

Untersuchung des Schwingungsanteils und des Kristallgitterfehleranteils des Temperaturfaktors in Myoglobin durch Vergleich von Mössbauerabsorptionsmessungen mit Röntgenstrukturdaten

VON F. PARAK

Physik Department der Technischen Hochschule München, Arcisstrasse 21, Institut E 15, Deutschland

UND H. FORMANEK

Röntgenstrukturabteilung am Max Planck Institut für Leder und Eiweissforschung, München, Schillerstrasse 46, Deutschland

(Eingegangen am 2. Dezember 1970)

The mean square displacement $\langle x^2 \rangle$ from the theoretical lattice point, obtained from X-ray structure data for myoglobin crystals, is compared with the corresponding value, $\langle x^2 \rangle_T$, measured by Mössbauer experiments on the iron in myoglobin crystals. $\langle x^2 \rangle_T$ depends only on the vibrations of the lattice. The value $\langle x^2 \rangle$, however, which is obtained from X-ray data contains a contribution due to lattice faults in addition to the contribution due to vibrations. $\langle x^2 \rangle - \langle x^2 \rangle_T = \langle x^2 \rangle_S$ is then the contribution due to lattice faults alone. The experimental values are $\langle x^2 \rangle = 13.2 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$ and $\langle x^2 \rangle_T = 8.6 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$ giving $\langle x^2 \rangle_S = 4.6 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$. The same comparison was made for $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and for hemine. Here $\langle x^2 \rangle$ was roughly equal to $\langle x^2 \rangle_T$. In addition the temperature dependence of $\langle x^2 \rangle_T$ was measured for myoglobin crystals. A new procedure is described for the substitution of the isotope ^{57}Fe required for Mössbauer measurements for the natural iron in myoglobin.

1. Einführung

Der physikalisch wesentliche Bestandteil des Debye-Waller Faktors ist die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ des streuenden Teilchens von seiner Normallage im Gitter. $\langle x^2 \rangle$ hat in einem Kristall zwei unabhängige Anteile. Zum einen sitzt infolge von Fehlern in Kristallbau das streuende Teilchen nicht genau an seinem Gitterplatz. Die mittlere quadratische Abweichung von diesem Platz beträgt $\langle x^2 \rangle_S$. Zum anderen entfernt sich das streuende Teilchen infolge der Temperaturschwingungen im Kristall aus seiner Ruhelage. Die mittlere quadratische Auslenkung durch diesen Prozess beträgt $\langle x^2 \rangle_T$. Wir nennen den Anteil des Debye-Waller Faktors, der durch den statischen Ausdruck $\langle x^2 \rangle_S$ bestimmt wird, den Kristallgitterfehleranteil, den Anteil, der durch $\langle x^2 \rangle_T$ bestimmt wird, den Schwingungsanteil. Bei der Röntgenstreuung wird das Röntgenquant in der Zeit von ungefähr 10^{-14} bis 10^{-15} sec* gestreut. Eine Gitterschwingung dauert etwa 10^{-11} bis 10^{-12} sec.† Der Streuprozess ist also schnell im Verhältnis zur Schwingungszeit. Auch der Schwingungsanteil ist daher quasistatisch. Die beiden Anteile sind ununterscheidbar und addieren sich in erster Näherung. Bei der Mössbauerstreuung dauert der Streuprozess im Fall von ^{57}Fe etwa 10^{-7} sec (Muir, Andor & Coogan, 1966). Das Eisenatom schwingt also

viele Male im Gitter hin und her, bis das absorbierte Quant reemittiert wird.‡ Daher lässt sich hier der Debye-Waller Faktor in einen Absorptionsfaktor und einen Emissionsfaktor zerlegen. Der Absorptionsfaktor lässt sich z.B. für Eisen in einem Transmissionsexperiment bestimmen. Er hängt in guter Näherung nur vom Schwingungsanteil ab. Röntgenstrukturdaten liefern dagegen immer die Summe aus Kristallgitterfehleranteil und Schwingungsanteil. Zum Vergleich der beiden Anteile wurden die Röntgendaten für Myoglobin von Watson verwendet. Mössbauertransmissionsexperimente wurden an Absorbieren, die aus zahlreichen kleinen Myoglobinkristallen bestanden, durchgeführt. Gemessen wurde dabei der Debye-Waller Faktor des Eisens im Myoglobin.

