

Ein Aufbau für Röntgenkleinwinkelstreuung an  
Protein-Lösungen an der  
Synchrotronstrahlungsquelle DELTA

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Physik der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von  
**Dipl.-Phys. Christina Krywka**

März 2008



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen der Röntgenstreuung</b>	<b>8</b>
2.1	Der Streuprozess . . . . .	9
2.2	Die Röntgenkleinwinkelstreuung . . . . .	10
2.3	Komplexe Partikel . . . . .	12
2.4	Partikel in Lösung . . . . .	14
2.5	Isotrope Systeme . . . . .	14
2.6	Die Abstandsverteilungsfunktion . . . . .	15
2.7	Übersicht Realraum - Fourierraum . . . . .	17
2.8	Die Guinier- und Porodnäherung . . . . .	18
2.9	Wechselwirkende Systeme, der Strukturfaktor . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Proteine</b>	<b>25</b>
3.1	Das Lösungsverhalten im wässrigen Milieu . . . . .	26
3.2	Der Streukontrast in Lösung . . . . .	28
3.3	Faltung und Denaturierung . . . . .	30
3.4	Die untersuchten Proteine . . . . .	34
3.4.1	Lysozym . . . . .	34
3.4.2	Insulin . . . . .	35
3.4.3	Staphylokokken Nuclease . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Das SAXS-Instrument am DELTA</b>	<b>38</b>
4.1	Dortmunder Elektronen-Speicherring-Anlage (DELTA) . . . . .	38
4.2	Die Beamline BL9 . . . . .	39
4.3	Das Helium-/ Vakuumsystem . . . . .	41
4.4	Monitorzähler . . . . .	46
4.5	Das Absorber- und Shutterssystem . . . . .	49
4.6	Blenden . . . . .	51
4.7	Probenumgebungen . . . . .	54
4.7.1	Die Temperaturzelle . . . . .	56
4.7.2	Hochdruckzelle . . . . .	58
4.8	Der Beamstop . . . . .	64
4.9	Das Detektorsystem . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Weitere Strahlungsquellen</b>	<b>71</b>
5.1	Die SAXS Laborquelle (Universität Helsinki) . . . . .	71
5.2	Die BioCAT Beamline an der Advanced Photon Source APS . . . . .	72
5.3	Die BW4 Beamline am Hamburger HASYLAB . . . . .	73

<b>6</b>	<b>SAXS an Proteinsystemen</b>	<b>75</b>
6.1	Kalibrationsmessungen . . . . .	75
6.2	Messungen an Lysozym . . . . .	80
6.2.1	Der Formfaktor . . . . .	80
6.2.2	Der Strukturfaktor . . . . .	85
6.3	Messungen an Insulin . . . . .	89
6.3.1	Der Formfaktor . . . . .	89
6.3.2	Der Strukturfaktor . . . . .	93
6.4	Messungen an Staphylokokken Nuclease . . . . .	96
6.4.1	Der Formfaktor . . . . .	97
6.4.2	Die Denaturierung . . . . .	99
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>A</b>	<b>Technischer Anhang</b>	<b>111</b>
A.1	Die Absorber/Shutter-Elektronik . . . . .	111
A.2	Helium- und Vakuum-Flightpath . . . . .	113
A.3	Die Hochdruck- und Temperaturzelle . . . . .	114
A.4	Der Detektorausleger . . . . .	120
A.5	Die Bremsensteuerung . . . . .	121
A.6	Die Patchfelderweiterung . . . . .	123
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>B</b>	<b>Danksagung</b>	<b>130</b>

# 1 Einleitung

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlung durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahre 1895 hat diese einen stets tieferen Einblick in immer neue, zuvor unzugängliche Strukturen der Materie ermöglicht. Schnell erkannte man den praktischen Nutzen für die Medizin und ebenso zügig auch die große Bedeutung der gegenüber sichtbarem Licht oder UV-Strahlung viel kürzeren Wellenlänge für die Strukturaufklärung an Materie. Viele neue, experimentelle Methoden wurden seitdem entwickelt, beispielhaft genannt seien hier die Röntgenfluoreszenzanalyse und Röntgenabsorptionsspektroskopie, die z.B. Einblicke in die chemische Zusammensetzung einer Probe ermöglichen. Einen besonderen Stellenwert nimmt die Methode der Röntgenkristallographie ein, weil sie bei kristallinen Proben in der Lage ist, die Struktur bis auf atomare Dimensionen aufzuklären. Diese eignet sich sogar für biologische Makromoleküle, deren Molekülmasse zu groß für eine Untersuchung mit Hilfe der Methode der Kernspinresonanz ist (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).

