Bindungszustände in der Generatorlösung bestimmt. Desweiteren wurden für die unter Nitrogenase-dereprimierenden Bedingungen kultivierten Zellen und die Fraktionen mit gereinigtem MoFe-Protein die Nitrogenaseaktivitäten bestimmt.

Da bei keiner der untersuchten Proben eine Temperaturabhängigkeit der Mo-Bindungszustände beobachtet wurde und eine Bestimmung des Asymmetrieparameters η nicht möglich war (vgl. Anhang D), wurden die Parameter λ und η bei allen Auswertungen auf Null festgehalten. Die übrigen in den Tabellen aufgeführten Werte der Quadrupolparameter sind Mittelwerte von Einzelmessungen. Zur konservativen Abschätzung der Fehler wurden bei der Mittelwertbildung sowohl der Fehler nach Fehlerfortpflanzung als auch der Fehler der Standardabweichung berechnet und der größere Wert angegeben. Bei Einzelmessungen wurde der Fehler, der aus der Anpassung der Modellfunktion nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt wurde, angegeben.

5.1 Ergebnisse der TDPAC-Messungen an $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -Lösungen

Das $R(t)$ -Spektrum der mit 1 N NaOH-Lösung eluierten Generatorlösung (pH 14) zeigt ein nahezu ungestörtes TDPAC-Signal (Abb. 5.1a). Die durchgezogene funktionale Abhängigkeit stellt die Modellfunktion dar, die anhand der optimalen Anpassungsparameter berechnet wurde. Das gemessene Signal kann mit dem Ansatz eines kubischen Feldgradienten ($\nu_Q = 0$ MHz) und einer geringen Frequenzverteilung ($\delta \approx 3$ MHz) beschrieben werden (Tabelle 5.1). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Modell eines tetraedrisch von Sauerstoffliganden umgebenen Mo-Atoms überein und ist somit mit der Annahme verträglich, daß Molybdän als $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ vorliegt. Geringfügige Koordinationsänderungen, die mit dem Auftreten eines kleinen Feldgradienten am Kernort verbunden sind, werden in der Frequenzverteilung δ berücksichtigt und führen zu einem leichten Anstieg der Meßpunkte im $R(t)$ -Spektrum. Die Frequenzverteilung beschreibt weiterhin auch Bindungszustände, die aufgrund ihres geringen relativen Anteils an der Gesamtheit aller Bindungen nicht durch einen eigenen Frequenzanteil berücksichtigt werden. Ein derartiges Modell wird im folgenden auch als Frequenzverteilung um Null bezeichnet.

Tabelle 5.1: Quadrupolparameter der Generatorlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten. Die hoch-pH-Lösung (pH 14) wurde sowohl mit als auch ohne Zugabe von L-Lactat neutralisiert.

Probe	Anteil [%]	ν_Q [MHz]	δ [MHz]	R_0 [%]
Gen.-Lösung (pH 14)	100*	0*	3 ± 1	0*
Gen.-Lösung + L-Lactat (pH 7)	100*	0*	10 ± 1	0*
Gen.-Lösung - L-Lactat (pH 7)	f_1 :	14 ± 4	114 ± 16	0*
	f_2 :	86 ± 4	0*	9 ± 2
zentr. Gen.-Lösung - L-Lactat (pH 7)**	77...87	90...106	< 50 %	14...20

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Aufgrund der Korrelation zwischen den Quadrupolparametern können diese nicht unabhängig voneinander ermittelt werden. Die Werte der Parameter liegen innerhalb der angegebenen Intervalle.

Das $R(t)$ -Spektrum der Lösung mit einem pH-Wert von 7 setzt sich im Gegensatz zum Spektrum der hoch-pH-Lösung (pH 14) aus mehreren Mo-Bindungszuständen mit unterschiedlichen elektrischen Feldgradienten zusammen (Abb. 5.1c). Einer der Bindungszustände wird durch eine Quadrupolkopplungskonstante von 114 MHz charakterisiert, die übrigen Bindungszustände können durch eine Frequenzverteilung um Null beschrieben werden ($\nu_Q = 0$ MHz, $\delta \approx 9$ MHz).

Zur Klärung der pH-Abhängigkeit des TDPAC-Signals wurde eine Elementanalyse der Generatorlösung mittels ICP-Massenspektroskopie (ICP-MS = Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy) durchgeführt. Die ICP-MS stellt eine Kombination aus einer induktiv gekoppelten Argon-Plasma-Fackel und einem Quadrupolmassenspektrometer dar. Diese Technik ermöglicht den Nachweis und die quantitative Analyse einer Vielzahl von Elementen im ppm- bis ppb-Bereich. Die Analysen ergaben, daß neben Molybdän (im Mittel etwa $450 \mu\text{M}$) auch große Mengen Aluminium (im Mittel etwa $1100 \mu\text{M}$) in der Generatorlösung enthalten waren. Das Aluminium stammt aus der Al-Matrix des Generators und wurde beim Eluieren des $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generators mit 1 N NaOH-Lösung gelöst. Al^{3+} -Ionen sind zur Bildung einer sehr beständigen Komplexverbindung mit Molybdän in einem Atomverhältnis von $\text{Al} : \text{Mo} = 1 : 6$ befähigt [WiFu67]. Diese Komplexbildung kann als Ursache für die Änderung der Bindungszustände beim Neutralisieren der Generatorlösung sowie für das Auftreten der milchigen Trübung, die beim Neutralisieren zu beobachten

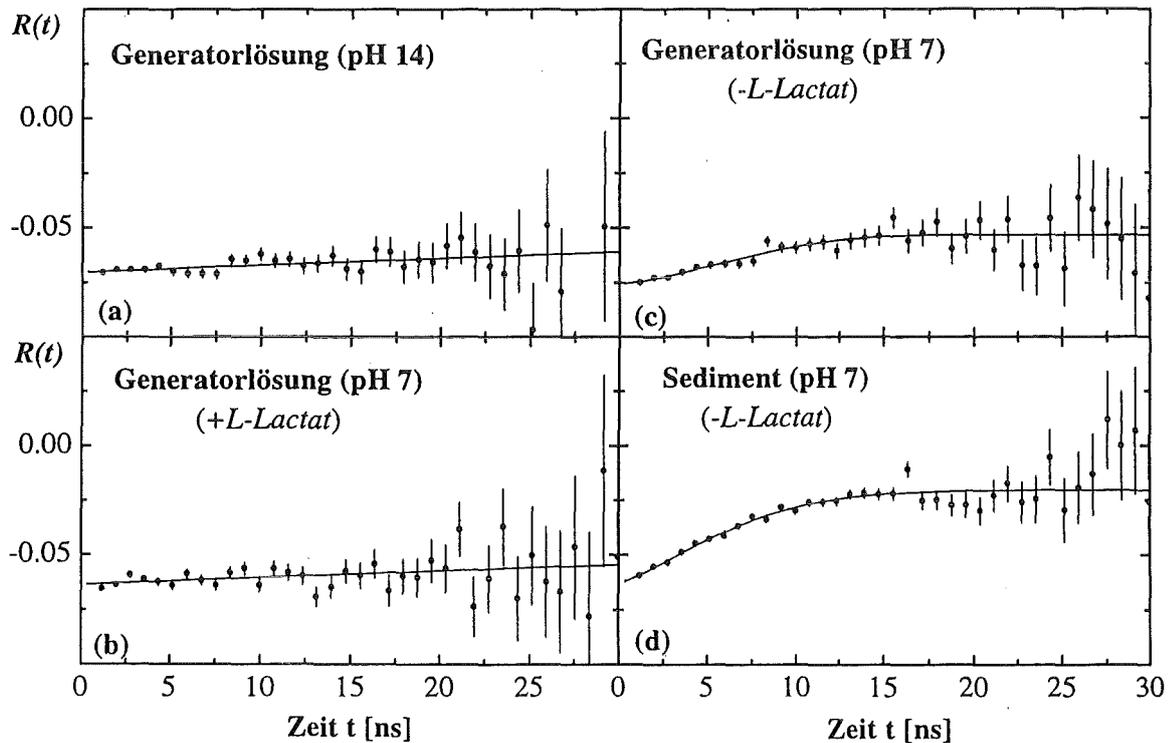


Abb. 5.1: TDPAC-Spektren und angepaßte Modellfunktionen der Generatorlösung bei unterschiedlichen pH-Werten:

- (a) hoch-pH Generatorlösung (pH 14)
- (b) neutralisierte Generatorlösung unter Zugabe von L-Lactat (pH 7)
- (c) neutralisierte Generatorlösung ohne Zugabe von L-Lactat (pH 7)
- (d) Sediment der ohne Zugabe von L-Lactat neutralisierten Generatorlösung (pH 7)

war, herangezogen werden. Die ausgefallenen Komplexe wurden abzentrifugiert und mit der TDPAC-Methode gemessen (Abb. 5.1d). Die Messungen zeigten, daß der überwiegende Anteil der Sondenatome in Bindungszuständen mit stark uneinheitlichen elektrischen Feldgradienten vorlag. Im Mittel läßt sich die Gesamtheit der Bindungszustände durch eine Quadrupolkopplungskonstante im Bereich von 90...106 MHz und eine maximale Frequenzverteilung von etwa 50 % beschreiben. Da eine exakte Bestimmung der Quadrupolparameter bei der Beobachtung von uneinheitlichen Bindungszuständen sowie von weniger als einer Schwingungsperiode nicht möglich ist, können für diese Fälle nur die Bereiche angegeben werden, in denen die Werte der Parameter liegen (vgl. Anhang B). Die im Vergleich zur nichtzentrifugierten Generatorlösung beobachtete größere Frequenzverteilung des Anteils mit endlichem Feldgradienten könnte sowohl auf die Abtrennung von freiem Molybdat und die damit verbundene Verbesserung in der Parameterbestimmung für diesen Anteil als auch auf mögliche Einflüsse der Zentrifugation zurückzuführen sein. So besteht die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen den abzentrifugierten Komplexen, die einen Einfluß auf die Einheitlichkeit der Mo-Bindungszustände haben kann.

Wird die neutralisierte Generatorlösung als Mo-Quelle bei der Zellanzucht verwendet, so kann ein Großteil des Molybdäns aufgrund der Bindung in den Mo-Al-Komplexen von den Bakterien nicht aufgenommen werden. Diese Komplexe sind auch in der für die TDPAC-Untersuchungen verwendeten konzentrierten Zellsuspension enthalten und tragen somit zu einer weiteren, unerwünschten Frequenzkomponente im $R(t)$ -Spektrum der Bakterienprobe bei. Um dies zu vermeiden, wurde der Generatorlösung vor dem Neutralisieren L-Lactat zugegeben. Durch die Zugabe von Lactat wurde Aluminium im hoch-pH-Bereich komplexiert und die Bildung von Mo-Al-Verbindungen, die erst bei niedrigeren pH-Werten auftritt, verhindert. Ein $R(t)$ -Spektrum der mit L-Lactat behandelten Lösung (pH 7) ist in Abb. 5.1b dargestellt. Das Spektrum kann erneut, wie im Fall der hoch-pH-Lösung, mit dem Ansatz einer Frequenzverteilung um Null ($\nu_Q = 0$ MHz, $\delta \approx 10$ MHz) beschrieben werden. Der im Vergleich zur hoch-pH-Lösung etwas höhere Wert der Frequenzverteilung zeigt allerdings, daß nicht alle Mo-Atome als Molybdat gebunden vorliegen. Da jedoch das $R(t)$ -Spektrum nahezu ungestört ist und dem Molybdatspektrum entspricht, wurden alle in dieser Arbeit untersuchten Bakterienproben unter Zugabe der mit L-Lactat versetzten Generatorlösung kultiviert.

5.2 Ergebnisse der TDPAC-Messungen an intakten Zellen

Die Mo-Bindungszustände in intakten Zellen der Bakterien wurden anhand der Quadrupolparameter charakterisiert. Typische $R(t)$ -Spektren sind in Abb. 5.2 dargestellt. Die zugehörigen Mittelwerte der Einzelmessungen können der Tabelle 5.2 entnommen werden. Für eine optimale Anpassung der Störfunktion ist es notwendig, Bindungszustände zu berücksichtigen, die einen Sondenplatz mit verschwindendem Feldgradienten am Kernort ($\nu_Q \approx 0$ MHz) beschreiben. Der relative Anteil dieser Mo-Atome wird in der Störfunktion durch den Parameter R_0 beschrieben und ergänzt den in der Tabelle angegebenen Anteil der Bindungszustände mit einem endlichen Feldgradienten auf 100 %.

Die Anpassung der Modellfunktion an die gemessenen $R(t)$ -Spektren von *R. capsulatus* liefert für Nitrogenase-dereprimierte ($-\text{NH}_4^+$) und Nitrogenase-reprimierte Zellen ($+\text{NH}_4^+$) gleiche Quadrupolkopplungskonstanten von etwa 60 MHz. Im Gegensatz zu den NH_4^+ -Zellen zeigen die Nitrogenase-dereprimierten Zellen eine deutliche Frequenzverteilung. Ursache für das Auftreten dieser Verteilung kann sowohl ein uneinheitlicher Feldgradient als auch das Vorliegen mehrerer Mo-Bindungszustände sein. So führen unterschiedliche Bindungszustände zu einer Überlagerung der jeweiligen TDPAC-Signale, die aufgrund der Beobachtung von weniger als einer Schwingungsperiode nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können. Die Bestimmung der Quadrupolparameter über die Anpassung der Modellfunktion an die gemessenen Daten führt somit zu einer mittleren Quadrupolfrequenz bei gleichzeitiger Beobachtung einer Frequenzverteilung.

Zellen von *A. vinelandii*, die unter Zugabe von NH_4^+ kultiviert wurden, zeigen eine deutlich höhere Quadrupolkopplungskonstante ($\nu_Q \approx 180$ MHz). Der so charakterisierte Mo-Bindungszustand kann der Mo-Bindung an dem von Pienkos und Brill nachgewiesenen Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii* zugeordnet werden, welches als einziges Mo-Bindungssystem in diesen Zellen vertreten ist [PiBr81]. Diese Bindung wurde ebenfalls bei Zellen von *A. vinelandii*, die unter Stickstoff-fixierenden Bedingungen kultiviert wurden, beobachtet. Bei einer Verringerung der Mo-Konzentration im Nährmedium unter etwa $0.2 \mu\text{M}$ wurde jedoch eine deutliche Änderung der Quadrupolkopplungskonstante beobachtet. Die bei geringen Mo-Konzentrationen kultivierten Zellen weisen Mo-Bindungszustände auf, die analog zu den Zuständen in *R. capsulatus* ($-\text{NH}_4^+$) beschrieben werden können. Die Abhängigkeit der Quadrupolparameter bei *A. vinelandii* ($-\text{NH}_4^+$) von der Molybdänkonzentration stimmt mit der Beobachtung von Pienkos und Brill überein, daß bei geringen Mo-Konzentrationen Molybdän nur an das MoFe-Protein und bei hohen Mo-Konzentrationen zusätzlich an das Speicherprotein gebunden wird [PiBr81].

Wird die Existenz des Speicherproteins bei der Anpassung der Modellfunktion an die aufgezeichneten Meßpunkte von Nitrogenase-dereprimierten Zellen, die bei geringer Mo-Konzentration kultiviert wurden, berücksichtigt, so können die Mo-Bindungen durch drei

unterschiedliche Bindungszustände beschrieben werden. Etwa 7 % der Mo-Bindungsplätze (f_1) können durch Quadrupolparameter beschrieben werden, die die Bindung am Mo-Speicherprotein charakterisieren, 55 % der Bindungsplätze (f_2) zeigen eine Quadrupolkopplungskonstante von ca. 70 MHz. Die verbleibenden 35 % der Sondenatome befinden sich in Bindungszuständen mit nahezu kubischen Feldgradienten ($\nu_Q \approx 0$ MHz) und werden durch den Parameter R_0 beschrieben.

Tabelle 5.2: Quadrupolparameter der Mo-Bindungszustände in *R. capsulatus*, *A. vinelandii* und *K. oxitoca*. Die Messungen wurden an Nitrogenase-dereprimierten Zellen ($-\text{NH}_4^+$) und an Nitrogenase-reprimierten Zellen ($+\text{NH}_4^+$) durchgeführt.

Probe		Anteil [%]	ν_Q [MHz]	δ [%]	R_0 [%]
<i>R. capsulatus</i>	$(-\text{NH}_4^+)^{**}$	60...100	50...70	< 18	0...40
	$(+\text{NH}_4^+)$	56 ± 5	60 ± 4	0^*	44 ± 5
<i>A. vinelandii</i>	$(-\text{NH}_4^+)^{**}$	55...100	35...75	< 30	0...45
	f_1 :	7 ± 4	181^*	0^*	38 ± 8
	f_2 :	55 ± 7	67 ± 9	0^*	
	$(-\text{NH}_4^+)$	64 ± 3	171 ± 4	0^*	36 ± 3
	$(+\text{NH}_4^+)$	62 ± 3	181 ± 1	0^*	38 ± 3
<i>K. oxitoca</i>	$(-\text{NH}_4^+)$	53 ± 4	75 ± 5	0^*	47 ± 4

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Aufgrund der Korrelation zwischen den Quadrupolparametern können diese nicht unabhängig voneinander ermittelt werden. Die Werte der Parameter liegen innerhalb der angegebenen Intervalle.

Bei der Charakterisierung der Mo-Bindung am Speicherprotein mit $\nu_Q \approx 180$ MHz muß allerdings angemerkt werden, daß nicht alle gemessenen Spektren der Nitrogenase-reprimierten Zellen von *A. vinelandii* mit nur einem gestörten Anteil hinreichend gut beschrieben werden können. Häufig wird zur optimalen Beschreibung der Meßdaten ein weiterer Bindungszustand benötigt. Eine einheitliche Beschreibung aller Spektren ist allerdings nicht möglich. Da jedoch der prinzipielle Verlauf der Daten unter der Annahme nur eines Zustandes für alle Proben einheitlich beschrieben werden kann, wurde dieses Modell zur Charakterisierung der Mo-Bindung am Speicherprotein von *A. vinelandii* gewählt.

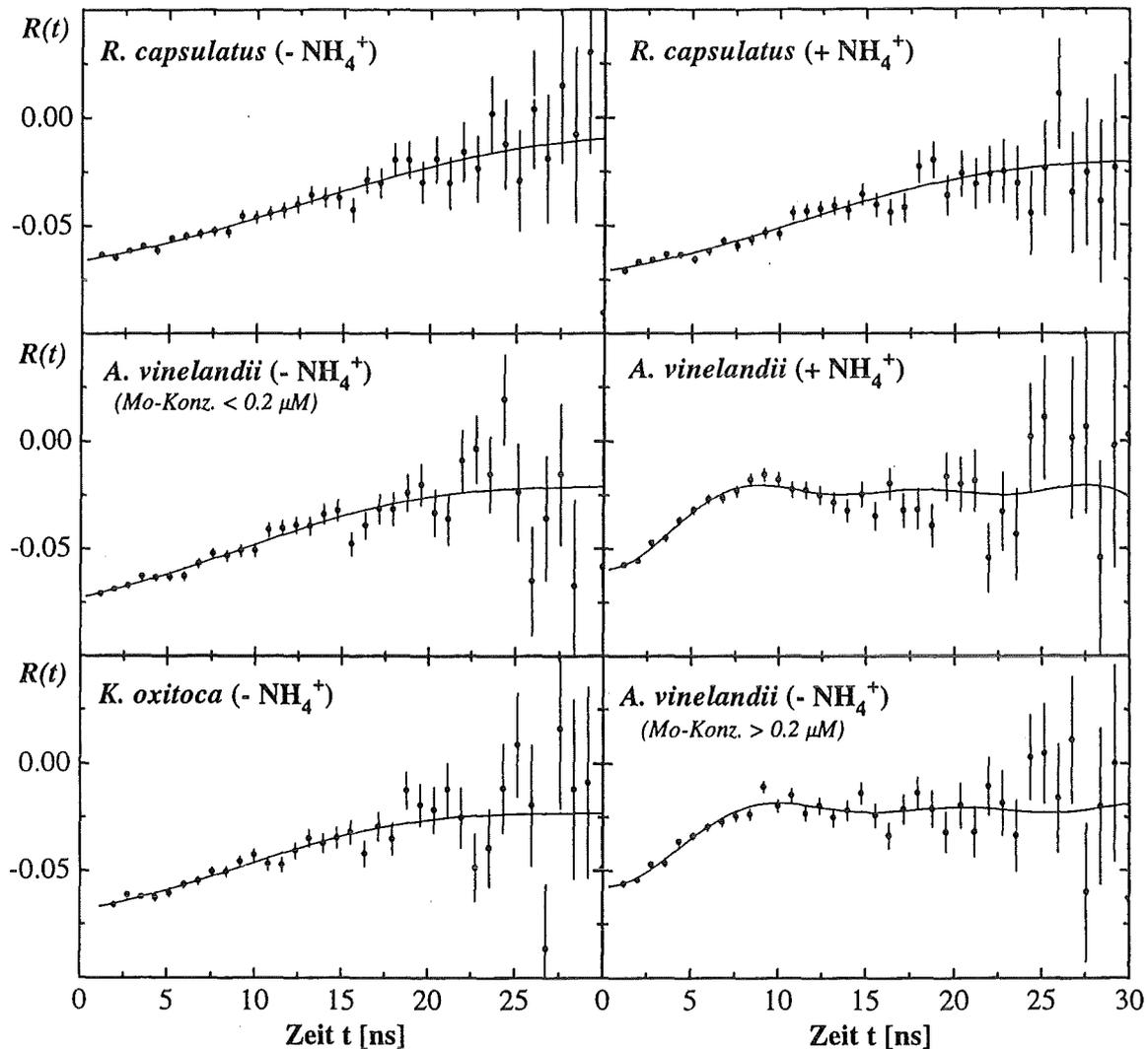


Abb. 5.2: $R(t)$ -Spektren der TDPAC-Messungen an Nitrogenase-dereprimierten (- NH_4^+) und -reprimierten Zellen (+ NH_4^+) der Bakterien *R. capsulatus*, *A. vinelandii* und *K. oxitoca*. Zellen von *A. vinelandii* (- NH_4^+) zeigen abhängig von der Mo-Konzentration unterschiedliche TDPAC-Signale.

Im Gegensatz zu *R. capsulatus* und *A. vinelandii* war bei NH_4^+ -Zellen von *K. oxitoca* eine Messung der γ - γ -Winkelkorrelation aufgrund einer zu geringen Mo-Aufnahme nicht möglich. Hingegen wurden bei Nitrogenase-dereprimierten Zellen eine Aufnahme von Molybdän beobachtet und zwei unterschiedliche Bindungszustände nachgewiesen. Ein Bindungszustand zeigt ein ungestörtes Signal, der Zweite wird durch eine Quadrupolkopplungskonstante von 75 MHz charakterisiert. Da bei *K. oxitoca* eine Mo-Aufnahme nur beim Wachstum unter Stickstoff-fixierenden Bedingungen beobachtet wird, kann zumin-

dest die Konfiguration mit $\nu_Q \approx 75$ MHz eindeutig dem Enzymsystem der Nitrogenase zugeordnet werden. Bei der Konfiguration mit $\nu_Q \approx 0$ MHz besteht auch die Möglichkeit, daß das beobachtete Signal auf unvollständig abgetrenntes $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ der Generatorlösung zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu *R. capsulatus* und *A. vinelandii* wurde bei *K. oxitoca* eine Anreicherung von ^{99}Tc beobachtet. Allerdings konnte anhand der Messungen an intakten Zellen nicht geklärt werden, ob Technetium von den Zellen aufgenommen oder außen an die Zellwände gebunden wurde.

Faßt man die Ergebnisse der Messungen an Nitrogenase-dereprimierten Zellen ($-\text{NH}_4^+$) zusammen, so konnte gezeigt werden, daß nur Zellen von *K. oxitoca* definierte Mo-Bindungszustände aufweisen, die eine exakte Bestimmung der Quadrupolparameter ermöglichen. Die gemessenen Feldgradienten von $\nu_Q \approx 75$ MHz und $\nu_Q \approx 0$ MHz sind unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen auch bei *R. capsulatus* und *A. vinelandii* zu beobachten. Um bei *R. capsulatus* und *A. vinelandii* eine eindeutige Charakterisierung der Mo-Bindungszustände zu erreichen, war es notwendig, die in diesen Bakterien vorkommenden unterschiedlichen Mo-Bindungssysteme zu isolieren und getrennt zu messen. Desweiteren wurde auch für *K. oxitoca* ein Zellaufschluß mit anschließender Proteinfractionierung durchgeführt. Anhand dieser Untersuchungen sollte zum einen geklärt werden, ob Technetium an den Zellwänden/-membranen gebunden wird oder proteingebunden im Rohextrakt der Zellen vorliegt, zum anderen sollte überprüft werden, ob beide Quadrupolkopplungskonstanten der Mo-Bindung im MoFe-Protein von *K. oxitoca* zuzuordnen sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

5.3. Säulenchromatographische Untersuchungen an Rohextrakten von *R. capsulatus*, *A. vinelandii* und *K. oxitoca*

Zur Reinigung des MoFe-Proteins von anderen Mo-bindenden Proteinen sowie von niedermolekularen Mo-Verbindungen wurden die Zellen enzymatisch aufgeschlossen und der Rohextrakt säulenchromatographisch fraktioniert. Zur Bestimmung des relativen ^{99}Mo -Gehaltes der einzelnen Fraktionen wurde über den energiewahlweisen Zweig der TDPAC-Apparatur die Koinzidenzzählrate der 740 - 141 keV Kaskade über eine Koinzidenzmessung ermittelt.