2. Theorie

Eine Ableitung der Debye-Waller Faktoren für schnelle und langsame Streuprozesse findet man bei Trammell (1962) und Mössbauer & Sharp (1964). Wir entnehmen der Literatur folgende Formeln: langsame Streuung (Amplitudenfaktor)

$$f_{MS}^A = \exp \left[-\frac{1}{2} \langle (\mathbf{k}_f \mathbf{r})^2 + (\mathbf{k}_0 \mathbf{r})^2 \rangle \right] \quad (1)$$

schnelle Streuung (Amplitudenfaktor)

$$f_X^A = \exp \left[-\frac{1}{2} \langle [(\mathbf{k}_f - \mathbf{k}_0) \mathbf{r}]^2 \rangle \right] \quad (2)$$

* Diesen Wert erhält man aus der Energiebreite einer charakt. Röntgenlinie nach Compton & Allison (1935).

† Dies entspricht der Grenzfrequenz im Debye Modell. Es kommt hier nur auf die Größenordnung an.

‡ Dies ist eine anschauliche Deutung. Physikalisch wesentlich ist die Tatsache der Resonanzstreuung.

für elastische Streuung gilt:

$$|\mathbf{k}_f| = |\mathbf{k}_0| = k.$$

$k = 2\pi/\lambda$: Wellenvektor des Röntgen- oder γ -Quants. Der Index 0 bzw. f bedeutet: 'vor' bzw. 'nach' dem Streuprozess.

Bei langsamer elastischer Streuung ist der Vektor \mathbf{r} jeweils dem Vektor \mathbf{k}_f bzw. \mathbf{k}_0 parallel. Wir erhalten aus (1)

$$f_{MS}^A = \exp[-k^2 \langle x^2 \rangle] \quad (3)$$

mit $|\mathbf{r}| = x$.

Der Debye-Waller Faktor $f_{M'}$, der bei einem Mössbauerexperiment gemessen wird, ist im Wirkungsquerschnitt für Absorption, σ_T , enthalten. Dieser ist durch das optische Theorem mit der Streuamplitude in Vorwärtsrichtung $f(\theta=0)$ und damit mit f_{MS}^A korreliert durch den Ausdruck:

$$\sigma_T = C f_{M'} = -\frac{4\pi}{k} \operatorname{Im} f(\theta=0) = -\frac{4\pi}{k} \operatorname{Im}(C' f_{MS}^A). \quad (4)$$

Damit ergibt sich:

$$f_{M'} = \exp[-k^2 \langle x^2 \rangle_T]. \quad (5)$$

Der Index T an $\langle x^2 \rangle$ soll bedeuten, dass es sich hier nur um den Schwingungsanteil handelt, denn die Absorptionswahrscheinlichkeit für ein γ -Quant im Kern ist vom Schwingungszustand des Atoms im Kristall abhängig. Ableitungen dieses rückstossfreien Anteiles findet man z.B. bei Trammell (1962), Mössbauer, Sharp (1964), Wegener (1965) und Goldanskii & Herber (1968). $\langle x^2 \rangle_T$ ist ein Mass für die reziproke Bindungsstärke des absorbierenden ^{57}Fe Atoms an das Gitter. Im Falle des Myoglobinkristalls kann man diese Bindung in drei Teile aufspalten und zwar: Bindung des Eisens an die Hämingruppe, Bindung der Hämingruppe im Gesamtmolekül und Bindung des Moleküls im Kristallgitter. Sollte sich die Gesamtbindung des Eisens durch eine statische Auslenkung des Moleküls von seinem regulären Gitterplatz messbar verändern, würde sich ein Einfluss des Gitterstörungsanteiles $\langle x^2 \rangle_S$ auf den Schwingungsanteil $\langle x^2 \rangle_T$ des Debye-Waller Faktors ergeben, da dadurch das gesamte Schwingungsspektrum verändert würde. Dieser Effekt dürfte jedoch im Myoglobinkristall wenig ausgeprägt sein und er wird in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt.

Wir formen nun Formel (2) um. Dabei sei x die Auslenkung in Richtung $\mathbf{k}_f - \mathbf{k}_0$ und θ der Winkel von \mathbf{k}_0 mit der reflektierenden Netzebene (Bragg Winkel). Wir erhalten dann mit $|\mathbf{k}_0 - \mathbf{k}_f| = 2k \sin \theta$:

$$f_x^A = \exp[-2k^2 \sin^2 \theta \langle x^2 \rangle] = \exp\left[-8\pi^2 \langle x^2 \rangle \left(\frac{\sin \theta}{\lambda}\right)^2\right]. \quad (6)$$

