

Untersuchung der Rekombinationskinetik von photodissoziiertem Myoglobin-CO bei tiefen Temperaturen mittels Mössbauer-Spektroskopie*

Investigation of the Recombination Kinetic of Photodissociated Myoglobin-CO at Low Temperatures by Mössbauer Spectroscopy

H. E. Marcolin, R. Reschke und A. Trautwein

Angewandte Physik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

(Z. Naturforsch. **32 c**, 683–695 [1977]; eingegangen am 16. Juni 1977)

Myoglobin, Mössbauer Spectroscopy, Recombination Kinetic

Myoglobin-CO (MbCO) has been photodissociated with white and monochromatic light at low temperatures (5–40 °K). The photoproduct Mb* was identified with Mössbauer spectroscopy as ferrous high-spin complex, with isomer shift and quadrupole splitting, which are similar to the corresponding parameters of deoxymyoglobin. From the time-dependent change of the linewidth of the Mb*-Mössbauer-spectrum at 5 °K over a time-intervall of 7 hours we conclude, that there exist several slightly different Mb*-conformations with different recombination characteristics. In order to obtain a convenient time resolution of the recombination behavior, we investigate the time-dependence of one of the Mb*-absorptionlines with a Mössbauer drive of constant velocity. The resulting recombination data then are analyzed in various steps of approximation. It is shown that at least two independent exponentials are necessary for the interpretation of experimental data. The attempt to interpret the experimental data on the basis of distribution of energies is in qualitative agreement with corresponding results, which are derived from optical recombination data by Austin *et al.* Typical activation energies for the recombination process $\text{CO} \rightarrow \text{Mb}^*$ are 2 kcal/mol. At low temperature ($T < 46$ °K) the recombination behavior is explained by quantum-mechanical tunneling.

1. Einleitung

Myoglobin-CO und -O₂ (MbCO, MbO₂) lassen sich photodissoziieren^{1–9}, d. h. durch Lichteinwirkung kann eine Trennung der Bindung Eisen-CO (bzw. Eisen-O₂) vollzogen werden. Die Rekombination der Liganden CO oder O₂ kann mit geeigneten Methoden, z. B. optischen Meßverfahren^{1, 4–9} verfolgt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der CO-Komplex des Myoglobins mittels der Mössbauer-Spektroskopie untersucht. Da die Funktion des Myoglobins mit dem Hämeisen aufs engste verknüpft ist, interessieren wir uns für die elektronische Struktur des Eisens und deren Änderungen mit der Ligandenbindung. Weil die Mössbauer-spektroskopie unter der Vielzahl der im Myoglobin enthaltenen Atome nur das Isotop ⁵⁷Fe „sieht“, dient in unserem Falle der Kern des Hämeisens als „Meßsonde“. Da bei physiologischen Temperaturen die Rekombinationsraten für eine Untersuchung mittels Mössbauer-Spektroskopie zu schnell – im Millisekundenbereich – verlaufen^{1, 4–8} und zudem die Mössbauer-Spektroskopie (von Ausnahmen ab-

gesehen) nur am Festkörper funktioniert, muß man die Untersuchungen bei tiefen Temperaturen vornehmen¹⁰. Im Temperaturbereich zwischen He-Siedepunkt (4,2 K) und N₂-Siedepunkt (77 K) sind die Rekombinationsvorgänge im Mb-CO-Komplex derart verlangsamt, daß sie Mössbauer-spektroskopisch verfolgt werden können. Wir entschieden uns für Untersuchungen am CO-Komplex, weil dort die Rekombinationsreaktionen langsamer ablaufen als beim O₂-Komplex⁴ und zudem die Quantenausbeute für die Photodissoziation des MbCO höher liegt als bei der Photodissoziation von MbO₂⁴.

2. Experimentelles Vorgehen

Als Ausgangssubstanz zur Herstellung von MbCO diente Metmyoglobin (Wal), das zu 90% mit ⁵⁷Fe angereichert war¹¹.

Mit dem ⁵⁷Fe-angereicherten MbCO wurden Lösungen mit destilliertem Wasser (pH 7) und Glycerin-Wasser (H₂O : Glycerin = 3 : 1) hergestellt. Die Konzentrationen betragen 5×10^{-3} mol/l (H₂O) bzw. 8×10^{-3} mol/l (Glycerin – Wasser). Die MbCO-Lösungen wurden in zylindrische Probengefäße aus Kupfer gefüllt; die effektive Probenstärke betrug dabei 3 mm und ihr Durchmesser 10 mm. Die Stirnflächen waren durchlässig für Gamma-Strahlen und Lichtstrahlen und schlossen

* Gefördert durch Deutsche Forschungsgemeinschaft. Sonderdruckerfordernungen an Prof. Dr. A. Trautwein, Universität des Saarlandes, Fachbereich 12.1, Angewandte Physik, D-6600 Saarbrücken 11.



das Probenvolumen mittels Indiumdichtungen vakuumdicht ab. Die Proben wurden nach der Herstellung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Vergleich zur Probe, die destilliertes Wasser als Lösungsmittel enthält, zeichnete sich die Probe, bei der Glycerin-Wasser als Lösungsmittel verwendet wurde, durch höhere Transparenz für sichtbares Licht aus.

Die Proben wurden in einem temperaturregulierten Kryostaten (Oxford-Instruments) eingebaut, der auf 77 K (N_2 -Siedetemperatur) vorgekühlt war und dann auf die gewünschte Temperatur abgekühlt werden konnte. Zur Bestrahlung der Proben standen eine Projektorlampe von 300 W (Siemens Nr. 588581 E) und eine Xenon-Hochdrucklampe von 450 W (Osram XBO 450) zur Verfügung. Der Lichtstrahl gelangte über einen Spiegel aus Al-Mylarfolie zur Probe. Bei den Experimenten mit dem Gesamtspektrum der Lampen betrug die Bestrahlungszeit der Probe im allgemeinen viermal eine Minute, wobei die Erwärmung der Probe kleiner als 0,25 K blieb. Um den Einfluß verschiedener Wellenlängen auf die Photodissoziation zu studieren, wurden Interferenzfilter mit den Durchlaßwellenlängen $\lambda_1 = 4200 \pm 100 \text{ \AA}$ und $\lambda_2 = 5100 \pm 100 \text{ \AA}$ in den Strahlengang gebracht. Diese monochromatischen Bestrahlungsexperimente wurden mit der Xenon-Lampe ausgeführt. Die Bestrahlungszeit betrug hierbei eine Stunde bzw. zwei Stunden. Eine Erwärmung der Probe war hierbei nicht meßbar.

Die Mössbauer-Spektren wurden in einer horizontalen Aufstellung von Quelle, Absorber und Detektor aufgenommen. Es wurden folgende Quellen benutzt: 50 mCi Rh und 25 mCi Pd. Die beschriebene experimentelle Anordnung zeigt Abb. 1. Bei

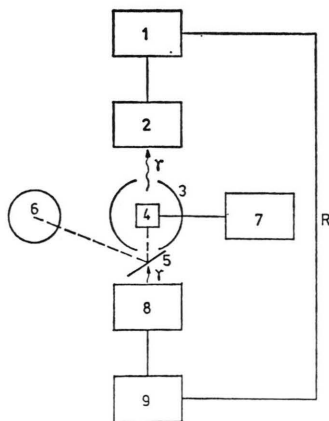


Abb. 1. Experimentelle Anordnungen. 1, Vielkanal; 2, Detektor; 3, Kryostat; 4, Probe; 5, Umlenkspiegel; 6, Lichtquelle; 7, Temperaturregelung; 8, Antrieb; 9, Antriebs-elektronik; R, Rückkopplung.

unseren Untersuchungen wurden zwei verschiedene Mössbauer-Antriebssysteme verwendet: ein Antrieb mit konstanter Beschleunigung (Fehler $\pm 3\%$ in der Geschwindigkeit) und ein Antrieb mit einstellbarer konstanter Geschwindigkeit (Fehler $\pm 2\%$). Den Spektren, die mit dem Antrieb konstanter Beschleunigung aufgenommen wurden, wurde mit der Methode kleinster Fehlerquadrate eine theoretische Lorentz-Kurve mathematisch angepaßt (Fit), um die Parameter Quadrupolaufspaltung (ΔE_Q), Isomerieverschiebung (δ), Linienbreite (Γ) und Meßeffekt zu erhalten.