Die Mo-Profile der Rohextrakte zeigen für alle Bakterienstämme einen ähnlichen Verlauf. Das erste Maximum der ^{99}Mo -Konzentration ist auf Mo-bindende Membranpartikel und Membranproteine zurückzuführen, die nicht an DEAE-Sephacel gebunden werden. Diese Mo-bindenden Systeme werden bereits beim Auftragen der Probe auf die Säule und beim anschließenden Spülen mit dem Elutionspuffer (0 mM NaCl) eluiert. Da sich das in diesen Fraktionen nachgewiesene Molybdän keiner definierten Bindung zuordnen läßt, wurden diese Fraktionen nicht weiter untersucht. Fraktionen der übrigen ^{99}Mo -Konzentrationsmaxima wurden mit der TDPAC-Methode gemessen und die Quadrupolparameter der Mo-Bindungszustände bestimmt.

Neben den Untersuchungen am Rohextrakt der Zellen wurde auch das Elutionsverhalten der $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -haltigen Generatorlösung untersucht. Das Elutionsprofil der $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ -Lösung ist in Abb. 5.3 dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wird Molybdat nur in einem sehr engen Bereich bei einer NaCl-Konzentration von 100 mM eluiert.

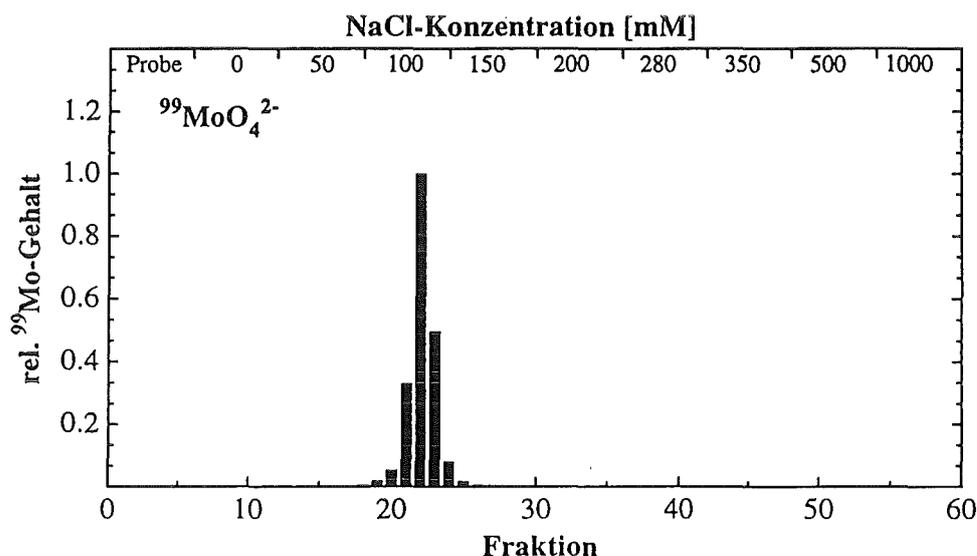


Abb. 5.3: DEAE-Elutionsprofil der neutralisierten Generatorlösung.

5.3.1 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein und Nachweis weiterer Mo-Bindungssysteme in *R. capsulatus*

Die säulenchromatographische Fraktionierung des Rohextraktes von *R. capsulatus* wurde unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen an Zellen durchgeführt, die unter Zugabe von Serin (Nitrogenase-dereprimierende Bedingungen) bzw. NH_4^+ als Stickstoffquelle kultiviert wurden. Wie in Abb. 5.5 dargestellt, zeigt das DEAE-Elutionsprofil der unter Nitrogenase-dereprimierenden Bedingungen kultivierten Zellen zwei dominante Maxima der ^{99}Mo -Verteilung bei Konzentrationen von 100 mM NaCl und 280 - 350 mM NaCl. Weiterhin wurde eine "Mo-Schulter" bei einer NaCl-Konzentration von 50 mM beobachtet, sowie ein Maximum der Mo-Verteilung bei 0 mM NaCl, das auf membrangebundenes Molybdän zurückzuführen ist. Die Maxima des relativen ^{99}Mo -Gehaltes werden im folgenden vereinfacht als Peak bezeichnet.

Der Peak bei 100 mM NaCl wurde auch bei NH_4^+ -Zellen gefunden und ist somit nicht dem Enzymsystem der Nitrogenase zuzuordnen. Hingegen tritt der zweite Mo-Peak nur bei Zellen auf, die unter Stickstoff-fixierenden Bedingungen ($-\text{NH}_4^+$) kultiviert wurden und über eine vollständig ausgebildete Mo-Nitrogenase verfügen. Wie Voruntersuchungen an Nitrogenase-dereprimierten Zellen, die mit natürlichem Molybdän als Mo-Quelle kultiviert wurden, gezeigt haben, fällt die maximale Mo-Konzentration bei 280 mM NaCl mit der maximalen Nitrogenaseaktivität (Abb. 5.4) zusammen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Fraktionen mit hohen ^{99}Mo -Konzentrationen in bezug auf ihre enzymatische Ak-

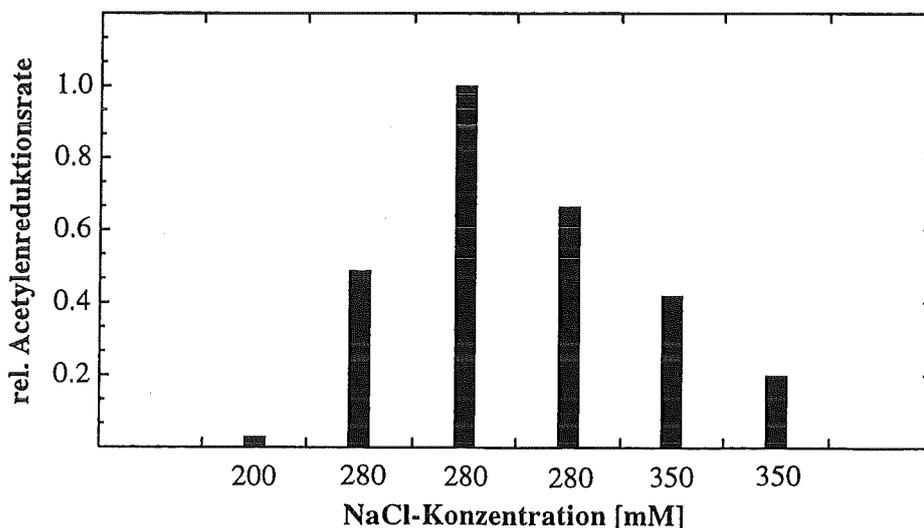


Abb. 5.4: Relative Acetylenreduktionsrate der Fraktionen im Elutionsbereich von 200 bis 350 mM NaCl. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus Voruntersuchungen an Nitrogenase-dereprimierten Zellen, die mit natürlichem Molybdän als Mo-Quelle kultiviert wurden.

tivität untersucht und mit der TDPAC-Methode gemessen. Eine Bestimmung der Enzymaktivität zeigte für diese Fraktionen eine Acetylenreduktionsrate A ($C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$) von etwa 250 nmol Ethylen pro mg Protein und Minute. Desweiteren konnte anhand einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese gezeigt werden, daß in den enzymatisch aktiven Fraktionen das MoFe-Protein dominant vertreten ist. Aufgrund dieser Ergebnisse kann der 280 mM NaCl-Peak eindeutig dem gereinigten MoFe-Protein der Nitrogenase zugeordnet werden.

Tabelle 5.3: Quadrupolparameter der Bindungszustände von ^{99}Mo in verschiedenen Proteinfractionen des Rohextraktes von *R. capsulatus*. Die Messungen wurden an Nitrogenase-dereprimierten Zellen ($-\text{NH}_4^+$) und an Nitrogenase-reprimierten Zellen ($+\text{NH}_4^+$) durchgeführt.

Probe	Anteil [%]	ν_Q [MHz]	δ [%]	R_0 [%]
100 mM NaCl**				
($-\text{NH}_4^+$)	60...100	35...75	< 40	0...40
($+\text{NH}_4^+$)	64...82	50...70	< 40	18...36
280 - 350 mM NaCl	55 ± 3	70 ± 3	0*	45 ± 3

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Aufgrund der Korrelation zwischen den Quadrupolparametern können diese nicht unabhängig voneinander ermittelt werden. Die Werte der Parameter liegen innerhalb der angegebenen Intervalle.

Die $R(t)$ -Spektren der untersuchten MoFe-Proteinfractionen (280 - 350 mM NaCl, Abb. 5.6) können durch den Ansatz von zwei Mo-Bindungszuständen, in denen jeweils etwa 50 % der Sondenatome gebunden sind ($\nu_Q \approx 70$ MHz und $\nu_Q \approx 0$ MHz) beschrieben werden (Tabelle 5.3). Aufgrund der Ergebnisse der DEAE-Säulenchromatographie der Generatorlösungen kann es sich bei den Zuständen mit $\nu_Q \approx 0$ MHz nicht um Molybdänverbindungen in Form von $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ handeln, da gezeigt werden konnte, daß Molybdat bei einer NaCl-Konzentration von 100 mM eluiert wird (Abb. 5.3). Die zweite Konfiguration ($\nu_Q \approx 70$ MHz) weist im Gegensatz zu den Messungen an intakten Zellen von *R. capsulatus* keine Frequenzverteilung auf und charakterisiert somit einen definierten Bindungszustand. Die Ergebnisse der TDPAC-Untersuchungen in Verbindung mit den Messungen der enzymatischen Aktivität und dem Nachweis des MoFe-Proteins als dominierendes Protein in den 280 - 350 mM NaCl-Fractionen führen zu dem Schluß, daß beide Mo-Bindungszustände dem MoFe-Protein zuzuordnen sind.

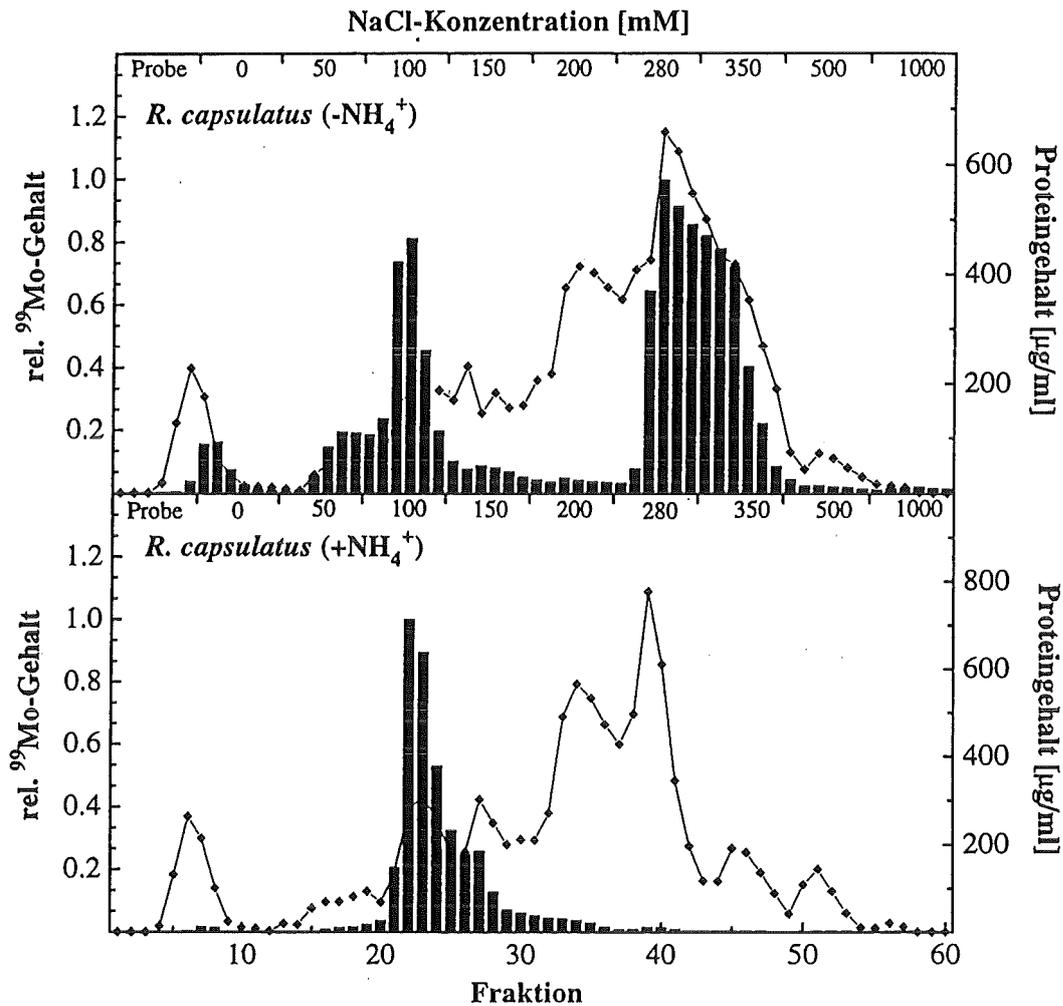


Abb. 5.5: DEAE-Elutionsprofile des Rohextraktes von *R. capsulatus*. Die Proteine wurden mit einem nichtlinearen NaCl-Gradienten (0, 50, 100, 150, 200, 280, 350, 500 und 1000 mM) in 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 4 mM Dithionit eluiert. Zusätzlich sind die Fraktionen dargestellt, die beim Auftragen der Probe auf die Säule gewonnen wurden (Elutionsbereich "Probe"). Der relative ^{99}Mo -Gehalt ist als Säule dargestellt. Die durchgezogene Linie verbindet die Proteingehalte der Fraktionen und soll den Verlauf der Meßdaten verdeutlichen.

- Nitrogenase-dereprimierte Zellen ($-\text{NH}_4^+$)
- Nitrogenase-reprimierte Zellen ($+\text{NH}_4^+$)

Der Peak bei 100 mM NaCl zeigt für Nitrogenase-reprimierte und -dereprimierte Zellen identische Mo-Bindungszustände (Tabelle 5.3). In beiden Fällen weist der dominierende Anteil der Mo-Bindungszustände eine Quadrupolkopplungskonstante im Bereich von 35...75 MHz ($\delta < 40\%$) auf. Bei den in diesen Fraktionen nachgewiesenen Mo-Bindungs-

zuständen kann es sich sowohl um unspezifisch gebundenes Molybdat als auch um Mo-Bindungen an Speicher- oder Transportproteinen handeln. Überraschend war, daß die 100 mM NaCl-Fractionen einen ebenso hohen Mo-Gehalt wie die MoFe-Proteinfractionen (280 - 350 mM NaCl) aufwiesen und daß sowohl für Nitrogenase-reprimierte als auch -dereprimierte Zellen identische Bindungszustände beobachtet wurden. Ein derartiges Aufnahmeverhalten zeigen im allgemeinen nur Bakterien mit Mo-Speicher- oder Transportproteinen [PiBr81].

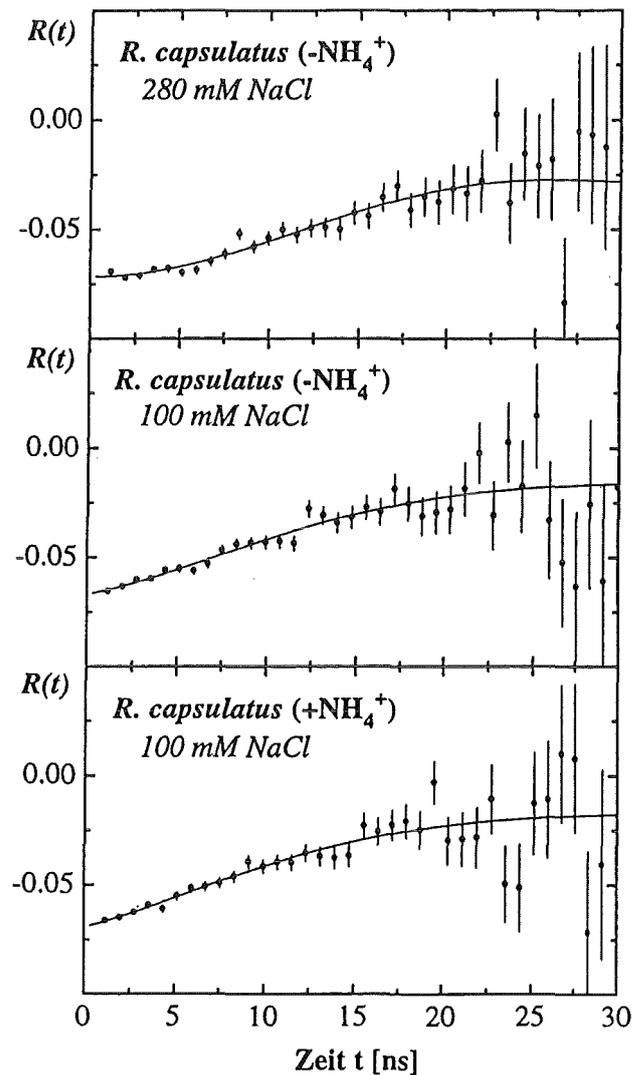


Abb. 5.6: $R(t)$ -Spektren des MoFe-Proteins (280 mM NaCl) und der bei einer NaCl-Konzentration von 100 mM eluierten Fraktion von Nitrogenase-dereprimierten (- NH_4^+) und -reprimierten Zellen (+ NH_4^+) von *R. capsulatus*.

5.3.2 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein und im Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii*

Die Rohextrakte von *A. vinelandii* wurden ebenso wie die Rohextrakte von *R. capsulatus* unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen fraktioniert. Das ^{99}Mo -Profil des Rohextraktes von Nitrogenase-dereprimierten Zellen (N_2 als Stickstoffquelle) zeigt einen dominanten Mo-Peak bei einer NaCl-Konzentration von 280 mM und eine "Mo-Schulter" bei 200 mM NaCl (Abb. 5.7). Die in diesen Elutionsbereichen gewonnenen Fraktionen mit maximalem ^{99}Mo -Gehalt wiesen eine enzymatische Aktivität (Acetylenreduktionsrate von $106 \text{ nmol Ethylen} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$) sowie eine dominierende MoFe-Proteinbande in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (etwa 80 % Av1) auf. Somit kann das in diesen Fraktionen nachgewiesene Molybdän auf das im MoFe-Protein gebundene Mo zurückgeführt werden. Die $R(t)$ -Spektren der 280 mM NaCl-Fraktionen (Abb. 5.9) zeigen zwei Mo-Bindungszustände (Tabelle 5.4). Sie sind identisch mit den Zuständen, die für die Mo-Bindung im MoFe-Protein von *R. capsulatus* beobachtet wurden.

Analog zu *R. capsulatus* wurden auch bei *A. vinelandii* ($-\text{NH}_4^+$) Mo-Bindungssysteme beobachtet, die nicht an DEAE-Sephacel gebunden werden. Weiterhin zeigt das DEAE-Elutionsprofil der NH_4^+ -Zellen einen dominanten Mo-Peak bei 100 - 150 mM NaCl. Die TDPAC-Messungen dieser Fraktionen lieferten jedoch ein überraschendes Ergebnis. In keiner der Fraktionen konnte das in den Messungen an NH_4^+ -Zellen beobachtete Signal der Mo-Bindung am Speicherprotein nachgewiesen werden. Die $R(t)$ -Spektren zeigen, daß die Mo-Atome in allen Fraktionen in Bindungszuständen vorliegen, die am Kernort einen verschwindenden elektrischen Feldgradienten aufweisen (Abb. 5.9). Die Änderung des TDPAC-Signals gegenüber den Messungen an intakten Zellen könnte auf den Einfluß von Dithionit oder eine Instabilität der Mo-Speicherproteinbindung bei der Fraktionierung an DEAE-Sephacel zurückzuführen sein.

Um zu klären, ob Dithionit einen Einfluß auf die Bindung von Molybdän am Speicherprotein hat, wurde eine DEAE-Fraktionierung des Rohextraktes von *A. vinelandii* ohne Zugabe von Dithionit und somit unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Analog zu der Untersuchung am Mo-Speicherprotein sollte ebenfalls der Einfluß von Dithionit auf die Bindung von Molybdän im MoFe-Protein untersucht werden. Um die Nitrogenase vor einem Kontakt mit Sauerstoff und der damit verbundenen Inaktivierung des Enzymsystems zu schützen, wurde dem Rohextrakt MgCl_2 zugegeben. Die Zugabe von MgCl_2 bewirkt die Bildung hochmolekularer Komplexe aus MoFe-, Fe- und Fe/S-Proteinen, die die O_2 -Toleranz der Nitrogenase deutlich erhöhen und eine Inaktivierung des Enzyms verhindern [HaVe77, ScHa83].

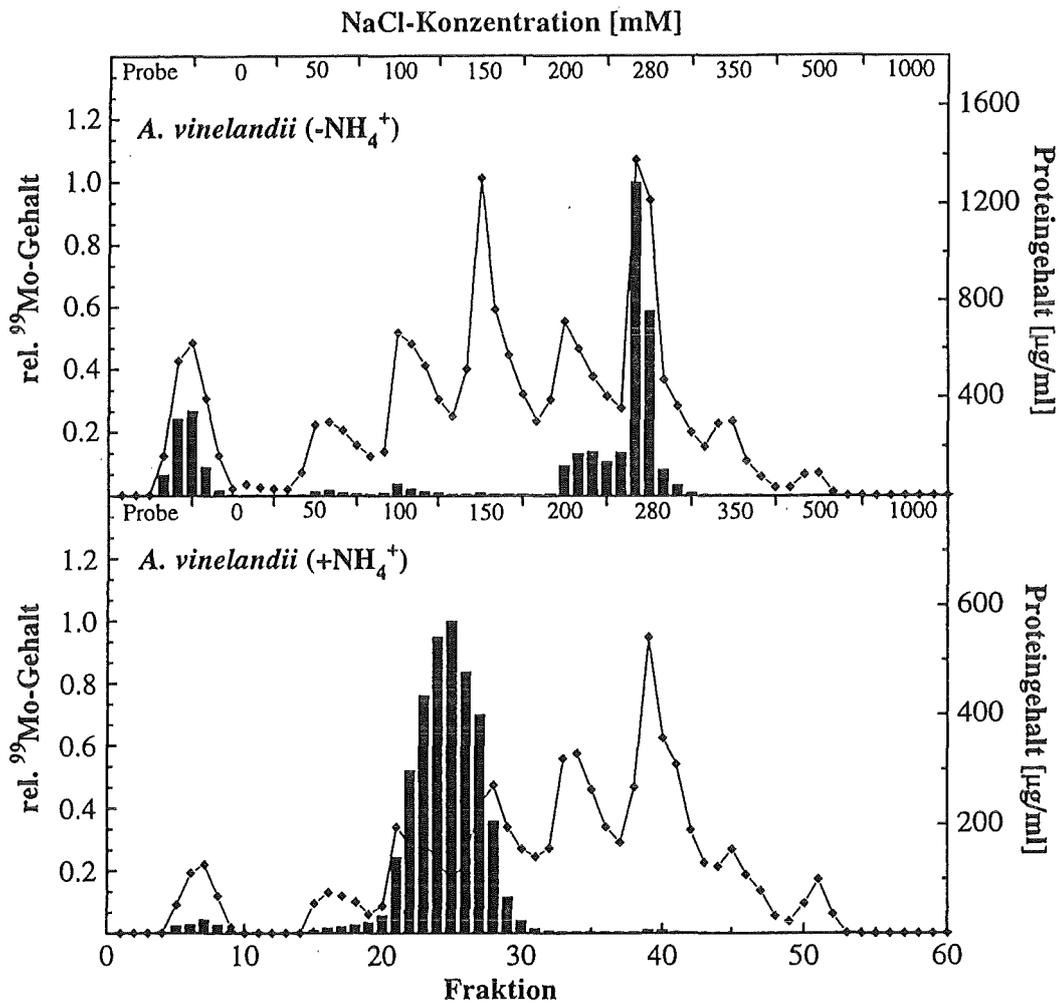


Abb. 5.7: DEAE-Elutionsprofile des Rohextraktes von *A. vinelandii*. Die Proteine wurden mit einem nichtlinearen NaCl-Gradienten (0, 50, 100, 150, 200, 280, 350, 500 und 1000 mM) in 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 4 mM Dithionit eluiert. Zusätzlich sind die Fraktionen dargestellt, die beim Auftragen der Probe auf die Säule gewonnen wurden (Elutionsbereich "Probe"). Der relative ⁹⁹Mo-Gehalt ist als Säule dargestellt. Die durchgezogene Linie verbindet die Proteingehalte der Fraktionen und soll den Verlauf der Meßdaten verdeutlichen.