Der Ausdruck $8\pi^2 \langle x^2 \rangle$ wird in der Röntgenstrukturforschung oft mit B bezeichnet. Es ist der isotrope Temperaturfaktor. In genaueren Röntgenstruktur-

arbeiten wird meist der anisotrope Temperaturfaktor angegeben (vergleiche z.B. Cruickshank, 1956). Um mit den Mössbauerexperimenten vergleichen zu können, wird durch Mittelung der Daten wieder ein isotroper Temperaturfaktor gebildet. Wie bereits in der Einführung erwähnt, ist der Röntgenstreuungsprozess ein schneller Vorgang. Unterscheidung zwischen $\langle x^2 \rangle_T$ und $\langle x^2 \rangle_S$ ist daher nicht möglich. Für die Reduktion der in einen Braggreflex gestreuten Intensität, die durch das Quadrat von f_x^A beschrieben wird, ist nur der Abstand des streuenden Atoms von der reflektierenden Ebene massgeblich. Sein mittleres Quadrat wird gegeben durch:

$$\langle x^2 \rangle = \langle x^2 \rangle_T + \langle x^2 \rangle_S. \quad (7)$$

Ein etwa möglicher Interferenzterm $\langle x_T \cdot x_S \rangle$ ist dabei vernachlässigt.

3. Herstellung des Myoglobinabsorbes für das Mössbauerexperiment

Um den Vergleich der Mössbauerdaten mit den Röntgendaten sinnvoll durchzuführen, muss der Mössbauerabsorber aus kleinen Myoglobinkristallen bestehen, die sich in derselben Lösung befinden, wie der Einkristall bei der Röntgenstrukturbestimmung. Um zu einer vernünftigen Messzeit zu gelangen, muss überdies das Eisen des Myoglobins gegen das Eisenisotop ^{57}Fe ausgetauscht werden. Dies kann nur erreicht werden, wenn das in einer hydrophoben Tasche des Myoglobins gebundene Hämin mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und an seiner Stelle ein ^{57}Fe haltiges Hämin eingebaut wird. Die Trennung von Met-Myoglobin in Globin und Hämin gelang bisher nur in Aceton-Salzsäure Lösung (Theorell & Akeson) oder durch Extraktion einer wässrigen Met-Myoglobin Lösung mit Äthylmethylketon bei pH 10 (Teale, 1959). Beide Methoden bewirkten eine teilweise Denaturierung des Globins (Breslow, 1964), wodurch eine Kristallisation des mit ^{57}Fe Hämin rekombinierten Myoglobins verhindert wird. Diese Nachteile können vermieden werden, wenn das Hämin aus einer 1% Met-Myoglobin Lösung in 0,1 M Histidinmonochlorid Lösung bei pH 5 mit Äthylmethylketon extrahiert wird. Nach zweimaliger Extraktion verbleiben noch 10% des Hämins im Globin. Beim Vermischen von Globin und ^{57}Fe Hämin in 0,1 M Histidinmonochlorid Lösung von pH 9 findet die Rekombination des Myoglobins statt. Vor der Kristallisation muss dieses Myoglobin durch dreimalige Säulenchromatographie gereinigt werden, zuerst über Sephadex G25 in 0,1 M Natriumchloridlösung, dann über DEAE Cellulose in 0,005 M Natriumphosphatlösung bei pH 8,6. Zuletzt wurde das Myoglobin in 0,005 M Natriumphosphatlösung bei pH 6,3 an CM Cellulose absorbiert und mit Hilfe eines Natriumchlorid Gradienten (0,001 M Natriumphosphat pH 6,3 + 0,15 M Natriumchlorid) ausgewaschen. Einkristalle wurden aus einer 0,5%igen ^{57}Fe Lösung in 3,8 M Ammosulfat von pH 7 gezüchtet (Kendrew

& Parrish, 1956). Aus 2 g Pottwal Myoglobin konnten 500 mg ^{57}Fe Myoglobin Einkristalle gewonnen werden. Durch Röntgenaufnahmen wurde deren vollständige Identität mit unausgetauschten Myoglobin Kristallen bewiesen. Die Herstellung von ^{57}Fe Hämin erfordert zuerst die Abspaltung des natürlichen Eisens vom Hämin (Fischer & Pützer, 1926). Zur Rekombination des Hämins wird das so gewonnene Protoporphyrin in konzentrierter Essigsäure (mit 2% HCl) gelöst (Fischer, Treibs & Zeile, 1930) und bei Siedehitze unter Luftausschluss mit einer äquivalenten Menge von Eisen 57-II-Acetat in konzentrierter Essigsäure versetzt. Das ^{57}Fe Hämin wurde mit konzentrierter Essigsäure, Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Ein typischer Absorber hatte einen Durchmesser von 0,7 cm und enthielt 51,2 mg Pottwalmyoglobin, in dem 90% der Hämingruppen ersetzt waren durch mit ^{57}Fe angereicherte Hämingruppen. Der Anreicherungsgrad dieser Gruppen mit ^{57}Fe betrug etwa 90%.