Wenn die Voraussetzungen für die Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie nicht gegeben sind, weil z.B. ausreichend große und homogene Kristalle nicht herstellbar sind, findet die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. *Small Angle X-Ray Scattering*, SAXS) oder Neutronenkleinwinkelstreuung (engl. *Small Angle Neutron Scattering*, SANS) Anwendung. Der wesentliche Vorteil dieser Verfahren gegenüber anderen Methoden der Strukturbestimmung ist die Anwendbarkeit auf völlig ungeordnete Probensysteme, wie es beispielsweise bei gelösten Proteinen der Fall ist. Selbst wenn ein Protein sich nicht kristallisieren läßt, kann man aus diesem reine, wässrige Lösungen herstellen - eine ideale Voraussetzung für die Anwendung von SAXS- und SANS-Methoden.

SAXS- und SANS-Methoden ermöglichen die Messung geometrischer Parameter der Proteinmoleküle selbst für den Fall stark verdünnter Lösungen. So ist es möglich, Strukturaufklärung an Proteinen in ihrer natürlichen, wässrigen Umgebung zu betreiben. Ebenfalls zugänglich sind darüber hinaus funktionelle Strukturänderungsprozesse, wie sie in Form von Faltungs- und Entfaltungsprozessen bei vielen Proteinen auftreten und für deren biologische Funktionen von höchster Bedeutung sind.

Bedingt durch die üblicherweise kleinen Konzentrationen der untersuchten Proteinlösungen sowie durch den geringen Elektronendichtekontrast zwischen den Proteinmolekülen und dem sie umgebenden Lösungsmittel, ist das Streusignal eines SAXS-Experiments in aller Regel sehr schwach. Um dennoch ein Spektrum mit ausreichender Zählrate zu erhalten, wird eine möglichst intensive und brillante Röntgenquelle benötigt. Die begrenzte Intensität von Röntgenröhren erweist sich oft als zu schwach, um Messungen in SAXS-Geometrie an stark verdünnten Proteinlösungen zu betreiben.

Mit der Entstehung der ersten dedizierten Elektronenspeicherringe für die Erzeugung von Synchrotronstrahlung in den 80er Jahren standen erstmalig Quellen hochbrillanter Röntgenstrahlung zur Verfügung, die zudem eine in weitem Rahmen freie Wahl der Wellenlänge ermöglichten. Durch die Nutzung der Synchrotronstrahlung und paralleler Entwicklung immer leistungsfähigerer Computer hat die strukturelle Biologie

seitdem einen entscheidenden Vorschub erfahren: In der weltweit größten Datenbank für 3D-Strukturen biologischer Makromoleküle, der *Protein Data Bank* [PDB], waren zu Beginn der Entstehung dieser Arbeit etwa 45000 Strukturen verzeichnet. Hiervon wurden ca. 37500 mittels Verfahren der Röntgenstreuung aufgeklärt und davon ca. 90% allein in den letzten 10 Jahren. Die zeitliche Entwicklung der Gesamtzahl der in der *Protein Data Bank* verzeichneten Strukturen während der letzten Jahre läßt sich in Abbildung 1.1 eindrucksvoll nachverfolgen.

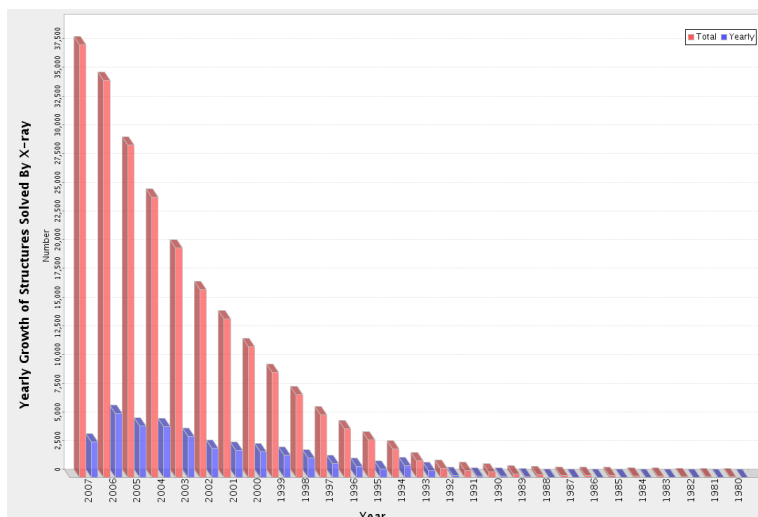


Abbildung 1.1: Zeitliche Entwicklung der Anzahl der in der Protein Data Bank (PDB) verzeichneten, mittels Röntgenstremethoden strukturell aufgeklärten Biomoleküle. Daten entnommen aus [PDB], Stand 06/2007.

Die Entwicklung eines Instruments, das SAXS-Experimente an Proteinlösungen an der Dortmunder Synchrotronstrahlungsquelle DELTA ermöglichen sollte, ist wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit.

