

Direkter Nachweis einer Wasserstoffbrücke zu gebundenem Disauerstoff in einem Modellkomplex für Myoglobin/Hämoglobin und in Cobalt-Myoglobin durch Puls-EPR**

Henry Dube, Besnik Kasumaj, Carlos Calle, Makoto Saito, Gunnar Jeschke und François Diederich*

Im Gedenken an Arthur Schweiger

Die Diskriminierung zwischen Disauerstoff- und Kohlenmonoxidbindung durch die Proteine Myoglobin (Mb) und Hämoglobin (Hb) ist von grundlegender Bedeutung für alle aeroben Organismen, und noch immer gibt es Uneinigkeit über den molekularen Mechanismus dieses Vorgangs.^[1] Es wird weithin angenommen, dass gebundener Disauerstoff durch das distale Histidin durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird, obwohl sich eine eindeutige und direkte Beobachtung dieser postulierten Wasserstoffbrücke als schwierig herausgestellt hat.^[1,2b] Funktionale Co^{II}-Analoga der natürlichen Fe^{II}-Proteine Mb und Hb können verwendet werden, um die Interaktionen von gebundenem Disauerstoff mit seiner Umgebung mit EPR-Methoden zu untersuchen.^[2] Dabei wurde gezeigt, dass die Geometrien der Disauerstoffaddukte von Co-Mb und natürlichem Mb nahezu identisch sind.^[3] Hier präsentieren wir den neuartigen Co^{II}-Komplex **1-Co** als Modell für die Bindungstasche von Mb und Hb, zusammen mit einem direkten Puls-EPR-Beweis für das Auftreten einer distalen Wasserstoffbrücke im entsprechenden Disauerstoffaddukt **1-Co-O₂**. Zudem haben wir unsere Untersuchungen auf Co-Mb ausgedehnt und erbringen hier eine umfassende Puls-EPR-Studie der distalen Wasserstoffbrückenbindung in Co-Mb-O₂.

Komplex **1-Co** besteht aus einem Co^{II}-Porphyrinkern mit einem an einer Alkylkette gebundenen Imidazol, welches das proximale Histidin in Mb und Hb nachahmt, und einem mit

einer Alkinylgruppe verbundenen Benzimidazol, welches das distale Histidin nachahmt (Schema 1). Einzig das distale NH-Proton, das die Wasserstoffbrücken bildet, ist durch D₂O austauschbar.

Die Modellverbindung **1-Co** wurde über das entsprechende Zn^{II}-Derivat **1-Zn** synthetisiert, wobei eine klassische Porphyrinkondensation als Schlüsselschritt genutzt wurde (Schema 1).^[4] Die Dipyrromethane **2**^[5] und **3**^[6] und Aldehyd **4**^[7] wurden in einer Kondensationsreaktion zur freien Porphyrinbase **5-2H** umgesetzt. Die nachfolgende Zn^{II}-Insertion ergab Verbindung **5-Zn**, die durch Reaktion mit 1-(6-Bromhexyl)imidazol^[8] mit der axialen Base versehen wurde, um **6-Zn** zu erhalten. Die Entfernung der SiPr₃-Schutzgruppe ergab **7-Zn**, und Sonogashira-Kreuzkupplung mit 5(6)-Iodbenzimidazol^[9] führte zu **1-Zn** mit dem vollständig funktionalisierten Porphyrinkern. Nach Entfernung des Zn^{II}-Ions mit TFA wurde Co^{II} unter Verwendung von CoCl₂ in die intermediär erhaltene, freie Porphyrinbase **1-2H** koordiniert.