4. Experimente und Auswertungsmethode

Mössbauermessungen wurden an den Substanzen $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Mäminchlorid, an Pottwal Myoglobin Kristallen in Mutterlauge bei Zimmertemperatur und an Myoglobin Kristallen bei verschiedenen Temperaturen bis zu 4,2°K herab durchgeführt. Mit Ausnahme der Myoglobin Kristalle enthielten alle Substanzen natürliches Eisen. Ihre Präparation wurde bereits im § 3 beschrieben. Als Quelle wurde ^{57}Co in Pt oder in Pd benutzt. Die Genauigkeit der Bestimmung von Debye-Waller Faktoren mit Hilfe des Mössbauerfekt wird stark durch die sogenannte Untergrundkorrektur bestimmt. Es ist nötig, genau zu wissen, welcher Prozentsatz der auf den Absorber auftreffenden Strahlung wirklich rückstossfrei emittierte Strah-

lung der Quelle ist. Vor allem stören die K- oder L-Röntgenlinien von Fe, Pt bzw. Pd. Dies Problem wird bei Johnson & Dash (1968) und Nussbaum, Howard, Nees & Steen (1968) ausführlich behandelt. Bei allen Experimenten wurden zuerst die 14,4 keV Impulse, die aus einem 0,1 mm dicken NaJ-Zähler kamen, mit Hilfe eines Einkanal-Diskriminators so gut wie möglich ausgeblendet. Dann wurde jeweils 5 Minuten lang die Zählrate im Fenster ohne Zusatzabsorber, mit einem Cu-Absorber, einem Al-Absorber und bei Pd-Quellen mit einem Nb-Absorber bestimmt. Mit Hilfe der leider nicht allzu genau bekannten Absorptionskoeffizienten dieser Materialien für die verschiedenen Energien der charakteristischen Röntgenlinien der Quelle kann man aus diesen Messungen den 14,4 keV-Anteil der im Fenster eingezählten Strahlung bestimmen. Den rückstossfreien Anteil dieser Strahlung erhält man dann mit Hilfe des *f*-Faktors, der der Literatur entnommen wird (Nussbaum *et al.*, 1968). Man findet dort die Werte:

$$f(\text{Pt}, 295^\circ\text{K}) = 0,723 \pm 0,004 \text{ und } f(\text{Pd}, 295^\circ\text{K}) = 0,661 \pm 0,003.$$

Bei allen Materialien wurden mehrere Messungen an Absorbern verschiedener Dicke durchgeführt, die im Rahmen der Fehlergrenze dasselbe Resultat ergaben. Angeführt werden im folgenden jeweils die Mittelwerte aus diesen Messungen. Die aufgenommenen Mössbauerspektren wurden mit Lorentzlinien gefittet. Dies geschah auch bei den Tieftemperatur-Myoglobin-Spektren, bei denen die Lorentzkurve nur noch eine Einhüllende von verschiedenen nichtaufgelösten Linien ist.*

Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 1 mit

* Teilweises Einfrieren der Spin Gitter Relaxation.

Tabelle 1. Vergleich von Mössbauerexperimenten mit Röntgendaten

	f_M'	Mössbauereffekt $\langle x^2 \rangle_T$ (Å ²)	B_T (Å ²)	$\langle x^2 \rangle$ (Å ²)	Röntgendaten \bar{B} (Å ²)	Literatur
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,20	$3,02 \times 10^{-2}$	2,4	$2,84 \times 10^{-2}$	2,24	Figgis, Gerloch & Mason (1969)
Häminchlorid	0,10	$4,31 \times 10^{-2}$	3,4	$5,13 \times 10^{-2}$	4,05	Koenig (1965)
Myoglobin (lyophilisiert)	ca. 0,2	$3,0 \times 10^{-2}$	2,4			
Myoglobin (Kristalle) bei Temperatur:						
Zi	0,01	$8,6 \times 10^{-2}$	6,8	$13,2 \times 10^{-2}$	10,42	Watson (1970)
251°K	0,12	$4,0 \times 10^{-2}$	3,1			
228°K	0,25	$2,6 \times 10^{-2}$	2,05			
185°K	0,38	$1,8 \times 10^{-2}$	1,43			
162°K*	0,39	$1,77 \times 10^{-2}$	1,4			
135°K*	0,37					
110°K*	0,32					
86°K*	0,31					
4,2°K	0,79	$4,4 \times 10^{-3}$	0,35			

* Bei diesen Temperaturen trat starke Linienverbreiterung auf. Die Werte sind nur bedingt interpretierbar. Die Messgenauigkeit der übrigen f_M' -Werte beträgt etwa 10%.

einem Stern versehen. Sie werden nicht weiter diskutiert. Bei 4,2°K ist die Relaxation praktisch eingefroren und das Spektrum ist gut aufgelöst. Für die Berechnung des Debye-Waller Faktors wurde jeweils die best aufgelöste Linie verwendet und der Wirkungsquerschnitt für Resonanzabsorption entsprechend des Flächenanteils dieser Linie an der Gesamtfläche des Spektrums korrigiert.