Im Zuge dieser Arbeit wurden mehrere Proteinsysteme mit Hilfe des neuen Instruments untersucht. Erste Referenzmessungen erfolgten an dem sehr gut erforschten und leicht verfügbaren Protein Lysozym. Anschließend wurde eine ausführliche Charakterisierung des Moleküls in wässriger Lösung sowie in Anwesenheit zusätzlich zur Lösung beigemischter Substanzen (Cosolventien) vorgenommen und die intermolekulare Wechselwirkung untersucht.

Das intermolekulare Wechselwirkungspotenzial von Insulin, einem amyloidogenen also unter bestimmten Bedingungen zu unlöslichen und pathogenen Proteinkomplexen aggregierendem Protein, wurde im Hinblick auf die Proteinaggregation, die für die Entstehung von vielen Krankheiten verantwortlich gemacht wird, untersucht. In einem ähnlichen Zusammenhang steht das ebenfalls untersuchte Protein Staphylokokken Nuclease, ein für die Erforschung von Proteinfaltungs- und Entfaltungsprozessen hervorragend geeignetes Modellprotein.

Creutzfeld-Jakob, Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), Alzheimer'sche und die Parkinson'sche Krankheit - all diese Erkrankungen wurzeln in fehlgefalteten Proteinen (z.B. Prionen), die durch anschließende Aggregation zu unlöslichen Ablagerungen am neuronalen Gewebe oder in anderen Organen führen und eine schleichende Zerstörung dieser verursachen. Die genauen Mechanismen, die hinter diesen Fehlfaltungen stehen, sind daher von höchster Bedeutung für das Verständnis der genannten Erkrankungen und für die Entwicklung entsprechender Heilmittel.

Um Entfaltungsprozesse von Proteinen mit dem neuen SAXS-Instrument untersuchen zu können, wurden geeignete Probenumgebungen entwickelt, die die Möglichkeit schufen, Druck- und Temperaturbedingungen einstellen zu können, unter den Proteine Entfaltungsprozessen unterliegen und so einen tieferen Einblick in die diesen Prozessen zugrundeliegenden Effekte zu erhalten.

Diese Arbeit gliedert sich in vier wesentliche Abschnitte: Im ersten Teil werden die theoretischen Grundlagen der Röntgenstreuung an Materie dargelegt. Das zweite Kapitel gibt einen kurzen Überblick über den Aufbau und die Natur von Proteinen gefolgt von Details über die im Zuge dieser Arbeit untersuchten Proteine. Im dritten Kapitel werden die Beamline BL9 des DELTA sowie das dort entstandene, neue SAXS-Instrument ausführlich beschrieben und anschließend die externen Strahlungsquellen vorgestellt, an den ergänzende Messungen vorgenommen worden sind. Die Ergebnisse der am DELTA sowie der an den externen Strahlungsquellen durchgeführten Messungen sind im fünften Kapitel dargestellt, und eine Zusammenfassung bildet den Inhalt des letzten, sechsten Kapitels.

## 2 Grundlagen der Röntgenstreuung

Man spricht von elastischer Röntgenstreuung, wenn die Energie  $E = h\nu$  bzw. die Wellenlänge  $\lambda = c_0/\nu$  der einfallenden und der gestreuten Wellen gleich ist, mit der Frequenz  $\nu$ , dem Planck'schen Wirkungsquantum  $h$  und der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum  $c_0$ . Elastische Streuung wird häufig auch als kohärente Streuung (bei nichtkohärenter Anregung) bezeichnet. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung in einem Röntgenkleinwinkelstreuexperiment ist stets so gewählt, dass die gestreute Intensität im Wesentlichen durch elastische Streuprozesse hervorgerufen wird.

Der Streuprozess als solcher ist als statisch anzusehen, denn die dynamischen Prozesse auf atomarer Skala sind viel zu kurzlebig, um in einem SAXS Experiment erfasst zu werden, wenngleich sie inzwischen prinzipiell mit Hilfe der Synchrotronstrahlung detektiert werden können. Wenn von zeitaufgelöster Röntgenstreuung die Rede ist, so ist damit stets gemeint, dass eine zeitliche Veränderung der Probe detektiert wird, die durch äußere Parameter (Temperatur, Druck, Cosolventien etc.) verursacht wird und die auf einer gegenüber den dynamischen Prozessen der Materie unvergleichbar längeren Zeitskala stattfindet.

Einen Überblick über die mit Hilfe der Röntgenstreuung und anderer experimenteller Methoden zugänglichen Längenskalen und Strukturen gibt die Abbildung 2.1. Die genauen Zusammenhänge zwischen der Intensitätsverteilung des Streubildes und der inneren Struktur der Materie sind Gegenstand der folgenden Unterkapitel über die Theorie der Röntgenstreuung.