Zunächst wurden Continuous-Wave(CW)-EPR-Spektren im X-Band (etwa 9.6 GHz) von **1-Co-O₂** in gefrorener Lösung (120 K) aufgenommen, um die spektrale Reinheit der erhaltenen Proben zu prüfen. Die Spektren sind typisch für Low-Spin-Co^{II}-Spezies mit dominierendem d_{z2}-Charakter in einer Porphyrinumgebung (siehe Hintergrundinformationen). Proben von **1-Co** wurden reinem Disauerstoff bei 20 °C ausgesetzt, und das Disauerstoffaddukt **1-Co-O₂** wurde innerhalb von Sekunden erhalten. Bei der Bildung des Disauerstoffaddukts wird die Spinpopulation vom zentralen Co^{II}-Ion auf die gebundenen Sauerstoffkerne übertragen. Dies führt zu einem veränderten CW-EPR-Spektrum der gefrorenen Lösung (120 K) im X-Band, mit schmäleren Linien (siehe Hintergrundinformationen).

Protonenhyperfeinaufspaltungen lassen sich durch gepulste EPR-Experimente spektral auflösen.^[10] Allerdings waren die gängigen ESEEM- (Elektronenspin-echo-Enveloppenmodulation) und ENDOR-Techniken (Elektron-Kern-Doppelresonanz) aufgrund eines Kreuzunterdrückungseffekts^[11] nicht in der Lage, die Protonenhyperfeinstruktur von **1-Co-O₂** vollständig zu erfassen (siehe Hintergrundinformationen). Davies-ENDOR-Experimente^[10d,e] im Q-Band (etwa 35 GHz) in Kombination mit kurzen Präparationspulsen, die die relative Signalstärke der größeren Hyperfeinaufspaltungen erhöhen,^[10d] ermöglichten es jedoch, die Hyperfeinwechselwirkungen derjenigen Protonen zu analysieren, die sich in der Nähe des Disauerstoffs befinden.

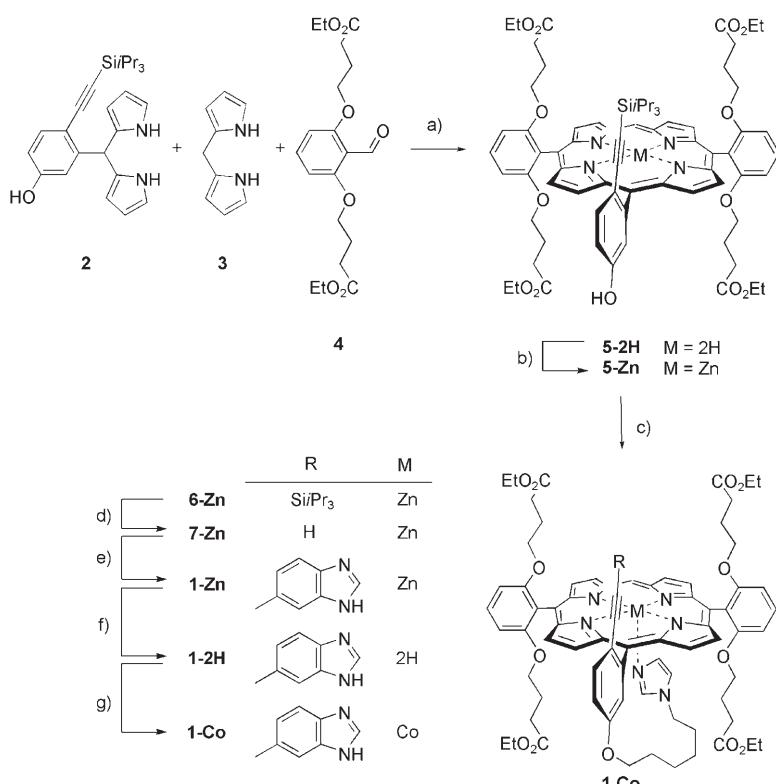
[*] H. Dube,^[+] Dr. M. Saito, Prof. Dr. F. Diederich
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich
Hönggerberg, HCI, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+ 41) 44-632-1109
E-Mail: diederich@org.chem.ethz.ch
Homepage: <http://www.diederich.chem.ethz.ch>

B. Kasumaj,^[+] Dr. C. Calle
Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH Zürich
Hönggerberg, HCI, 8093 Zürich (Schweiz)
Prof. Dr. G. Jeschke
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)