Mit dem Antrieb konstanter Beschleunigung erhält man ein Mössbauer-Spektrum über einen vorgegebenen Geschwindigkeitsbereich. Die Zählrate wird auf mehrere Kanäle verteilt, in unserem Falle 400 (Vielkanal-Analysator der Firma Frieske und Höpfner). Untersuchungen der zeitabhängigen Rekombination von CO mit Myoglobin unter Verwendung dieses Antriebs stoßen auf Schwierigkeiten, da Meßzeiten von im allgemeinen einer Stunde erforderlich sind, um ein volles Spektrum mit 400 Kanälen bei hinreichend genauer Statistik aufzunehmen. Eine zeitliche Auflösung von Vorgängen, die sich während dieser Zeit abspielen, ist damit nicht möglich. Will man zeitlich veränderliche Abläufe verfolgen, muß man ein Verfahren benutzen, das in kürzeren Zeiten die notwendigen Informationen liefert. Durch einen Antrieb mit konstanter Geschwindigkeit können die vorgenannten Schwierigkeiten umgangen werden; denn dadurch gelangt die gesamte Zählrate in nur einen Kanal, der mit der interessierenden Geschwindigkeit v im Mössbauer-Spektrum verknüpft ist. Man kann dadurch wesentlich kürzere Zeiten – in unserem Fall bis zu zwei Minuten – für die Messung erreichen. Will man die zeitliche Veränderung einer Mössbauer-Linie und damit das Probenverhalten studieren, so wird die Geschwindigkeit v an der Apparatur eingestellt und in jeweils fest einstellbaren Zeitintervallen (z. B. zwei Minuten) die Zählrate der Gammastrahlen, die bei v die Probe transmittieren, ausgedruckt.

3. Auswertung der Meßergebnisse

3.1. Antrieb mit konstanter Beschleunigung

Die Ergebnisse der Messungen mit dem Antrieb konstanter Beschleunigung sind in Tab. I zusammengefaßt. Einige repräsentative Spektren, von denen die Mössbauer-Parameter der Tab. I durch Computerfit resultieren, sind in Abb. 2 dargestellt. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, daß nach der Belichtung des MbCO ein zusätzliches Linienpaar (Mb^*) auftritt, dessen Werte (Nr. 3–8 in Tab. I)

Tab. I. Experimentelle Mössbauer-Parameter von Deoxymyoglobin (Mb), Myoglobin-CO (MbCO) und des durch Photodissoziation entstandenen Komplexes Mb*.

Nr.	<i>T</i> [K]	Substanz	Quadrupol- aufspaltung ΔE_Q [mm s ⁻¹]	Linienbreite Γ [mm s ⁻¹]	Isomerie- verschiebung δ [mm s ⁻¹]	Meßeffekt A_v/A_∞ [%]	Lösungs- mittel	Bemerkungen
1	4,2	Mb	2,174 ± 0,004	0,429 ± 0,006	0,921 ± 0,009	6,8 ± 0,1	dest. H ₂ O, pH = 7	Meßzeit 20 h
2	5	MbCO	0,370 ± 0,005	0,282 ± 0,008	0,278	9,6 ± 0,2	Glycerin- Wasser, pH = 7	Meßzeit 16 h
3	5	Mb*	2,27 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,89 ± 0,03	2,0 ± 0,2	dest. H ₂ O, pH = 7	Meßzeit 1 h, Be- strahlzeit 5 min
4	5	MbCO	0,35 ± 0,01		0,27 ± 0,02	4,5 ± 0,2		
4	5	Mb*	2,14 ± 0,03	0,390 ± 0,008	0,93 ± 0,04	1,2 ± 0,1	Glycerin- Wasser, pH = 7	Meßzeit 7 h, Be- strahlzeit 4 min
		MbCO	0,355 ± 0,004		0,28 ± 0,02	5,9 ± 0,3		
5	46	Mb*	2,25 ± 0,02	0,310 ± 0,009	0,89 ± 0,04	1,9 ± 0,2	Glycerin- Wasser, pH = 7	Meßzeit 9- h, Messung nach Nr. 4 durchgeführt
		MbCO	0,368 ± 0,005		0,28 ± 0,02	6,8 ± 0,2		
6	5	Mb*	2,19 ± 0,02	0,402 ± 0,020	0,96 ± 0,03	1,8 ± 0,2	Glycerin- Wasser, pH = 7	Meßzeit 6 h, Be- strahlzeit 1 h, $\lambda = 5100 \text{ \AA}$
		MbCO	0,339 ± 0,008		0,29 ± 0,02	5,0 ± 0,2		
7	5	Mb*	2,25 ± 0,10	0,382 ± 0,005	0,95 ± 0,10	0,5 ± 0,2	Glycerin- Wasser, pH = 7	Meßzeit 13 h, Bestrahlzeit 1 h, $\lambda = 4200 \text{ \AA}$
		MbCO	0,354 ± 0,005		0,27 ± 0,01	6,8 ± 0,2		
8	4,2	Mb*	2,191 (a) 2,330 (b)	0,31 0,19	0,888 0,888		Phosphat- puffer, pH = 7	Spartalian <i>et al.</i> ¹ . Probe auf jeder Seite 2 min bestrahlt mit 150 W; ausge- wertet (a) mit Lorentz-Kurven, (b) Voigt-Kurven.

denen des Linienpaares des deoxygenierten Myoglobins (Mb) (Nr. 1 in Tab. I) ähnlich sind. Hält man die belichtete Probe eine Stunde auf 77 K, so wird nur noch die Ausgangssubstanz MbCO gemessen; demnach hat eine vollständige Rekombination der CO-Moleküle mit Mb* stattgefunden. Das Linienpaar, das durch die Photodissoziation bei 5 K entsteht, besitzt einen Meßeffekt A_v/A_∞ von ca. 2% im Mössbauer-Spektrum der Abb. 2 c gegenüber ca. 5% des MbCO-Linienpaares. Der Quotient A_v/A_∞ bedeutet: „Zählrate bei Resonanzgeschwindigkeit dividiert durch Zählrate bei Nicht-Resonanzgeschwindigkeit.“ Ungefähr die gleichen Intensitätsverhältnisse sind noch bei 46 K zu sehen, wenn nach Hochheizen auf diese Temperatur (ca. 1–2 h) die Mössbauer-Messung ca. 9 Stunden dauert (Abb. 2 d, Nr. 5 in Tab. I). Größere Werte des Meßeffectes wurden nicht beobachtet.

Bestrahlt man die Probe mit Licht der Wellenlänge $5100 \pm 1000 \text{ \AA}$, so findet man im wesentlichen das gleiche Mb*-Spektrum wie bei der Bestrahlung mit dem Gesamtspektrum der Xenon-Lampe (Nr. 6 in Tab. I). Hierzu wurde zunächst eine Belichtungs-

zeit von einer Stunde gewählt, da die Intensität des Lichtstrahls bei Verwendung einer Linie mit Breite 200 \AA wesentlich geringer ist als die Lichtintensität, die mit dem Gesamtspektrum der Lampe eingestrahlt werden kann. Die Erhöhung der Belichtungszeit auf zwei Stunden erhöhte die Rate der weggeblitzten CO-Moleküle nicht. Läßt man dagegen Licht der Wellenlänge $4200 \pm 100 \text{ \AA}$ während einer Stunde auf die Probe auftreffen (Nr. 7 in Tab. I), so ergibt sich für das Linienpaar Mb* ein Meßeffect von ca. 0,5%. Eine Erhöhung der Belichtungszeit auf zwei Stunden ändert an der Größe dieses Effektes innerhalb des Meßfehlers nichts. Aus der Literatur ist bekannt⁵, daß für dünne Proben die Quantenausbeute bei 296 K für Licht des Wellenlängengebietes $2800 \text{ \AA} - 5460 \text{ \AA}$ für MbCO gleich ist. Da unsere Proben eine effektive Dicke von 3 mm besitzen, ist anzunehmen, daß der unterschiedliche Meßeffect bei $5100 \pm 100 \text{ \AA}$ und $4200 \pm 100 \text{ \AA}$ durch das optische Absorptionsspektrum der Probe im Sichtbaren bedingt ist. Bei 4100 \AA in der Nähe der Soret-Bande zeigt MbCO eine starke optische Absorption; bei 5100 \AA dagegen befindet sich ein

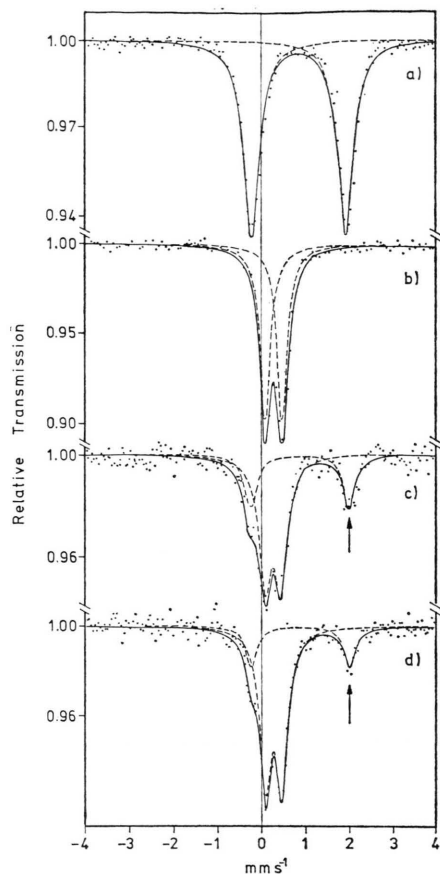


Abb. 2. Experimentelle Mössbauer-Spektren von (a) Mb bei 4,2 K (Nr. 1 in Tab. I), (b) MbCO bei 5 K vor der Bestrahlung mit weißem Licht (Nr. 2 in Tab. I), (c) MbCO bei 5 K nach der Bestrahlung mit weißem Licht (Nr. 3, 4 in Tab. I) und (d) MbCO bei 46 K nach der unter (c) beschriebenen Messung (Nr. 5 in Tab. I). Der Pfeil in (c) und (d) gibt die Geschwindigkeit v an, die mit dem Mössbauer-Antrieb zur Messung der Rekombination von CO mit Mb* eingestellt wurde.