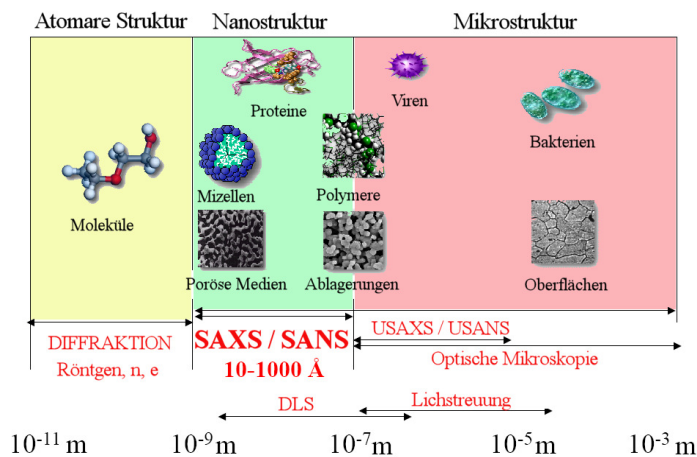


Abbildung 2.1: Übersicht der über verschiedene Methoden zugänglichen Längenskalen. Verwendete Abkürzungen: Dynamic Light Scattering (DLS), Small Angle Neutron Scattering (SANS), TEM (Transmission Electron Microscopy), USAXS (Ultra Small Angle X-Ray Scattering).



## 2.1 Der Streuprozess

Die klassische Streutheorie nach [Thomson] und [Debye] bildet die mathematische Grundlage der Röntgenkleinwinkelstreuung. Es wird nur die kohärente Streustrahlung berücksichtigt und Mehrfachstreuungsprozesse vernachlässigt [Guinier55]. Die genannten Voraussetzungen sind somit im Wesentlichen die gleichen wie in der Kristallstrukturanalyse. Von diesen ausgehend soll nun die Streuamplitude bestimmt werden, die von einem einzelnen Partikel verursacht wird, das vom homogenen Medium (Lösungsmittel) umgeben ist.

Die prinzipielle Darstellung eines elastischen Streuprozesses für ein im Vakuum befindliches Partikel ist in der Abbildung 2.2 gezeigt.

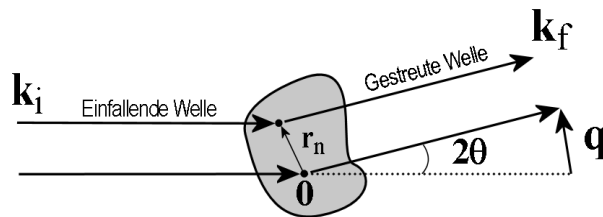


Abbildung 2.2: Prinzipielle Skizze eines Streuprozesses. Der einfallende Röntgenstrahl, gekennzeichnet durch den Wellenvektor  $\mathbf{k}_i$ , wird exemplarisch an zwei punktförmigen Streuzentren innerhalb des Partikels gestreut. Zu der unter einem Streuwinkel  $2\theta$  gestreuten Intensität gehört ein Wellenvektor  $\mathbf{k}_f$  und der Wellenvektorübertrag ist definiert als  $\mathbf{q} = \mathbf{k}_f - \mathbf{k}_i$

Die Wellenvektoren  $\mathbf{k}_i$  der einfallenden und  $\mathbf{k}_f$  der gestreuten Welle sind bei der elastischen Streuung betragsgleich und definiert als

$$k_i = k_f = \frac{2\pi}{\lambda}. \quad (2.1)$$

Zu der unter einem Streuwinkel  $2\theta$  gestreuten Intensität gehört ein Wellenvektorübertrag  $\mathbf{q} = \mathbf{k}_f - \mathbf{k}_i$ , für dessen Betrag im elastischen Streuprozess gilt

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta). \quad (2.2)$$

Für die Amplitude  $A(\mathbf{q})$  der unter einem Streuwinkel  $2\theta$  gestreuten Welle gilt

$$A(\mathbf{q}) = A_e f_n e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_n}. \quad (2.3)$$

Hierbei kennzeichnen  $\mathbf{r}_n$  die Position des Streuzentrums (siehe Abbildung 2.2),  $A_e$  die Streuamplitude eines einzelnen Elektrons und  $f_n$  die Streukraft des punktförmigen Streuers, die als Verhältnis der gestreuten und der einfallenden Amplitude definiert ist. Zwar ist die Streukraft auch eine Funktion von  $\mathbf{q}$ , wenn aber statt eines punktförmigen Streuers das an dieser Stelle platzierte Atom betrachtet wird, gilt bei kleinen Streuwinkeln näherungsweise  $f(q) \approx f(0) = Z$  mit der Elektronenzahl  $Z$ .