[+] Beide Autoren haben gleichwertig zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds, den NCCR „Nanoscale Science“ Basel und die ETH Zürich unterstützt. Wir danken Joerg Forrer für technische Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Synthese von **1-Co**. a) TFA, CH₂Cl₂, 20°C, 16 h, dann Chloranil, 40°C, 2 h, 15%; b) Zn(OAc)₂·2H₂O, MeOH/CHCl₃, 65°C, 1 h, 96%; c) 1-(6-Bromhexyl)imidazol, Cs₂CO₃, DMF, 20°C, 14 h, 79%; d) nBu₄NF, THF, 20°C, 40 min, 93%; e) 5(6)-Iodbenzimidazol, [Pd(PPh₃)₄], Cul, NEt₃, DMF, 100°C, 4 h, 51%; f) TFA, CHCl₃, 20°C, 12 min, quant.; g) CoCl₂, 2,6-Lutidin, THF, 20°C, 12 h. TFA = Trifluoressigsäure.

Diese Experimente wurden bei Tieftemperatur (10 K) an einer gefrorenen Lösung von **1-Co-O₂** durchgeführt. Um die Magnetfeldpositionen (Beobachterpositionen) für diese Experimente festzulegen, wurden über den gesamten Magnetfeldbereich zunächst EPR-Spektren durch Messung der integralen Signalstärke des FIDs gemessen. Zur vollständigen Aufzeichnung der Protonenhyperfeinaufspaltungen wurden dann Protonen-ENDOR-Spektren an zwölf Magnetfeldpositionen aufgenommen. Nach D₂O-Austausch verschwand das stärkste Protonensignal, das im Komplex **1-Co-O₂** gemessen wurde (Abbildung 1a). Dieses Signal reicht von 6.0 MHz an den Einkristallpositionen g_z und g_y (bzw. Tief- und Hochfeldrand des Spektrums) bis zu 14.0 MHz entlang g_x . Verglichen mit den in der Literatur angeführten Hyperfeinaufspaltungen,^[2] die für ähnliche Co^{II}-Disauerstoffaddukte gemessen wurden, ist die Stärke dieser Hyperfeinaufspaltung eines austauschbaren Protons äußerst bemerkenswert. Sie belegt unmittelbar das Auftreten einer Wasserstoffbrückenwechselwirkung zwischen dem gebundenen Disauerstoff im Komplex **1-Co-O₂** und einem nahen und geometrisch wenig flexiblen Proton. Um mögliche Lösungsmittelleffekte zu untersuchen, wurden zusätzlich Davies-ENDOR-Spektren von **1-Co-O₂** in CD₂Cl₂ aufgenommen (siehe Hintergrundinformationen). Allerdings lassen sich nur für schwächere Protonenhyperfeinaufspaltungen (< 6 MHz, siehe Hintergrundinformationen) bedeutende Unterschiede zu den in CH₂Cl₂ aufgenommenen Spektren feststellen. Proben von **1-**

Co-O₂ wurden sowohl mit wasserhaltigen als auch wasserfreien Lösungsmitteln hergestellt, ohne dass ein Unterschied für die starken Hyperfeinaufspaltungen messbar war. Somit kann eine starke Wechselwirkung von Lösungsmittelmolekülen oder Restwasser mit dem gebundenen Disauerstoff in **1-Co-O₂** ausgeschlossen werden. Um herauszuarbeiten, ob der Hyperfeintensor des austauschbaren Protons sowohl positive als auch negative Hauptachsenwerte trägt, wurde im X-Band an der Magnetfeldposition, die einer maximalen Protonenwechselwirkung entspricht, ein 6-Puls-HYSCORE-Spektrum^[12] von **1-Co-O₂** aufgenommen. Leider konnte mit diesem Experiment nicht die vollständige Aufspaltung des austauschbaren Protons erfasst werden. Nichtsdestotrotz ist der wellenförmige Verlauf oberhalb der Antidiagonalen klar erkennbar (siehe Hintergrundinformationen). Somit steht fest, dass sowohl positive als auch negative Hauptachsenwerte existieren. Daraus folgt, dass die von der Wasserstoffbrücke hervorgerufene Hyperfeinkopplung sehr stark von einer räumlichen Komponente geprägt wird und der isotrope Beitrag nur sehr klein ist. Folglich liegt ein hauptsächlich dipolarer Charakter der Wasserstoffbrücke vor.^[10c]