Absorptionsminimum, was eine größere Eindringtiefe der Photonen zur Folge haben kann.

Wie aus den Parametern in Tab. I ersichtlich ist, zeigen die ΔE_Q Werte des Mb* (destilliertes H₂O) leicht erhöhte Werte, um etwa $0,1 \text{ mm s}^{-1}$, im Verhältnis zur deoxygenierten Substanz. Die δ -Werte tendieren zu kleineren Werten. Die Parameter von Mb* (Glycerin-H₂O) sind vergleichbar mit denen von Mb. Zum Vergleich sind die Parameter für Mb* gemessen von Spartalian *et al.*¹¹ ebenfalls in Tab. I (Nr. 8) aufgeführt.

Photodissoziation konnte nicht nur bei 5 K festgestellt werden. Unsere Experimente zeigen, daß

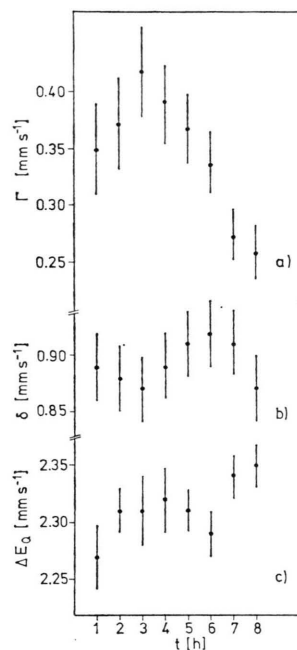


Abb. 3. Experimentelle Mössbauer-Parameter bei 5 K des Mb* Spektrums in Abhängigkeit von der Meßzeit nach der Bestrahlung der MbCO Probe mit weißem Licht; nach jeder Stunde wurde ein neues Spektrum aufgenommen. (a) Linienbreite, (b) Isomerieverschiebung, (c) Quadrupolaufspaltung.

noch bei 30 K Mb* nach einer Belichtung der Probe auftaucht, und zwar mit dem gleichen Meßeffekt von ca. 2% innerhalb der Fehlergrenze wie bei 5 K. Jedoch schon bei 45 K läßt sich kein Mb* mehr nach Abblitzen von CO bei dieser Temperatur Mössbauer-spektroskopisch feststellen, obwohl nach einer bei 5 K durchgeführten Photodissoziation und anschließendem Hochheizen auf 46 K Mb* nachweisbar ist. Möglicherweise hängt dies mit einer erhöhten Beweglichkeit des CO-Moleküls sofort nach der Photodissoziation bei der höheren Temperatur von 45 K zusammen. Dadurch vermögen die CO-Moleküle mit dem Hämesein wahrscheinlich relativ schnell zu rekombinieren, in einer Zeit, die mit unserem Meßverfahren nicht mehr zu erfassen ist.

Verfolgt man die Linienbreite der Mb*-Mössbauer-Linie über sieben Stunden bei 5 K, so stellt man eine Abnahme der Breite Γ fest (Abb. 3 a). In der gleichen Abbildung ist zusätzlich das zeitliche Verhalten der Isomerieverschiebung δ (Abb. 3 b) und der Quadrupolaufspaltung ΔE_Q (Abb. 3 c) dargestellt.

3.2. Antrieb mit konstanter Geschwindigkeit

Abb. 4 veranschaulicht die Zeitabhängigkeit des Meßeffectes A_V/A_∞ von Mb* unter Verwendung des Antriebs mit konstanter Geschwindigkeit. Unmittelbar nach dem Bestrahlen beträgt der Effekt ca. 2%, danach rekombiniert das CO an das Mb*, wobei der Effekt von Mb* abnimmt. In Abb. 5 sind die Meßwerte von A_V/A_∞ und Bestkurven für vier verschiedene Temperaturen aufgetragen. (Die Ermittlung der Bestkurven wird im folgenden Kapitel beschrieben.) Im Temperaturintervall zwischen 5 K und 46 K ändert sich über einen Zeitraum von ca. 12

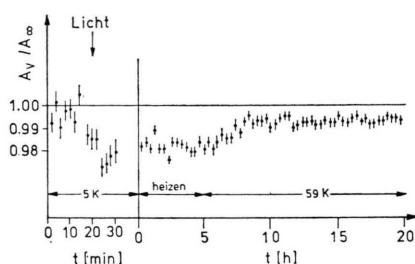


Abb. 4. Zeitabhängigkeit des Meßeffectes A_V/A_∞ der in Abb. 2 c durch einen Pfeil gekennzeichneten Mb*-Absorptionslinie unter Verwendung eines Mössbauer-Antriebs mit konstanter Geschwindigkeit.

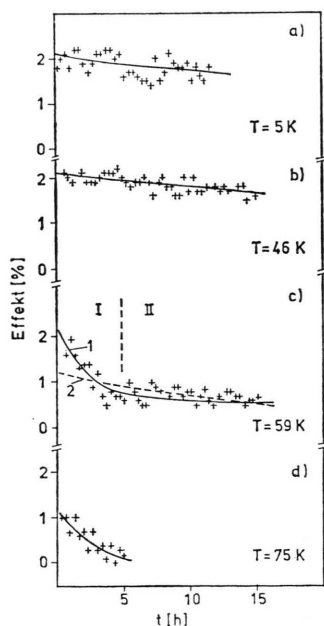


Abb. 5. Zeitabhängigkeit des Meßeffectes $1 - A_V/A_\infty$ der in Abb. 2 c durch einen Pfeil gekennzeichneten Mb*-Absorptionslinie bei verschiedenen Temperaturen. (Die eingezeichneten Kurven folgen aus der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen zeitabhängigen Auswertung des Meßeffectes.)

Stunden der Meßeffect nur unwesentlich; bei 59 K und höheren Temperaturen dagegen nimmt er deutlich ab, jedoch bleibt über einen Zeitraum von mehr als zehn Stunden ein Resteffect von ca. $0,5\% \pm 0,2\%$ bestehen. Erst bei Hochheizen der Probe auf 75 K erfolgt eine vollständige Rekombination, wobei die Probe fünf Stunden bei dieser Temperatur gehalten wurde.

3.2.1. Zeitabhängige Auswertung

Um das Rekombinationsverhalten von Mb* mit CO zu untersuchen, greifen wir auf die Theorie der Reaktionskinetik zurück. Nach dieser Theorie¹²⁻¹⁴ gehorchen im allgemeinen monomolekulare Reaktionen einem Gesetz erster Ordnung. Es gilt dann folgender funktionaler Zusammenhang:

$$\frac{dN}{dt} = -kN, \quad (1)$$

wobei t die Reaktionszeit, k die Rekombinationsrate (Geschwindigkeitskonstante) und N die Wahrscheinlichkeit * bedeuten, einen bestimmten Zustand des Moleküls anzutreffen. Die Lösung dieser Differentialgleichung lautet:

$$N(t) = N_0 \exp(-kt). \quad (2)$$

N_0 bedeutet dabei die Wahrscheinlichkeit bei $t = 0$. Gehorcht unser gemessener Reaktionsverlauf einem Gesetz erster Ordnung, müßten die Meßwerte in Abb. 4 und 5 mit einer Exponentialfunktion gefittet werden können. Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, gelingt dies bei 5 K und 46 K, nicht mehr jedoch bei 59 K und höheren Temperaturen, wo wir eine systematische Abweichung einer einzelnen gefitteten Exponentialfunktion (Kurve 2 in Abb. 5 c) von den Meßwerten beobachten. Man kommt daher mit der Annahme einer einfachen Reaktion erster Ordnung nicht aus. Auf Grund der Messungen bei $T \geq 55$ K können wir mindestens zwei Teilreaktionen beobachten, wie es in Abb. 5 c für $T = 59$ K gezeichnet ist. Einer der beiden Rekombinationsprozesse ist charakterisiert durch den starken Abfall im Bereich I und ein zweiter, langsamerer durch den schwachen Abfall im Bereich II.

Vor der Lichteinstrahlung ist das CO-Molekül an das Hämeisen gebunden (Platz A in Abb. 6 a). Durch die Lichteinstrahlung wird die Bindung aufgebrochen, und das CO-Molekül gelangt an eine

* Die Wahrscheinlichkeit entspricht der Zahl der Teilchen, die sich in einem bestimmten Zustand befinden, wobei die Gesamtteilchenzahl auf Eins normiert ist.

Stelle B oder C in der Hämtasche (Abb. 6 b). Beide Plätze korrespondieren mit den Spektren von Mb*, d. h. bezüglich beiden Plätzen B und C sitzt das CO relativ weit vom Eisen entfernt. Zur Rekombination gibt es folgende Möglichkeiten: einmal den Übergang von B nach A, dann den Übergang von C nach A über B und den Übergang von C sofort nach A. Im allgemeinsten Fall kann man ein Reaktionsschema wie in Abb. 7 angeben.