Um nun zu der an einem ausgedehnten System gestreuten Intensität zu gelangen, muss man berücksichtigen, dass die an allen Punkten des Partikels generierten Sekundärwellen miteinander interferieren. Wie später gezeigt wird, kann das umgebende, homogene Medium zunächst ignoriert werden. Die vom aus  $K$  Atomen zusammengesetzten Partikel ausgehende Streuamplitude  $A(\mathbf{q})$  ist eine phasengerechte Superposition der von allen Atomen des Partikels ausgehenden Streuwellen, und es gilt

$$A(\mathbf{q}) = \sum_{n=1}^K A_n(\mathbf{q}) = A_e \sum_{n=1}^K f_n e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_n}. \quad (2.4)$$

Für die gestreute Intensität  $I(\mathbf{q})$  gilt dann [Guinier55]

$$I(\mathbf{q}) = A(\mathbf{q})A(\mathbf{q})^* = A_e^2 \left( \sum_{n=1}^K f_n e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_n} \right) \left( \sum_{m=1}^K f_m e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_m} \right) = A_e^2 \sum_{n=1}^K \sum_{m=1}^K f_n f_m \cos(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_{nm}), \quad (2.5)$$

wobei  $\mathbf{r}_{nm} = \mathbf{r}_n - \mathbf{r}_m$  der Abstandsvektor zweier beliebiger Atome innerhalb des Partikels ist.

Da die Energie eines Röntgenphotons sehr groß im Vergleich zu den Bindungsenergien in leichten Atomen ist, verhalten sich die Elektronen im Feld der einfallenden Welle wie freie Elektronen<sup>1</sup>. Für die im Abstand  $a$  unter einem Winkel  $2\theta$  von einem einzelnen Elektron gestreute Intensität  $I_e = A_e^2$  gilt dann die nach Thomson benannte Streuformel

$$I_e = \frac{I_0}{a^2} r_e^2 \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2} = \frac{I_0}{a^2} r_e^2 P \quad (2.6)$$

mit dem klassischen Elektronenradius  $r_e = e^2/(m_e c^2 4\pi\epsilon_0)$  und der einfallenden Intensität  $I_0$  für den Fall unpolarisierter Strahlung. Hierbei bezeichnen  $e$  und  $m_e$  die Ladung bzw. die Masse des Elektrons sowie  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante. Bei der Verwendung von (horizontal polarisierter) Synchrotronstrahlung gilt für den Polarisationsfaktor  $P$  in vertikaler Streuebene ein Wert von 1 und in horizontaler Streuebene ein Wert von  $\cos^2(2\theta)$ . Unter den in einem SAXS-Experiment beobachteten, kleinen Winkeln kann  $P$  jedoch stets gleich 1 gesetzt werden und die von einem Elektron gestreute Intensität besitzt dann keine  $2\theta$ -Abhängigkeit.

## 2.2 Die Röntgenkleinwinkelstreuung

Früh erkannte man, dass Substanzen, die aus submikrometergroßen Partikeln bestehen (z.B. kolloidale Pulver, Faserstoffe) stets ein diffuses Röntgenstreubild bei kleinen Winkeln verursachen. Bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die diffuse Streuung mit der ungeordneten räumlichen Verteilung dieser Partikel in Verbindung gebracht [Krishnamurti].

<sup>1</sup>Eine Ausnahme bilden die Elektronen schwerer Atome, deren Beitrag aber bei SAXS-Experimenten an Proteinen in der Regel keine Rolle spielt.

Die in einer Flüssigkeit gelösten Teilchen besitzen in aller Regel keine Vorzugsorientierung, vielmehr sind sie gleichmäßig in alle Raumrichtungen orientiert. Demzufolge ist die Verteilung der an einer solchen, flüssigen Probe gestreuten Intensität richtungsunabhängig, und die gestreute Intensität ist lediglich eine Funktion des Streuwinkels.

In einem Röntgenkleinwinkelstreuexperiment wird das Probenvolumen, welches prinzipiell flüssig, fest oder sogar gasförmig sein kann, vom monochromatischen Röntgenstrahl durchstrahlt und die unter kleinen Winkeln (unterhalb von 10 Grad) gestreute Intensität wird aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der gestreuten Intensität erfolgt üblicherweise mit einem 2-dimensional ortsauflösenden Detektor, um einerseits die Zählrate durch anschließende radiale Integration zu erhöhen und andererseits um Anisotropien im Streusignal - falls welche vorhanden sind - erkennen zu können. Der prinzipielle Aufbau eines SAXS-Experiments ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

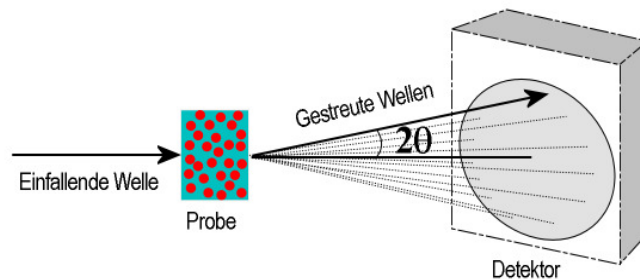


Abbildung 2.3: Prinzipielle Skizze eines SAXS-Experiments. Der einfallende Röntgenstrahl wird an der Probe gestreut und die gestreute Strahlung wird typischerweise mit Hilfe eines zweidimensional auflösenden Detektors in Abhängigkeit vom Streuwinkel  $2\theta$  aufgezeichnet.