Die CW-EPR- und Davies-ENDOR-Spektren von **1-Co-O₂** wurden simuliert, um Einblicke in die geometrischen Gegebenheiten und in Bindungseigenschaften zu gewinnen. Zunächst wurden die CW-EPR-Spektren von **1-Co-O₂** simuliert, um Informationen über die Co-O₂-Anordnung zu erhalten. Folgende g -Werte wurden gefunden: $g = [2.0027 \pm 0.0005, 1.989 \pm 0.001, 2.0723 \pm 0.0005]$. Die Hauptachsenwerte des Hyperfeintensors des Zentralions sind $A^{Co} = [-54, -28, -28]$ MHz (jeweils ± 2 MHz), wobei die relative Orientierung dieses Tensors mit dem durch g aufgespannten Koordinatensystem durch die Euler-Winkel (α, β, γ) = $(0^\circ \pm 10^\circ, 70^\circ \pm 10^\circ, 0^\circ \pm 20^\circ)$ ausgedrückt werden kann. So findet sich für Komplex **1-Co-O₂** ein Winkel von 70° zwischen der O-O-Achse und der Normalen auf die Häm-Ebene (Abbildung 2).

Anschließend wurden die durch die Davies-ENDOR-Experimente erhaltenen Differenzspektren sowohl für das austauschbare Proton (Abbildung 1b) als auch für die Lösungsmittelprotonen (siehe Hintergrundinformationen) an allen gemessenen Magnetfeldpositionen simuliert. Für das austauschbare Proton ergaben sich die Hauptachsenwerte des Hyperfeintensors zu $A^H = [-6.8, -6.0, 13.5]$ MHz (jeweils ± 0.5 MHz) mit den zugehörigen Euler-Winkeln (α, β, γ) = $(0^\circ, 105^\circ, 0^\circ) \pm 10^\circ$ (Abbildung 2). Dieses Ergebnis lässt deutlich den hauptsächlich dipolaren Charakter dieser Wasserstoffbrücke erkennen, wobei der größte Hauptachsenwert der Protonenhyperfeinwechselwirkung (A_z^H) in Richtung des Disauerstoffs zeigt. Das austauschbare Proton befindet sich direkt oberhalb des Disauerstoffs. Hierbei beträgt der Winkel zwischen diesem distalen Proton und der O-O-Achse $\pm 105^\circ$. Obwohl der Hyperfeintensor nicht streng axial ist und obwohl

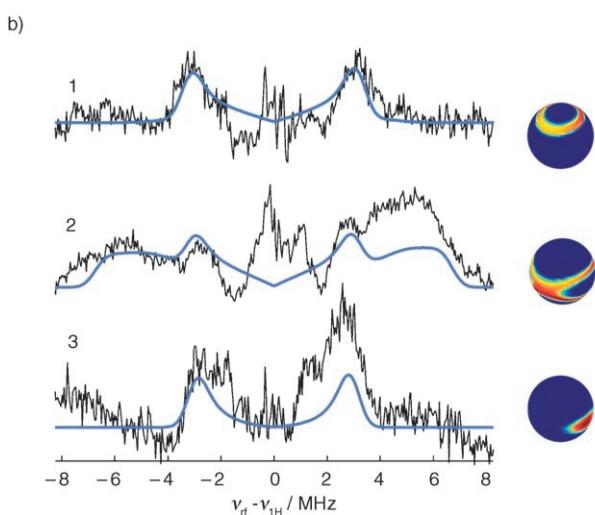
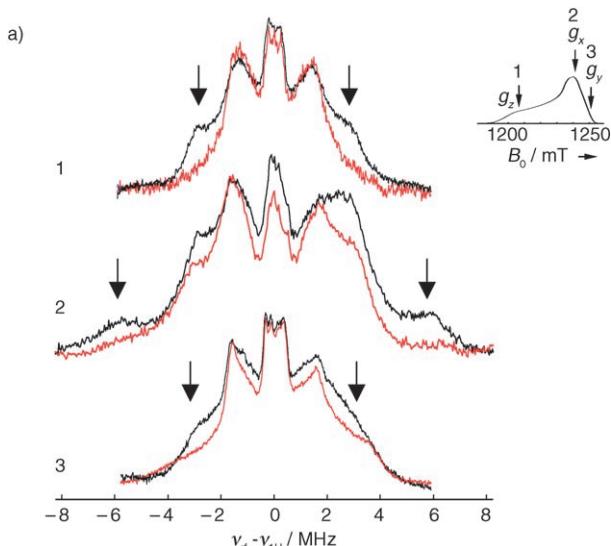