Bezeichnet N_a die Wahrscheinlichkeit, das CO-Molekül in A anzutreffen und N_b bzw. N_c die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten für die Plätze B und C, dann lassen sich die zeitlichen Änderungen der Wahrscheinlichkeiten allgemein durch folgende Gleichungen angeben, wenn man die Teilreaktionen dabei als Reaktion erster Ordnung betrachtet:

$$\begin{aligned}\frac{dN_a}{dt} &= -k_{ab} N_a - k_{ac} N_a + k_{ab} N_b + k_{ca} N_c, \\ \frac{dN_b}{dt} &= k_{ab} N_a - k_{ba} N_b - k_{bc} N_b + k_{cb} N_c, \\ \frac{dN_c}{dt} &= k_{ac} N_a + k_{bc} N_b - k_{cb} N_c - k_{ca} N_c.\end{aligned}\quad (3)$$

Die Größe dN_a/dt ist Mössbauer-spektroskopisch durch die zeitliche Änderung des Meßeffektes A_v/A_∞

der in Abb. 2 c mit einem Pfeil gekennzeichneten Absorptionslinie meßbar:

$$\frac{dN_b}{dt} + \frac{dN_c}{dt} = -\frac{dN_a}{dt} = 1 - \frac{A_v}{A_\infty}. \quad (4)$$

Da wir nur Reaktionen nach der Lichteinstrahlung betrachten wollen und zudem bekannt ist, daß MbCO selbst bei 300 K stabil ist, d. h. die thermische Energie im Vergleich zu der für den Übergang $A \rightarrow B$ und $A \rightarrow C$ notwendigen Aktivierungsenergie sehr klein ist, sind die Konstanten k_{ab} und k_{ac} hier null. Unter Verwendung von $k_{ab} = k_{ac} = 0$ und mit den Definitionen

$$N = \begin{pmatrix} N_a \\ N_b \\ N_c \end{pmatrix}, \quad M = \begin{pmatrix} 0 & k_{ba} & k_{ca} \\ 0 & -(k_{ba} + k_{bc}) & k_{cb} \\ - & k_{bc} & -(k_{cb} + k_{ca}) \end{pmatrix}, \quad (5)$$

erhalten wir für das in Gl. (3) angegebene Differentialgleichungssystem in vektorieller Schreibweise:

$$\frac{dN}{dt} = M N. \quad (6)$$

Die Lösung dieses gekoppelten Differentialgleichungssystems kann angegeben werden durch (20)

$$N(t) = \sum_{i=1}^3 w_i v_i \exp(-\lambda_i t), \quad (7)$$

wobei die w_i Entwicklungskoeffizienten sind und die v_i und λ_i Eigenvektoren und Eigenwerte der Gleichung:

$$(M - \lambda_i E) v_i = 0. \quad (8)$$

Ein Eigenwert λ_m ist Null, da eine Spalte in M (wegen der Bedingung $k_{ab} = k_{ac} = 0$) Null ist. Unser Problem reduziert sich damit auf:

$$N(t) = \sum_{i=1}^2 w_i v_i \exp(-\lambda_i t). \quad (9)$$

Der Zusammenhang zwischen der Lösungsfunktion [Gl. (9)] und den mit zwei Rekombinationsprozessen erkläraren Meßdaten (siehe Abb. 5 c) ist gegeben durch:

$$\begin{aligned}N_{\text{exp}}(t) &= \left(1 - \frac{A_v(t)}{A_\infty}\right) = w_1(v_1^b + v_1^c) \exp(-\lambda_1 t) \\ &\quad + w_2(v_2^b + v_2^c) \exp(-\lambda_2 t) \\ &= A_1 \exp(-\lambda_1 t) + A_2 \exp(-\lambda_2 t).\end{aligned}\quad (10)$$

Es ist möglich, A_1 , A_2 , λ_1 und λ_2 aus den gemessenen Werten N_{exp} durch ein iteratives Verfahren

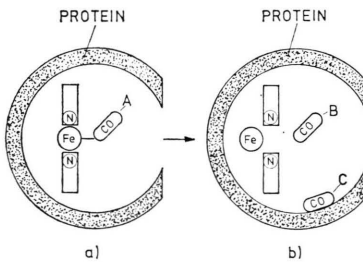


Abb. 6. Modell der Hämtasche im Myoglobin. (a) MbCO vor der Bestrahlung mit Licht; das Fe befindet sich in der Hämebene. (b) Nach der Belichtung ist die Fe-CO-Bindung aufgebrochen, das Fe ist aus Hämebene heraus zum proximalen Histidin hin verschoben, und das CO kann (bei tiefen Temperaturen) die schematisch angedeuteten Plätze B oder C in der Hämtasche einnehmen.

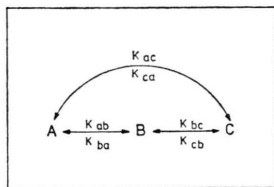


Abb. 7. Reaktionsmöglichkeiten des CO-Moleküls in der Hämtasche des Myoglobins bei tiefen Temperaturen. (Die Plätze A, B und C sind in Abb. 6 erläutert.)

zu gewinnen. (Das Verfahren ist im Anhang beschrieben.) Will man aus den bestimmaren Größen die fehlenden Werte — es interessieren die k -Werte (Rekombinationsraten) der Gl. (5) — berechnen, erhält man weniger Gleichungen, als Unbekannte vorhanden sind. Wir haben nämlich zwei unbekannte Koeffizienten (w_1, w_2), vier unbekannte Komponenten von Eigenvektoren ($v_1^b, v_2^b, v_1^c, v_2^c$) und vier unbekannte k -Werte ($k_{ba}, k_{bc}, k_{cb}, k_{ca}$), zusammen zehn Unbekannte. Dem stehen als bekannt gegenüber die aus der Anpassung an das Experiment folgenden beiden Eigenwerte (λ_1, λ_2), die beiden Vorfaktoren der Iteration (A_1, A_2), sowie die Bedingung der Orthogonalität und der Normierung der Eigenvektoren. Um das Problem lösbar zu machen, führen wir zusätzliche Annahmen ein: Wir setzen $k_{cb} = k_{bc} = 0$. Diese Annahme scheint sinnvoll im Hinblick auf folgendes von Austin^{8, 16} durchgeführtes Experiment; dabei wurde eine MbCO-Probe alle 18 Sekunden mit einem Laserblitz bestrahlt. Anschließend wurde jeweils die Rekombination gemessen. Dabei ging das Signal der photodissoziierten Substanz jeweils auf den gleichen Wert zurück. Gäbe es Übergänge von CO zwischen unterschiedlichen Plätzen B und C (mit unterschiedlichen Konstanten $k_{cb} \neq k_{bc}$), dürfte das Signal nicht nach gleicher Rekombinationszeit den gleichen Wert annehmen. Zudem ist zu beachten, daß sich in einer Häm Tasche nur ein CO aufhält, d. h. die Rekombination findet jeweils in verschiedenen Häm-Taschen für die verschiedenen CO-Moleküle statt.

Mit $k_{cb} = k_{bc} = 0$ wird M in Gl. (5) eine Diagonalmatrix. Wir können jetzt λ_1 und λ_2 mit k_{ba} bzw. k_{ca} , A_1 mit $N_b(0)$ und A_2 mit $N_c(0)$ identifizieren.

Aus den Meßwerten $N_{\text{exp}}(t)$ erhält man dann für die verschiedenen Temperaturen T die Reaktionskonstanten, die in Tab. II zusammengestellt sind. Wie man sieht, ändert sich das Verhältnis $A_1 : A_2$, d. h. das Besetzungsverhältnis von Platz B zu C, mit der Temperatur.

3.2.2. Temperaturabhängige Auswertung

Reaktionsraten sind von der Temperatur abhängig. Im allgemeinen folgt die Geschwindigkeitskonstante $k(T)$ dem Arrhenius-Gesetz¹³

$$k(T) = A \exp(-\Delta E/RT), \quad (11)$$

wobei A ein Frequenzfaktor ist, der ein Maß für die Versuche darstellt, den Potentialberg zwischen zwei Reaktionszuständen zu überwinden. ΔE ist die zur Überwindung nötige Aktivierungsenergie, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Trägt man die in Tab. II enthaltenen Werte von k

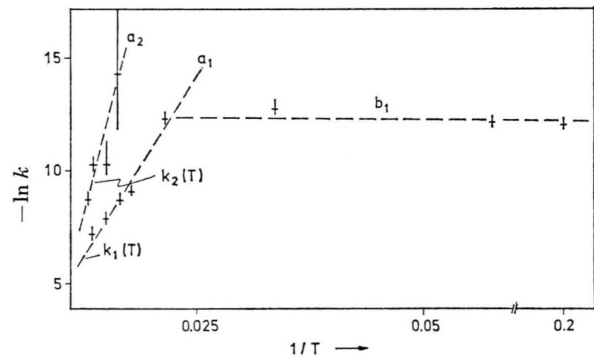


Abb. 8. Temperaturabhängigkeit der aus dem Mb*-Meßeffect $A_V(t, T)/A_\infty$ bestimmten Rekombinationsraten k_i (vgl. Tab. II).