Die Beschränkung auf kleine Winkel folgt unmittelbar aus dem Reziprozitätsgesetz, das für alle Streuphänomene von elektromagnetischen Wellen gilt: Umso größer die Dimensionen der die Streuung verursachenden Strukturen sind, desto kleiner sind die Winkel, unter denen die Streueffekte zu beobachten sind. Ganz analog verhält es sich mit der Beugung von Neutronen, der lediglich ein anderes physikalisches Wirkungsprinzip zu Grunde liegt.

Die über Röntgenkleinwinkelstreuung zugänglichen Längenskalen - in anderen Worten die Auflösung eines SAXS-Experiments - liegen üblicherweise in der Größenordnung zwischen 10 und 1000 Å ( $1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm}$ ).

In einer verdünnten Lösung aus kugelförmigen Partikeln, deren Abstände unregelmäßig und groß gegenüber der Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung sind, besitzen die von allen Partikeln ausgehenden, gestreuten Wellen eine zufällige Phasenbeziehung zueinander. Die Gesamtamplitude entspricht dann einfach dem Vielfachen der Amplitude eines einzelnen, isoliert gedachten Partikels.

Man betrachte ein kugelförmiges Teilchen, dessen Durchmesser  $2R$  groß gegenüber der Wellenlänge ist und dessen strukturelle Inhomogenitäten nur auf molekularer Ebene zu finden sind, also auf einer Längenskala, die sehr klein gegenüber der Wellenlänge ist.

Ein solches Teilchen hat demnach aus der ‘‘Sicht’’ des Röntgenstrahls eine homogene Dichte, was einen typischen Fall für Proteinmoleküle darstellt.

Die von allen Teilen des Partikels in Einfallrichtung gestreuten Wellen sind stets in Phase und überlagern sich konstruktiv zum Intensitätsmaximum unter dem Streuwinkel  $2\theta = 0$ . Steigt der Streuwinkel, so erhöht sich auch die Phasendifferenz zwischen den von den einzelnen Volumenelementen ausgehenden, gestreuten Wellen und die Amplitude sinkt bedingt durch die zunehmende destruktive Interferenz. Im Falle von kugelförmigen Streuern kommt es letztlich zu einem Verschwinden der Streuintensität unter einem Streuwinkel, der durch  $qR \simeq 4.493$  bestimmt ist <sup>2</sup> (siehe Abbildung 2.4). Betrachtet man zwei unterschiedlich große Partikel, so folgt gemäß Gleichung 2.2, dass der Winkel, unter dem das Verschwinden der Streuintensität zu beobachten ist, umso größer sein muss, je kleiner das Partikel ist. Dies demonstriert, wie man bereits aus dem Verlauf der winkelabhängigen gestreuten Intensität Rückschlüsse auf die Geometrie der beteiligten Partikel ziehen kann.

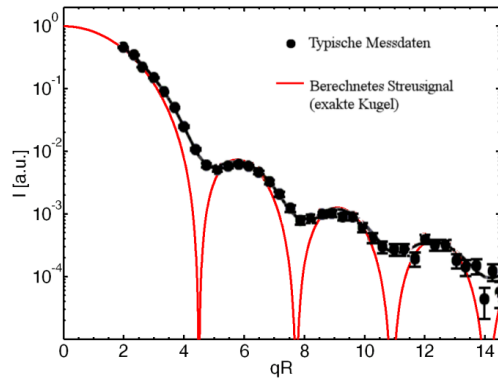


Abbildung 2.4: Vergleich der berechneten Intensität eines exakt kugelförmigen Streuers mit realen, durch Polydispersität und Abweichung von der Kugelform abweichenden Messdaten.

Eine Abweichung der Geometrie von der Kugelform schlägt sich sowohl im Intensitätsverlauf bei kleinen Winkeln als auch in der Lage der Minima nieder. Bei einem realen System, in dem die Streuer nicht zwingend eine exakt kugelförmige Form besitzen und/oder eine nicht konstante Größe aufweisen (Polydispersität), wandeln sich die scharfen Nullstellen in lokale Minima. Es ergibt sich ein typischer Verlauf der SAXS-Streuintensität, die gekennzeichnet ist durch ein Maximum bei  $\mathbf{q} = 0$  und die stark abfallende, durch die Minima modulierte Intensität bei größeren Winkeln, so wie in Abbildung 2.4 dargestellt.