Wir benützen im wesentlichen die Formeln von Heberle & Franco (1968a). Diese gestatten im Gegensatz zu allen anderen Verfahren eine Berechnung für den Fall, dass die Linienbreite der Quelle und des Absorbers unterschiedlich gross ist. Als Eingabedaten werden ein geschätzter f_M -Faktor, die beobachtete Linienbreite Γ_{exp} , der gemessene, untergrundkorrigierte Effekt $\eta_{\text{exp}} = (I_{\infty} - I_0)/I_{\infty}$, sowie Linienbreite Γ_S und f -Faktoren der Quelle verwendet. I_{∞} ist dabei die Zählrate, die bei völliger Zerstörung der Kernresonanz gemessen wird, I_0 die Zählrate in Resonanz. Aus $\Gamma_{\text{exp}} - \Gamma_S$ wird zuerst Γ_A gebildet und der Resonanzabsorptionsquerschnitt mit dem Faktor Γ/Γ_A korrigiert. (Γ : natürliche Linienbreite). Dann wird der Effekt η nach Heberle *et al.* (1968a) berechnet, wobei bis zur 6. Näherung in der hier definierten Grösse Q gerechnet wird. Dieser Effekt wird mit dem gemessenen verglichen und durch systematische Iteration des geschätzten f_M -Faktors an den gemessenen angeglichen. Nun wird mit diesem Wert nach Heberle & Franco (1968b) die Linienbreite Γ_{Ab} berechnet, die im allgemeinen (dicke Absorber) mit der bisher verwendeten Breite Γ_A nicht übereinstimmt. Γ_A wird verändert und damit der Resonanzabsorptionsquerschnitt. Ein neuer Faktor f_M wird berechnet. Das Iterationsverfahren ist abgeschlossen, wenn ein f_M -Wert gefunden ist, mit dem gemessener Effekt gleich berechneter Effekt ist und gleichzeitig $\Gamma_{\text{exp}} = \Gamma_S + \Gamma_{\text{Ab}}$.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Zum Vergleich sind die Röntgendaten aus der Literatur daneben gesetzt.

Für $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und Häminchlorid stimmen die $\langle x^2 \rangle$ -Werte aus Mössbauermessungen und Röntgendaten einigermaßen überein. Die Abweichung bei $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ kann eventuell auch durch Ungenauigkeiten der Röntgendaten infolge der Verwendung einer ziemlich beschränkten Anzahl von Reflexen hervorgerufen werden. Dagegen sollte die Tatsache, dass die Mössbauermessungen und Röntgenmessungen nicht an Kristallen desselben Kristallisationsansatzes durchgeführt wurden, keinen Einfluss haben. Dies zeigen Röntgenstrukturbestimmungen an Substanzen, die von verschiedenen Autoren untersucht wurden. Die Genauigkeit des Vergleiches wird auch durch den bei Röntgenmessungen nicht abtrennbaren Anteil der inelastisch in einen Reflex gestreuten Intensität etwas beeinträchtigt. In guter Näherung lässt die vorliegende Messung jedoch den Schluss zu, dass bei $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

und Häminchlorid der entscheidende Anteil von $\langle x^2 \rangle$ der Schwingungsanteil ist. Der Fehlordnungsanteil spielt demgegenüber zumindest bei Zimmertemperatur eine untergeordnete Rolle. Myoglobinkristalle zeigen jedoch ein anderes Verhalten. Der B -Faktor, der sich aus Röntgenmessungen ergibt, liegt deutlich höher, als der B -Faktor der Mössbauermessungen. Aus Formel (7) ergibt sich ein Kristallgitterfehleranteil von $\langle x^2 \rangle_S = 4,6 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$. Das entspricht einem Wert $B_S = 3,6 \text{ \AA}^2$. Diese Separierung der Anteile von $\langle x^2 \rangle$ setzt voraus, dass der B -Wert des Fe in Myoglobin nicht allzusehr von dem mittleren B -Wert des gesamten Moleküls verschieden ist. Inwieweit diese Näherung zulässig ist, wird im folgenden noch diskutiert.