T [K]	Rekombinations- rate k_1 [s ⁻¹]	Rekombinations- rate k_2 [s ⁻¹]	Besetzung der Plätze B und C	Anzahl der zur Auswertung von A_V/A_∞ verwen- deten Exponen- tialfunktionen
5	$5,0 \pm 1,7 \times 10^{-6}$	—	—	1
17	$4,7 \pm 1,2 \times 10^{-6}$	—	—	1
30	$2,5 \pm 0,9 \times 10^{-6}$	—	—	1
46	$4,1 \pm 0,6 \times 10^{-6}$	—	—	1
55	$9,3 \pm 1,5 \times 10^{-5}$	—	—	1
59	$1,6 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-7} \pm 6,0 \times 10^{-6}$	$A_1 = 0,66 \pm 0,09,$ $A_2 = 0,33 \pm 0,08$	2
65	$3,1 \pm 1,3 \times 10^{-4}$	3,1	$\pm 2,1 \times 10^{-5}$ $A_1 = 0,55 \pm 0,16,$ $A_2 = 0,46 \pm 0,17$	2
72	$6,8 \pm 2,5 \times 10^{-4}$	3,0	$\pm 0,8 \times 10^{-5}$ $A_1 = 0,43 \pm 0,19,$ $A_2 = 0,57 \pm 0,18$	2
75	—	1,5	$\pm 0,5 \times 10^{-4}$	1

Tab. II.
Ergebnis der zeitabhängi-
gen Auswertung des
Mb*-Meßeffectes
 $A_V(t)/A_\infty$ (siehe
Kapitel 3.2.1).

Tab. III. Gegenüberstellung von ΔE - und $\Delta S/R$ -Werten aus der Literatur mit eigenen Ergebnissen.

Literatur	Temperaturbereich [K]	ΔE [kcal/mol]	$\Delta S/R$	Mb-Menge [μM]	Zeitbereich [s]	Lösungsmittel	Meßmethode	Belichtung	Bemerkungen
Austin <i>et al.</i> (Ref. 8)	4,2–150	$2,4 \pm 0,3$	$-9,9 \pm 1$	200	$10^{-6} - 10^3$	Glyzerin-Wasser (Mischungsverhältnis 3 : 1)	Absorption bei der Soret-Bande	2×10^{-6} s Blitze bei 5900 Å	ΔE -Werte entsprechen der Peaklage der Energieverteilungskurve
Iizuka <i>et al.</i> (Ref. 6)	4,2–70	$1,4 \pm 0,15$ $0,124$ $0,124$	$-12,2 \pm 1,2$ $-28,1$ $-30,6$	200 4	$10^{-6} - 10^3$ $10^{-3} - 10^2$	PVA dest. H ₂ O	Absorption im Sichtbaren und Infraroten	2×10^{-6} s Blitze, weißes Licht	Auswertung auf der Grundlage zweier unabhängiger Exponentialfunktionen [siehe Gl. (12)]
eigene Messung	5 – 77	$1,3 \pm 0,3$ $2,9 \pm 1,4$	$-29,9 \pm 1$ $-18,0 \pm 7$	5	$10^3 - 5 \times 10^4$	Glyzerin-Wasser (Mischungsverhältnis 3 : 1)	Mössbauer-Effekt	4 min weißes Licht	

logarithmisch gegen $1/T$ auf (Abb. 8), so kann man ΔE aus der Steigung und den Frequenzfaktor A aus dem Ordinatenabschnitt der Geraden erhalten. (Entsprechende Ergebnisse sind in Tab. III zusammengefaßt.) Auf die horizontale Gerade b_1 in Abb. 8 wird unter 3.2.4 eingegangen.

3.2.3. Alternative Auswertung

Die Geschwindigkeitskonstanten $k(T)$ können neben der Beschreibungsweise der Gl. (11) auch anders dargestellt werden, gemäß der Theorie der Übergangszustände¹². Danach gilt

$$k(T) = \nu \exp(-\Delta G/RT), \quad (12)$$

wobei ΔG die Änderung der freien Enthalpie und ν ein Frequenzfaktor ist, der bei Reaktionen erster Ordnung mit 10^{13} angegeben wird¹². Mit

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (13)$$

ergibt sich aus Gl. (12):

$$k(T) = \nu \exp(\Delta S/R) \exp(-\Delta H/RT). \quad (14)$$

Ein Vergleich der Gl. (11) und (14) ergibt:

$$A = \nu \exp(\Delta S/R) \quad \text{und} \quad \Delta E = \Delta H. \quad (15)$$

Die entsprechenden numerischen Werte für $\Delta S/R$ und ΔE sind in Tab. III zusammengefaßt und werden mit Literaturdaten verglichen. Aus diesem Vergleich ist ersichtlich, daß sowohl die Arbeiten von Austin *et al.*⁸ und Iizuka *et al.*⁶ wie die eigenen Messungen für $\Delta S/R$ einen negativen Wert ergeben. Hieraus läßt sich folgern, daß der Zustand der Bin-

dung des CO am Eisen der geordnetere ist, wenn das CO-Molekül rekombiniert hat.

3.2.4. Tunneleffekt

Will ein Teilchen von Potentialmulde B zur Potentialmulde A (Abb. 9) gelangen, muß es im allgemeinen eine ausreichende Aktivierungsenergie besitzen, um den Potentialwall zu überwinden. Das Teilchen kann jedoch auch durch den Potentialwall tunnelt. Elektronen tunnelt z.B. bei der Photosynthese¹⁷. Das Tunnelt von Molekülen tritt auf bei der strahleninduzierten Polymerisation von Formaldehyd^{18, 19}. Genau wie der klassische Vorgang nach Arrhenius, kann das Tunnelt temperaturabhängig sein, wird jedoch im Grenzfall $T \rightarrow 0$ temperaturunabhängig^{19, 20}. Beim Experiment ist der Tunneleffekt daran zu erkennen, daß die Rekombinationsraten $k(T)$ bei $T \rightarrow 0$ nahezu konstant bleiben. Dieses Verhalten zeigt sich in unserem

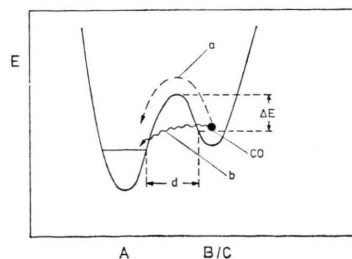


Abb. 9. Abhängigkeit des Potentials E vom Platz (siehe Abb. 6), an dem sich das CO-Molekül in der Hämtasche befindet. Der Reaktionsweg a (b) entspricht dem Arrhenius-Gesetz (Tunneltvorgang).

Fälle im Temperaturbereich $5\text{ K} < T < 46\text{ K}$ (vgl. Abb. 8). In diesem Temperaturbereich müßte eine wesentlich geringere Rekombinationsrate (mehrere Zehnerpotenzen) auftreten, wenn das Rekombinationsverhalten allein dem Arrhenius-Gesetz folgen würde.

Zur Interpretation der Reaktionskonstanten im erwähnten Temperaturbereich ($5 - 46\text{ K}$) wird ein dreidimensionaler, kugelförmiger Potentialwall angenommen, der in r -Richtung eine rechteckige Form aufweist. Die Reaktionskonstante wird dann beschrieben²¹ durch:

$$k = A_t \exp\left(-\frac{2}{\hbar} \sqrt{2m(U-E)}d\right). \quad (16)$$

Dabei ist A_t die Zahl der „Stöße“ auf den Potentialwall pro Sekunde. Der Exponentialausdruck stellt die Durchlässigkeit des Walls dar (U : Potentialhöhe, E : Teilchenenergie, d : Dicke des Potentialberges, m : Masse des Teilchens). Man sieht aus Gl. (16), daß bei bekanntem k und unbekanntem Potentialverlauf die Größe A_t bestimmt werden kann oder bei bekannten k und A_t die Breite d des Potentialwalles ermittelt werden kann. Bei dieser Art der Behandlung des Rekombinationsvorgangs wird angenommen, daß das CO-Molekül radial auf das Zentrum (Fe) zuläuft und dabei den Potentialwall durchtunnelt. Streuung wird vernachlässigt. Betrachtet man das CO in der Hämtasche als freies Gas, so kann man schreiben²¹

$$A_t = v_0/2 r_0, \quad (17)$$

wobei v_0 aus der kinetischen Gastheorie abgeleitet werden kann. Diese Abschätzung ergibt einen maximalen Wert für A_t , da bei unserem Experiment das CO-Molekül wahrscheinlich behindert sein wird. r_0 gibt den Radius des kugelförmigen Potentials an. Man erhält bei 5 K für $r_0 = 5\text{ Å}$ (Hämtasche) für A_t einen Wert von $7 \times 10^{10}\text{ s}^{-1}$. Die maximale Energie des CO-Moleküls beträgt nach der kinetischen Gastheorie höchstens 8% der Potentialhöhe U , so daß in Gl. (16) die Energie E des Teilchens gegenüber U vernachlässigt werden kann. Damit ergibt sich für eine Abschätzung der Potentialbreite d :

$$d = \frac{\ln A_t - \ln k}{\frac{2}{\hbar} \sqrt{2mU}} = 0,72 \pm 0,05\text{ Å}.$$

Für $r_0 = 2,5\text{ Å}$ würde sich ergeben: $d = 0,70 \pm 0,05\text{ Å}$. Der Fehler von d ist bedingt durch k und U . Nimmt man an, daß die Potentialdicke bestimmt

ist durch den Abstand des Eisens im ligandenfreien Zustand (Mb^*) von der Hämebene, $0,4 - 0,8\text{ Å}$ ²², so ergibt sich ein A_t im Bereich von $10^5 - 10^{12}\text{ s}^{-1}$. Dieser Bereich für A_t steht in Übereinstimmung mit Werten von Alberding *et al.*²³, die aus Reaktionskinetikkmessungen mit optischen Verfahren am βHbCO gefunden wurden.