## 2.3 Komplexe Partikel

Für ein ausgedehntes Makromolekül, das zudem von Lösungsmittel umgeben ist, wäre es bei der großen Anzahl der beteiligten Atome sehr schwierig aus den exakten Atom-

<sup>2</sup>Der exakte Wert entspricht der kleinsten Lösung der transzendenten Gleichung  $qR = \tan(qR)$

positionen gemäß Gleichung 2.5 zu der Streuintensität zu gelangen. Es ist daher zweckmäßig, die diskreten Atompositionen durch eine kontinuierliche räumliche Funktion der Elektronendichte zu ersetzen, denn die Elektronen allein tragen zum Röntgenstreusignal bei [Guinier63].

Die in Gleichung 2.4 vorkommende Streukraft  $f_n$  an der Stelle  $\mathbf{r}_n$  kann dazu durch  $\rho(\mathbf{r})dV$  ersetzt werden, wobei  $\rho(\mathbf{r})$  die ortsabhängige Elektronendichte ist. Mit der so definierten räumlichen Elektronendichte kann die Summation durch eine Integration ersetzt werden, und Gleichung 2.4 wird zu

$$A(\mathbf{q}) = A_e \int \rho(\mathbf{r})e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}dV. \quad (2.7)$$

Der Einfachheit halber wird die Einheitsamplitude fortan  $A_e = 1$  gesetzt. Die Gleichung 2.7 ist offensichtlich eine Fouriertransformation der Elektronendichteverteilung  $\rho(\mathbf{r})$  des betrachteten Partikels. Man erkennt darin die wesentliche Aussage der *1. Born'schen Näherung* wieder: Die Streuamplitude für einen elastischen Streuprozess an einem Störpotenzial ist gleich der Fouriertransformierten des Potenzials. Bei der elastischen Röntgenstreuung ist das Störpotenzial gerade die räumliche Elektronendichteverteilung  $\rho(\mathbf{r})$ .

Es ergibt sich somit ein Streubild, in dem die Variation der Intensität in Abhängigkeit vom Beobachtungswinkel charakteristische Informationen über die Elektronendichteverteilung und damit über die Struktur des die Streuung verursachenden Partikels enthält. Einen besonderen Stellenwert hat hierbei die hypothetische (weil experimentell nicht zugängliche) Amplitude  $A(\mathbf{q} = \mathbf{0})$ , also die unter dem Winkel  $2\theta = 0$  beobachtete. Für diesen Streuwinkel ist das Integral proportional zur Gesamtzahl  $N$  aller im bestrahlten Probenvolumen enthaltenen Elektronen, denn

$$A(\mathbf{0}) \propto \int \rho(\mathbf{r})dV = \sum_{n=1}^K f_n = N. \quad (2.8)$$

Mehrfachstreuprozesse, also z.B. die erneute Streuung einer Sekundärwelle, werden in dieser Beschreibung nicht berücksichtigt. Diese können bei stark streuenden Proben großer Dicke jedoch einen durchaus nicht zu vernachlässigenden Beitrag zum Gesamtstreusignal liefern. Durch die Verwendung eines ausreichend dünnen Präparates mit geringer Streukraft (wie im Falle von Proteinlösungen) ist die Mehrfachstreuung allerdings in der Tat vernachlässigbar.

Die Annahme der Abwesenheit von inkohärenter Streuung ist darüber hinaus ebenfalls nicht ganz korrekt. Die z.B. durch Fluoreszenz erzeugte inkohärente Streustrahlung (also mit einer von der einfallenden Welle verschiedenen Wellenlänge) ist jedoch isotrop und trägt zum Gesamtstreubild unter kleinen Winkeln lediglich in Form eines konstanten, aber um viele Größenordnungen schwächeren Untergrundes bei und bleibt daher vernachlässigbar.

## 2.4 Partikel in Lösung

Die für die Berechnung der Streuamplitude verwendete Elektronendichteverteilung  $\rho(\mathbf{r})$  beschränkte sich bisher auf das Proteinmolekül, eine Berücksichtigung des Lösungsmittels fand bislang nicht statt. Betrachtet man jedoch ein Proteinmolekül mit der Elektronendichte  $\rho_p(\mathbf{r})$ , das von einem als homogen anzusehenden Lösungsmittel mit der Dichte  $\rho_b$  umgeben ist und berücksichtigt, dass das (bestrahlte) Lösungsvolumen sehr groß gegenüber den Proteindimensionen ist, kann die Gesamtstreuamplitude geschrieben werden zu

$$A(\mathbf{q}) = \int_{V.\text{Protein}} (\rho_p(\mathbf{r}_p) - \rho_b) e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_p} dV + \rho_b \int_{V.\text{Lösung}} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} dV. \quad (2.9)$$