Abbildung 1. a) Davies-ENDOR-Spektren bei Q-Band-Frequenz einer gefrorenen Lösung (CH_2Cl_2 , 10 K) von **1-Co-O₂** vor (schwarz) und nach D_2O Austausch (rot); Pfeile markieren die größte und austauschbare Hyperfeinaufspaltung. Im Einschub sind die jeweiligen Beobachterpositionen 1 (nahe g_z) 2 (nahe g_x) und 3 (nahe g_y) auf den integral gemessenen FID-EPR-Spektren angegeben. Die Präparationspulslänge an den Beobachterpositionen 1 (nahe g_z) und 3 (nahe g_y) ist 160 ns, und an der Beobachterposition 2 (nahe g_x) 80 ns. b) Differenzspektren von **1-Co-O₂** vor und nach D_2O -Austausch an den drei im Einschub markierten Beobachterpositionen 1–3 (schwarz) und simulierte Spektren (rot) des mit D_2O austauschbaren Protons. Die zu den experimentellen Spektren beitragenden Orientierungen sind auf Einheitskugeln projiziert.

die Elektronenspinpopulation nicht an einem Atom lokalisiert ist, sondern sich zwischen den beiden Sauerstoffkernen verteilt, haben wir zur Abstandsberechnung angenommen, dass die Spindichte an einem Punkt im Raum zentriert liegt.^[13] So lässt sich der Abstand zwischen diesem virtuellen Spindichtezentrum und dem NH-Proton des distalen Benzimidazols zu $2.3 \pm 0.2 \text{ \AA}$ berechnen. Hierzu wurde der dipolare Anteil der Hyperfeinwechselwirkung $T = 6.5 \text{ MHz}$ anhand der Punkt-Dipol-Näherung interpretiert.^[10c] Eine grobe Modellierung auf semiempirischem PM5-Niveau ergab

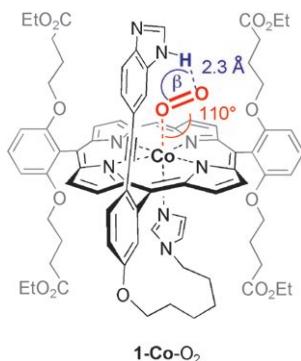


Abbildung 2. Im Komplex **1-Co-O₂** wird eine distale Wasserstoffbrücke zu gebundenem Disauerstoff gebildet. Der angegebene Winkel und der Abstand wurden durch EPR-Messungen an einer gefrorenen Lösung von **1-Co-O₂** erhalten, $\beta = 105^\circ$.

für den aus Konvergenzgründen Fe^{II} -substituierten Komplex **1-Fe-O₂** einen sehr ähnlichen Abstand zwischen dem distalen Benzimidazol-NH-Proton und dem Disauerstoff von ca. 2.40 Å (siehe Hintergrundinformationen). Nimmt man nun dieses Ergebnis zusammen mit der Tatsache, dass das NH-Proton des distalen Benzimidazols das einzige durch D_2O austauschbare Proton ist, kann die beobachtete Wasserstoffbrücke nur auf Wechselwirkungen zwischen diesem Proton und dem gebundenen Disauerstoff basieren.