4. Diskussion

Gewöhnlich wird sich das reversible Verhalten des Myoglobins nicht bei den tiefen Temperaturen ($5 - 77\text{ K}$) abspielen, bei denen unsere Experimente gemacht wurden, sondern bei physiologischen Temperaturen. Dennoch sind Messungen im genannten Temperaturintervall von Interesse, um grundlegende Erkenntnisse über den Ablauf der Kinetik am Myoglobin zu gewinnen und einzelne Rekombinationsprozesse deutlicher zu sehen. So werden z. B. erst bei sehr tiefen Temperaturen ($T < 77\text{ K}$) Verschiedenheiten des elektronischen Verhaltens des Eisens bei den Einzelketten des Hämoglobins (α , β) gegenüber dem Tetramer $\alpha_2\beta_2$ sichtbar²⁴.

Die Mössbauer-Parameter des MbCO zeigen uns, daß wir es mit einer elektronischen low-spin Konfiguration zu tun haben²⁵. Deoxymyoglobin kann dagegen als eine Substanz identifiziert werden, in der das Eisen high-spin Konfiguration besitzt²⁶. Die Frage des Spinzustandes von Mb^* , die bei Iizuka⁶ gestellt wird, ist mit der Mössbauer-Spektroskopie lösbar. Man sieht aus den Parametern δ und ΔE_Q und aus dem Vergleich mit der deoxygenierten Form (Tab. I), daß bei Mb^* eine high-spin Konfiguration vorliegt. Mit der Photodissoziation ist also eine Spinzustandsänderung verknüpft, ebenso mit der Rekombination. Die Mössbauer-Parameter für Mb^* (δ und ΔE_Q) sind etwas verschieden von den Parametern der deoxygenierten Form. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Spertalian *et al.*⁹ überein (Tab. I). Das Photoprodukt besitzt demnach Unterschiede zur deoxygenierten Substanz. Dies deutet auf eine spezielle Photoform hin, die bei höheren Temperaturen sehr schnell verschwindet^{1, 27}, bei sehr tiefen Temperaturen aber über längere Zeit bestehen bleibt. Der Unterschied der gemessenen Mössbauer-Parameter der Photoform Mb^* könnte folgende Ursachen haben: Beim Mb^* bleiben die CO-Moleküle in einem gewissen Abstand vom Eisen (Abb. 6) in der Hämtasche hängen und nehmen auf diese Weise Einfluß auf die Mössbauer-Parameter, d. h. auf Ladungsdichte und Feldgradient am Kernort des Eisens. Beim Mb da-

gegen ist der Ligand völlig aus der Hämtasche entfernt.

Das Zeitverhalten der Parameter Γ , δ und ΔE_Q von Mb* (Abb. 3) deutet darauf hin, daß mehrere fast gleiche Spektren entstehen, deren Superposition z. B. eine vergrößerte Breite Γ (von ca. 0,40 mm s⁻¹) verursachen. Dem müßten Eisenplätze mit geringfügig verschiedener Umgebung entsprechen, was in der Literatur^{1,8} mit verschiedenen Konformationen des Myoglobins erklärt wird. Nach der Photodissoziation können demnach eine Vielzahl unterschiedlicher Mb*-Mössbauer-Spektren entstehen, herrührend von verschiedenen lokalen Umgebungen des Eisens im Myoglobin. Wie die zeitliche Änderung der Linienbreite Γ von Mb* zeigt (Abb. 3 a), nimmt die Zahl der unterschiedlichen Mb*-Subspektren mit wachsender Zeit, bedingt durch unterschiedliches Rekombinationsverhalten verschiedener Mb*-Konformationen, ab.

Aus den Kinetikmessungen geht hervor, daß mit der Mössbauer-Spektroskopie im Temperaturbereich von 5–77 K mindestens zwei unterschiedlich schnelle Rekombinationsprozesse „gesehen“ werden. Dies führt zu folgendem Arbeitsmodell: Zunächst ist das CO-Molekül am Hämeisen gebunden; das Eisen liegt dabei in der Hämebene. Das entspricht in einem Potentialbild^{4,8} einer Potentialmulde A (Abb. 9). Nun wird durch Absorption optischer Strahlung ein angeregter Zustand des MbCO-Komplexes erreicht. Das System kann dabei in den Grundzustand übergehen unter Abgabe der überschüssigen Energie an die Umgebung, oder ein Teil der absorbierten Energie wird zum Aufbrechen der Bindung zwischen Eisen und CO aufgewendet. Das Eisenatom bewegt sich dabei aus der Hämebene²² und verbleibt ca. 0,4–0,8 Å außerhalb, was eine gegenüber MbCO drastisch reduzierte Ligandenfeldstärke in der Umgebung des Hämeisens und damit den Fe(II) „high-spin“-Zustand des Mb*-Komplexes bewirkt. Besitzt das CO-Molekül genügend Energie, so kann es den Potentialberg von A nach B (Abb. 9) bzw. von A nach C überwinden und nach B bzw. C gelangen. Diese Vorstellung entspricht einem „Wandern“ des CO-Moleküls in der Hämtasche, wo es stabilisiert wird unter Abgabe seiner kinetischen Energie an die Umgebung. Es wird als unwahrscheinlich angesehen, daß das CO-Molekül bei den tiefen Temperaturen die Hämtasche verläßt^{4,6,8}, da die gemessenen Mb*-Spektren ansonsten mit denen von deoxygeniertem Myoglobin

identisch sein müßten. Für einen anschließenden Rekombinationsprozeß, $\text{CO} \rightarrow \text{Mb}^*$, ist es notwendig, daß das CO-Molekül die Aktivierungsenergie ΔE besitzt, um im Potentialbild der Abb. 9 von B (bzw. C) über den Reaktionsweg a nach A zurückzugelangen. Wie Experimente an Protohämverbindungen²⁸ zeigen, ist der Potentialberg durch das Häm bedingt, wird aber auch durch die weitere Umgebung mitbeeinflusst. Alternativ zum Reaktionsweg a (Abb. 9) kann das CO-Molekül (über b) durch den Potentialberg hindurchtunneln (was sich bei tiefen Temperaturen unterhalb 46 K als geschwindigkeitsbestimmender Schritt erweist), wobei die Breite des Potentialberges von ca. 0,7 Å mit der Lageänderung des Eisens von 0,4 bis 0,8 Å beim Übergang von Mb* zu MbCO vergleichbar ist.

In Tab. III vergleichen wir unsere Aktivierungsenergien ΔE mit denen von Iizuka *et al.*⁶ und Austin *et al.*⁸ und stellen fest, daß unsere Energiewerte besser mit denen von Austin *et al.* übereinstimmen. Iizuka *et al.*⁶ analysieren experimentelle Rekombinationskurven $N_{\text{exp}}(t)$ auf der Basis von zwei unabhängigen Exponentialfunktionen, Austin *et al.*⁸ dagegen mit einem Potenzgesetz. Aus dem Potenzgesetz läßt sich eine Verteilung $g(E)$ ermitteln, die die Wahrscheinlichkeit angibt, eine benötigte Aktivierungsenergie im Intervall $E, E + dE$ zu finden. Um einen besseren Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Austin *et al.* zu ermöglichen, wenden wir das Auswertungsschema, das diese Autoren zur Interpretation ihrer optischen Rekombinationsdaten entwickelt haben, auf unsere Mössbauer-Rekombinationsexperimente an. Dabei wird für die Rekombinationskurve $N(t)$ bei einer bestimmten Temperatur T eine Verteilung unabhängiger Exponentialfunktionen angenommen:

$$N(t) = RT \int_0^{\infty} \frac{1}{k} g(k) \exp(-kt) dt. \quad (18)$$

Daraus ergibt sich für die Verteilungsfunktion von Reaktionskonstanten durch Laplace-Transformation:

$$g(k) = \frac{k}{RT} \mathcal{L}^{-1} \{N(t)\}. \quad (19)$$

\mathcal{L}^{-1} ist die inverse Laplace-Transformation. Fittet man nun die experimentelle Rekombinationskurve $N_{\text{exp}}(t)$ mit dem Potenzgesetz⁸

$$N(t) = (1 + t/t_0)^{-n} \quad (20)$$

nach einem least square-Verfahren, so folgt aus Gl. (19):

$$g(k) = \frac{(t_0 k)^n \exp(-k t_0)}{R T \Gamma(n)} \quad (21)$$

n , t_0 entsprechen den gefitteten Daten aus Gl. (20) und Γ ist die Gammafunktion. Trägt man die Verteilung $g(k)$ gegen $\ln k$ auf, so erhält man die Energieverteilung $g(E)$, denn aus Gl. (11) folgt:

$$\ln k = \ln A - \frac{\Delta E}{R T} \quad (22)$$

Abb. 10 gibt die Energieverteilung für unser Experiment bei $T = 65$ K an. Eingezeichnet zum Vergleich sind die beiden k -Werte, die auf dem Fit der experimentellen Werte $N_{\text{exp}}(t)$ mit zwei Exponentialfunktionen folgen. (Die mit k_1 korrelierten Werte