In Tabelle 1 ist der Temperaturverlauf des Debye-Waller Faktors von Myoglobin aus Mössbauermessungen angegeben. Man sieht, dass $\langle x^2 \rangle$ mit der Temperatur abnimmt. Der Temperaturverlauf zeigt ab 162°K kein kontinuierliches Verhalten. Eine genauere Analyse dieses Verlaufs wird in der vorliegenden Arbeit nicht unternommen. Es sei nur darauf hingewiesen, dass es sich zwischen 135°K und 86°K, wo der f_M -Faktor völlig unsystematisch verläuft um das Gebiet handelt, wo infolge von Relaxationseffekten das Mössbauerspektrum eine sehr übersichtliche Linienstruktur zeigte. Auch der Übergang in eine andere kristallographische Phase in diesem Temperaturbereich kann nicht ausgeschlossen werden. Ein Vergleich der B_T -Werte von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Häminchlorid und Myoglobinkristallen zeigt, dass die Bindungsstärke in Myoglobin deutlich kleiner ist. Dies ist schwer einzusehen, wenn man annimmt, dass der für die Schwingung des Eisens in Myoglobin wesentliche Anteil von der Bindung des Eisens bzw. der Hämingruppe an das Restmolekül herkommt. Die B_T -Werte von Myoglobin sollten dann den Werten, die für ionische bzw. kovalente Bindung charakteristisch sind, wesentlich näher kommen, das heisst sie sollten niedriger sein. Man kann jedoch zur Deutung der Mössbauereffekt-Messungen folgendes Modell annehmen: Wesentlich für den B_T -Wert von Fe in Myoglobin sind die Schwingungen der gesamten Moleküle gegeneinander. Die Ursache dafür ist die schwache Bindung der Moleküle im Kristallgitter. Diese Bindung ist nur sehr ungenau bekannt. Sie wird an den wenigen Berührungspunkten der Moleküle durch vom Lösungsmittel abgeschirmte ionische Brücken und H-Brücken gebildet. Van der Waals Kräfte spielen wegen des im Durchschnitt grossen Abstandes der Moleküle voneinander nur eine untergeordnete Rolle. Dieses Modell erklärt auch den im Vergleich zu Myoglobinkristallen wesentlich geringeren B_T -Wert von gefriergetrocknetem Myoglobin. Hier rücken in Folge des Wasserentzugs die Moleküle näher zusammen und die van der Waals Bindungen werden wesentlich stärker. Die Bindung der Moleküle aneinander steigt. Auch ein anderer Effekt könnte einen Einfluss haben. Im Kristall ist die H-Brückenbindung zwischen den einzelnen Molekülen wesentlich schwächer, als in der trockenen Substanz, da das Wasser sich

den Aminosäuren ebenfalls zur H-Bindung anbietet. Die Annahme von H-Brücken im Kristall über zahlreiche Wassermoleküle hinweg, erscheint wegen der Austauschbarkeit des Lösungsmittels nicht zulässig. Die absoluten Werte von B_T bei lyophilisierter Substanz waren nicht streng reproduzierbar und hängen wahrscheinlich von der Restfeuchtigkeit der Probe ab. Um den Unterschied des B_T -Wertes von lyophilisierter Substanz und Kristall zu erklären, könnte man allerdings auch eine sterische Behinderung des Eisens im trockenen Material annehmen. Gerade für Myoglobin erscheint diese Deutung jedoch relativ unwahrscheinlich, da sich das Häm in einer hydrophoben Tasche befindet und sich deshalb in der Umgebung des Eisens sowieso kein Wasser befindet (mit Ausnahme des einen Moleküls an der 6. Koordination). Eine starke Deformation der Struktur durch das Trocknen sollte daher an dieser Stelle nicht auftreten. Auch die Annahme, dass das gesamte Molekül sich beim Trocknen so deformiert, dass das Fe sterisch behindert wird, erscheint nicht plausibel, da sich lyophilisiertes Myoglobin als nicht denaturiert erweist. Wir wollen nun die Fehler betrachten, die durch die verwendeten Röntgendaten entstehen können. Die Mössbauer- und die Röntgenmessungen wurden an Kristallen aus verschiedenen Kristallisationsansätzen durchgeführt. Prinzipiell ist es daher möglich, dass die Kristalle sich in ihren Gitterfehlern unterscheiden. Dadurch würde auch $\langle x^2 \rangle_S$ modifiziert. Da die Kristallisationsmethode gleich war, dürfte sich jedoch, zumindest in 1. Näherung, kein Einfluss auf die thermischen Parameter ergeben. Der Einfluss der inelastisch in den Reflex gestreuten Strahlung wurde bereits erwähnt. Er vermindert die Grösse der B -Werte. Eine quantitative Abschätzung erscheint nur schwer möglich.