Nachdem nun eine geeignete Puls-EPR-Methode zur Messung der vollständigen Protonenhyperfeinaufspaltungen in porphyrinoiden Co^{II} -Disauerstoff-Addukten gefunden war, vervollständigten wir diese Studie mit der Untersuchung der Hyperfeinaufspaltungen in Co-Mb-O_2 . Co-Mb-O_2 wurde entweder in wässriger oder deuterierter Pufferlösung gewonnen, wobei als Ausgangsmaterial Apo-Mb aus der Skelettmuskulatur eines Pferdes verwendet und den Standardprotokollen gefolgt wurde.^[14] In den Tieftemperatur-Davies-ENDOR-Spektren einer gefrorenen Lösung von Co-Mb-O_2 , die bei 13 K und Q-Band-Frequenzen aufgenommen wurden, fand sich eine noch größere Hyperfeinaufspaltung. Sie reicht von 10.0 MHz (nahe g_z und g_y bzw. Tief- und Hochfeld) bis zu 19.0 MHz (nahe g_x). Diese große Hyperfeinaufspaltung war nach D_2O -Austausch der Pufferlösung nicht mehr zu beobachten (Abbildung 3).

Wie zuvor in unserem Modellkomplex wurde auch in Co-Mb-O_2 eine geometrisch wenig flexible distale Wasserstoffbrücke beobachtet. Die Abhängigkeit der größten und austauschbaren Protonenhyperfeinwechselwirkung von der Magnetfeldposition in Co-Mb-O_2 entspricht genau derjenigen in unserem Modellkomplex **1-Co-O₂**. Einzig die Ausdehnung der Hyperfeinaufspaltung ist im Protein größer, was auf einen geringeren Abstand ($2.0 \pm 0.2 \text{ \AA}$) des wechselwirkenden Protons schließen lässt. Ganz analog zu unserem Modellkomplex **1-Co-O₂** ist auch der hauptsächlich dipolare Charakter der Wasserstoffbrücke in Co-Mb-O_2 , was wiederum durch das 6-Puls-HYSCORE-Spektrum im X-Band nachgewiesen werden konnte, das an der Magnetfeldposition gemessen wurde, bei der diese Wechselwirkung maximal ist (siehe Hintergrundinformationen).

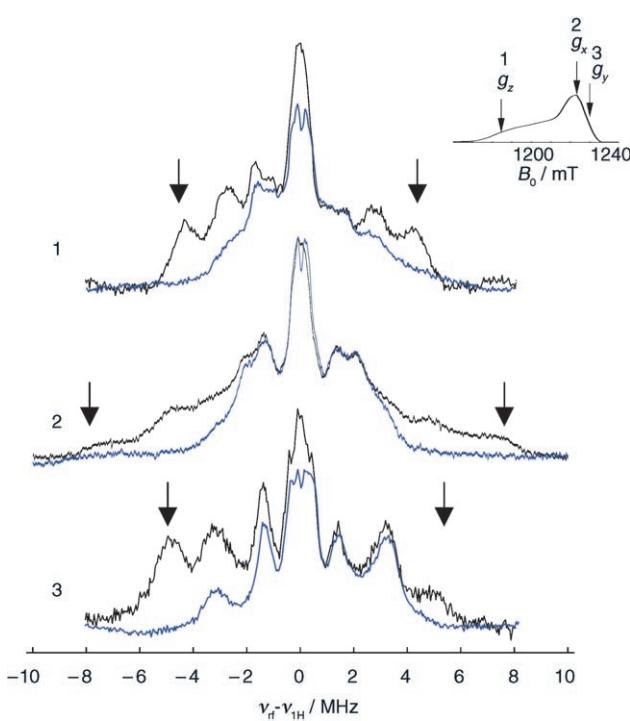


Abbildung 3. Q-Band-Davies-ENDOR-Spektren einer gefrorenen Lösung (13 K) von Co-Mb-O₂ in H₂O-Puffer (schwarz) und in D₂O-Puffer (blau); Präparationspulslänge 80 ns. Pfeile markieren die größte und austauschbare Hyperfeinaufspaltung. Im Einschub sind die jeweiligen Beobachterpositionen auf den integral gemessenen FID-EPR-Spektren angegeben.