- Nitrogenase-dereprimierte Zellen (-NH₄⁺)
- Nitrogenase-reprimierte Zellen (+NH₄⁺)

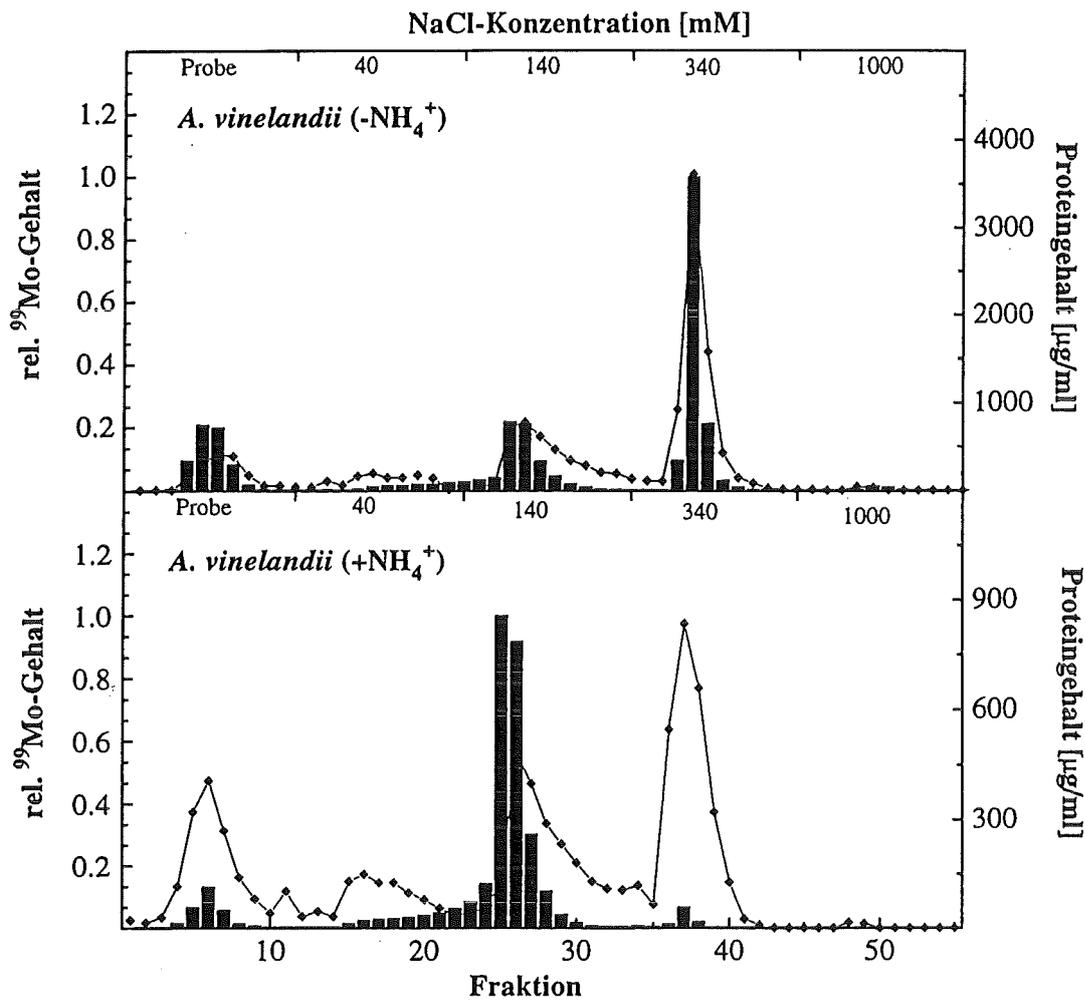


Abb. 5.8: DEAE-Elutionsprofile des Rohextraktes von *A. vinelandii*. Die Proteine wurden mit einem nichtlinearen NaCl-Gradienten (0, 40, 120, 340 und 1000 mM) in 50 mM Tris/HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl₂ eluiert. Zusätzlich sind die Fraktionen dargestellt, die beim Auftragen der Probe auf die Säule gewonnen wurden (Elutionsbereich "Probe"). Der relative ⁹⁹Mo-Gehalt ist als Säule dargestellt. Die durchgezogene Linie verbindet die Proteingehalte der Fraktionen und soll den Verlauf der Meßdaten verdeutlichen.

- Nitrogenase-dereprimierte Zellen (-NH₄⁺)
- Nitrogenase-reprimierte Zellen (+NH₄⁺)

Die Elutionsprofile der mit MgCl_2 versetzten Rohextrakte von *A. vinelandii* (Abb. 5.8) zeigen bezüglich der ^{99}Mo -Gehalte einen ähnlichen Verlauf wie die Mo-Profile der unter reduzierenden Bedingungen durchgeführten Fraktionierungen (Abb. 5.7). Da der Protein-komplex stärker an DEAE-Sephacel gebunden wird als das freie MoFe-Protein, wurde die Elution mit einem nichtlinearen NaCl-Gradienten von 0, 40, 120, 340 und 1000 mM NaCl durchgeführt. Das MoFe-Protein wurde in den 340 mM NaCl-Fractionen nachgewiesen (Acetylenreduktionsrate von $30 \text{ nmol Ethylen} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$). Allerdings wurde auch bei Nitrogenase-reprimierten Zellen ($+\text{NH}_4^+$) in diesem Elutionsbereich ein geringer ^{99}Mo -Gehalt beobachtet. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß zum Zeitpunkt der Zellern-te die Stickstoffquelle im Nährmedium (NH_4^+) verbraucht war und die Bakterien zur Si-cherstellung einer weiteren Stickstoffversorgung auf die Bildung der Nitrogenase angewie-sen waren. Im Gegensatz zum MoFe-Protein, das unter reduzierenden Bedingungen isoliert wurde, zeigt das TDPAC-Spektrum des Protein-Komplexes eine leicht höhere Quadrupol-kopplungskonstante sowie eine deutliche Frequenzverteilung (Tabelle 5.4). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Bindungsstelle des Mo-Atoms im FeMo-Cofaktor durch die Kom-plexierung beeinflusst wird.

Der zweite ^{99}Mo -Peak bei einer NaCl-Konzentration von 120 mM zeigt analog zur Frak-tionierung mit Dithionit ein ungestörtes TDPAC-Signal. Damit wurde nachgewiesen, daß die Mo-Bindung des Speicherproteins durch die Zugabe von Dithionit nicht beeinflusst wird.

Tabelle 5.4: Quadrupolparameter der Bindungszustände von ^{99}Mo im MoFe-Protein und im Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii*.

Probe	Anteil [%]	ν_Q [MHz]	δ [%]	R_0 [%]
100 - 150 mM NaCl (+ NH_4^+ , Dithionit)	100	0*	5 ± 1 MHz	0*
120 mM NaCl (+ NH_4^+ , MgCl_2)	100	0*	5 ± 2 MHz	0*
MoFe-Protein (- NH_4^+ , Dithionit)	55 ± 8	66 ± 7	0*	45 ± 8
MoFe-/Fe-Protein ** (- NH_4^+ , MgCl_2)	69...87	83...97	< 20	16...28
Mo-Speicherprotein (+ NH_4^+ , G-25)	60 ± 6	178 ± 4	0*	40 ± 6

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Aufgrund der Korrelation zwischen den Quadrupolparametern können diese nicht unabhängig voneinan-der ermittelt werden. Die Werte der Parameter liegen innerhalb der angegebenen Intervalle.

Um den Einfluß von DEAE-Sephacel auf das Speicherprotein zu untersuchen, wurde der Rohextrakt von *A. vinelandii* (+NH₄⁺) in einer G-25 Gelfiltration von ⁹⁹MoO₄²⁻ und anderen niedermolekularen, nicht proteingebundenen Mo-Verbindungen gereinigt. Die Mo-Bindungszustände des so gereinigten Rohextraktes können mit Quadrupolparametern beschrieben werden, die auch für die Mo-Bindung am Speicherprotein der intakten Zellen bestimmt wurden (Tabelle 5.4). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Mo-Abgabe präparationsbedingt ist, und läßt die Vermutung zu, daß Molybdän nur schwach an das Protein gebunden wird und leicht als ⁹⁹MoO₄²⁻ abgegeben werden kann. Das freie Molybdän wird dann analog zur ⁹⁹MoO₄²⁻-Lösung bei einer NaCl-Konzentration von 100 - 140 mM eluiert (Abb. 5.7 und 5.8).

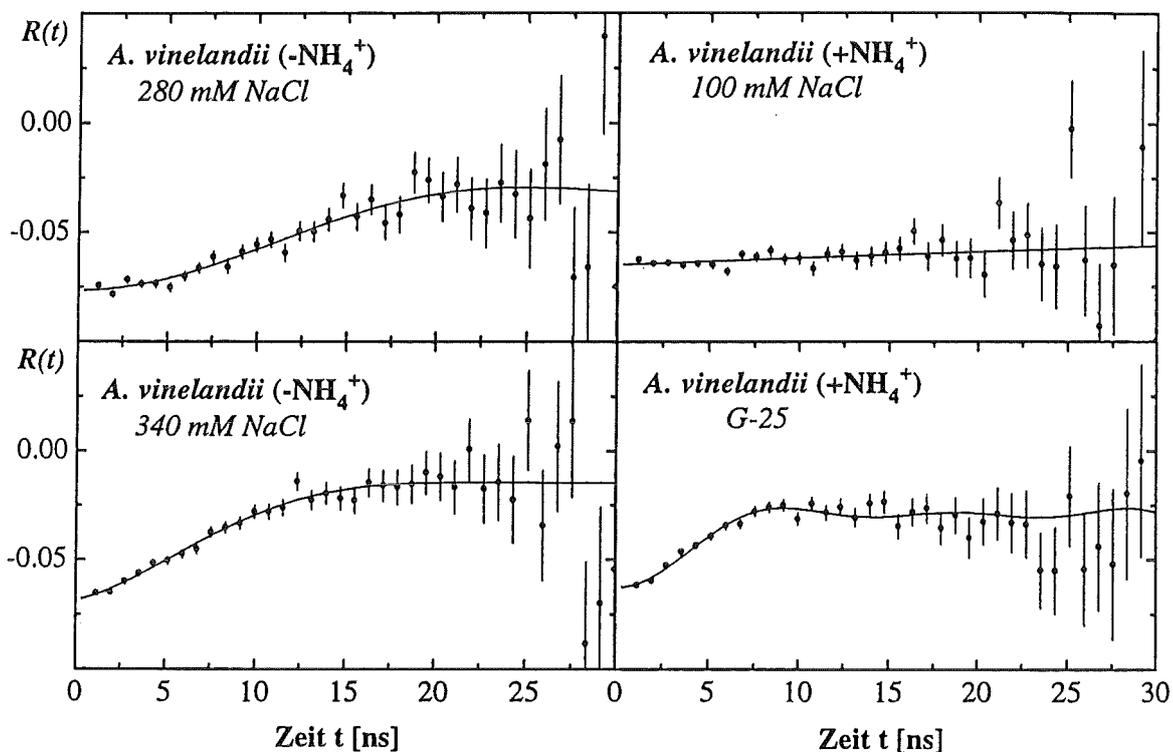


Abb. 5.9: $R(t)$ -Spektren des MoFe-Proteins (280 mM NaCl) und des MoFe-/Fe-Proteinkomplexes (340 mM NaCl) von Nitrogenase-de-reprimierten Zellen (-NH₄⁺) sowie des Mo-Speicherproteins (Isolierung an Sephadex G-25) und der 100 mM NaCl-Fraktion von Nitrogenase-reprimierten Zellen (+NH₄⁺) von *A. vinelandii*.

5.3.3 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein von *K. oxitoca*

Die Bestimmung des relativen Mo-Gehaltes in den Proteinfractionen des Rohextraktes von *K. oxitoca* bestätigte die bereits aus den Messungen an intakten Zellen gewonnenen Ergebnisse. Im Rohextrakt der NH_4^+ -Zellen konnte kein Molybdän nachgewiesen werden. Daraus folgt, daß das von den Bakterien aufgenommene Molybdän ausschließlich zum Aufbau der Nitrogenase verwendet wird und keine weiteren Mo-Bindungssysteme vorliegen. Im Gegensatz zu den bisher betrachteten Bakterienspezies wurde bei *K. oxitoca* nur ein geringer Teil des proteingebundenen Molybdäns bei einer NaCl-Konzentration von 280 mM eluiert, der weitaus größere Teil wurde in den 350 mM NaCl-Fractionen gefunden (Abb. 5.10). In den 280 mM NaCl-Fractionen konnte, wie auch bei *R. capsulatus* und *A. vinelandii*, nur nach Zugabe von Fe-Protein eine Nitrogenaseaktivität gemessen werden. Hingegen wurde bei dem 350 mM NaCl-Peak eine Enzymaktivität auch ohne Zugabe des Fe-Proteins beobachtet (Abb. 5.11). Da zur Acetylenreduktion beide Proteine benötigt werden, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, daß bei 280 mM NaCl nur das MoFe-Protein und bei 350 mM NaCl das MoFe- und das Fe-Protein gemeinsam eluiert wurden.

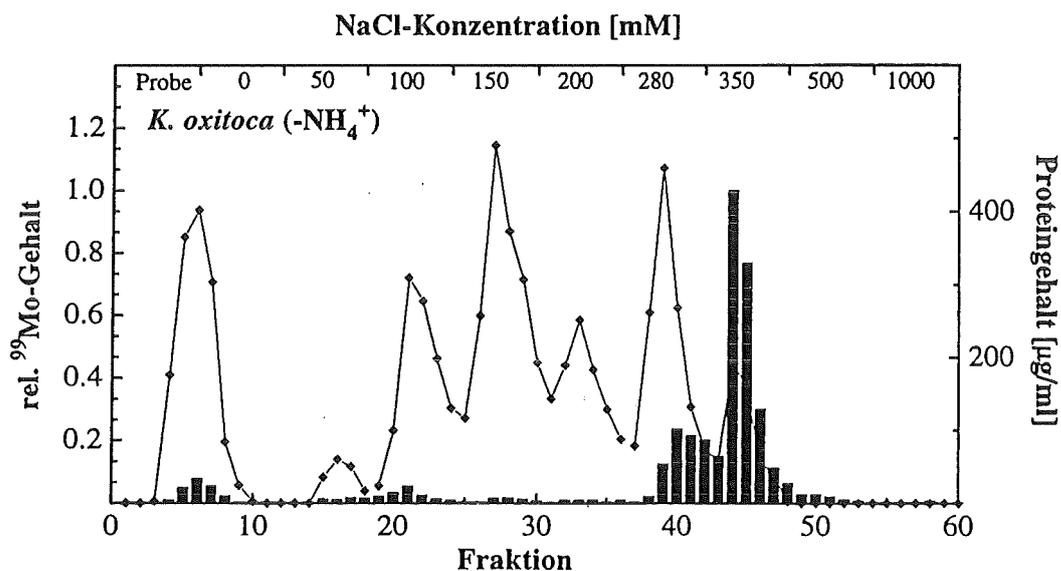


Abb. 5.10: DEAE-Elutionsprofil des Rohextraktes von Nitrogenase-dereprimierten Zellen von *K. oxitoca*. Die Proteine wurden mit einem nicht-linearen NaCl-Gradienten (0, 50, 100, 150, 200, 280, 350, 500 und 1000 mM) in 50 mM Tris/HCl, pH 7.8, 4 mM Dithionit eluiert. Zusätzlich sind die Fraktionen dargestellt, die beim Auftragen der Probe auf die Säule gewonnen wurden (Elutionsbereich "Probe"). Der relative ^{99}Mo -Gehalt ist als Säule dargestellt. Die durchgezogene Linie verbindet die Proteingehalte der Fraktionen und soll den Verlauf der Meßdaten verdeutlichen.

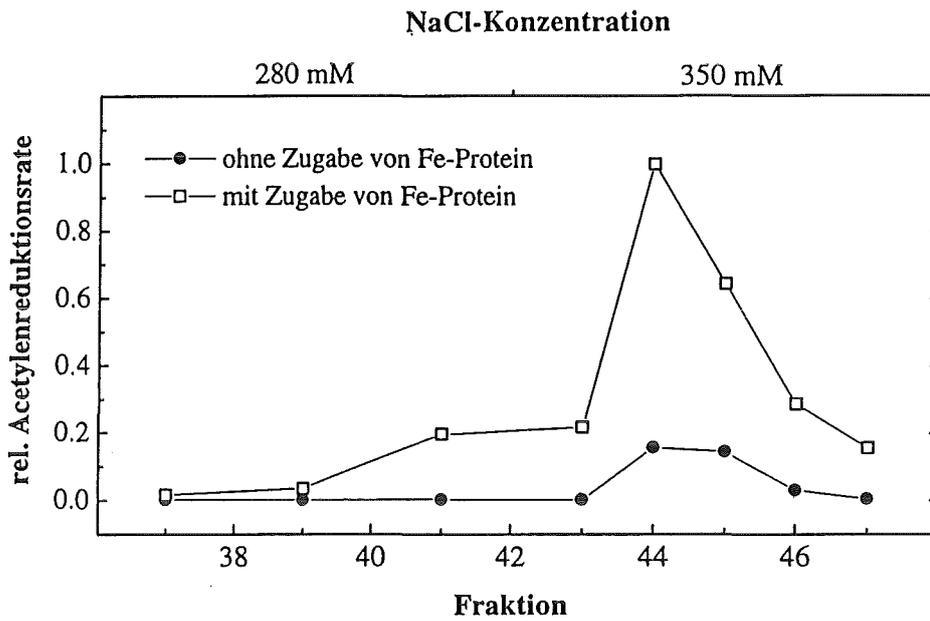


Abb. 5.11: Relative Acetylenreduktionsrate für den Elutionsbereich von 280 - 350 mM NaCl [Suer96]. Die durchgezogene Linie verbindet die Datenpunkte und dient der Augenführung.

- unter Zugabe von Fe-Protein
- ohne Zugabe von Fe-Protein

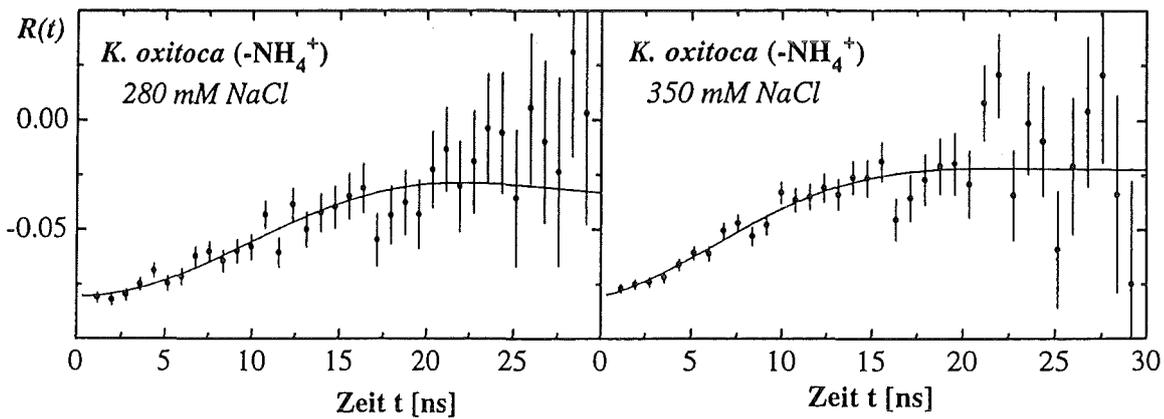


Abb. 5.12: $R(t)$ -Spektren des MoFe-Proteins (280 mM NaCl) und des MoFe-/Fe-Proteinkomplexes (350 mM NaCl) von *K. oxitoca*.

Die TDPAC-Messungen (Abb. 5.12) zeigen, daß die Mo-Bindungszustände in beiden Elutionsbereichen mit identischen Quadrupolkopplungskonstanten ($\nu_Q \approx 81$ MHz bzw. $\nu_Q \approx 83$ MHz) beschrieben werden können. Die bei einer NaCl-Konzentration von 280 mM eluierten Proteine weisen Mo-Bindungszustände auf, die analog zu den Zuständen charakterisiert werden können, die im MoFe-Protein von *R. capsulatus* und *A. vinelandii* nachgewiesen wurden (Tabelle 5.5). Die Bindungszustände der 350 mM NaCl-Fractionen hingegen zeigen eine deutliche Frequenzverteilung. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Messungen am MoFe-/Fe-Proteinkomplex von *A. vinelandii* (+MgCl₂) läßt darauf schließen, daß das Auftreten der Frequenzverteilung auf die Bindung des Fe-Proteins an das MoFe-Protein zurückzuführen ist.

Tabelle 5.5: Quadrupolparameter der Bindungszustände von ⁹⁹Mo im MoFe-Protein und im MoFe-/Fe-Proteinkomplex von *K. oxitoca*.

Probe	Anteil [%]	ν_Q [MHz]	δ [%]	R_0 [%]
MoFe-Protein (-NH ₄ ⁺)	52 ± 5	81 ± 8	0*	48 ± 5
MoFe-/Fe-Protein** (-NH ₄ ⁺)	60...80	67...97	< 33	20...40

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Aufgrund der Korrelation zwischen den Quadrupolparametern können diese nicht unabhängig voneinander ermittelt werden. Die Werte der Parameter liegen innerhalb der angegebenen Intervalle.

Für die Untersuchung der ⁹⁹Tc-Anreicherung, die bei den Messungen an intakten Zellen beobachtet wurde, wurden die γ -Spektren der Zellwände/-membranen und des Rohextraktes aufgezeichnet. Ein Vergleich der Spektren zeigt, daß nur in den nach dem Zellaufschluß abgetrennten Zellwänden und -membranen eine deutliche ⁹⁹Tc-Anreicherung vorliegt (Abb. 5.13). Der ⁹⁹Tc-Überschuß äußert sich im γ -Energiespektrum durch eine Unterdrückung der 740 keV-Linie von ⁹⁹Mo. Im γ -Energiespektrum des Rohextraktes hingegen zeigt das Verhältnis der 740 keV-Linie zur 140 keV-Linie ein ⁹⁹Mo/⁹⁹Tc-Gleichgewicht (vgl. Abb. 3.4). Damit wurde gezeigt, daß Technetium nicht proteingebunden in der Zelle vorliegt, sondern vermutlich nur unspezifisch an den Zellwänden und -membranen gebunden wird.

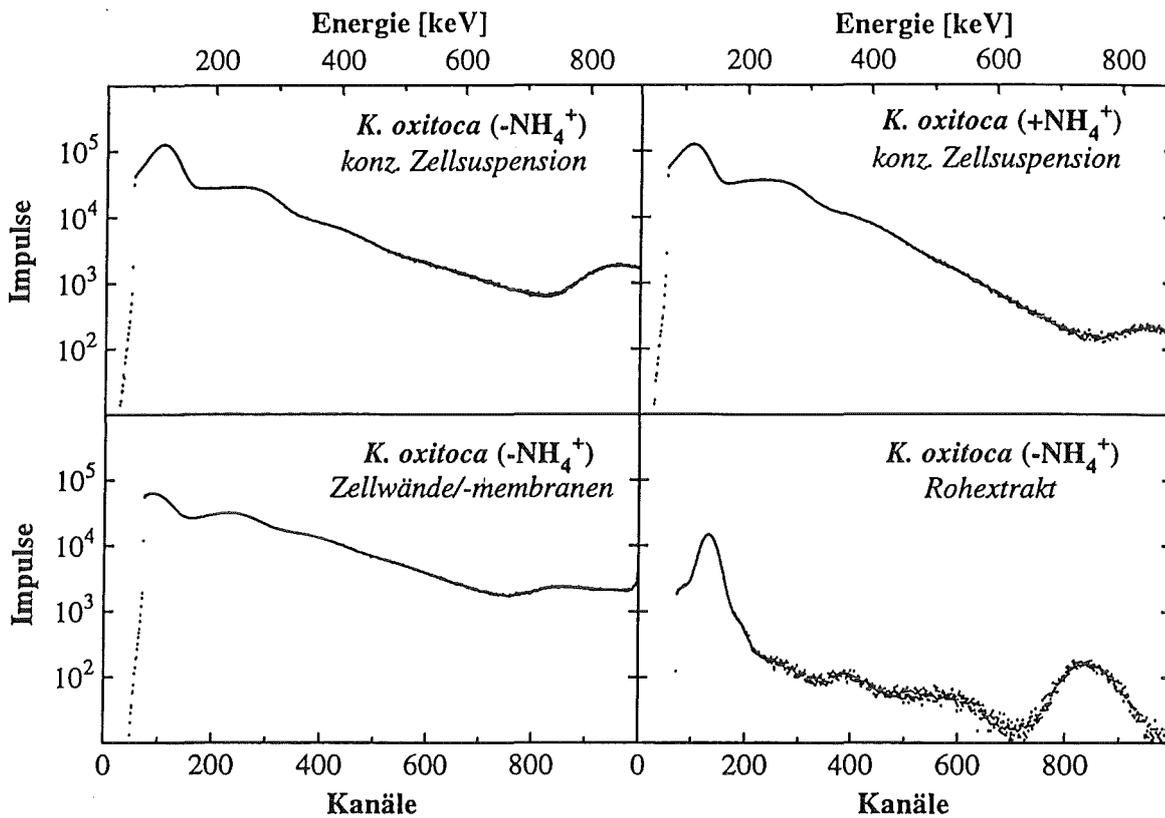


Abb. 5.13: Mit einem BaF₂-Detektor gemessene γ -Energiespektren von Nitrogenase-dereprimierten (-NH₄⁺) und reprimierten Zellen (+NH₄⁺) von *K. oxitoca* sowie die γ -Energiespektren der Zellwände/-membranen und des Rohextraktes der Nitrogenase-dereprimierten Zellen. Das Verhältnis der 740 keV-Linie zur 140 keV-Linie zeigt eine Tc-Anreicherung an den Zellwänden/-membranen.

6. Diskussion der Ergebnisse

Für die Untersuchung von Mo-Bindungen steht mit ^{99}Mo ein Isotop zur Verfügung, das aufgrund seiner Zerfallseigenschaften für TDPAC-Messungen geeignet ist. ^{99}Mo wird von den Bakterien analog zum natürlich vorkommenden Molybdän aufgenommen und in die zu untersuchenden Mo-Bindungsplätze eingebaut. Das Isotop zerfällt über einen β^- -Übergang in angeregte Kernzustände des Tochterisotopes ^{99}Tc . Die mit der TDPAC-Methode beobachtete γ - γ -Zerfallskaskade wird von einem dieser angeregten Kernzustände emittiert. Die mit dem β^- -Zerfall verbundene Kernumwandlung hat elektronische Umordnungsprozesse zur Folge ("after effects"). Diese können, wie zum Beispiel beim Elektroneneinfangprozeß von ^{111}In , zu einer vollständigen Auslöschung der Quadrupolkorrelation führen [BaBö82]. Derartige "after effects" sind bei Messungen mit ^{99}Mo bisher nicht beobachtet worden. Die Wechselwirkung des Kernquadrupolmomentes der ^{99}Mo -Sondenkerne mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort erzeugt somit wohldefinierte Signale, die durch die üblichen Größen ν_Q , δ , η und λ parametrisiert werden können. Da bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben keine Relaxation zu beobachten war, wurde der Parameter λ zur Beschreibung der Meßdaten nicht benötigt. Bei der Verwendung von ^{99}Mo als Sondenkern kann aufgrund der Kerneigenschaften der Asymmetrieparameter η unterhalb von $\nu_Q \approx 200$ MHz nicht mehr bestimmt werden und wurde deshalb bei der Auswertung der $R(t)$ -Spektren festgehalten. Trotz dieser Einschränkungen aufgrund der speziellen Eigenschaften des Sondenisotopes ^{99}Mo war eine Charakterisierung der Mo-Bindungszustände anhand der bestimmaren Quadrupolparameter ν_Q und δ möglich.