Die Separierung des Schwingungsanteils und des Fehlordnunganteils von $\langle x^2 \rangle$ bleibt auch dann zulässig, wenn neben den Schwingungen der Moleküle gegeneinander die Schwingungen der Atome im Molekül wesentlich werden, die Schwingungsamplituden der Atome aber nicht allzu unterschiedlich sind. Kritisch wird der Vergleich, falls das Eisen ein völlig anderes Schwingungsverhalten zeigt, als der Rest des Myoglobinmoleküls. Wir betrachten den Fall, dass das bisher beschriebene Modell nicht gilt und der mittlere B -Wert von Myoglobin sich vom B -Wert des Fe im Myoglobin wesentlich unterscheidet. Es erscheint unwahrscheinlich, dass der B -Wert des Eisens grösser ist, als der des Myoglobins, da bei gleicher Bindung schwere Atome

einen geringeren B -Wert haben, als leichte. Sollte dieser Fall jedoch vorliegen, so wäre der thermische Anteil bei der Mössbauermessung zu hoch bestimmt. Der Vergleich würde zu einem zu niedrigen statischen Anteil $\langle x^2 \rangle_S$ führen. Grösser erscheint jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass der B -Wert des Eisens kleiner ist, als der B -Wert des Gesamtmoleküls. In diesem Falle wäre der richtige $\langle x^2 \rangle_S$ -Wert kleiner, als der in der vorliegenden Arbeit bestimmte. $\langle x^2 \rangle_T$ wäre dann gleich oder grösser als $8,6 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$.

Zum Abschluss untersuchen wir die Frage, welche Auswirkung dieses Ergebnis auf eine etwaige Strukturanalyse mit gekühlten Proteinkristallen haben könnte. In Tabelle 2 sind die Röntgen-Debye-Wallerfaktoren (als Amplitudenfaktoren) von Myoglobinkristallen bei Zimmertemperatur und bei 162°K nebeneinander gestellt. Zur Berechnung des Debye-Waller Faktors bei 162°K wurde der Schwingungsanteil gemäss den Mössbauerergebnissen reduziert, so dass sich ein $B(162^\circ\text{K}) = 5,0 \text{ \AA}^2$ ergibt.

Bei Proteinen wird sich also eine Verringerung des B -Faktors durch Abkühlung erst bei den hoch indizierten Reflexen bemerkbar machen. Wenn man annimmt, dass das Verhalten des Eisens repräsentativ für das ganze Molekül ist, erhält man im Amplitudenfaktor für den 38,0,0 Reflex einen Faktor 1,6 als Gewinn. Dies entspricht einem 2,6-fachen Intensitätsgewinn und einer entsprechenden Messzeitverkürzung. Wesentlich wird dieser Gewinn aber erst bei sehr grosser Auflösung. Es wurde schon oft versucht, bei Protein eine Intensitätsverbesserung durch Kühlung zu erreichen. In der Regel wurde die Intensität jedoch schlechter bzw. blieb höchstens gleich. Dies scheint von der Tatsache zu kommen, dass die Proteinkristalle beim Einfrieren stark geschädigt werden. Der Gewinn in B_T wird durch ein stark vergrössertes B_S überkompensiert.

Wir danken Herrn Prof. Mössbauer und Herrn Prof. Hoppe für die Unterstützung dieser Arbeit und für fruchtbare Diskussionen. Besonders danken möchten wir auch Herrn Dr. Huber für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Literatur

- BRESLOW, E. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 486.
 COMPTON, A. H. & ALLISON, S. K. (1935). *X-rays in Theory and Experiment* (2. Aufl.). New York: Van Nostrand 1935.
 CRUCKSHANK, D. W. J. (1956). *Acta Cryst.* **9**, 747.