Obwohl die Protonenhyperfeinwechselwirkungen in Co-Mb-O₂ schon untersucht wurden, ist nur an einer einzigen Magnetfeldposition (entsprechend g_y) gemessen worden, und die beobachtete Hyperfeinaufspaltung des D₂O-austauschbaren Protons war bedeutend kleiner (9.0 MHz).^[2b] Aufgrund unserer Resultate vermuten wir, dass die damals beobachtete Protonenhyperfeinaufspaltung von 9.0 MHz lediglich ein Teil der tatsächlichen Hyperfeinaufspaltung an dieser Magnetfeldposition ist.

Da das Protein im Lösungsmittel H₂O untersucht wurde, ist es schwierig, D₂O-austauschbare Protonenhyperfeinaufspaltungen bestimmten Proteinresten oder umgebendem H₂O zuzuordnen. Allerdings wurde in unserem Modellkomplex gezeigt, dass das wasserstoffbrückengebundene NH-Proton des distalen Benzimidazols direkt oberhalb des gebundenen Disauerstoffs positioniert ist. Da die Geometrie der distalen Wasserstoffbrücke in Co-Mb-O₂ ähnlich wie in unserem Modell ist, muss sich das wechselwirkende Proton im Protein ebenfalls oberhalb des gebundenen Disauerstoffs befinden. Solch eine Position in 2.00 Å Entfernung kann nur durch das NH-Proton des distalen Histidins eingenommen werden. H₂O in der distalen Tasche ist an einer vollkommen anderen Position zu finden,^[15] daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass H₂O die größte Protonenhyperfeinwechselwirkung in den Davies-ENDOR-Spektren verursacht, die beim Austausch mit D₂O verschwindet.

In vorangegangen EPR-Kristallstudien an Co-Mb-O₂^[13b, 16] wurde gezeigt, dass bei tiefen Temperaturen ($T <$

-50 °C) zwei Disauerstoffspezies existieren, die sich in ihrer relativen Orientierung, bezogen auf die Cobalt-Hämgruppe, um etwa 90° unterscheiden. Dieser Befund wurde von unseren Messungen bestätigt. Durch den Einsatz eines longitudinalen Relaxationszeitfilters im Q-Band konnten die integral gemessenen FID-EPR-Spektren der beiden Disauerstoffspezies getrennt werden (siehe Hintergrundinformationen). Durch die Anwendung des gleichen Filters in Kombination mit der Davies-ENDOR-Pulssequenz waren wir außerdem in der Lage, die größte und D₂O-austauschbare Hyperfeinwechselwirkung ausschließlich Spezies 2 (longitudinale Relaxationszeit ca. 450 µs) zuzuordnen. Offenbar gibt es keine starke Wechselwirkung zwischen einem D₂O-austauschbaren Proton und Disauerstoff von Spezies 1 (longitudinale Relaxationszeit ca. 80 µs) innerhalb von 2.70 Å Abstand, sonst wäre dies in den gemessenen Davies-ENDOR-Spektren sichtbar geworden. Da die absoluten Geometrien der beiden Disauerstoffspezies bis dato nicht bekannt sind, können wir über die Gründe dieser Ergebnisse nur spekulieren. Weitere Untersuchungen werden von uns unternommen, um die offenen Fragen zu beantworten.

Zusammenfassend haben wir auf direkte Weise eine distale Wasserstoffbrücke zu gebundenem Disauerstoff im Modellkomplex **1-Co-O₂** durch Davies-ENDOR bei Q-Band-Frequenz nachgewiesen und teilen die vollständigen EPR-Parameter dieser Wechselwirkung mit, welche durch Simulationen erhalten wurden. Es wurde gezeigt, dass der dipolare Charakter ebenso wie die Orientierung der Wasserstoffbrücke im Modellkomplex **1-Co-O₂** analog zum natürlichen Co-Mb-O₂ ist. Daher kann der Komplex **1-Co-O₂** als vorzügliches, funktionelles Modell für die disauerstoffbindende Tasche von Mb und Hb betrachtet werden, welches in der Lage ist, entscheidende Eigenschaften der natürlichen Proteine zu reproduzieren.