6.1 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase

Die Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase wurde an Zellen der Stickstofffixierenden Bakterien *R. capsulatus*, *A. vinelandii* und *K. oxitoca* sowie am gereinigten MoFe-Protein dieser Bakterien untersucht. Zur Reinigung des MoFe-Proteins von weiteren Mo-bindenden Proteinen sowie von niedermolekularen Mo-Verbindungen wurde der Rohextrakt der enzymatisch aufgeschlossenen Zellen mittels DEAE-Sephacel fraktioniert. Um sicherzustellen, daß die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Proben stattfanden, die über ein vollständig ausgebildetes Enzymsystem bzw. einen intakten FeMo-Cofaktor verfügten, wurden die Zellanzucht- und Präparationsbedingungen so gewählt, daß sowohl bei intakten Zellen als auch beim gereinigten MoFe-Protein eine enzymatische Aktivität vorhanden war.

Die Auswertungen der $R(t)$ -Spektren ergaben für alle gereinigten MoFe-Proteinproben zwei unterschiedliche Mo-Bindungszustände, die durch die Quadrupolkopplungskonstan-

ten $\nu_Q \approx 70$ MHz und $\nu_Q \approx 0$ MHz charakterisiert werden konnten (Tabelle 6.1). Durch den Nachweis der Nitrogenaseaktivität konnte weiterhin gezeigt werden, daß mindestens einer dieser Mo-Bindungszustände der Mo-Bindung im enzymatisch aktiven FeMo-Cofaktor zuzuordnen ist. Auch intakte Zellen von *K. oxitoca* zeigten ausschließlich diese beiden Bindungszustände. Hingegen wurden in Zellen von *R. capsulatus* und *A. vinelandii* neben der Mo-Bindung im MoFe-Protein noch weitere Mo-Bindungssysteme nachgewiesen.

Die in dieser Arbeit beobachteten Feldgradienten stehen jedoch im Widerspruch zu früheren TDPAC-Untersuchungen von Mottner et al. [MoBu93], die anhand von Messungen an Zellen von *K. oxitoca* (früher: *K. pneumoniae*) der Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor eine deutlich größere Quadrupolkopplungskonstante ($\nu_Q \approx 220$ MHz) und einen Asymmetrieparameter von Eins zuwies. Allerdings konnten nur etwa 15 % der Mo-Bindungszustände dieser spezifischen Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor zugeordnet werden. Die übrigen Mo-Bindungszustände zeigten ein unspezifisches TDPAC-Signal und wurden abhängig von der Meßtemperatur mit einer Frequenzverteilung um die Frequenz Null (300 K) bzw. durch schnelle Relaxation (195 K) beschrieben (Tabelle 6.1). Bereits in ihrer Veröffentlichung haben Mottner et al. auf die Inkonsistenz ihrer Ergebnisse mit dem Modell des FeMo-Cofaktors nach Kim und Rees [KiRe92a,b] hingewiesen. Aufgrund des allgemein anerkannten Strukturmodells ist zu vermuten, daß das sechsfach koordinierte Molybdän, das einerseits über drei Schwefel-Liganden an den Fe-S-Komplex des FeMo-Cofaktors und andererseits über zwei Sauerstoffbindungen und eine Stickstoffbindung an Homocitrat bzw. Histidin gebunden wird (vgl. Abb. 2.2), einen deutlich kleineren und näherungsweise axialsymmetrischen Feldgradienten aufweist. Derart hohe Übergangsfrequenzen, wie sie der Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor zugeordnet wurden, werden in der Regel nur bei zweikernigen Mo-Verbindungen beobachtet [SuNi88, NiSu88, Reis94], wobei der hohe Wert für den Feldgradienten durch eine starke Mo-Mo-Wechselwirkung hervorgerufen wird. Desweiteren wurde der Wert für den Asymmetrieparameter η nicht aus den Meßdaten bestimmt, sondern aufgrund einer früheren ^{95}Mo -ENDOR-Arbeit (Electron Nuclear Double Resonance), in der ein asymmetrisch koordiniertes Mo(IV) für die Mo-Bindung im semi-reduzierten MoFe-Protein postuliert wurde [VeNe86], auf Eins festgehalten.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte auf die damals gewählten Zellanzuchtbedingungen zurückzuführen sein. Die von Mottner et al. untersuchten Zellen wurden nicht unter diazotrophen Bedingungen kultiviert, und die Inkubation mit ^{99}Mo fand erst nach der Zellernte statt. Wie Voruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, wiesen Zellen von *K. oxitoca*, die unter diesen Bedingungen kultiviert wurden, keine Nitrogenaseaktivität auf [Suer95]. Somit besteht die Möglichkeit, daß die von Mottner et al. untersuchten Zellen kein vollständig ausgebildetes Enzymsystem besaßen und der Cofaktor nicht oder nur unvollständig vorhanden war.

Auffallend an den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist, daß bei nur einem Mo-Bindungsplatz im FeMo-Cofaktor zwei unterschiedliche Feldgradienten beobachtet wurden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine teilweise Zerstörung des Cofaktors während der Probenaufbereitung oder -lagerung. So wurde von Newton et al. eine Molybdänabgabe in Form von MoS_4^{2-} und MoOS_3^{2-} bei einer Kontamination des isolierten Cofaktors mit Luftsauerstoff beobachtet [NeGh86]. Weiterhin konnte von Zumft gezeigt werden, daß auch eine Säure-/Basenbehandlung des MoFe-Proteins zu den oben genannten Zerfallsprodukten des Cofaktors führt [Zumf78]. Beide Zerfallsprodukte würden analog zu MoO_4^{2-} zu einem ungestörten bzw. im Fall von MoOS_3^{2-} zu einem nahezu ungestörten TDPAC-Signal führen und könnten somit den Anteil der Bindungszustände mit einem verschwindenden elektrischen Feldgradienten erklären.

Tabelle 6.1: Quadrupolparameter der Mo-Bindungszustände im MoFe-Protein der Nitrogenase.

MoFe-Protein		Anteil [%]	ν_Q [MHz]	R_0 [%]
<i>R. capsulatus</i> , isoliert		55 ± 3	70 ± 3	45 ± 3
<i>A. vinelandii</i> , isoliert		55 ± 8	66 ± 7	45 ± 8
<i>K. oxitoca</i> , isoliert		52 ± 5	81 ± 8	48 ± 5
<i>A. vinelandii</i> , Zellen	f_1 :	7 ± 4	178^*	38 ± 8
	f_2 :	55 ± 7	67 ± 9	
<i>K. oxitoca</i> , Zellen		53 ± 4	75 ± 5	47 ± 4
<i>K. oxitoca</i> , Zellen (300 K)** [MoBu93]		13 ± 3	222 ± 4	13 ± 1
<i>K. oxitoca</i> , Zellen (195 K)** [MoBu93]		16 ± 2	225 ± 5	0

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Um einen Vergleich der Meßergebnisse zu ermöglichen, wurde aus der von Mottner et al. angegebenen Übergangsfrequenz ω_1 und dem Asymmetrieparameter $\eta = 1$ die Quadrupolkopplungskonstante ν_Q berechnet. Der verbleibende Anteil von 74% (300 K) zeigte einen exponentiellen Abfall und wurde durch eine Frequenzverteilung um Null (480 ± 30 Mrad/s) beschrieben. Der Anteil von 84% (195 K), der ebenfalls einen exponentiellen Abfall aufweist, wurde durch schnelle Relaxation beschrieben.

Um eine Kontamination der Proben mit Sauerstoff und eine damit verbundene mögliche Zerstörung des Cofaktors zu vermeiden, wurden die Probenpräparationen in der vorliegenden Arbeit unter Argonatmosphäre und reduzierenden Bedingungen, d.h. unter Zugabe von Dithionit, durchgeführt. Zusätzlich erfolgte für Zellen von *A. vinelandii* auch eine Isolierung des MoFe-Proteins unter anaeroben Bedingungen, wobei dem Zellextrakt $MgCl_2$ zur Bildung eines O_2 -toleranten Enzymaggregates [HeVe77], jedoch kein Dithionit zugefügt wurde. Zum Nachweis einer möglichen Zerstörung des Cofaktors nach der Probenpräparation wurden die Proben wiederholt gemessen. Sollte der Bindungszustand mit $\nu_Q \approx 0$ MHz auf einen Zerfall des Cofaktors nach der Präparation zurückzuführen sein, so müßte der Anteil dieses Zustandes bei wiederholten Messungen zunehmen. Dies wurde jedoch selbst bei einer Variation der Meßtemperatur (-20 bis +40°C) nicht beobachtet. Somit können die nach der Präparation vorliegenden Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor als stabil angesehen werden. Weiterhin besteht noch die Möglichkeit, daß der Anteil mit $\nu_Q \approx 0$ MHz in der Probenpräparation selbst bedingt ist. Da jedoch dieser Bindungszustand sowohl in intakten Zellen als auch in den gereinigten MoFe-Proteinproben nachgewiesen wurde, ist ein Artefakt aufgrund der Präparation nicht wahrscheinlich. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die gemessenen Mo-Bindungszustände mit $\nu_Q \approx 70$ MHz und $\nu_Q \approx 0$ MHz beide der Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor zuzuordnen sind.

Zur Interpretation dieser Mo-Bindungszustände werden im folgenden drei Möglichkeiten diskutiert:

- (a) die Existenz unterschiedlicher Mo-Bindungen im FeMo-Cofaktor
- (b) der Einfluß der Substratbindung auf den Mo-Bindungszustand
- (c) der Einfluß unterschiedlicher Redoxzustände des MoFe-Proteins auf die Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor.

Außerdem ist es für die Zuordnung der Mo-Bindungszustände notwendig, die hier vorgestellten Ergebnisse mit den Resultaten anderer Untersuchungsmethoden zu vergleichen.

6.1.1 Aufbau des FeMo-Cofaktors und Einfluß der Substratbindung auf dessen Konformation

Das MoFe-Protein ist ein Tetramer, bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Beide α -Untereinheiten enthalten jeweils einen FeMo-Cofaktor mit einer Mo-Bindungsstelle [Burg90]. Röntgenstrukturanalysen des MoFe-Proteins (vgl. Kap. 2) haben gezeigt, daß der Cofaktor in beiden Untereinheiten identisch koordiniert ist [KiRe92a,b]. Somit sprechen die bisher gewonnenen Erkenntnisse gegen die Existenz von zwei unterschiedlichen Mo-Bindungsplätzen im FeMo-Cofaktor, auf welche die in dieser Arbeit beobachteten Bindungszustände zurückgeführt werden könnten.

Eine der angesprochenen Interpretationsmöglichkeiten für die Beobachtung zweier Bindungszustände könnte der Einfluß der Substratbindung (N_2 , H^+) und die damit verbundene Änderung der Ladungsdichteverteilung sein. Bei dieser Annahme ist allerdings zu berücksichtigen, daß eine Substratbindung nur unter "turn-over" - Bedingungen stattfinden kann. Dies bedeutet, daß in der Meßprobe ein Reduktionsmittel wie Ferredoxin (*in vivo*) oder Dithionit (*in vitro*), MgATP, ein Substrat und die zum Enzymsystem gehörenden Proteine (Fe-Protein und MoFe-Protein) in ausreichender Menge vorhanden sein müssen. Da den Bakterien nach der Zellernte kein Stickstoff mehr zugegeben wurde, stand ihnen nur der während des Wachstums aufgenommene Stickstoff als Substrat zur Verfügung. Dieser wurde jedoch bereits während der Probenpräparation reduziert, so daß während der Messung eine N_2 -Fixierung nicht mehr beobachtet werden konnte. Die gemessenen Bindungszustände können somit nicht auf den Einfluß einer N_2 -Bindung am FeMo-Cofaktor zurückgeführt werden. Andererseits kann eine H^+ -Reduktion aufgrund der Verfügbarkeit von H^+ -Ionen auch weiterhin stattfinden. So wurde sogar bei einem verminderten Elektronenfluß vom Fe-Protein zum MoFe-Protein die Reduktion von $2H^+$ zu H_2 beobachtet [EaPo74, HaBu78, WhBu81]. Der kinetische Ablauf der H^+ -Reduktion wird durch das von Thorneley und Lowe entwickelte kinetische Modell der Stickstoff-Fixierung beschrieben (vgl. Kap. 2.1.2). Bei einem reduzierten Elektronenfluß (MoFe-Protein : Fe-Protein = 100 : 1) finden nur die beiden ersten Fe-Proteinzyklen statt und führen zu einer Freisetzung von H_2 (Abb. 6.2). Der Elektronenfluß reicht unter diesen Bedingungen nicht aus, um eine signifikante Konzentration des MoFe-Proteins im N_2 -bindenden Zustand (E_3) zu erzeugen [ThAs93]. Bei der reinen H^+ -Reduktion liegt das MoFe-Protein hauptsächlich in zwei definierten Redoxzuständen vor: dem semi-reduzierten (E_0) und dem einelektron-reduzierten Zustand (E_1) [FiLo91].

Da das Auftreten von Redoxprozessen bei der Aufbereitung der Proben nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine Isolierung des MoFe-Proteins in unterschiedlichen Redoxzuständen prinzipiell möglich. Der Einfluß von Redoxübergängen auf die Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

6.1.2 Einfluß von Redoxübergängen des MoFe-Proteins auf die Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor

6.1.2.1 Der (s-r) \rightarrow (r) - Prozeß

Bei einem verminderten Elektronenfluß vom Fe-Protein zum MoFe-Protein wird der MoFe-Proteinzyklus auf drei Redoxzustände reduziert: E_0 , E_1 und E_2 [FiLo91]. Der Zustand E_0 entspricht dem Dithionit-reduzierten MoFe-Protein und wird auch als semi-reduzierter oder nativer Zustand bezeichnet. Die Zustände E_1 und E_2 sind die ein- bzw. zweielektron-reduzierten Zustände. Zum Nachweis des semi-reduzierten Zustandes (s-r) wird üblicherweise das charakteristische $S = 3/2$ EPR-Signal (g-Werte 4.3, 3.7, 2.01) des FeMo-Cofaktors verwendet [MüRh75, Burg90]. Dieser (s-r) - Zustand des MoFe-Proteins kann sowohl einelektron-oxidiert (ox) als auch -reduziert (r) werden. Jeder dieser Übergänge ist mit einer Änderung des charakteristischen EPR-Signals des FeMo-Cofaktors verbunden (Abb. 6.1). Dies bedeutet, daß die Einelektron-Übergänge des MoFe-Proteins eine Änderung des Redoxzustandes des Cofaktors bewirken.

Für den stationären Zustand des Subzyklus (Abb. 6.2), bei dem das MoFe-Protein (s-r) zunächst zweifach reduziert wird ($E_0 \rightarrow E_1 \rightarrow E_2$) und anschließend unter Abgabe von H_2 wieder in den (s-r)-Zustand (E_0) übergeht, wurde eine Abschwächung des EPR-Signals um etwa 50 % im Vergleich zum reinen E_0 -Zustand beobachtet [HaBu78, FiLo91, ThAs93]. Diese Beobachtung steht in Einklang mit dem kinetischen Modell von Fisher et al. [FiLo91], wonach sich im stabilen Gleichgewicht 55 % der MoFe-Proteine im Zustand E_0 und 45 % im Zustand E_1 befinden. Der Zustand E_2 wird aufgrund der im Vergleich zur Reduktionsgeschwindigkeit ($E_0 \rightarrow E_1$ und $E_1 \rightarrow E_2$) deutlich höheren Oxidationsgeschwindigkeit ($E_2 \rightarrow E_0$) von weniger als 0.02 % der MoFe-Proteine besetzt [FiLo91].

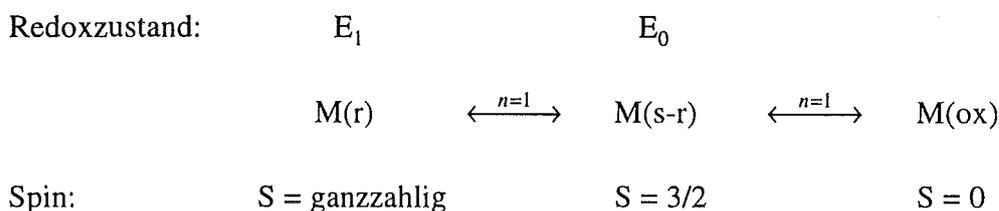


Abb. 6.1: Redox Eigenschaften des FeMo-Cofaktors. $M(ox)$, $M(s-r)$ und $M(r)$ stellen den proteingebundenen FeMo-Cofaktor in der oxidierten, der semi-reduzierten (Dithionit-reduzierten) und der reduzierten Form dar. Jeder Redoxvorgang ist ein Einelektron-Übergang ($n = 1$).

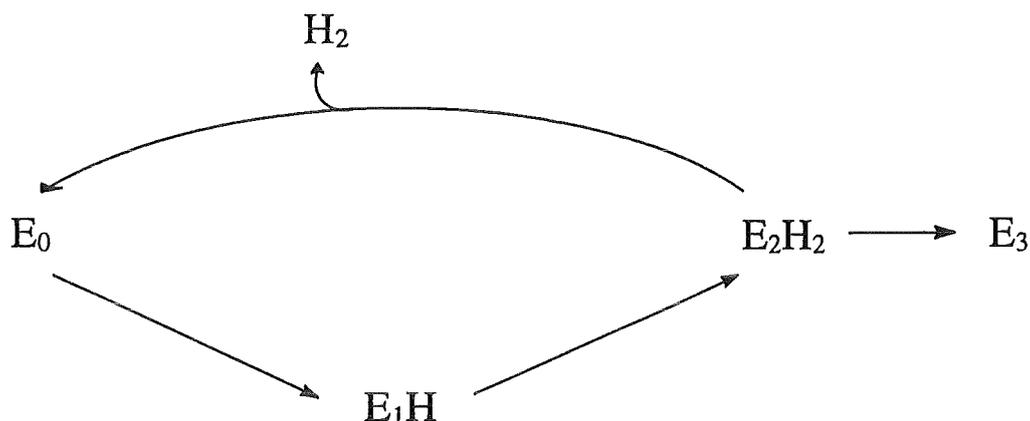


Abb. 6.2: Subzyklus des MoFe-Proteinzyklus bei einem reduzierten Elektronenfluß vom Fe-Protein zum MoFe-Protein [FiLo91]. Die Übergänge vom Zustand $E_0 \rightarrow E_1$, $E_1 \rightarrow E_2$ und $E_2 \rightarrow E_3$ sind jeweils mit einer Komplexbildung zwischen dem reduzierten Fe-Protein und dem MoFe-Protein, einem Elektronentransfer vom Fe-Protein zum MoFe-Protein und einer Dissoziation des oxidierten Fe-Proteins vom reduzierten MoFe-Protein verbunden.

Die in dieser Arbeit bestimmten Anteile von 55 % und 45 % der Mo-Atome in Bindungszuständen mit unterschiedlichen Feldgradienten stimmen mit den von Fisher et al. bestimmten Anteilen der MoFe-Proteine in den Redoxzuständen E_0 und E_1 überein. Unter der Annahme, daß die Beobachtung der zwei Mo-Bindungszustände auf eine Isolierung des bei der H^+ -Reduktion entstehenden Mischzustandes der MoFe-Proteine zurückzuführen ist, könnte der Mo-Bindungszustand im FeMo-Cofaktor des semi-reduzierten MoFe-Proteins (E_0) durch eine Quadrupolkopplungskonstante von 70 MHz beschrieben werden und dem Bindungszustand im reduzierten Protein (E_1) eine Quadrupolkopplungskonstante von Null zugeordnet werden.

Die hier getroffene Zuordnung beinhaltet die Annahme, daß das Mo-Atom in den $(s-r) \rightarrow (r)$ -Prozeß des Proteins involviert ist. Diese Annahme wurde durch Mo-EXAFS-Untersuchungen (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) am proteingebundenen FeMo-Cofaktor bestätigt [ChTi95]. Christiansen et al. untersuchten die Mo-X-Abstände ($X = O, N, S, Fe$) in MoFe-Proteinproben, die den oben beschriebenen $E_0 - E_1$ -Mischzustand aufwiesen. Bei dem Übergang vom semi-reduzierten zum reduzierten Zustand des Proteins wurde eine Verkürzung der Mo-O/N-Bindungslängen und der Mo-Fe-Abstände um etwa 0.06 - 0.07 Å beobachtet. Hingegen blieben die Mo-S-Bindungslängen unverändert. Die Änderung der Bindungslängen führt zu einer Änderung der Ladungsdichteverteilung am Ort des Sondenkerns und kann somit in TDPAC-Experimenten nachgewiesen werden.

Nach dem Strukturmodell von Kim und Rees [KiRe92a,b] wird das Mo-Atom von drei S-Atomen auf der einen Seite und zwei O- sowie einem N-Atom auf der gegenüberliegenden Seite koordiniert (vgl. Abb. 2.2). Aufgrund dieser Koordination kann ein näherungsweise axialsymmetrischer Feldgradient mit einer größeren Ladungsdichte auf der Seite der S-Atome vermutet werden. Verkürzen sich die Mo-O/N-Bindungslängen bei der Reduktion des Cofaktors, so ist es wahrscheinlich, daß diese Änderung zu einer Erhöhung der Ladungsdichte auf der O/N-Seite führt und somit eine Abnahme des Feldgradienten bewirkt. Aufgrund dieser Überlegungen wäre der Mo-Bindung im semi-reduzierten FeMo-Cofaktor die in dieser Arbeit gemessene Quadrupolkopplungskonstante von etwa 70 MHz zuzuordnen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Zuordnung überein, die aufgrund des Vergleiches mit dem kinetischen Modell der H^+ -Reduktion von Fisher et al. [FiLo91] getroffen wurde.

Um die bei der H^+ -Reduktion auftretenden Redoxzustände des MoFe-Proteins beobachten zu können, ist das Vorliegen eines stabilen E_0 - E_1 -Mischzustandes notwendig. Da während der Probenpräparation zwangsläufig ein Zustand mit vermindertem Elektronenfluß auftrat, ist es sehr wahrscheinlich, daß sich die MoFe-Proteine in den Proben der konzentrierten Zellsuspension unter reduzierenden Bedingungen in diesem Mischzustand befanden [Burg96]. Somit besteht prinzipiell auch die Möglichkeit, die in diesem Mischzustand vorliegenden MoFe-Proteine zu isolieren.

6.1.2.2 Der (s-r) \rightarrow (ox) - Prozeß

Bei der Interpretation der in dieser Arbeit beobachteten Mo-Bindungszustände muß auch die Möglichkeit einer Oxidation des MoFe-Proteins berücksichtigt werden. Der (s-r) \rightarrow (ox) - Übergang könnte auf die sogenannte "Selbstoxidation", wie sie für den isolierten FeMo-Cofaktor beobachtet wurde [ScGh85], zurückgeführt werden. Für den isolierten Cofaktor wird davon ausgegangen, daß er durch ein bisher nicht bekanntes Oxidationsmittel oxidiert und in Gegenwart von Dithionit wieder zurückreduziert wird. Diese Annahme stimmt mit der Beobachtung überein, daß auf Trockeneis gelagerte Proben zwar einen enzymatisch aktiven FeMo-Cofaktor, aber kein Dithionit mehr enthalten [ScGh85]. Im Gegensatz dazu sind Dithionitproben in Abwesenheit des Cofaktors stabil [Burg90].

Zum anderen könnte ein (s-r) \rightarrow (ox) -Übergang auch auf eine Oxidation mit Sauerstoff zurückgeführt werden [ZiMü78]. Die Reduktion des oxidierten MoFe-Proteins durch Dithionit wird als langsamer Prozeß beschrieben, führt aber bei chemisch induzierten (s-r) \rightarrow (ox) - Übergängen zu einer vollständigen Wiederherstellung des charakteristischen $S = 3/2$ EPR-Signals [SmLo72, SmLa74, ZiMü78]. Die Reversibilität dieses Übergangs konnte sowohl für den isolierten als auch für den proteingebundenen Cofaktor nachgewiesen werden [MoZu73, BuSt80, Step85]. Der O_2 -oxidierte Cofaktor hingegen wird durch Dithionit

nur teilweise zurückreduziert [StCr85, NeBu80]. Die irreversible Oxidation mit O_2 ist darauf zurückzuführen, daß der Cofaktor in Gegenwart eines starken Oxidationsmittels wie z.B. O_2 bis zu zwei Elektronen abgeben kann und nicht mehr in den semi-reduzierten Zustand zurückreduziert werden kann [WaWa89, WaHu93]. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Oxidation des MoFe-Proteins und somit auch des FeMo-Cofaktors ist die Beobachtung, daß Dithionit in proteinhaltigen Lösungen schneller abgebaut wird als in proteinfreien Lösungen [EaSm72]. Eine gleichzeitige Existenz dieser beiden Redoxzustände in Lösungen konnte in ^{19}F -NMR-Experimenten am isolierten FeMo-Cofaktor nachgewiesen werden [MaSm82, CoBu88].

Die in dieser Arbeit beobachtete Änderung der Mo-Bindungs Zustände im FeMo-Cofaktor, die bei der Zugabe von $MgCl_2$ anstelle von Dithionit zum Rohextrakt von *A. vinelandii* auftrat (vgl. Kap. 5.3.2), könnte ebenfalls auf die Existenz eines oxidierten MoFe-Proteins in den untersuchten Proben zurückgeführt werden. Durch die Zugabe von $MgCl_2$ wird die Bildung von O_2 -toleranten Proteinkomplexen, bestehend aus mehreren MoFe-, Fe- und Fe/S-Proteinen, bewirkt [HaVe77]. Zu dieser Komplexbildung kommt es jedoch nur, wenn sich alle drei Proteine im oxidierten Zustand befinden [ScHa83]. Legt man der Änderung dieses Signals die für die isolierten Proteine nachgewiesene Komplexbildung zugrunde, so bedeutet dies, daß in diesen Proben ein oxidiertes MoFe-Protein und somit auch ein oxidiertes FeMo-Cofaktor vorlag.