$N_1(0)$ und $N_2(0)$ sind ein Maß für die Besetzung der verschiedenen Plätze B und C.) Wie aus Abb. 10 ersichtlich ist, liegt k_1 (schnelle Reaktion) nahe dem Maximum der Energieverteilung bei kleineren Aktivierungsenergien, während k_2 (langsame Reaktion) am Schwanz der Energieverteilung, also bei größeren Aktivierungsenergien liegt.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend stellen wir fest, daß die Mössbauer-Spektroskopie unter speziellen Versuchsbedingungen (tiefe Temperaturen, Verwendung eines Antiebers mit konstanter Geschwindigkeit) in der Lage ist, einen Beitrag zum Verständnis der Rekombinationskinetik von Myoglobin-CO zu liefern. Vorerst sind die Messungen jedoch auf einen im Vergleich zu optischen Meßverfahren relativ engen Zeitbereich ($10^2 - 10^5$ s) beschränkt; an einer Erweiterung zu kleineren Zeiten hin wird gearbeitet. Ein Vorteil der Methode besteht allerdings darin, daß jedes Eisenatom direkt zum Meßeffect beiträgt, unterschiedliche Photoprodukte dadurch sichtbar gemacht werden können. Außerdem ist den Mössbauer-Spektren zu entnehmen, daß sich die Photoprodukte Mb* elektronisch signifikant von deoxygeniertem Myoglobin Mb unterscheiden, was zur Annahme Anlaß gibt, daß sich das vom Hämeisen dissoziierte CO bei tiefen Temperaturen (bis 77 K zumindest) noch in der Hämtasche befindet.

Die Auswertung unserer gemessenen Rekombinationsdaten befindet sich in qualitativer Übereinstimmung mit den aus optischen Messungen gewonnenen Ergebnissen anderer Autoren: Die Rekombination von CO mit Myoglobin ist bei tiefen Temperaturen (bis ca. 50 K) durch Tunneleffekt zu erklären. Oberhalb 50 K dominiert ein Rekombinationsverhalten, das dem Arrhenius-Gesetz folgt, allerdings sind mindestens zwei Exponentialfunktionen zur quantitativen Beschreibung notwendig. Typische Aktivierungsenergien liegen bei ca. 2 kcal/mol.

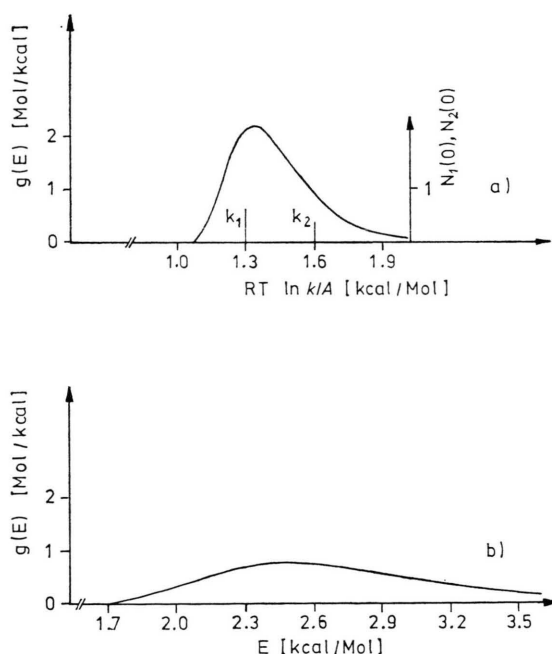


Abb. 10. (a) Energieverteilungskurve $g(E)$ für $T = 65$ K, wie sie nach Gl. (22) aus unseren Mössbauer-spektroskopisch bestimmten Daten $A_V(t)/A_\infty$ folgt. Die eingezeichneten k -Werte entsprechen einer Auswertung der $A_V(t)/A_\infty$ -Daten mit zwei unabhängigen Exponentialfunktionen nach Gl. (10). Die Konstante A in $R T \ln k/A$ wird bestimmt, indem die aus dem Arrhenius-plot der Abb. 8 resultierende Aktivierungsenergie $E_1 = 1.3$ kcal/mol mit k_1 korreliert wird; damit ergibt sich aus $R T \ln k_2/A$ ein Wert für E_2 von 1.6 kcal/mol, der noch im Fehlerbereich der zweiten aus Abb. 8 zu entnehmenden Aktivierungsenergie von 2.9 ± 1.4 kcal/mol liegt. (b) Energieverteilungskurve $g(E)$ nach Austin *et al.*⁹ aus optischen Rekombinationsdaten.

Herrn Prof. Dr. Y. Morita sind wir zu besonderem Dank verpflichtet, da er uns die von ihm mit ^{57}Fe angereicherten Myoglobinproben zu den in unserer Arbeit beschriebenen Messungen überlassen hat. Herrn Dr. B. Austin und seiner Frau Dr. S. Chan danken wir für die aufschlußreiche Diskussion während ihres Besuches in Saarbrücken. Wir danken Herrn Dr. Nastainczyk für die Präparation der MbCO-Proben.

6. Mathematischer Anhang

6.1. Mössbauer-Meßeffect

Durch die Mössbauer-spektroskopische Untersuchung mittels eines Antriebes konstanter Geschwindigkeit kann man den durch Mb* verursachten Effekt, der in einem Zeitintervall von z. B. 20 min bestimmt wird, angeben durch:

$$\text{Effekt}(t) = \frac{A_v(t)}{A_\infty}. \quad (\text{A } 1)$$

Für die Größen $A_v(t)$ und A_∞ gilt (Abb. 11):

$$A_v(t) = \sum_{i=1}^N \int_{t_i}^{t_i + \Delta t} A_v(t') dt',$$

$$A_\infty = \sum_{j=1}^N \int_{t_j}^{t_j + \Delta t} A_\infty(t') dt'. \quad (\text{A } 2)$$

$A_v(t)$ ist die Zählrate bei eingestellter Resonanzgeschwindigkeit v (Pfeil in Abb. 2 c). A_∞ ist die Zählrate bei einer Geschwindigkeit v_∞ , bei der sicher keine γ -Resonanzabsorption auftritt. Die Summen in (A 1) und (A 2) sind dadurch begründet, daß bei einem Meßvorgang über ein vorgegebenes Zeitintervall der Antrieb die Richtung ändert und nur innerhalb eines sicheren Intervalls Δt die Resonanzgeschwindigkeit v eingestellt ist. Der „sichere“ Bereich ist dann gegeben, wenn der Antrieb weit genug von seinen Umkehrpunkten entfernt ist und mit minimalem Fehler läuft (Abb. 11). Daneben tritt jeweils eine Totzeit $\Delta t'$ ein, während der keine γ -Impulse eingelesen werden. Während einer 20-minütigen Intervallzeit wird ca. 5 min lang $A_v(t)$ und ca. 5 min A_∞ eingezählt.