Eingegangen am 9. November 2007
Online veröffentlicht am 25. Januar 2008

Stichwörter: ENDOR-Spektroskopie · Hämoglobin · Myoglobin · Porphyrinoide · Wasserstoffbrücken

- [1] a) J. P. Collman, R. Boulatov, C. J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588; b) J. A. Lukin, V. Simplaceanu, M. Zou, N. T. Ho, C. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10354–10358; c) S. Borman, *Chem. Eng. News* **1999**, *77*(49), 31–36; d) M. Momenteau, C. A. Reed, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 659–698; e) B. A. Springer, S. G. Sligar, J. S. Olson, G. N. Phillips, Jr., *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699–714; f) L. Pauling, *Nature* **1964**, *203*, 182–183.
- [2] a) H. C. Lee, E. Scheuring, J. Peisach, M. R. Chance, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12201–12209; b) J. Huettemann, R. Stabler in *Electron Magnetic Resonance of Disordered Systems* (Hrsg.: N. D. Yordanov), World Scientific, Singapore, **1989**, S. 127–148; c) F. A. Walker, J. Bowen, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7632–7635; d) B. M. Hoffman, D. H. Petering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67*, 637–643.
- [3] E. A. Brucker, J. S. Olson, G. N. Phillips, Jr., Y. Dou, M. Ikeda-Saito, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25419–25422.
- [4] Alle Verbindungen wurden vollständig durch Schmelzpunkte, ¹H- und ¹³C-NMR- (außer für **1-Co**), IR- und UV/Vis-Spektro-

- skopie, Massenspektrometrie und hochauflösende MS charakterisiert. Die Synthese von **1-Co** ist in den Hintergrundinformationen vollständig beschrieben.
- [5] Dipyrrromethan **2** wurde nach einer analogen Methode hergestellt, wie sie für das Derivat ohne OH-Gruppe beschrieben wurde: B. Felber, F. Diederich, *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 120–153.
- [6] B. J. Littler, M. A. Miller, C.-H. Hung, R. W. Wagner, D. F. O’Shea, P. D. Boyle, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1391–1396.
- [7] P. J. Dandliker, F. Diederich, A. Zingg, J.-P. Gisselbrecht, M. Gross, A. Louati, E. Sanford, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1773–1801.
- [8] P. Weyermann, F. Diederich, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 599–617.
- [9] Z. Kazimierczuk, L. Dudycz, R. Stolarski, D. Shugar, *J. Carbohyd. Nucleosides Nucleotides* **1981**, 8, 101–117.
- [10] a) D. Goldfarb, D. Arieli, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 441–468; b) T. Prisner, M. Rohrer, F. MacMillan, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 279–313; c) A. Schweiger, G. Jeschke, *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*, Oxford University Press, Oxford, **2001**; d) Puls-Davies-ENDOR wird beschrieben in: C. Fan, P. E. Doan, C. E. Davoust, B. M. Hoffman, *J. Magn. Reson.* **1992**, 98, 62–72; e) E. R. Davies, *Phys. Lett. A* **1974**, 47, 1–2.
- [11] S. Stoll, C. Calle, G. Mitrikas, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2005**, 177, 93–101.
- [12] B. Kasumaj, S. Stoll, *J. Magn. Reson.* **2008**, DOI: 10.1016/j.jmr.2007.11.001.
- [13] a) Siehe: S. Van Doorslaer, A. Schweiger, B. Kraeutler, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 7554–7563, zit. Lit.; b) zur stereoelektronischen Struktur von Co-Mb-O₂ siehe: L. C. Dickinson, J. C. W. Chien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1235–1239.
- [14] F. Ascoli, M. Rosaria, R. Fanelli, E. Antonini, *Methods Enzymol.* **1981**, 76, 72–87.
- [15] M. L. Quillin, R. M. Arduini, J. S. Olson, G. N. Phillips, Jr., *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 140–155.
- [16] H. Hori, M. Ikeda-Saito, T. Yonetani, *Nature* **1980**, 288, 501–502.