6.1.3 Zusammenfassende Interpretation

Die Involvierung des Mo-Atoms in Redoxübergänge des FeMo-Cofaktors wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. So wurde in Mo-EXAFS-Untersuchungen eine Verkürzung der Mo-X-Abstände ($X = O/N/Fe$) für den (s-r) \rightarrow (r) - Übergang des proteingebundenen Cofaktors beobachtet und könnte ein Hinweis auf eine Änderung der Oxidationszahl des Mo-Atoms sein [ChTi95]. Hingegen zeigten Mo-XANES-Messungen (X-Ray Absorption Near Edge Structure) am isolierten Cofaktor keine Änderung der elektronischen Umgebung des Mo-Atoms bei Redoxübergängen des Cofaktors [NeCa90, HeFr88]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein redox-inaktives Mo-Atom postuliert [NeCa90] sowie eine Änderung der Mo-Oxidationszahl bei Redoxübergängen des Cofaktors ausgeschlossen [HeFr88]. ^{95}Mo -ENDOR- [VeNe86] und $^{95,96}Mo$ -EPR-Untersuchungen [GeBa89] zeigten andererseits, daß das Mo-Atom in das $S = 3/2$ Spin-System des FeMo-Cofaktors (s-r) involviert ist. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß ein Redoxübergang des Cofaktors, der mit einer Spinänderung des Clusters verbunden ist (vgl. Abb. 6.1), auch zu einer Änderung der Ladungsdichteverteilung am Kernort des Mo-Atoms führt und in TDPAC-Experimenten nachgewiesen werden kann.

Die teilweise kontroverse Bewertung der Involvierung des Mo-Atoms in Redoxübergänge des Cofaktors ist zum einen darauf zurückzuführen, daß unterschiedlich gebundene Cofaktoren untersucht wurden. So besteht die Möglichkeit, daß der proteingebundene Cofaktor andere Redoxeigenschaften zeigt als der isolierte Cofaktor. Zum anderen ist auch grundsätzlich die Sensitivität der jeweiligen Methode für den Nachweis von Änderungen der Ladungsdichteverteilung zu berücksichtigen. Da bei der Beobachtung von gestörten γ - γ -Winkelkorrelationen die Größe und Symmetrie von elektrischen Feldgradienten bestimmt wird, ist diese Methode extrem sensitiv auf lokale Änderungen der Ladungsdichteverteilung in der Umgebung des Sondenatoms. Änderungen der Oxidationszahl sowie der Anordnung der Liganden führen zu einer Änderung des elektrischen Feldgradienten und können somit eindeutig nachgewiesen werden. Da die in dieser Arbeit beobachteten Bindungszustände des Mo-Atoms im FeMo-Cofaktor nur in Verbindung mit zwei Redoxzuständen erklärt werden können, ist aus den TDPAC-Ergebnissen zu folgern, daß das Mo-Atom in Redoxübergänge des proteingebundenen Cofaktors involviert ist.

Anhand der vorliegenden TDPAC-Ergebnisse konnte allerdings nicht zweifelsfrei geklärt werden, welcher Redoxzustand des Cofaktors den gemessenen Bindungszuständen zuzuordnen ist. Diese Einschränkung ist nicht auf die TDPAC-Methode zurückzuführen, sondern liegt in der Komplexität des Enzymsystems und der damit verbundenen Problematik in der Präparation von definierten Zuständen des FeMo-Cofaktors begründet. Für den (s-r) \rightarrow (ox) - Übergang konnten weder EXAFS- noch XANES-Messungen eine elektronische Änderung am Mo-Atom nachweisen. Hingegen wurde in EXAFS-Messungen eine Änderung der Mo-Umgebung für den (s-r) \rightarrow (r) -Übergang beobachtet. Die bei den EXAFS-Untersuchungen beobachtete Änderung der Atomabstände könnte die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Feldgradienten für die Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor erklären. Desweiteren zeigen auch die aus den TDPAC-Messungen bestimmten Anteile der Mo-Atome in den jeweiligen Bindungszuständen eine gute Übereinstimmung mit den Anteilen der Cofaktoren im E_0 - und E_1 -Zustand, die bei einem verminderten Elektronenfluß zum MoFe-Protein beobachtet wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die Charakterisierung der Mo-Bindung im semi-reduzierten Cofaktor durch eine Quadrupolkopplungskonstante von etwa 70 MHz und der Mo-Bindung im reduzierten Cofaktor durch eine Quadrupolkopplungskonstante von Null als sinnvoll.

6.2 Charakterisierung der Mo-Bindungszustände im Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von Molybdän am Speicherprotein von *A. vinelandii* mit einem ν_Q von etwa 180 MHz (Tabelle 6.2) beschrieben. Die aus Messungen am isolierten Speicherprotein und an intakten Zellen bestimmten Quadrupolparameter für die Mo-Bindung am Speicherprotein zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von Mottner et al. [MoBu93] veröffentlichten Quadrupolparametern aus Messungen an NH_4^+ -Zellen von *A. vinelandii* (Tabelle 6.2). Mottner et al. beobachteten eine Quadrupolkopplungskonstante $\nu_Q = 186$ MHz und einen Asymmetrieparameter $\eta = 0.25$. Simulationen von $R(t)$ -Spektren, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen jedoch, daß bei dieser Frequenz eine Unterscheidung zwischen $\eta = 0$ und $\eta = 0.25$ nicht möglich ist (vgl. Anhang D). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Asymmetrieparameter bei der Anpassung der Modellfunktion an die Meßdaten auf Null festgehalten.

Tabelle 6.2: Quadrupolparameter der Mo-Bindungszustände im Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii*.

Mo-Speicherprotein	Anteil [%]	ν_Q [MHz]	R_0 [%]	η
isoliert	60 ± 6	178 ± 4	40 ± 6	0*
NH_4^+ -Zellen	62 ± 3	181 ± 3	38 ± 3	0*
NH_4^+ -Zellen [MoBu93] **	81 ± 2	186 ± 14	19 ± 2	0.25 ± 0.07

* Dieser Wert wurde bei der Bestimmung der Quadrupolparameter durch die Modellfunktion festgehalten.

** Um einen Vergleich der Meßergebnisse zu ermöglichen, wurde aus der von Mottner et al. angegebenen Übergangsfrequenz ω_1 und dem Asymmetrieparameter η die Quadrupolkopplungskonstante ν_Q berechnet.

Wie bereits in Kap. 5.2 dargestellt, konnten nicht alle gemessenen Spektren mit der Annahme eines Mo-Bindungsplatzes hinreichend gut beschrieben werden. Häufig wurde die Beschreibung der Meßdaten durch die Berücksichtigung eines weiteren Bindungszustandes verbessert. Eine einheitliche Beschreibung aller Proben war allerdings nicht möglich. Ein ähnliches Verhalten bei der Bestimmung der Quadrupolparameter wurde auch für neutronenaktivierte Ammoniumparamolybdatproben $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ beobachtet, die im Rahmen von Voruntersuchungen mit der TDPAC-Methode gemessen wurden (Abb. 6.3). Kristallographische Untersuchungen zur Struktur des Paramolybdatens $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$ ergaben sieben unterschiedliche Mo-Bindungsplätze [EvGa75]. Prinzipiell können die sieben Bindungsplätze durch drei Mo-Bindungskonfigurationen im Verhältnis 4 : 2 : 1 beschrieben werden [EvGa75]. Allerdings wird eine optimale Anpassung der Modellfunktion bereits bei der Annahme von zwei Mo-Bindungskonfigurationen erreicht [Reis94]. Bei der

Annahme einer einzigen Bindungskonfiguration kann die Mo-Bindung in Ammoniumparamolybdat (APM) für alle Messungen einheitlich mit einem ν_Q von etwa 200 MHz beschrieben werden (Abb. 6.3). Bei der Beschreibung der Daten mit zwei unterschiedlichen Bindungskonfigurationen wurde bei den APM-Proben analog zum Mo-Speicherprotein eine starke Streuung der Quadrupolfrequenzen beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, daß mehrere unterschiedliche Bindungszustände bei einer Beobachtung von weniger als einer Schwingungsperiode nur bedingt aufgelöst werden können und in Abhängigkeit von der Zählratenstatistik stark unterschiedliche Frequenzen bzw. Amplitudenverhältnisse liefern.

Ein Vergleich der Messungen am Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii* mit den APM-Messungen läßt somit die Vermutung zu, daß Molybdän auch am Mo-Speicherprotein in unterschiedlichen Bindungskonfigurationen gebunden wird. Es scheint sehr wahrscheinlich, daß Molybdän, wie bereits von Pope und Müller vermutet [PoMü91], in Form eines Polymolybdatkerns gebunden wird und die Abgabe von Molybdän über eine Änderung des pH-Wertes gesteuert werden kann. Die schwache Bindung von Molybdän am Speicherprotein wird durch die Abgabe von Molybdat (MoO_4^{2-}) bei der Isolierung des Speicherproteins deutlich.

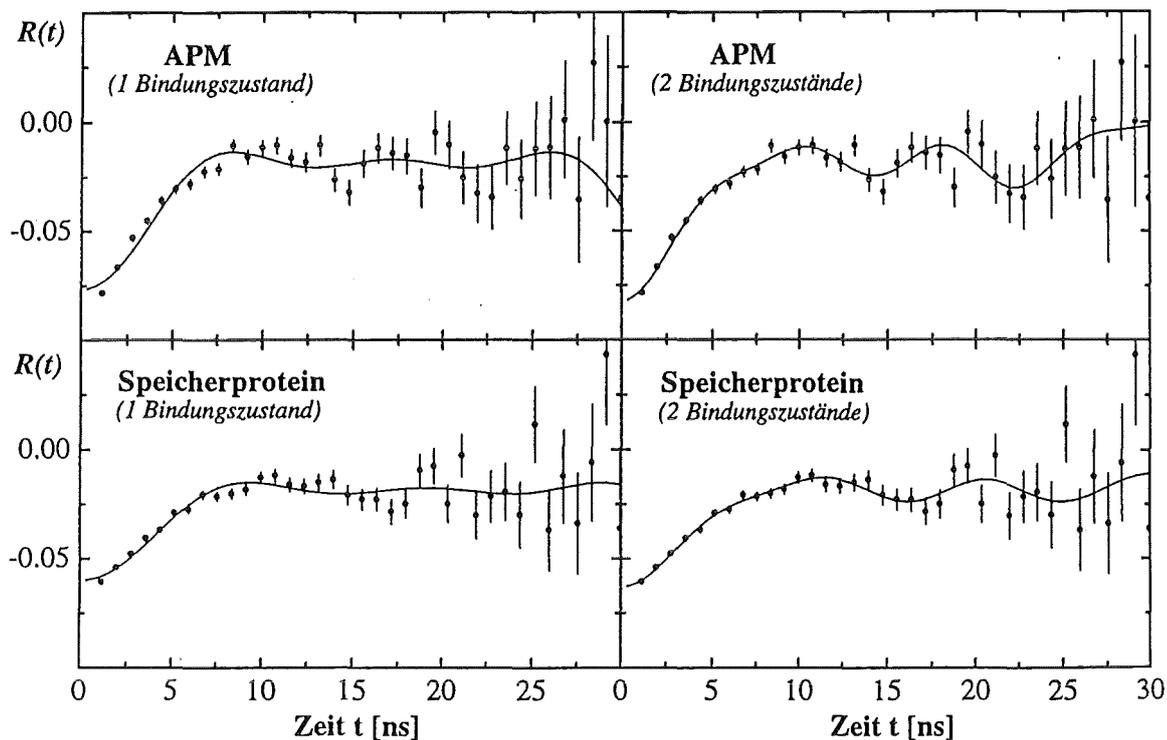


Abb. 6.3: $R(t)$ -Spektren und angepaßte Modellfunktionen einer neutronenaktivierten Ammoniumparamolybdatprobe (APM) sowie von NH_4^+ -Zellen von *A. vinelandii*, die als einziges Mo-Bindungssystem das Mo-Speicherprotein aufweisen. Die Modellfunktionen wurden unter der Annahme von einem bzw. zwei Bindungszuständen angepaßt.

6.3 Nachweis weiterer Mo-Bindungssysteme in *R. capsulatus*

Die DEAE-Säulenchromatographie des Rohextraktes von *R. capsulatus* ergab zusätzlich zum erwarteten MoFe-Proteinpeak (280 - 350 mM NaCl) einen weiteren deutlichen Mo-Peak im Bereich von 100 mM NaCl (Abb. 5.5). Dieser Peak wurde sowohl bei der Fraktionierung von NH_4^+ -Zellen als auch bei der Fraktionierung von Nitrogenase-dereprimierten Zellen ($-\text{NH}_4^+$) gefunden. Die Mo-Bindungszustände in den 100 mM NaCl-Fractionen können für Nitrogenase-reprimierte und -dereprimierte Zellen einheitlich beschrieben werden, weisen aber eine große Frequenzverteilung und somit einen uneinheitlichen Bindungszustand auf ($\delta < 40\%$). Die Messungen an intakten NH_4^+ -Zellen zeigen dagegen einen definierten Mo-Bindungszustand. Dieses Verhalten weist eine Analogie zur Bindung von Molybdän am Speicherprotein von *A. vinelandii* auf. Auch hier wurde bei Messungen an NH_4^+ -Zellen ein definierter Mo-Bindungszustand nachgewiesen. Eine Isolierung des Proteins an DEAE-Sephacel führte jedoch zu einer Mo-Abgabe in Form von niedermolekularem Molybdat (MoO_4^{2-}). Ein Mo-Speicherprotein ist für *R. capsulatus* bisher nicht entdeckt worden. Doch konnten in Genanalysen zwei Mo-bindende Proteine (MopA und MopB) sowie ein Molybdäntransportsystem, das aus vier Proteinen (ModA, B, C, D) besteht, nachgewiesen werden [WaAn93]. Die Mop-Proteine zeigen in bezug auf ihre Aminosäuresequenzen eine große Ähnlichkeit zu den niedermolekularen Molybdän-Pterin-Bindungsproteinen in *Clostridium pasteurianum* und sind weder in den Molybdäntransport noch in die Synthese des FeMo-Cofaktors involviert [WaAn93]. Die ModABCD-Proteine hingegen gehören zu einem spezifischen Mo-Transportsystem [WaAn93].

Ein Vergleich der Mo-Bindungsproteine von *C. pasteurianum* und *R. capsulatus* zeigt, daß in beiden Bakterienstämmen zwei dominante Mo-Bindungssysteme voneinander getrennt werden können. In *C. pasteurianum* sind dies das MoFe-Protein der Nitrogenase und das sogenannte Mo-Bindungs-Speicherprotein (MoB-SP) [ElMo77]. Dieses MoB-SP wurde in drei niedermolekularen Varianten eluiert [HiMo85b], die später die Bezeichnungen MopI, II, III erhielten. Die Varianten unterscheiden sich in bezug auf Ladung und Menge des gebundenen Molybdäns [HiMo85a]. Das DEAE-Elutionsverhalten der Mop-Proteine von *C. pasteurianum* zeigt analog zu den in dieser Arbeit bei *R. capsulatus* gefundenen Mo-Spezies eine Molybdänverteilung in einem Konzentrationsbereich von 30 - 115 mM NaCl [HiMo85a] bzw. 80 - 130 mM NaCl [HiMe86]. Kutsche et al. beobachteten jedoch eine Bildung der Mop-Proteine bei *R. capsulatus* nur unter Stickstoff-fixierenden Bedingungen [KuLe96]. Allerdings konnte von Hinton und Mortenson an NH_4^+ -Zellen von *C. pasteurianum* gezeigt werden, daß ab einer bestimmten Zelldichte verstärkt Molybdän aufgenommen und in alle Mo-bindenden Proteine eingebaut wird [HiMo85b]. Desweiteren wurde von ihnen beobachtet, daß bei einer Abnahme der NH_4^+ -Konzentration im Nährmedium die Mop-Proteine vor den Mo-Enzymen gebildet werden. Da jedoch bei den in dieser Arbeit untersuchten Nitrogenase-reprimierten Zellen von *R. capsulatus* bei 280 mM NaCl (MoFe-Protein) eine geringe Mo-Konzentration nachgewiesen werden konnte, muß davon ausge-

gangen werden, daß zum Zeitpunkt der Zellernte die NH_4^+ -Konzentration im Nährmedium bereits so weit abgenommen hatte, daß das Enzymsystem der Nitrogenase und somit auch die Mop-Proteine gebildet wurden. Die Mo-Spezies im Elutionsbereich von 100 mM NaCl wurden daher analog zu *C. pasteurianum* den Mop-Proteinen zugeordnet.

Zusätzlich zum Mo-Peak bei 100 mM NaCl zeigt das Elutionsprofil der Nitrogenase-dereprimierten Zellen ($-\text{NH}_4^+$) eine "Mo-Schulter" bei 50 mM NaCl und einen Mo-Peak bei 0 mM NaCl (Abb. 5.5). Die im Vorlauf der Säulenchromatographie gefundenen Mo-Spezies können dem Transportsystem ModABCD von *R. capsulatus* zugeordnet werden. Da die Proteine ModABCD zu einem spezifischen Transportsystem gehören und direkt an der Bildung des FeMo-Cofaktors beteiligt sind, treten sie erst bei einer vollständigen Expression der Nitrogenase auf und können deshalb nur unter Stickstoff-fixierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Die *modB*- und *modC*-Gene zeigen einen hohen Grad an Homologie zu den *chlJ*- und *chlD*-Genen in *Escherichia coli* [WaAn93]. Für die durch diese Gene codierten Proteine wird eine Membranbindung angenommen [JoHi87]. Sie werden nicht an DEAE-Sephacel gebunden und können somit den Mo-Peak im DEAE-Elutionsprofil der Nitrogenase-dereprimierten Zellen erklären. *ModA* hingegen zeigt keine Homologie zu bekannten Sequenzen und könnte ein periplasmatisches Bindungsprotein sein [WaAn93]. Auch bei *modD* liegt keine Homologie zu bekannten Genen vor. Somit könnte die "Mo-Schulter" im Elutionsprofil der Nitrogenase-dereprimierten Zellen von *R. capsulatus* bei 50 mM NaCl auf diese Proteine zurückgeführt werden. Aufgrund der geringen Menge an gebundenem Molybdän war eine Untersuchung dieser Proteine mit der TDPAC-Methode jedoch nicht möglich.

6.4 Zuordnung von Bindungszuständen durch die Berechnung elektrischer Feldgradienten

Die in TDPAC-Experimenten bestimmten Quadrupolparameter erlauben eine Charakterisierung unterschiedlicher Bindungszustände des Sondenatoms. Liegen in einer Probe jedoch mehrere Zustände mit unbekanntem Quadrupolparameter vor, so ist es für eine eindeutige Zuordnung der gemessenen Parameter notwendig, diese Zustände zu trennen und einzeln zu charakterisieren. Ist eine biochemische Trennung nicht möglich, so bietet sich neben der experimentellen Bestimmung von Größe und Symmetrie der Feldgradienten die Berechnung dieser Größen an. Ein Vergleich der theoretisch bestimmten Feldgradienten mit den experimentell gemessenen Größen bietet prinzipiell die Möglichkeit, die gemessenen Bindungszustände den berechneten Feldgradienten zuzuordnen und Strukturmodelle zu überprüfen. Eine verlässliche Methode zur Berechnung von Feldgradienten in Biomolekülen existiert gegenwärtig noch nicht, allerdings wurden kürzlich Fortschritte bei der Berechnung von Feldgradienten in Festkörpern erzielt. So konnten z.B. über einen Vergleich von TDPAC-Messungen mit berechneten elektrischen Feldgradienten die Kernquadrupolmomente von ^{57}Fe , ^{77}Se und ^{100}Ru bestimmt werden [BIDu96]. Zur Berechnung der Feldgradienten wurde der sog. Dichtefunktionalformalismus verwendet. Da mithilfe dieses Formalismus prinzipiell auch die Berechnung von Feldgradienten in Biomolekülen möglich ist, soll der Dichtefunktionalformalismus kurz skizziert werden.

Die allgemeine Aufgabe bei der Behandlung von Systemen mit vielen Elektronen besteht darin, die Gesamtenergie sowie die Elektronendichte in einem gegebenen äußeren Potential - hier dem Coulombpotential der Kerne - zu bestimmen. Mit traditionellen *ab initio*-Methoden, wie der Hartree-Fock- oder der Thomas-Fermi-Methode, lassen sich nur Systeme mit wenigen Atomen berechnen. Ein effizientes und genaues Schema zur Berechnung der Grundzustandsenergie von Vielteilchensystemen ergibt sich aus dem Dichtefunktionalformalismus von Hohenberg, Kohn und Sham [HoKo64, KoSh65], der 1979 von Levy verallgemeinert wurde [Levy79].

Die Gesamtenergie des Systems $E_t[\rho]$ setzt sich aus den Beiträgen der kinetischen Energie $T[\rho]$, der potentiellen Energie $U[\rho]$ und der nicht-klassischen Austauschenergie $E_{xc}[\rho]$ zusammen:

$$E_t[\rho] = T[\rho] + U[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (6.1)$$

Für ein gegebenes äußeres Potential wird die Gesamtenergie bei der exakten Grundzustandsdichte minimal. Durch ein selbstkonsistentes Verfahren läßt sich die Grundzustandsenergie eines Systems aus Ionen und Elektronen berechnen, ohne daß die Vielteilchenwellenfunktion bestimmt werden muß. Alle Grundzustandseigenschaften des Systems,

wie z.B. elektrostatische Potentiale, werden somit allein durch die Elektronendichte $\rho(\vec{r})$ vollständig bestimmt, d.h. sie sind Funktionale der Dichtefunktion $\rho(\vec{r})$.

Zur Beschreibung der Austauschenergie $E_{xc}[\rho]$ sind Näherungen notwendig, die physikalisch plausibel und numerisch handlich, jedoch nicht aus fundamentalen Prinzipien hergeleitet sind, wobei deren Güte durch einen Vergleich mit theoretischen und experimentellen Informationen getestet werden muß [Jone84]. Eine einfache und zugleich genaue Näherung ist die lokale Dichtenäherung (LDA, Local Density Approximation), die auf den bekannten Austauschkorrelationsenergien eines homogenen Elektronengases basiert [HeLu71, PeWa92]. Da die Austauschkorrelation am Ort \vec{r} nicht nur von der Dichte an diesem Ort, sondern auch von den Dichten an benachbarten Orten \vec{r}_i abhängt, müssen in einem weiteren Schritt nichtlokale Effekte berücksichtigt werden. Dies kann durch eine Bestimmung der Elektronendichtegradien erreicht werden [LaAn91]. Der wesentliche Unterschied bei der Berechnung von elektrischen Feldgradienten in Festkörpern und Molekülen liegt in der Wahl der Basissätze, d.h. in den Funktionen, die zur Darstellung von Orbitalen dienen. So kann zur Bestimmung der Basissätze bei Berechnungen von elektrischen Feldgradienten in Festkörpern die Periodizität und die Bandstruktur des Festkörpers genutzt werden [WiKr81, Sing94]. Bei der Berechnung von Feldgradienten in Molekülen haben sich Gaußfunktionen, durch Gaußfunktionen approximierte Slaterfunktionen und numerische Basissätze als Basisfunktionen für quantenmechanische Rechnungen bewährt [PrMü90]. Die Güte der Rechnung wird im wesentlichen durch die Wahl der Basissätze und die Austauschkorrelationsenergie bestimmt.

Der Vorteil der hier kurz skizzierten Methode zeigt sich insbesondere bei der Behandlung von Systemen mit den für biologische Vorgänge relevanten Übergangsmetallen. Die Berechnung von molekularen Geometrien, die üblicherweise mit Hartree-Fock-Methoden gut durchgeführt werden können, ist bei Systemen mit Übergangsmetallen nur bedingt möglich. Diese Systeme können hingegen sehr gut mit der Dichtefunktionalmethode behandelt werden [SoAn92]. Da sich der Dichtefunktionalformalismus bei der Berechnung in Festkörpern [BiDu96] und auch bei der Strukturbestimmung von kleinen Systemen mit Übergangsmetallen bewährt hat [SoAn92], ist anzunehmen, daß der Einsatz dieser Methode künftig auch auf die Berechnung von Feldgradienten in Biomolekülen erweitert werden kann. Erste Ansätze zur theoretischen Strukturbestimmung und zur Beschreibung der Substratreduktion am FeMo-Cofaktor sind bereits durchgeführt worden und haben gezeigt, daß der Dichtefunktionalformalismus prinzipiell auf Biomoleküle anwendbar ist [Danc94].