Wählt man zur mathematischen Darstellung der hier zu untersuchenden Rekombinationskinetik den Formalismus aus, der eine Reaktion 1. Ordnung beschreibt,

$$A_v(t') = A_0 \exp(-\lambda t'), \quad (\text{A } 3)$$

so ergibt sich aus den Gln. (A 1), (A 2) und (A 3):

$$A_v(t') = \sum_{i=1}^N \int_{t_i}^{t_i + \Delta t} A_0 \exp(-\lambda t') dt'. \quad (\text{A } 4)$$

Da $-\lambda t' \ll 1$, vereinfacht sich Gl. (A 4) (Taylor-Entwicklung) für die folgende Rechnung zu:

$$A_v(t) = \sum_{i=1}^N A_0 \Delta t \exp(-\lambda t_i). \quad (\text{A } 5)$$

Beginnt man die Messung von $A_v(t)$ bei $t = t_1$, so ergibt sich für die t_i -Werte des 10-minütigen Intervalls (Abb. 11):

$$t_i = t_1 + (i-1)(\Delta t + \Delta t'). \quad (\text{A } 6)$$

Aus Gl. (A 5) und (A 6) folgt somit:

$$A_v(t) = A_0 \Delta t \sum_{i=1}^N \exp[-\lambda(i-1)(\Delta t + \Delta t')] \exp(-\lambda t_1); \quad (\text{A } 7)$$

wobei die Summe in Gl. (A 7) eine geometrische Reihe darstellt und vereinfacht dargestellt werden kann durch:

$$A_v(t) = A_0' \exp(-\lambda t_1), \quad \text{mit} \quad (\text{A } 8)$$

$$A_0' = A_0 \Delta t \frac{1 - \exp[-\lambda(N-1)(\Delta t + \Delta t')]}{1 - \exp[-\lambda(\Delta t + \Delta t')]}.$$

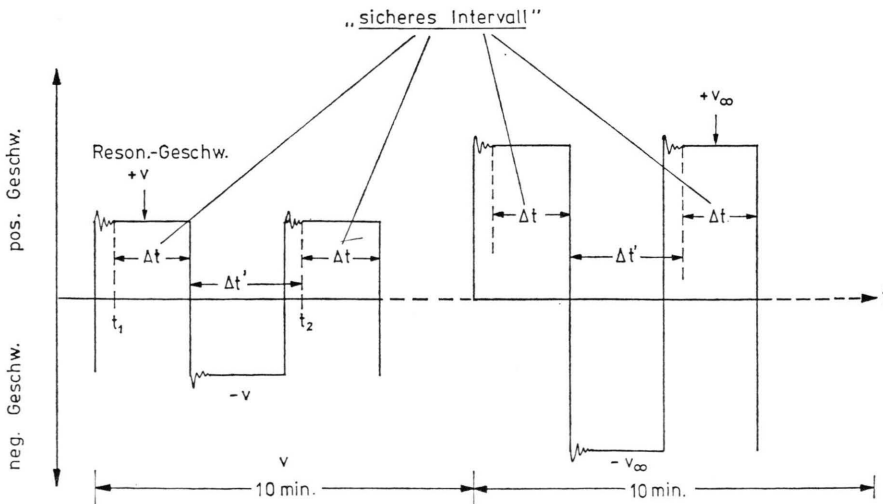


Abb. 11. Zeitintervalle, in denen der Mössbauer-Antrieb automatisch auf die konstanten Geschwindigkeiten $+v$ (Resonanzgeschwindigkeit), $-v$, $+v_\infty$ und $-v_\infty$ eingestellt ist. An den Umkehrpunkten der Geschwindigkeit wird der Antrieb elektronisch stabilisiert, so daß effektiv als „sicheres Meßintervall“ nur das Zeitintervall Δt in Frage kommt. Als positive (negative) Geschwindigkeit wird der Fall definiert, bei dem sich die Mössbauer-Quelle auf den Myoglobinabsorber zu bewegt (vom Absorber weg bewegt).

Wird anstelle der Gl. (A 3) für $A_v(t')$ eine Summe von Exponentialfunktionen angesetzt, läßt sich die Auswertung analog durchführen.

6.2. Fitverfahren

Will man eine Summe von zwei Exponentialfunktionen

$$y = Q_1 \exp(-Q_2 t) + Q_3 \exp(-Q_4 t) \quad (\text{A } 10)$$

an experimentell bestimmte Daten $y_k = 1 - A_v(t_k)/A_\infty$ optimal anpassen, so kann man dazu die Theorie der Ausgleichsrechnung heranziehen²⁹. Dabei wird gefordert, daß $\sum_k (y - y_k)^2$ minimal wird und man erhält ein nichtlineares Gleichungssystem für die Q_i . Durch eine Taylor-Entwicklung

$$y = y_0 + \sum_{i=1}^4 \frac{\partial y_k}{\partial Q_i} \Delta Q_i \quad (\text{A } 11)$$

ergibt sich ein lineares Gleichungssystem, womit ein iteratives Verfahren zur Bestimmung der Q_i möglich ist, wenn man von gewissen Startwerten Q_{i0} ausgeht und Korrekturen ΔQ_i dazu als Lösungen

des Normalgleichungssystems

$$\mathcal{A}(\mathbf{Q})\mathbf{x} = \mathbf{b} \quad (\text{A } 12)$$

bestimmt. Die Größen \mathbf{x} , \mathbf{Q} , $\mathcal{A}(\mathbf{Q})$ und \mathbf{b} sind definiert durch:

$$\mathbf{x} = \begin{pmatrix} \Delta Q_1 \\ \vdots \\ \Delta Q_4 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{Q} = \begin{pmatrix} Q_1 \\ \vdots \\ Q_4 \end{pmatrix},$$

$$A_{ij} = \sum_k \frac{\partial y_k}{\partial Q_i} \bigg|_{\mathbf{Q}_0} \frac{\partial y_k}{\partial Q_j} \bigg|_{\mathbf{Q}_0}, \quad (\text{A } 13)$$

$$b_i = - \sum_k (y - y_k) \frac{\partial y_k}{\partial Q_i} \bigg|_{\mathbf{Q}_0}.$$

Mit dem Gaußschen Algorithmus werden \mathbf{x} [Gl. (A 12)] und \mathcal{A}^{-1} bestimmt. Die Matrix \mathcal{A}^{-1} wird zur Fehlerberechnung benötigt. Das Verfahren wird fortgesetzt bis die Korrekturen ΔQ_i kleiner als die statistischen Fehler von Q_i sind. Die statistischen Fehler der Q_i ergeben sich aus²⁹

$$F_{Q_i} = \left(\frac{(\mathcal{A}^{-1})_{ii}}{N-4} \sum_{k=1}^N (y - y_k)^2 \right)^{1/2}, \quad (\text{A } 14)$$

wobei N die Anzahl der Meßpunkte ist.

¹ Q. H. Gibson, *Biochem. J.* **71**, 293 [1959].

² E. Antonini u. M. Brunori, „Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands“, North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London 1971.

³ E. F. Fesenko, W. N. Kulakov u. A. L. Ljubarskii, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **205**, 485 [1972].

⁴ K. W. Beeson, PhD-Thesis, University of Illinois 1975.

⁵ R. H. Austin, K. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I. C. Gunsalus u. V. P. Marshall, *Science* **181**, 541 [1973].

⁶ T. Iizuka, H. Yamamoto, M. Kotani u. Yonetani, *Biophys. Biochim. Acta* **371**, 126 [1974].

⁷ R. H. Austin, K. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I. C. Gunsalus u. V. P. Marshall, *Phys. Rev. Lett.* **32**, 403 [1974].

⁸ R. H. Austin, K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder u. I. E. Gunsalus, *Biochemistry* **14**, 5355 [1975].

⁹ K. Spatalian, G. Lang u. T. Yonetani, *Biophys. Biochim. Acta* **428**, 281 [1976].

¹⁰ A. Trautwein, *Structure and Bonding* **20**, 101 [1974].

¹¹ Y. Maeda, Y. Morita u. C. Yoshida, *J. Biochem.* **70**, 509 [1971].

¹² S. Glasstone, K. J. Laidler u. H. Eyring, *The Theory of Rate Processes*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London 1941.

¹³ J. A. Campbell, *Allgemeine Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1970.

¹⁴ H. J. Bittlich, D. Haberland u. G. Jost, *Leitfaden der chemischen Kinetik*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1973.

¹⁵ H. Grauert u. W. Lieb, *Differential- und Integralrechnung II*, Springer-Verlag, Berlin 1968.

¹⁶ R. H. Austin, persönliche Mitteilung 1977.

¹⁷ D. de Vault, J. H. Parkes u. B. Chance, *Nature* **215**, 642 [1967].

¹⁸ V. I. Goldanskii, M. D. Frank-Kamenetskii u. I. M. Barkalov, *Science* **182**, 1344 [1973].

¹⁹ V. I. Goldanskii, persönliche Mitteilung 1976.

²⁰ V. I. Goldanskii, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **124**, 1261 [1959].

²¹ B. I. Blochinzew, *Grundlagen der Quantenmechanik*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1953.

²² M. F. Perutz, *Nature* **228**, 726 [1970].

²³ N. Alberding, R. H. Austin, K. W. Beeson, S. S. Chan, L. Eisenstein, H. Frauenfelder u. T. M. Nordlund, *Science* **192**, 1002 [1976].

²⁴ A. Trautwein, Y. Alpert, Y. Maeda u. H. E. Marcolin, *J. de Phys., Coll.* **6**, 191 [1976].

²⁵ A. Trautwein, Y. Maeda, F. E. Harris u. H. Formanek, *Theor. Chim. Acta* **36**, 67 [1974].

²⁶ A. Trautwein, R. Zimmermann u. F. E. Harris, *Theor. Chim. Acta* **37**, 89 [1975].

²⁷ B. Alpert, R. Banerjee u. L. Lindquist, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 558 [1974].

²⁸ N. Alberding, R. H. Austin, S. S. Chan, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I. C. Gunsalus u. T. M. Nordlund, *J. Chem. Phys.* **65**, 4701 [1976].

²⁹ R. Zurmühl, *Praktische Mathematik*, Springer-Verlag, Berlin 1965.