Tabelle 2. Röntgen-Debye-Wallerfaktoren von Myoglobinkristallen

Reflex	$\sin \theta/\lambda$	$f_x^A (B=10,42 \text{ \AA}^2)$ Zimmer temperatur	$f_x^A (B=5,0 \text{ \AA}^2)$ Temperatur 162°K
1, 0, 0	0,00803	1	1
10, 0, 0	0,08032	0,935	0,968
20, 0, 0	0,16064	0,764	0,88
30, 0, 0	0,24096	0,548	0,75
38, 0, 0	0,30522	0,38	0,63

- FIGGIS, B. N., GERLOCH, M. & MASON, R. (1969) *Proc. Roy. Soc. A* **309**, 91.
- FISCHER, H. & PÜTZER, B. (1926). *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.* **154**, 39.
- FISCHER, H., TREIBS, A. & ZEILE, K. (1930). *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.* **193**, 1.
- GOLDANSKII, V. I. & HERBER, R. H. (1968). *Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy*. New York: Academic Press.
- HEBERLE, J. & FRANCO, S. (1968a). *Z. Naturforsch.* **23a**, 1439.
- HEBERLE, J. & FRANCO, S. (1968b). *Bull. Amer. Phys. Soc.* **13**, 60.
- JOHNSON, D. P. & DASH, J. G. (1968). *Phys. Rev.* **172**, 983.
- KENDREW, J. C. & PARRISH, A. G. (1956). *Proc. Roy. Soc. A* **238**, 305.
- KOENIG, D. F. (1965). *Acta Cryst.* **18**, 663.
- MÖSSBAUER, R. L. & SHARP, D. H. (1964). *Rev. Mod. Phys.* **36**, 410.
- MUIR, A. H., ANDOR, H. I. & COOGAN, H. M. (1966). *Mössbauer-Effect Data Index, 1958-1965*. New York: John Wiley.
- NUSSBAUM, R. H., HOWARD, D. G., NEES, W. L. & STEEN, C. F. (1968). *Phys. Rev.* **173**, 653.
- TEALE, F. W. J. (1959). *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 543.
- THEORELL, A. H. & AKESON, A. (1950). *Ann. Sci. Fenn. Ser. A II* **60**, 303.
- TRAMMELL, G. T. (1962). *Phys. Rev.* **126**, 1045.
- WATSON, H. C. (1970). Department of Biochemistry, Univ. of Bristol, private Mitteilung.
- WEGENER, H. (1965). *Der Mössbauereffekt*, BI Hochschultaschenbuch Nr. 2/2a.

Acta Cryst. (1971). **A27**, 578

A Method for Determining Stresses in Single Crystals by X-ray Diffraction

BY S'KENG PAN* AND ROLF WEIL

Department of Metallurgy, Stevens Institute of Technology, Hoboken, New Jersey 07030, U.S.A.

(Received 21 May 1970 and in revised form 25 March 1971)

A method for determining the stresses in single crystals similar to that generally used for polycrystalline samples is described. The method for single crystals is more complicated because of the need for accurate alignment and consideration of anisotropic elastic constants. Means for calculating and compensating for alignment errors are included. Stress values determined by this method are compared with those determined by other independent means.

Introduction

X-ray diffraction methods are widely used to determine stresses in polycrystalline solids. However, these methods have been applied successfully to single crystals in only a few instances and then either necessitated the employment of special equipment or were limited to certain types of samples. Pseudo-Kossel patterns obtained by means of microfocus X-ray units have been used successfully by Imura (1954, 1957) and by Imura, Weissmann & Slade (1962), Ellis, Nanni, Shrier, Weissmann, Padawer & Hosokawa (1964) and Slade, Weissmann, Nakajima & Hirabayashi (1965), to determine stresses in single-crystal samples. Stresses in a special type of specimen, a vapor-deposited metal film epitaxially grown on a sodium chloride monocrystal and still attached to it were measured by Freedman (1962). Newton (1964) used conventional X-ray equipment to measure stresses in individual crystals of a large-grained piece of aluminum. But as he neglected line shifts due to errors in alignment, his results were inconsistent. No general method for determining the

stresses of single crystals using conventional X-ray equipment existed prior to this study.

A procedure for determining the stresses from the shifts of X-ray diffraction lines of monocrystalline samples analogous to the widely used two-angle method was developed in connection with a study of the origins of internal stresses in electrodeposits. This method which only requires certain modifications of the generally available types of X-ray units and a special specimen holder is described here and has been named the 'two-plane method'.

The two-plane method differs from the two-angle method used for the determination of stresses in polycrystalline samples and described in almost all diffraction textbooks in two ways. The two-plane method of single crystals requires the determination of the Bragg angle from a set of planes ($h_0k_0l_0$) nearly parallel to the surface and from a second set of planes, ($h_1k_1l_1$) inclined at a definite angle, α .

The two-plane method differs from Bond's technique for precision lattice determination of single crystals in that the Bragg angle of the inclined plane ($h_1k_1l_1$) must also be determined. The alignment errors for Bond's method have been considered by Burke & Tomkeieff (1968). The evaluation of the alignment errors resulting

* Presently associated with Speedway Laboratory, Union Carbide Corp. Indianapolis, Indiana 46224.