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Untersuchung von Metallproteinen ist ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet, auf dem Physiker, Chemiker und Biologen tätig sind. Das in dieser Arbeit untersuchte Metallprotein, das MoFe-Protein, ist Bestandteil des Enzymsystems der Nitrogenase. Die Nitrogenase gehört zu den Molybdänenzymen und katalysiert die biologische Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak. Die Bindung von N_2 erfolgt am Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMo-Cofaktor) der Nitrogenase, einem komplexen Metallcluster mit einem Mo-Bindungsplatz. Da es bisher nicht gelungen ist, Röntgenstrukturuntersuchungen am isolierten FeMo-Cofaktor durchzuführen, ist man bei der Untersuchung des katalytisch aktiven Zentrums der Nitrogenase auf einen Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher spektroskopischer Methoden angewiesen. Erst die globale Betrachtung der Ergebnisse eröffnet die Möglichkeit zur Entwicklung von Strukturmodellen und zum Verständnis der katalytischen Prozesse.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Mo-Bindungszustände im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase verschiedener Stickstoff-fixierender Bakterien. Die Untersuchungen fanden mithilfe der Methode der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten γ - γ -Winkelkorrelationen (TDPAC-Technik) statt, wobei als Sondenisotop Molybdän-99 verwendet wurde. ^{99}Mo wurde von den Bakterien analog zum natürlichen Molybdän aufgenommen und in den FeMo-Cofaktor sowie in andere Mo-bindende Proteine eingebaut. Durch die Beobachtung der Hyperfeinwechselwirkung zwischen dem Kernquadrupolmoment des Sondenkerns und dem elektrischen Feldgradienten am Kernort des Sondenatoms war es möglich, unterschiedliche Mo-Bindungssysteme in den Bakterien nachzuweisen und anhand der gemessenen Feldgradienten zu charakterisieren. Aufgrund der Empfindlichkeit der Methode konnten weiterhin Änderungen der Ladungsdichteverteilung, wie sie bei Redoxprozessen vorkommen, beobachtet werden.

Die TDPAC-Messungen wurden an Stämmen der Stickstoff-fixierenden Bakterien *R. capsulatus*, *A. vinelandii* und *K. oxitoca* (früher: *K. pneumoniae*) durchgeführt. Unabhängig vom Bakterienstamm konnten sowohl in Zellen mit einem vollständig ausgebildeten Enzymsystem als auch in gereinigten MoFe-Proteinen zwei definierte Mo-Bindungszustände ($\nu_Q \approx 70$ MHz und $\nu_Q \approx 0$ MHz) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer früheren TDPAC-Untersuchung, bei der ein deutlich größerer Feldgradient beobachtet wurde [MoBu93], konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität gezeigt werden, daß die gemessenen Bindungszustände der Mo-Bindung im intakten FeMo-Cofaktor zuzuordnen sind.

Durch einen Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Resultaten anderer Methoden wurden die beobachteten Mo-Bindungszustände auf zwei unterschiedliche Redoxzustände des FeMo-Cofaktors zurückgeführt. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, wel-

che Redoxzustände den Bindungszuständen zuzuordnen sind. Diese Einschränkung ist nicht durch die TDPAC-Methode bedingt, sondern auf die Problematik der Präparation von definierten Zuständen des FeMo-Cofaktors zurückzuführen.

Neben den Mo-Bindungszuständen im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase wurden in den Bakterien weitere Mo-Bindungssysteme nachgewiesen. So konnten das Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii* mittels G-25 Sephadex gereinigt und die Mo-Bindungszustände anhand der gemessenen Quadrupolparameter charakterisiert werden. Ein Vergleich der TDPAC-Untersuchungen am Mo-Speicherprotein mit Messungen an neutronenaktivierten Ammoniumparamolybdatproben verstärkte die Annahme, daß Molybdän in Form eines Polymolybdatkerns an das Protein gebunden wird [PoMü91]. Auf diese Weise gebundenes Molybdän könnte leicht über eine Änderung des pH-Wertes abgegeben werden [PoMü91] und somit die beobachtete MoO_4^{2-} -Abgabe bei der Isolierung an DEAE-Sephacel erklären.

Auch in Zellen von *R. capsulatus* wurden neben der Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor weitere Mo-Bindungssysteme nachgewiesen. Aus Genanalysen ist bekannt, daß *R. capsulatus* zwei Mo-bindende Proteine (Mop-Proteine) und ein aus vier Proteinen bestehendes Mo-Transportsystem (ModABCD) besitzt. Die Mop-Proteine weisen hinsichtlich der Aminosäuresequenzen eine große Homologie zu den Mop-Proteinen von *C. pasteurianum* auf [WaAn93]. Da die Elution der Mop-Proteine von *C. pasteurianum* in einem Konzentrationsbereich von 30 - 130 mM NaCl erfolgte [HiMo85a, HiMe86], wurden auch die in dieser Arbeit bei 100 mM NaCl eluierten Mo-bindenden Proteine von *R. capsulatus* den Mop-Proteinen zugeordnet. TDPAC-Messungen dieser Proteinfractionen ergaben jedoch keinen einheitlichen Mo-Bindungszustand. Die Proteine ModA, B, C, D gehören zu einem spezifischen Transportsystem [WaAn93]. Sie wurden im Gegensatz zu den Mop-Proteinen nur in Nitrogenase-dereprimierten Zellen nachgewiesen. Aufgrund eines zu geringen Anteils an gebundenem Molybdän konnten sie jedoch nicht mit der TDPAC-Methode gemessen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die TDPAC-Technik zur Charakterisierung von Mo-Bindungszuständen in Bakterien geeignet ist. Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine Grundlage für weitere Untersuchungen am FeMo-Cofaktor der Nitrogenase. Ziel weiterführender Arbeiten sollte eine biochemische Trennung der beobachteten Mo-Bindungszustände des Cofaktors sein. Die isolierten Zustände könnten dann in wohldefinierte Redoxzustände überführt und anhand der gemessenen Quadrupolparameter eindeutig charakterisiert werden. Da die TDPAC-Technik die Untersuchung biologischer Proben unter physiologischen Bedingungen erlaubt, könnten dann die zuvor charakterisierten Redoxzustände dazu dienen, das Redoxverhalten des Cofaktors während der Substratreduktion zu studieren. Parallel zu den experimentellen Arbeiten sollte jedoch auch die theoretische Bestimmung von elektrischen Feldgradienten in Biomolekülen weiter verfolgt werden. Ein Vergleich der berechneten Feldgradienten mit den in dieser Arbeit experimentell

7. Zusammenfassung und Ausblick

bestimmten Größen könnte dann einer Überprüfung des gegenwärtig existierenden Modells des FeMo-Cofaktors der Nitrogenase dienen.

Anhang A: Einfluß der Frequenzverteilung δ beim Nachweis von Bindungszuständen

Die in dieser Arbeit bestimmten physikalischen Größen, die Quadrupolparameter, sind der Beobachtung nicht direkt zugänglich, sondern werden indirekt über die Anpassung einer Modellfunktion an das gemessene $R(t)$ -Verhältnis bestimmt. Zur Bestimmung der Quadrupolparameter wurde die Methode der kleinsten Fehlerquadrate von Gauß (LSFIT) verwendet, die auf der Bedingung basiert, daß die Summe der quadratischen Abweichungen der Meßpunkte von der theoretischen Anpassungsfunktion minimal sein soll. Die so ermittelten Parameter sind Erwartungswerte der wahren Werte. Die berechneten Fehler der Quadrupolparameter beinhalten nur statistische Fehler. Die Güte der Anpassung berechnet sich aus der Summe der quadratischen Abweichungen des gemessenen Zählratenverhältnisses $R^{exp}(t_i)$ von der theoretischen Anpassungsfunktion $R^{th}(t_i)$, normiert auf die Zahl der unabhängigen Parameter (Anzahl der Meßpunkte (N) und Anzahl der freien Parameter (N_p)):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{\{R^{th}(t_i) - R^{exp}(t_i)\}^2}{\{N - N_p\} R^{exp}(t_i)}$$

Da bei Feldgradienten im Bereich von $\nu_Q \approx 70$ MHz nur ein Anstieg der Meßpunkte im Zeitspektrum beobachtet wird, stellte sich die Frage, ob eine Unterscheidung zwischen einem Bindungszustand mit einem einheitlichen elektrischen Feldgradienten ($\delta = 0$ %) und einem Zustand mit einem uneinheitlichen Feldgradienten möglich ist. Im Fall eines uneinheitlichen Feldgradienten ist das Signal des wohldefinierten Bindungszustandes (Cosinus-Funktion) zusätzlich mit einer Exponentialfunktion gefaltet. Simulationen haben gezeigt, daß mithilfe des χ_{min}^2 -Wertes zwischen diesen beiden Bindungszuständen unterschieden werden kann. Die Ergebnisse dieser Simulationen sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

In Abb. A1 ist die Verteilung der Anpassungsgüte χ^2 als Funktion der Quadrupolkopplungskonstante dargestellt. Die durchgezogene Linie verbindet die χ^2 -Werte und soll den Verlauf der Datenpunkte verdeutlichen. Abb. A1 (oben) zeigt die Verteilung der χ^2 -Werte für zwei simulierte Spektren, die hinsichtlich der Quadrupolparameter und der Zählratenstatistik den untersuchten Meßproben entsprechen. Ein Spektrum wurde ohne Frequenzverteilung simuliert ($\delta = 0$ %), das zweite Spektrum weist ein δ von 20 % auf (Tabelle A1). Die Simulationsparameter wurden so gewählt, daß die Anpassung der Modellfunktion bei der Annahme von definierten Bindungszuständen ($\delta = 0$ %) für beide Simulationen vergleichbare Quadrupolparameter liefert (Tabelle A2). Die über den LSFIT bestimmten Parameter entsprechen den Werten, die für die Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor bestimmt

wurden. Für die Anpassung einer Modellfunktion ohne Frequenzverteilung weist die Verteilung der Anpassungsgüte χ^2 für beide Simulationen ein Minimum auf. Wird hingegen beim LSFIT der Parameter δ freigegeben, also eine mögliche Frequenzverteilung berücksichtigt, so findet man bei der Auswertung beider Spektren kein eindeutiges Minimum in der Verteilung der χ^2 -Werte. Allerdings wird beim LSFIT des mit einem δ von 20 % simulierten Spektrums eine signifikante Abnahme des χ_{\min}^2 -Wertes ($\chi_{\min}^2 = 0.7$) im Vergleich zur Anpassung mit $\delta = 0$ % ($\chi_{\min}^2 = 1.0$) beobachtet. Für das simulierte Spektrum mit $\delta = 0$ % konnte durch die Freigabe des Parameters δ beim LSFIT keine Verbesserung der Anpassung erreicht werden.

Tabelle A1: Simulationsparameter der $R(t)$ -Spektren.

Parameter	Simulation mit $\delta = 0$ %	Simulation mit $\delta = 20$ %
R_0 :	45 %	15 %
Anteil:	55 %	85 %
ν_Q :	70 MHz	55 MHz

Tabelle A2: Die über den LSFIT bestimmten Quadrupolparameter der simulierten $R(t)$ -Spektren.

Parameter	LSFIT für die Simulation mit $\delta = 0$ %		LSFIT für die Simulation mit $\delta = 20$ %	
	R_0 :	44 ± 4 %	21 ± 18 %	37 ± 5 %
Anteil:	56 ± 4 %	79 ± 20 %	63 ± 5 %	100 %
ν_Q :	72 ± 5 MHz	53 ± 14 MHz	69 ± 5 MHz	44 ± 2 MHz
δ :	0 fest	26 ± 10 %	0 fest	37 ± 8 %
χ^2	0.7	0.7	1.0	0.7

Werden die aus den Simulationen gewonnenen Erkenntnisse auf die untersuchten Meßproben angewendet, so kann anhand des χ_{\min}^2 -Wertes entschieden werden, ob ein spezifisch gebundener Sondenkern vorliegt oder das Meßsignal auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen ist. In Abb. A1 (Mitte und unten) ist ein Vergleich der minimalen χ^2 -Werte bei einer Variation der Quadrupolkopplungskonstanten exemplarisch am Beispiel verschiedener Proben von *R. capsulatus* dargestellt. Die Bindung von Molybdän im MoFe-

Protein der Nitrogenase wird durch die Annahme von zwei spezifischen Bindungszuständen ($\nu_Q \approx 70$ MHz und $\nu_Q \approx 0$ MHz) hinreichend gut beschrieben, wobei der relative Anteil der Atome im Bindungszustand $\nu_Q \approx 0$ MHz durch den Parameter R_0 beschrieben wird. Dieses gilt für den gesamten Temperaturbereich von -20°C bis $+40^\circ\text{C}$. Anders verhält es sich bei Messungen an intakten Nitrogenase-dereprimierten Zellen. Hier führt die Berücksichtigung einer Frequenzverteilung zu einer signifikanten Verbesserung des χ_{\min}^2 -Wertes und ist somit als Hinweis auf eine unspezifische Bindung des Sondenkerns bzw. eine Überlagerung der TDPAC-Signale mehrerer Bindungszustände zu werten. Die NH_4^+ -Zellen hingegen können wiederum allein durch die Annahme wohldefinierter Bindungszustände beschrieben werden.

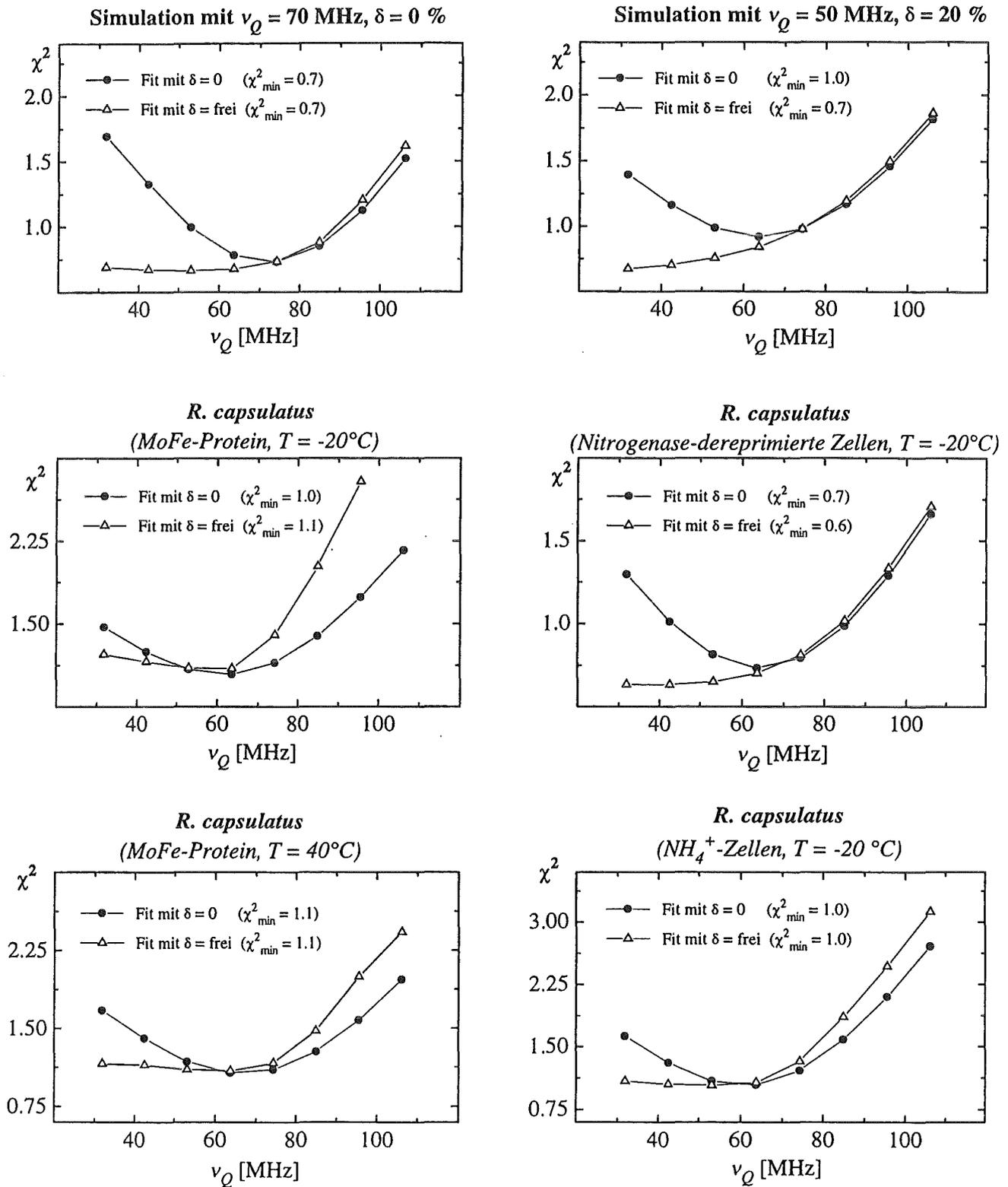


Abb. A1: Anpassungsgüte χ^2 als Funktion der Quadrupolkopplungskonstante ν_Q für simulierte $R(t)$ -Verhältnisse mit und ohne Frequenzverteilung (oben) sowie die Verteilung der Anpassungsgüte für ausgewählte $R(t)$ -Spektren von *R. capsulatus* (Mitte, unten).

Anhang B: Test der Parametersignifikanz

Wird eine 5 %-Abweichung von der idealen Anpassungsgüte als signifikant bewertet, so kann aus der Darstellung der Anpassungsgüte als Funktion der Quadrupolparameter die relative Breite der Verteilung bestimmt werden. In den nachfolgenden Abbildungen ist die χ^2 -Abhängigkeit für simulierte $R(t)$ -Verhältnisse mit und ohne Frequenzverteilung exemplarisch dargestellt. Die eingezeichneten Kurven der χ^2 -Abhängigkeit verbinden die Datenpunkte und sollen der Augenführung dienen. Dargestellt sind weiterhin das $105\% \cdot \chi_{\min}^2$ -Niveau, das zur Fehlerabschätzung der jeweiligen Quadrupolparameter dient, und die anhand dieser Fehlerabschätzung bestimmte obere und untere Grenze der korrelierten Parameter. Zu jeder Verteilung der Anpassungsgüte χ^2 wird die Variation der übrigen Quadrupolparameter im gesamten Variationsbereich dargestellt. Die simulierten Spektren sind bezüglich der Zählratenstatistik und der Simulationsparameter ($R_0 = 45\%$, Anteil = 55% , $\nu_Q = 70$ MHz) repräsentativ für die Mo-Bindung im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase. Die Simulationsparameter, die Breite der Verteilung, die über den LSFIT bestimmten Werte der simulierten Quadrupolparameter und die Änderung der jeweils korrelierten Parameter sind in der Tabelle B1 für die Simulation ohne Frequenzverteilung und in der Tabelle B2 für die Simulation mit einer Frequenzverteilung von 20% angegeben.

Tabelle B1: Parametervariation als Funktion eines Quadrupolparameters für ein simuliertes Spektrum mit $\nu_Q = 70$ MHz und $\delta = 0$.

Parameter	Simulationswert	Breite der Verteilung	LSFIT	Änderung der korrelierten Parameter
Anteil:	55 %	51...62 %	56 ± 4 %	66...77 MHz
ν_Q :	70 MHz	65...79 MHz	72 ± 5 MHz	52...62 %

Das ohne eine Frequenzverteilung simulierte $R(t)$ -Verhältnis zeigt eine absolute Breite der χ^2 -Abhängigkeit von 11% für den Anteil sowie von 14 MHz für die Quadrupolkopplungskonstante (Abb. B1). Der Variationsbereich der jeweils korrelierten Parameter beträgt innerhalb des $105\% \cdot \chi_{\min}^2$ -Niveaus für die Quadrupolkopplungskonstante $66...77$ MHz bzw. $52...62\%$ für den Anteil. Die so ermittelte Breite der Verteilung entspricht dem Fehler, der über die Anpassung der Modellfunktion (LSFIT) bestimmt wurde. Im Bereich des $105\% \cdot \chi_{\min}^2$ -Niveaus lassen sich auch die jeweils korrelierten Parameter mit einer Genauigkeit bestimmen, die der Breite der Verteilung entspricht.

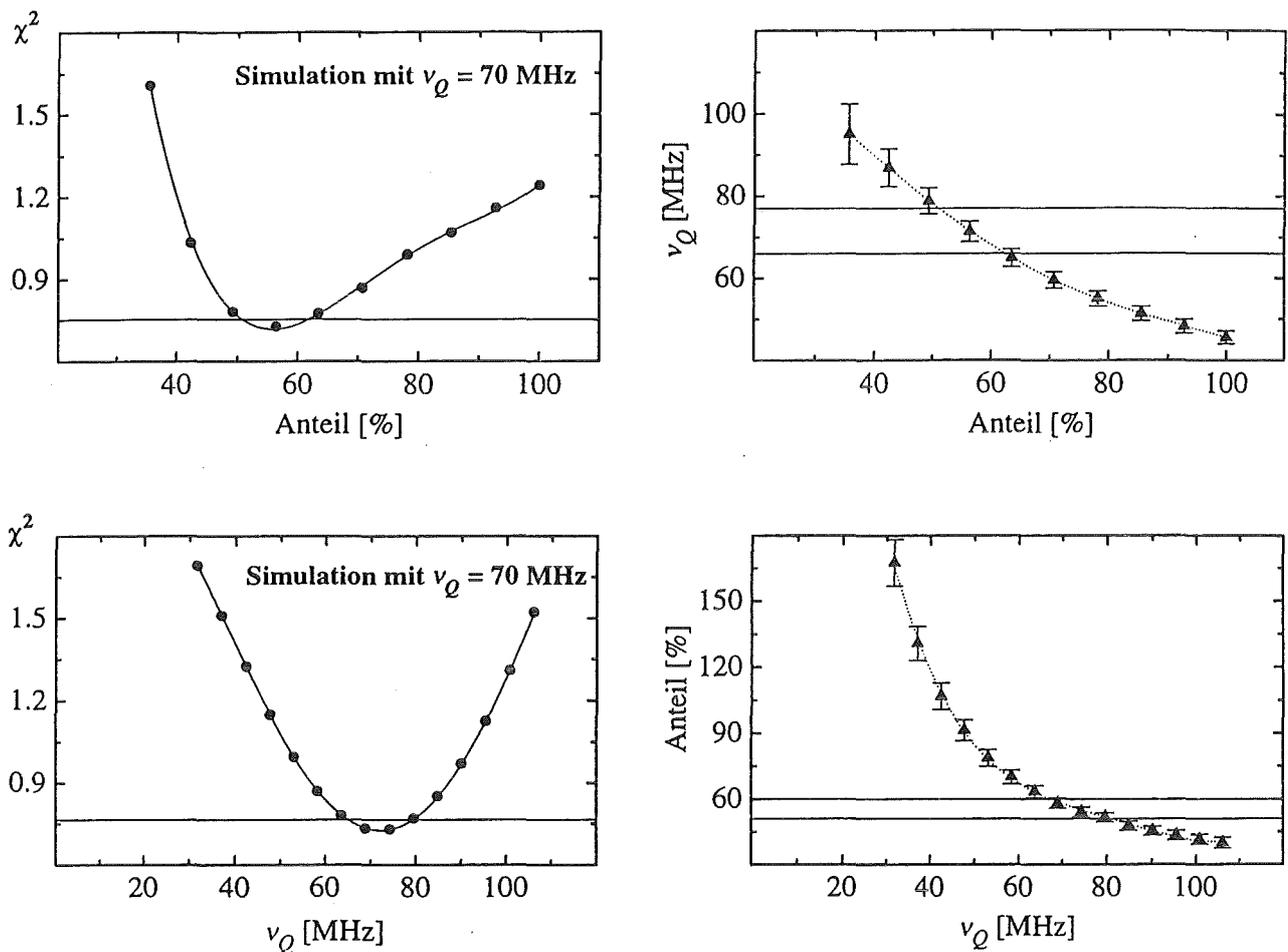


Abb. B1: Anpassungsgüte χ^2 als Funktion des Anteils und der Quadrupolkopplungskonstante v_Q für ein simuliertes $R(t)$ -Spektrum mit $v_Q = 70$ MHz und $\delta = 0$ % sowie die Änderung des jeweils korrelierten Parameters. Die Kurve soll den Verlauf der χ^2 -Werte verdeutlichen. Die durchgezogene Linie ist das 105 %-Niveau der Verteilung der Anpassungsgüte χ^2 und bestimmt die obere und untere Grenze des korrelierten Parameters.

Anders verhält es sich bei Spektren, die unter der Annahme einer Frequenzverteilung ($\delta = 20$ %) simuliert wurden. Wie in den Abb. B2 und B3 dargestellt, kann für das $105\% \cdot \chi_{\min}^2$ -Niveau nur ein unterer bzw. oberer Grenzwert für den Anteil bzw. die Quadrupolkopplungskonstante angegeben werden. Dies ist auf die starke Korrelation zwischen den Parametern zurückzuführen. Aufgrund dieser Korrelation konnten auch im LSFIT die simulierten Quadrupolparameter nicht reproduziert werden. Somit können nur die Bereiche angegeben werden, in denen die wahren Werte der Parameter liegen. Stellt man die Simulationswerte den im LSFIT bestimmten Werten gegenüber (Tabelle B2), so liegen sie für

den Anteil an der unteren und für die Quadrupolkopplungskonstante an der oberen Grenze des $105\% \cdot \chi_{\min}^2$ -Intervalls. Für die Frequenzverteilung hingegen bestimmt das $105\% \cdot \chi_{\min}^2$ -Niveau sowohl einen oberen als auch einen unteren Grenzwert (Abb. B4). Allerdings zeigt ein Vergleich mit dem Simulationswert, daß die Frequenzverteilung grundsätzlich überschätzt wird. Auch der im LSFIT ermittelte Wert für δ ist zu groß und kann nur als Schätzung für eine obere Grenze angesehen werden.

Tabelle B2: Parametervariation als Funktion der Quadrupolparameter für ein simuliertes Spektrum mit $\nu_Q = 70$ MHz und $\delta = 20\%$.

Parameter	Simulationswert	Breite der Verteilung	LSFIT	Änderung der korrelierten Parameter		
				Anteil	ν_Q	δ
Anteil	55 %	60...100 %	52...100 %	-	67...29 MHz	35... 93 %
ν_Q	70 MHz	0 ...72 MHz	16...69 MHz	58...100 %	-	28...100 %
δ	20 %	27... 90 %	53... 80 %	60... 79 %	41...67 MHz	-

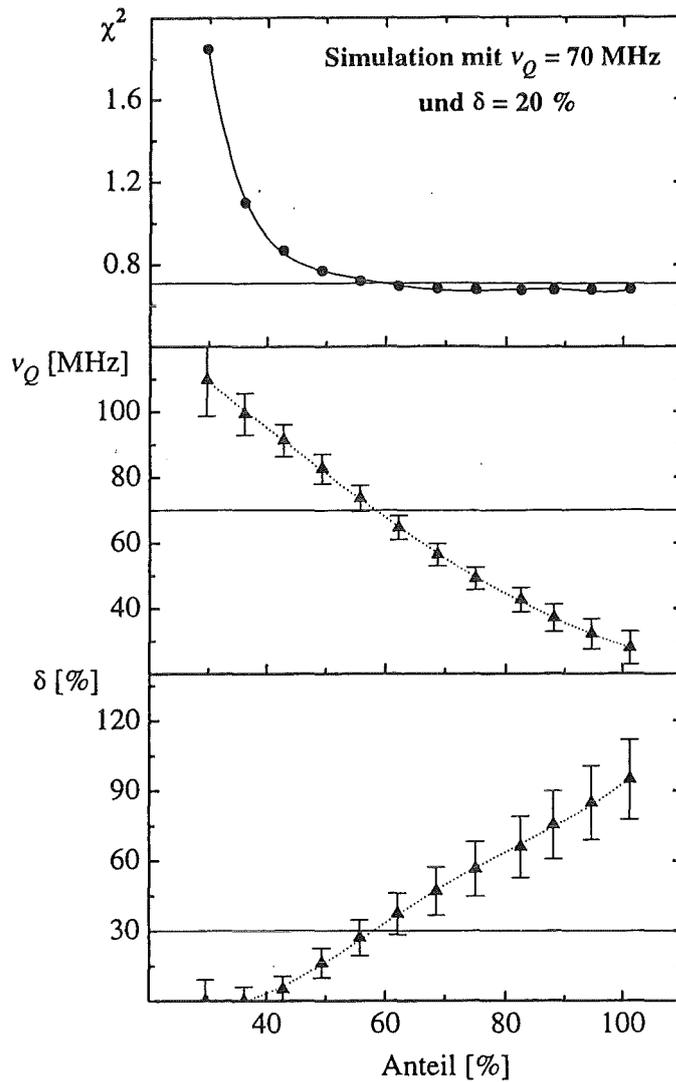


Abb. B2: Anpassungsgüte χ^2 als Funktion des Anteils für ein simuliertes $R(t)$ -Spektrum mit $\nu_Q = 70$ MHz und $\delta = 20$ %. Für die Verteilung der Anpassungsgüte ist die Änderung der korrelierten Parameter dargestellt. Die Kurve soll den Verlauf der χ^2 -Werte verdeutlichen. Die durchgezogene Linie ist das 105 %-Niveau der minimalen Anpassungsgüte. Der optimale Bereich der Anpassung beginnt für ν_Q an der oberen und für δ an der unteren Grenze.

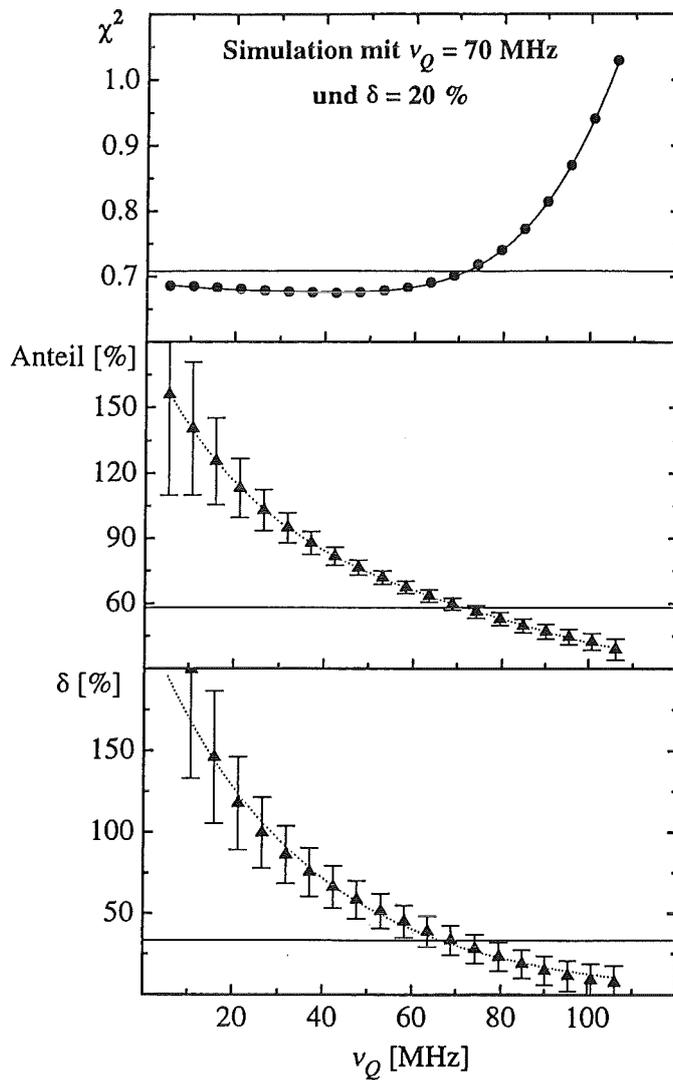


Abb. B3: Anpassungsgüte χ^2 als Funktion der Quadrupolkopplungskonstante ν_Q für ein simuliertes $R(t)$ -Spektrum mit $\nu_Q = 70$ MHz und $\delta = 20$ %. Für die Verteilung der Anpassungsgüte ist die Änderung der korrelierten Parameter dargestellt. Die Kurve soll den Verlauf der χ^2 -Werte verdeutlichen. Die durchgezogene Linie ist das 105 %-Niveau der minimalen Anpassungsgüte. Der optimale Bereich der Anpassung beginnt sowohl für den Anteil als auch für δ an der unteren Grenze.

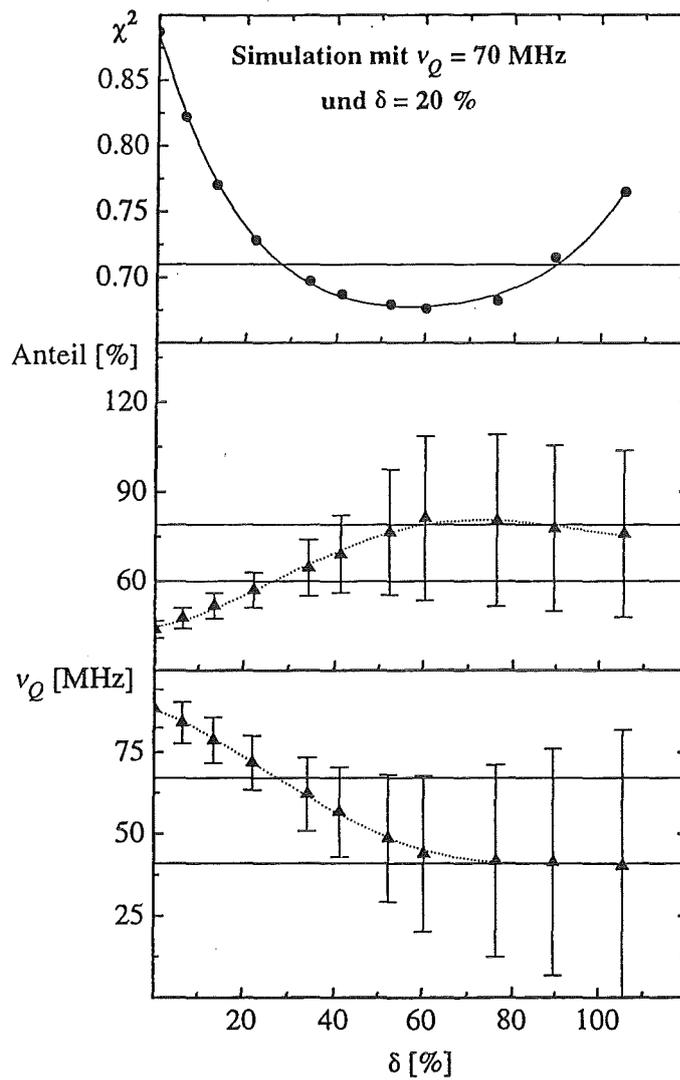


Abb. B4: Anpassungsgüte χ^2 als Funktion der Frequenzverteilung δ für ein simuliertes $R(t)$ -Spektrum mit $\nu_Q = 70$ MHz und $\delta = 20$ %. Für die Verteilung der Anpassungsgüte ist die Änderung der korrelierten Parameter dargestellt. Die Kurve soll den Verlauf der χ^2 -Werte verdeutlichen. Die durchgezogene Linie ist das 105%-Niveau der minimalen Anpassungsgüte und bestimmt die untere und obere Grenze der korrelierten Parameter.

Anhang C: Genauigkeit in der Bestimmung von kleinen Feldgradienten

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden mindestens zwei Bindungszustände beobachtet. Ein Zustand war dabei stets auf einen Bindungsplatz mit verschwindendem Feldgradienten zurückzuführen. Der Anteil f_1 der Bindungen in diesem Zustand wurde durch den Parameter R_0 und somit durch eine Quadrupolkopplungskonstante von Null beschrieben. Um den Fehlerbereich dieser Quadrupolkopplungskonstante (ν_{Q_1}) festzulegen, wurde die Verteilung der Anpassungsgüte χ^2 als Funktion von ν_{Q_1} exemplarisch an einer MoFe-Proteinprobe von *R. capsulatus* untersucht. Im ν_{Q_1} -Bereich von 0 - 30 MHz wurde keine Änderung des χ^2 -Wertes beobachtet (Abb. C1). Erst oberhalb von 30 MHz tritt eine deutliche Verschlechterung des χ^2 -Wertes auf. Betrachtet man auch hier die Parameterkorrelation, so vergrößert sich der Anteil (f_1) dieses Bindungszustandes von etwa 45 % bei $\nu_{Q_1} = 0$ MHz auf 75 % bei $\nu_{Q_1} = 30$ MHz. Hingegen wird für die Quadrupolkopplungskonstante des zweiten Bindungszustandes ($\nu_{Q_2} \approx 70$ MHz) keine signifikante Änderung in diesem Variationsbereich beobachtet.

Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der Bindungszustand, der im LSFIT durch den Parameter R_0 berücksichtigt wird und ein $\nu_Q \approx 0$ MHz impliziert, auch eine maximale Quadrupolkopplungskonstante von 30 MHz aufweisen kann. Da eine exakte Bestimmung derart niedriger Quadrupolkopplungskonstanten nicht möglich ist, wurden Bindungszustände mit kleinen Feldgradienten durch den Parameter R_0 beschrieben. Dieses Modell erfordert keine weiteren Annahmen und ermöglicht eine einheitliche Beschreibung aller Spektren. Obwohl der Feldgradient nicht exakt bestimmt werden kann, ist dieses Modell für vergleichende Untersuchungen geeignet, da eine Änderung des Feldgradienten auch eine Änderung von R_0 bewirkt.

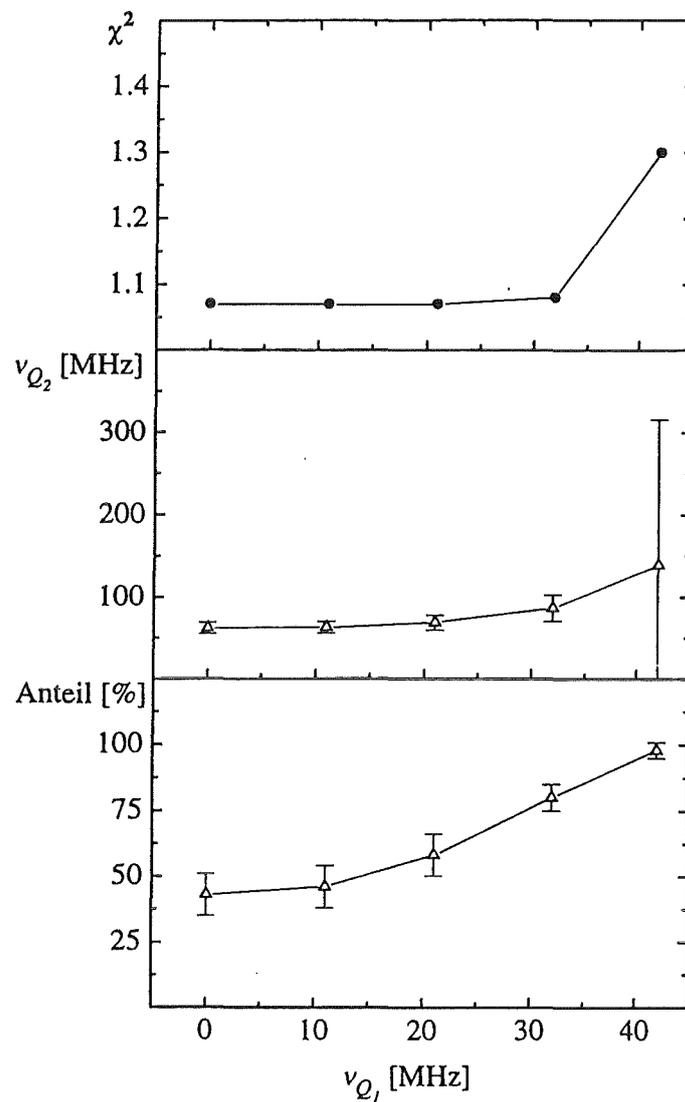


Abb. C.1: Anpassungsgüte χ^2 als Funktion des Quadrupolparameters (v_{Q_1}) des schwach gestörten Anteils (f_1) für ein MoFe-Proteinspektrum von *R. capsulatus*. Für die Verteilung der Anpassungsgüte ist die Änderung der korrelierten Parameter dargestellt. Die eingezeichneten Linien verbinden die Datenpunkte und sollen der Augenführung dienen.

Anhang D: Bestimmung des Asymmetrieparameters η

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben wurde stets nur ein Teil einer Schwingungsperiode beobachtet. In dem zur Verfügung stehenden Zeitfenster wird die Anpassung der Modellfunktion nicht vom Asymmetrieparameter beeinflusst. Dies soll anhand von Simulationen verdeutlicht werden. In Abb. D1 sind $R(t)$ -Spektren dargestellt, die dem TDPAC-Signal des Mo-Bindungszustandes im FeMo-Cofaktor entsprechen. Durch die Anpassung der Modellfunktion kann nicht einmal zwischen den Extremwerten des Asymmetrieparameters 0.0 und 1.0 unterschieden werden. Da aufgrund des von Kim und Rees vorgeschlagenen Modells für den FeMo-Cofaktor [KiRe92a,b] ein näherungsweise axialsymmetrischer Feldgradient wahrscheinlich ist, wurde der Asymmetrieparameter bei allen Auswertungen auf Null festgehalten.

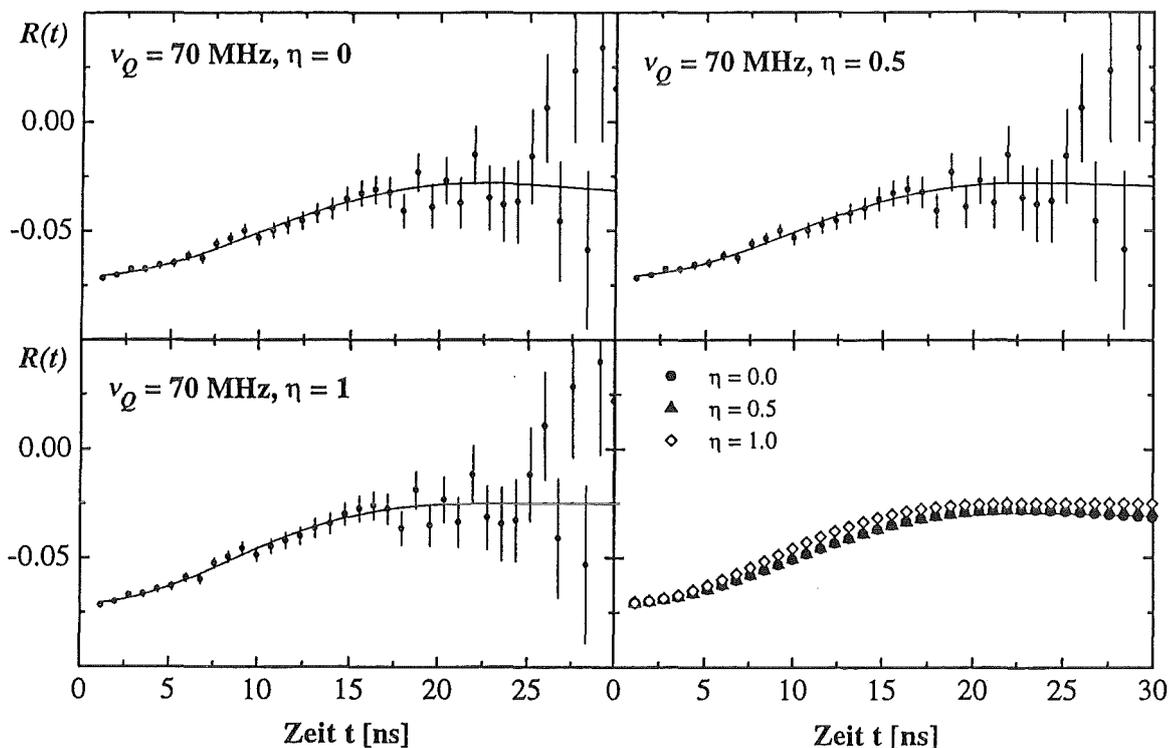


Abb. D1: Simulierte $R(t)$ -Spektren und angepaßte Modellfunktionen für verschiedene Werte des Asymmetrieparameters η bei einer Quadrupolkopplungskonstante ν_Q von 70 MHz.

Eine höhere Quadrupolkopplungskonstante wurde für die Mo-Bindung am Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii* gemessen. Wie in Abb. D2 dargestellt, kann jedoch auch bei $\nu_Q \approx 180$ MHz nicht zwischen den Asymmetrieparametern $\eta = 0.0$ und $\eta = 0.2$ unterschieden werden. Erst ab einem Wert von etwa 0.5 wird eine signifikante Änderung des $R(t)$ -Spektrums beobachtet.

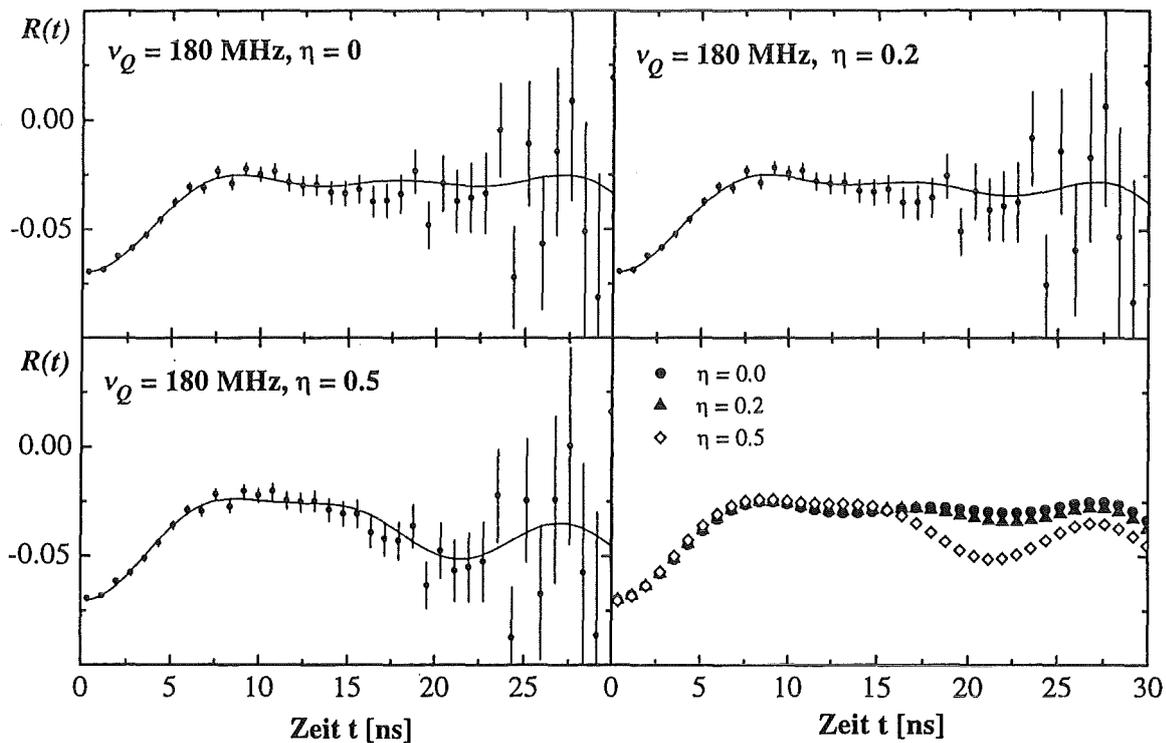


Abb. D2: Simulierte $R(t)$ -Spektrn und angepaßte Modellfunktionen für verschiedene Werte des Asymmetrieparameters η bei einer Quadrupolkopplungskonstante ν_Q von 180 MHz, wie sie für die Mo-Bindung am Mo-Speicherprotein von *A. vinelandii* gemessen wurde.

Literaturverzeichnis

- [Achi85] Achilles, D.
Die Fourier-Transformation in der Signalverarbeitung, Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg · New York · Tokyo (1985)
- [Appe68] Appel, H.
Numerische Tabellen für die Berechnung von Winkelkorrelationen in der α -, β - und γ -Spektroskopie, in: Landolt-Börnstein: Zahlenwerte und Funktionen aus Naturwissenschaft und Technik, Schopper, H. ed., Neue Serie, Gruppe I, Springer Verlag, Berlin 3 (1968)
- [ArDo89] Arber, J.M.; Dobson, B.R.; Eady, R.R.; Hasnain, S.S.; Garner, C.D.; Matsushita, T.; Nomura, M.; Smith, B.E.
Vanadium K-edge X-ray-absorption spectroscopy of the function and thionine-oxidized forms of the VFe-protein of the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*, Biochem. J. 268 (1989) 733-737
- [BaBö82] Barfuß, H.; Böhnlein, G.; Hohenstein, H.; Kreische, W.; Niedrig, H.; Appel, H.; Heidinger, R.; Raudies, J.; Then, G.; Thies, W.-G.
Temperature Dependence of the Electric Field Gradient in CdSe and HfO₂, Zeitschrift für Physik B47 (1982) 99-102
- [BéBe69] Béraud, R.; Berkes, I.; Danière, J.; Marest, G.; Rougny, R.
Effect of Finite Time Resolution on Perturbed Angular Correlation Measurements, Nucl. Instr. Meth. 69 (1969) 41-44
- [BiJa80] Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L.; Hetherington, D.R.
Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 7342-7346
- [BIDu96] Blaha, P.; Dufek, P.; Schwarz, K.; Haas, H.
Calculation of electric hyperfine interaction parameters in solids, Hyp. Int. 97/98 (1996) 3-10
- [BoCa93] Bolin, J.T.; Campobasso, N.; Muchmore, S.W.; Morgan, T.V.; Mortensen, L.E.
Structure and Environment of Metal Clusters in the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein of *Clostridium pasteurianum*, in: Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems, Ed. Stiefel, E.I.; Coucouvanis, D.; Newton, W.E.; Washington, Am. Chem. Soc. (1993) 186-195
- [Brad76] Bradford, M.M.
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analyt. Biochem. 72 (1976) 248-254

- [Burg85] Burgess, B.K.
Substrate Reactions of Nitrogenase, in: Spiro, T.G.; Molybdenum Enzymes, John Wiley & Sons, New York (1985) 161-219
- [Burg90] Burgess, B.K.
The Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, Chem. Rev. 90 (1990) 1377-1406
- [Burg92] Burgess, B.K.
Nitrogenase Structure, Function, and Genetics, in: Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems, Ed. Stiefel, E.I.; Coucouvanis, D.; Newton, W.E.; Washington, Am. Chem. Soc. (1992) 186-195
- [Burg96] Burgess, B.K.
priv. com. (1996)
- [Burr75] Burris, R.H.
The acetylene-reduction technique, in: Nitrogen Fixation by Free-Living Micro-Organisms, Vol. 6, W.D.P. Stewart, ed. Cambridge: Cambridge University Press (1975) 249-257
- [BuSt80] Burgess, B.K.; Stiefel, E.I.; Newton, W.E.
Oxidation-Reduction Properties and Complexation Reactions of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, J. Biol. Chem. 255 (1980) 353-356
- [BuVo89] Butz, T.; Vogdt, C.; Lerf, A.; Knözinger, H.
Time Differential Perturbed Angular Correlation of γ -Rays Emitted from $^{99}\text{Mo} \rightarrow ^{99}\text{Tc}$ in Molybdenum-Based Catalysts, J. Catal. 116 (1989) 31-48
- [ChCh93] Chen, J.; Christiansen, J.; Campobasso, N.; Bolin, J.T.; Tittsworth, R.C.; Hales, B.R.; Rehr, J.J.; Cramer, S.P.
Verfeinerung eines Modells für den Nitrogenase Mo-Fe-Cluster mit Einkristall-Mo und -Fe-EXAFS, Angew. Chem. 105 (11) (1993) 1661-1663
- [ChKi93] Chan, M.K.; Kim, J.; Rees, D.C.
The Nitrogenase FeMo-Cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures, Science 260 (1993) 792-794
- [ChMu73] Chen, J.-S.; Multani, J.S.; Mortensen, L.E.
Structural Investigation of Nitrogenase Components from *Clostridium Pasteurianum* and Comparison with similar Components of other Organisms, Biochim. Biophys. Acta 310 (1973) 51-59
- [ChPr88] Chisnell, J.R.; Premakumar, R.; Bishop, P.E.
Purification of a Second Alternative Nitrogenase from *nifHDK* Deletion Strain of *Azotobacter vinelandii*, J. Bacteriol. 170 (1) (1988) 27-33

- [ChTi95] Christiansen, J.; Tittsworth, R.C.; Hales, B.J.; Cramer, S.P.
Fe and Mo EXAFS of *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase in Partially Oxidized and Single Reduced Forms, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 10017-10024
- [CoBu88] Conradson, S.D.; Burgess, B.K.; Holm, R.H.
Fluorine-19 Chemical Shifts as Probes of the Structure and Reactivity of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, *J. Biol. Chem.* 263 (27) (1988) 13743-1374
- [Danc94] Dance, I.G.
The Binding and Reduction of Dinitrogen at an Fe₄ Face of the FeMo Cluster of Nitrogenase, *Aust. J. Chem.* 47 (1994) 979-990
- [DSMZ89] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH:
DSM Catalogue of Strains 1989, Braunschweig (1989)
- [Eady91] Eady, R.E.
The Mo-, V-, and Fe-based Nitrogenase Systems of *Azotobacter*, *Adv. Inorg. Chem.* 36 (1991) 77-102
- [Eady95] Eady, R.E.
The enzymology of biological nitrogen fixation, *Science Progress* 78 (1) (1995) 1-17
- [EaPo74] Eady, R.R., Postgate J.R.
Nitrogenase, *Nature* 249 (1974) 805-810
- [EaSm72] Eady, R.E.; Smith, B.E.; Cook, K.A.; Postgate, J.R.
Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: Purification and Properties of the Component Proteins, *Biochem. J.* 128 (1972) 655-675
- [ElMo77] Elliot, B.K.; Mortenson, L.E.
Molybdenum storage component from *Clostridium pasteurianum*, in: Newton, W.; Postgate, J.R.; Rodriguez-Barrueco, C.; Recent Developments in Nitrogen Fixation, Acad. Press, Inc. London (1977) 205-217
- [ErMü90] Erfkamp, J.; Müller, A.
Die Stickstoff-Fixierung, *Chemie in unserer Zeit* 6 (1990) 267-279
- [EvGa75] Evans, H.T.; Gatehouse, B.M.; Leverett, P.
Crystal Structure of the Heptamolybdate(VI) (Paramolybdate) Ion, [Mo₇O₂₄]⁶⁻, in the Ammonium and Potassium Tetrahydrate Salts, *J. Chem. Soc. Dalton* (1975) 505-514

Literaturverzeichnis

- [FiLo91] Fisher, K.; Lowe, D.J.; Thorneley, N.F.
Klebsiella pneumoniae nitrogenase
The pre-steady-state kinetics of MoFe-protein reduction and hydrogen evolution under conditions of limiting electron flux show that the rates of association with the Fe-protein and electron transfer are independent of the oxidation level of the MoFe-protein, *Biochem. J.* 279 (1991) 81-85
- [FrSt65] Frauenfelder, H.; Steffen R.M.
Angular Correlations, in: Alpha-, Beta- and Gamma-Ray Spectroscopy, Vol. 2; Siegbahn, K., ed., North Holland Publishing Company Amsterdam (1965) 997 - 1198
- [GaAr89] Garner, D.C.; Arber, J.M.; Harvey, I.; Hasnain, S.S.; Eady, R.E.; Smith, R.E.; de Boer, E.; Wever, R.
Characterization of the Molybdenum and Vanadium Centres in Enzymes by X-Ray Absorption Spectroscopy, *Polyhedron* 8 (13/14) (1989) 1649-1652
- [GaCh87] Gallon, J.R.; Chaplin, A.E.
An Introduction to Nitrogen Fixation, Cassel Education Ltd, London (1987)
- [GeBa89] George, G.N.; Bare, R.E.; Jin, H.; Stiefel, E.I.; Prince, R.C.
E.p.r.-spectroscopic studies on the molybdenum-iron site of nitrogenase from *Clostridium pasteurianum*, *Biochem. J.* 262 (1989) 349-352
- [GeKo92] Georgiadis, M.M.; Komiyama, H.; Chakrabarti, P.; Woo, D.; Kornuc, J.J.; Rees, D.C.
Crystallographic Structure of the Nitrogenase Iron Protein from *Azotobacter vinelandii*, *Science* 257 (1992) 1653-1659
- [GoSc93] Gollan, U.; Schneider, K.; Müller, A.; Schüddekopf, K.; Klipp, W.
Detection of the *in vivo* incorporation of a metal cluster into a protein, *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 25-35
- [Habe68] Haber, L.F.
Fritz Haber und das Stickstoffproblem, *Endeavor* 27 (1968) 15-153
- [HaBu78] Hageman, R.V.; Burris R.H.
Kinetic Studies on Electron Transfer and Interaction between Nitrogenase Components from *Azotobacter vinelandii*, *Biochemistry* 17 (20) (1978) 4117-4124
- [HaMc83] Hawkes, T.R.; McLean, P.A.; Smith, B.E.
Nitrogenase from *nifV* mutants of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor, *Biochem. J.* 217 (1983) 317-321
- [HaVe77] Haaker, H.; Veeger, C.
Involvement of the Cytoplasmic Membrane in Nitrogen Fixation by *Azotobacter vinelandii*, *Eur. J. Biochem.* 77 (1977) 1-10

- [HeFr88] Hedman, B.; Frank, P.; Gheller, S.F.; Roe, A.L.; Newton, W.E.; Hodgson, K.O.
New structural insights into the iron-molybdenum cofactor from *Azotobacter vinelandii* nitrogenase through sulfur K and molybdenum L x-ray absorption edge studies, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 3798-3805
- [HeLu71] Hedin, L.; Lundqvist, B.I.
Explicit local exchange and correlation potentials, *J. Phys. C; Sol. St. Phys.* **4** (1971) 2064-2083
- [Hess83] Hesselmann, N.
Digitale Signalverarbeitung, Vogel Buchverlag, Würzburg (1983)
- [HiMe86] Hinton, S.M.; Merritt, B.
Purification and Characterization of a Molybdenum-Pterin-Binding Protein (Mop) in *Clostridium pasteurianum* W5, *J. Bacteriol.* **168** (1986) 688-693
- [HiMo85a] Hinton, S.M.; Mortensen, L.E.
Identification of Molybdoproteins in *Clostridium pasteurianum*, *J. Bacteriol.* **162** (1985) 477-484
- [HiMo85b] Hinton, S.M.; Mortenson, L.E.
Regulation and Order of Involvement of Molybdoproteins During Synthesis of Molybdoenzymes in *Clostridium pasteurianum*, *J. Bacteriol.* **162** (2) (1985) 485-493
- [HoIm88] Hoover T.R.; Imperial, J.; Ludden, P.W.; Shah, V.K.
Homocitrate Cures the NifV⁻ Phenotype in *Klebsiella pneumoniae*, *J. Bacteriol.* **170** (4) (1988) 1978-1979
- [HoKo64] Hohenberg, P.; Kohn, W.
Inhomogenous Electron Gas, *Phys. Rev.* **136** (3B) (1964) B864-B871
- [Holm93] Holm, R.H.
Trinuclear Cuboidal and Heterometallic Cubane-Type Iron-Sulfur Clusters: New Structural and Reactivity Themes in Chemistry and Biology, *Adv. Inorg. Chem.* **38** (1993) 1-71
- [Horv94] Horvath, A.
TDPAC-Spektren von Mo-99-Nitrogenase: Auswertung mit Hilfe der Autoregressiven Spektralanalyse, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (1994)
- [HoSi85] Holm, R.H.; Simhon, E.D.
Molybdenum/Tungsten-Iron-Sulfur Chemistry: current Status and Relevance to the Native Cluster of Nitrogenase, in: Spiro, T.G.; *Molybdenum Enzymes*, John Wiley & Sons, New York (1985) 1-88

Literaturverzeichnis

- [JoHi87] Johann, S.; Hinton, S.M.
Cloning and Nucleotide Sequence of the chlD Locus, J. Bacteriol. 169 (1987) 1911-1916
- [Jone84] Jones, R.O.
Das Dichtefunktional - die Methode zur Berechnung von Bindungseigenschaften, Phys. Bl. 40 (6) (1984) 149-152
- [KiRe92a] Kim, J.; Rees, D.C.
Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*, Nature 360 (1992)
- [KiRe92b] Kim, J.; Rees, D.C.
Structural Models for the Metal Centers in the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein, Science 257 (1992) 1677-1682
- [KiRe94] Kim, J.; Rees, D.C.
Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation, Biochemistry 33 (2) (1994) 389-397
- [KiWo93] Kim, J.; Woo, D.; Rees, D.C.
Structure of the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0 Å Resolution, Biochemistry 32 (1993) 7104-7115
- [KlMa 88] Klipp, W.; Masepohl, B.; Pühler, A.
Identification and Mapping of Nitrogen Fixation Genes of *Rhodobacter capsulatus*: Duplication of a *nifA-nifB* Region, J. Bacteriol. 170 (1988) 693-699
- [KoSh65] Kohn, W.; Sham, L.J.
Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, Phys. Rev. 140 (4A) (1965) A1133-A1138
- [KuLe96] Kutsche, M.; Leimkühler, S.; Angermüller, S.; Klipp, W.
Promoters Controlling Expression of the Alternative Nitrogenase and the Molybdenum Uptake System in *Rhodobacter capsulatus* are Activated by NtrC, Independent of σ^{54} , and Repressed by Molybdenum, J. Bacteriol. 178 (7) (1996) 2010-2017
- [LaAn91] Labanowski, J.K.; Andzelm, J.W.
Density Functionals in Chemistry, Springer Verlag; New York, Berlin, Heidelberg (1991)
- [LeBu87] Lurf, A.; Butz, T.
Nuclear Quadrupole Interactions in Compounds studied by Time Differential Perturbed Angular Correlations/Distributions, Hyp. Int. 36 (1987) 275-370
- [Levy79] Levy, M.
Universal variational functionals of electron densities, first-order density matrices, and natural spin-orbitals and solution of the v -representability problem, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (12) (1979) 6062-6065

- [LoTh84a,b] Lowe, D.J.; Thorneley, N.F.
The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase action
[a] Pre-steady-state kinetics of H₂ formation, *Biochem. J.* 224 (1984) 877-886
[b] The determination of rate constants required for the simulation of the kinetics of N₂ reduction and H₂ evolution, *Biochem. J.* 224 (1984) 895-901
- [LuBu78] Ludden, P.W.; Burris, R.H.
Purification and Properties of Nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*, and Evidence for Phosphate, Ribose and an Adenine-Like Unit Covalently Bound to the Iron Protein, *Biochem. J.* 175 (1978) 251-259
- [Marp87] Marple, S.L.
Digital Spectral Analysis, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (1987)
- [MaSm82] Mascharak, P.K.; Smith, M.C.; Armstrong, W.H.; Burgess, B.K.; Holm, R.H.
Fluorine-19 chemical shifts as structural probes of metal-sulfur clusters and the cofactor of nitrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7056-7060
- [Meng91] Mengel, K.
Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze, Fischer Verlag (1991)
- [MoBu 93] Mottner, P.; Butz, T.; Lerf, A.; Erfkamp, J.; Schneider, K.; Müller, A.
The in-vivo Identification of the MoFe protein (FeMo cofactor) of Nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae* and of the Mo-storage protein in *Azotobacter vinelandii* via the nuclear quadrupole interaction of ⁹⁹Mo(β^-)⁹⁹Tc, *Biochim. Biophys. Acta* 1164 (1993) 311-318
- [MoZu73] Mortenson, L.E.; Zumft, W.G.; Palmer, G.
Electron Paramagnetic Resonance Studies on Nitrogenase, *Biochim. Biophys. Acta* 292 (1973) 422-435
- [MüCh86] Müller, H.W.; Chmielewska, D.
Nuclear Data Sheets for A = 99, *Nuclear Data Sheets* 48 (4) (1986) 663-752
- [MüRh75] Münck, E.; Rhodes, H.; Orme-Johnson, W.H.; Davis, L.C.; Brill, W.J.; Shah, V.K.
Mössbauer and EPR Spectroscopy. The MoFe Protein Component from *Azotobacter vinelandii* OP, *Biochim. Biophys. Acta* 400 (1975) 32-53
- [MüSu96] Müller, A.; Suer, W.; Pohlmann, C.; Schneider, K.; Thies, W.-G.; Appel, H.
Comparative *in-vivo* and *in-vitro* ⁹⁹Mo-TDPAC-studies on the nitrogenase MoFe protein and on other Mo species of different N₂-fixing bacteria, *Eur. J. Biochem.*; zur Veröffentlichung eingereicht
- [NeBu80] Newton, W.E.; Burgess, B.K.; Stiefel, E.I.
Chemical Properties of the FeMo-Cofactor from Nitrogenase, in: *Molybdenum Chemistry of Biological Significance*; Newton, W.E.; Otsuka, S.; New York: Plenum Press (1980) 191-202

- [NeCa90] Newton, W.E.; Cantwell, J.S.; Feldmann, B.J.; Gheller, S.F.; Schultz, F.A.; Frank, P.; Hedman, B.; Hodgson, K.O.
X-ray absorption spectroelectrochemistry of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor, in: Nitrogen fixation: Achievements and Objectives, Gresshoff, P.M.; Stacey, G.; Roth, L.E.; Newton, W.E., New York: Chapman and Hall (1990) 165
- [NeGh86] Newton, W.E.; Gheller, S.F.; Hedmann, B.; Hodgson, K.O.; Lough, S.M.; McDonald, J.W.
Elicitation of thiomolybdates from the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase: Comparison with synthetic FeMo-S-complexes, Eur. J. Biochem. 159 (1986) 111-115
- [NeGh89] Newton, W.E.; Gheller, S.F.; Sands, R.H.; Dunham, W.R.
Mössbauer Spectroscopy Applied to the Oxidized and Semi-Reduced States of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, Biochem. Biophys. Res. Com. 162 (1989) 882-891
- [Newt92] Newton, W.E.
Isolated Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, in: Biological Nitrogen Fixation, Stacey, G.; Burris, R.H.; Evans, H.J., Eds. Chapman and Hall: New York (1992) 877-930
- [Newt93] Newton, W.E.
Nitrogenases: Distribution, Composition, Structure and Functions, in: New Horizons in Nitrogen Fixation, Ed.: Palacios, R.; Mora J.; Newton, W.E.; Proceedings of the 9th International Congress on Nitrogen fixation, Mexico; Kluwer Academic Publishers (1993)
- [NiSu88] Ni, X.; Sun, G.; Butz, T.
Nuclear Quadrupole Interaction of $^{99}\text{Mo}(\beta^-)^{99}\text{Tc}$ in Mo(V; VI)-EDTA Complexes, Chem. Phys. 123 (1988) 455-460
- [OrHa72] Orme-Johnson, W.H.; Hamilton, W.D.; Jones, T.J.; Tso, M.-Y.W.; Burris, R.H.; Shah, V.K.; Brill, W.J.
Electron Paramagnetic Resonance of Nitrogenase and Nitrogenase Components from *Clostridium pasteurianum* W5 and *Azotobacter vinelandii* OP, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (11) (1972) 3142-3145
- [Orme92] Orme-Johnsen, W.H.
Nitrogenase Structure: Where to Now?, Science 257 (1992) 1639-1640
- [PeWa92] Perdew, J.P.; Wang, Y.
Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy, Phys. Rev. B45 (1992) 13244-13249
- [PiBr81] Pienkos, P.T.; Brill, W.J.
Molybdenum Accumulation and Storage in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*, J. Bacteriol. 145 (2) (1981) 743-751

- [PoMü91] Pope, M.T.; Müller, A.
Chemie der Polyoxometalle: Akute Variationen über ein altes Thema mit interdisziplinären Bezügen, *Angew. Chem.* **103** (1991) 56-70
- [PoSh91] Power, P.P.; Shoner, S.C.
Die neutralen Übergangsmetallthiolate $[M(SAr)_2]_2$ (M = Mo, Fe, Co; Ar = 2,4,6-*t*Bu₃C₆H₂), *Angew. Chem.* **103** (3) (1991) 308-309
- [PrMü90] Primas, H.; Müller-Herold, U.
Elementare Quantenchemie, Teubner; Stuttgart (1990)
- [Ragh89] Raghavan, P.
Table of Nuclear Moments, *Atomic and Nuclear Data Tables* **42** (1989) 189-291
- [RaSh78] Rawlings, J.; Shah, V.K.; Chisnell, J.R.; Brill, W.J.; Zimmermann, R.; Münck, E.; Orme-Johnson, W.H.
Novel Metal Cluster in the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, *J. Biol. Chem.* **253** (4) (1978) 1001-1004
- [ReCh94] Rees, D.K.; Chan, M.K.; Kim, J.
Structure and Function of Nitrogenase, *Adv. Inorg. Chem.* **40** (1994) 89-119
- [Reis94] Reiser, E.
⁹⁹Mo als Sondenkern für die zeitdifferentielle Beobachtung gestörter $\gamma\gamma$ -Winkelkorrelationen, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (1994)
- [ReKi93] Rees, D.C.; Kim, J.; Georgiadis, M.M.; Komiya, H.; Chirino, A.J.; Woo, D.; Schlessman, J.; Chan, M.K.; Joshua-Tor, L.; Santillan, G.; Chakrabati, P.; Hsu, B.T.
Crystal Structures of the Iron Protein and the Molybdenum-Iron Protein of Nitrogenase, in: *Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems*, Ed. Stiefel, E.I.; Coucouvanis, D.; Newton, W.E.; Washington, Am. Chem. Soc. (1993) 170-185
- [Schl92] Schlegel, H.G.
Allgemeine Mikrobiologie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1992)
- [Schw91] Schwab, F.
TDPAC-Untersuchungen der Bindung des Metalls Hafnium an das Protein Ovotransferrin, Dissertation, Universität Karlsruhe (1991)
- [ScMü91] Schneider, K.; Müller, A.; Schramm, U.; Klipp, W.
Demonstration of a molybdenum- vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*, *Eur. J. Biochem.* **195** (1991) 654-661
- [ScMü95] Schneider, K.; Müller, A.; Krahn, E.; Hagen, W.R.; Wassink, H.; Knüttel, K.
The molybdenum nitrogenase from wild-type *Xanthobacter autotrophicus* exhibits properties reminiscent of alternative nitrogenases, *Eur. J. Biochem.* **230** (1995) 666-675

Literaturverzeichnis

- [ScWe92] Schatz, G.; Weidinger, A.
Nukleare Festkörperphysik, Teubner Verlag, Stuttgart (1992)
- [Sell93] Sellmann, D.
Röntgenstrukturanalyse von FeMo-Nitrogenase - ist das Problem der enzymatischen N₂-Fixierung gelöst?, *Angew. Chem.* 105 (1993) 67-70
- [ShBr77] Shah, V.K.; Brill, W.J.
Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3249-3253
- [ScGh85] Schultz, F.A.; Gheller, S.F.; Burgess, B.K.; Lough, S.; Newton, W.E.
Electrochemical Characterization of the Iron-Molybdenum Cofactor from *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5364-5368
- [SchHa83] Scherings, G.; Hakker, H.; Wassink, H.; Veeger, C.
On the formation of an oxygen-tolerant three-component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*, *Eur. J. Biochem.* 135 (1983) 591-599
- [Sing94] Singh, D.J.
Planewaves, Pseudopotentials and the LAPW Method, Kluwer Academic Publishers; Boston, Dordrecht, London (1994)
- [SmEa92] Smith, B.E.; Eady, R.R.
Metalloclusters of the Nitrogenase, *Eur. J. Biochem.* 205 (1992) 1-15
- [SmLa74] Smith, B.E.; Lang, G.
Mössbauer Spectroscopy of Nitrogenase Proteins from *Klebsiella pneumoniae*, *Biochem. J.* 137 (1974) 169-180
- [SmLo72] Smith, B.E.; Lowe, D.J.; Bray, R.C.
Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: Electron-paramagnetic-resonance on the catalytic mechanism, *Biochem. J.* 130 (1972) 641-643
- [SoAn92] Sosa, C.; Andzelm, J.; Elkin, B.C.; Wimmer, E.; Dobbs, K.D.; Dixon, D.A.
A Local Density Functional Study of the Structure and Vibration Frequencies of Molecular Transition-Metal Compounds, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 6630-6636
- [Spir85] Spiro, T.G.
Molybdenum Enzymes, John Wiley & Sons, New York (1985)
- [StCo93] Stiefel, E.I.; Coucouvanis D.; Newton W.E.
Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems, ACS Symposium Series 535, Am. Chem. Soc., Washington, DC (1993)

- [StCr85] Stiefel, E.I.; Cramer, S.P.
Chemistry and Biology of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase, in: Molybdenum Enzymes; Spiro, T.G.; Ed.: John Wiley & Sons, New York (1985), 89-116
- [Step85] Stephens, P.J.
The Structures of the Iron-Molybdenum and the Iron Proteins of the Nitrogenase Enzyme, in: Molybdenum Enzymes; Spiro, T.G.; Ed.: John Wiley & Sons, New York (1985), 117-220
- [StWi68] Strandberg, G.; Wilson, P.W.
Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*, Can. J. Microbiol. 14 (1968) 25-31
- [Suer95] Suer, W.
priv. com. (1995)
- [Suer96] Suer, W.
⁹⁹Mo-TDPAC-Studien am MoFe-Protein der Nitrogenase und an anderen Mo-haltigen Komponenten N₂-fixierender Bakterien, Dissertation, Universität Bielefeld (1996)
- [SuNi88] Sun, G.; Ni, X.; Butz, T.; Lerf, A.
Nuclear Quadrupole Interaction of ⁹⁹Mo(β^-)-⁹⁹Tc in Mo(V; VI)-Cysteine Complexes, Chem. Phys. Lett. 151 (1,2) (1988) 54-59
- [ThAs93] Thorneley, R.N.F.; Ashby, G.A.; Fisher, K.; Lowe, D.J.
Electron-Transfer Reactions Associated with Nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*, in: Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems, ACS Symposium Series 535, Am. Chem. Soc., Washington, DC (1993)
- [Then86] Then, G.M.
Untersuchungen zur Metallbindung im Eisentransportprotein Transferrin mit der Methode der zeitdifferenziellen Beobachtung von gestörten Winkelkorrelationen, Dissertation, Kernforschungszentrum Karlsruhe und Universität Karlsruhe (1986)
- [ThLo83] Thorneley R.N.F.; Lowe, D.J.
Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*
Kinetics of the dissociation of oxidized iron protein from molybdenum-iron protein: Identification of the rate limiting step for substrate reduction, Biochem. J. 215 (1983) 393-403
- [ThLo84a,b] Thorneley, R.N.F.; Lowe, D.J.
The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase action
[a] Pre-steady-state kinetics of an enzyme-bound intermediate in N₂ reduction and of NH₃ formation, Biochem. J. 224 (1984) 887-894
[b] Simulation of the dependence of H₂-evolution rate on component-protein concentration and ratio and sodium dithionite concentration, Biochem. J. 224 (1984) 903-909

Literaturverzeichnis

- [VeNe86] Venters, R.A.; Nelson, M.J.; McLean, P.A.; True, A.E.; Levy, M.A.; Hoffmann, B.M.; Orme-Johnson, W.H.
ENDOR of the Resting State of Nitrogenase Molybdenum-Iron Proteins from *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Clostridium pasteurianum*: ^1H , ^{57}Fe , ^{95}Mo , and ^{33}S Studies, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 3487-3498
- [WaAn93] Wang, G.; Angermüller, S.; Klipp, W.
Characterization of *Rhodobacter capsulatus* Encoding a Molybdenum Transport System and Putative Molybdenum-Pterin-Binding Proteins. J. Bacteriol. 175 (10) (1993) 3031-3042
- [WaHu93] Watt, G.D.; Huang, H.; Reddy, K.R.N.
Redox Properties of the Nitrogenase Proteins from *Azotobacter vinelandii*, in: Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems, Ed. Stiefel, E.I.; Coucouvanis, D.; Newton, W.E.; Washington, Am. Chem. Soc. (1993) 243-256
- [WaWa89] Watt, G.D.; Wang, Z.-C.
Protein Interaction with Higher Oxidized States of the Nitrogenase MoFe Protein from *Azotobacter vinelandii*, Biochemistry 28 (1989) 1844-1850
- [WhBu81] Wherland, S.; Burgess, B.K.; Stiefel, E.I.; Newton, W.E.
Nitrogenase Reactivity: Effects of Component Ratio on Electron Flow and Distribution during Nitrogen Fixation, Biochemistry 20 (1981) 5132-5140
- [WiFu67] Wiese, G.; Fuchs, J.
Die Komplexbildung zwischen Molybdationen und Aluminiumionen, Z. Naturforschung 22b (1967) 469-473
- [WiKr81] Wimmer, E.; Krakauer, H.; Weinert, M.; Freeman, A.J.
Full-Potential Self-Consistent Linearized-Augmented-Plane-Wave Method for Calculating the Electronic Structure of Molecules and Surfaces: O_2 Molecule, Phys. Rev. B 24 (2) (1981) 864-875
- [Yate92] Yates, M.G.
The Enzymology of Molybdenum-Dependent Nitrogen-Fixation, in: Biological Nitrogen Fixation; Stacey, G.; Burris, R.H.; Evans, H.J., Chapman and Hall: New York (1992) 685-735
- [YoPe66] Yoch, D.C.; Pengra, R.M.
Effects of Amino Acids on the Nitrogenase System of *Klebsiella pneumoniae*, J. Bacteriol. 92 (3) (1966) 618-622

- [ZiMü78] Zimmermann, R.; Münck, E.; Brill, W.J.; Shah, K.S.; Henzl, M.T.; Rawlings, J.; Orme-Johnson, W.H.
Nitrogenase X: Mössbauer and EPR Studies on Reversibly Oxidized MoFe Protein from *Azotobacter vinelandii* OP, *Biochim. Biophys. Acta* 537 (1978) 185-207
- [Zumf78] Zumft, W.G.
Isolation of Thiomolybdate Compounds from the Molybdenum-Iron Protein of Clostridial Nitrogenase, *Eur. J. Biochem.* 91 (1978) 345-350