Die Streuamplitude setzt sich demnach zusammen aus einem Term, der den Streubeitrag des Proteinmoleküls angibt und nur die Elektronendichtedifferenz  $\rho_p(\mathbf{r}_p) - \rho_b$  berücksichtigt sowie aus einem Term, der die Streuung an dem gesamten Lösungsmittel wiedergibt. Bei makroskopischen Dimensionen des Probenvolumens ist dieser Term gleich einer Deltafunktion, so dass der Streubeitrag des Lösungsmittels auf die Vorwärtsstreuung beschränkt ist, d.h. nur für  $A(0)$  von Null verschieden ist. Demnach ist für die im Experiment zugänglichen Werte  $q > 0$  die Streuamplitude eines von Lösungsmittel umgebenen Proteinmoleküls gleich der eines im Vakuum gedachten Proteinmoleküls, mit einer Elektronendichte, die um den Wert der Elektronendichte des Lösungsmittels reduziert ist. Wann immer im Folgenden die Elektronendichte Erwähnung findet, ist damit fortan die Elektronendichtedifferenz

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_p(\mathbf{r}) - \rho_b \quad (2.10)$$

gemeint.

## 2.5 Isotrope Systeme

Diese Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung verdünnter Systeme von wässrigen Proteinlösungen, in den die einzelnen Partikel keinerlei Vorzugsorientierung besitzen. In anderen Worten handelt es sich um isotrope Systeme, deren Streubilder bei einer Änderung der Orientierung der Probe bzgl. der Strahlrichtung konstant bleiben.

In diesen Fällen kann der Phasenfaktor  $e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}$  in der Gleichung 2.7 durch einen räumlich gemittelten Term<sup>3</sup> ersetzt werden, und die Gleichung vereinfacht sich zu

$$\langle A(\mathbf{q}) \rangle_{\Omega} = \int \rho(r) \langle e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \rangle_{\Omega} dV = \int \rho(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dV = 4\pi \int_0^{\infty} \rho(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr. \quad (2.11)$$

Bei ausreichend verdünnten Systemen, d.h. wenn die Abstände der Partikel in der Lösung sehr groß gegenüber der Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung sind

---

<sup>3</sup>Die Raummittelung erfolgt über den vollen Raumwinkel  $\Omega = 4\pi$  und geschieht wie folgt:  $\langle e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \rangle_{\Omega} = \frac{1}{\Omega} \int e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\Omega = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \sin\theta d\theta d\phi = \frac{\sin(\mathbf{q}\cdot\mathbf{r})}{\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}$

und es daher nicht zu Interferenzeffekten zwischen den von den einzelnen Partikeln ausgehenden Streuwellen kommen kann, ist die Streuamplitude des gesamten Systems proportional zu der Streuamplitude eines einzelnen, über alle möglichen Orientierungen gemittelten Partikels gemäß Gleichung 2.11. Für die Streuintensität des gesamten Probensystems aus identischen Partikeln, auch Formfaktor  $F(q)$  genannt, folgt dann

$$F(q) = \langle |A(\mathbf{q})|^2 \rangle_{\Omega}. \quad (2.12)$$

Unter den genannten Voraussetzungen kann also die an einer verdünnten Proteinlösung gestreute Intensität aus der gegebenen Elektronendichteverteilung eines einzelnen Partikels (Proteins) berechnet werden.

## 2.6 Die Abstandsverteilungsfunktion

Wie in Gleichung 2.7 gezeigt, besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der räumlichen Elektronendichteverteilung  $\rho(\mathbf{r})$  und der Streuamplitude  $A(\mathbf{q})$ . Dieser Zusammenhang ist durch eine Fouriertransformation gegeben; zu der Elektronendichteverteilung, einer Funktion im realen Raum, existiert also die zugehörige Streuamplitude als Funktion im reziproken Raum. Über diesen Zusammenhang und die im letzten Kapitel angeführte Mittelung lässt sich die Observable des Streuexperiments - die Streuintensität - einfach berechnen, wenn die Elektronendichteverteilung der streuenden Partikel bekannt ist. Der umgekehrte Weg, also aus der Messung des Streusignals mittels einer Fourier-Rücktransformation zurück zu der Elektronendichteverteilung zu gelangen und so sämtliche strukturelle Information über das streuende Objekt zu erhalten, ist nicht möglich. Zum einen geht durch die räumliche Mittelung der Streuamplitude ein Großteil der Strukturinformation verloren. Darüber hinaus kann in einem SAXS-Experiment stets nur die Intensitätsverteilung gemessen werden, die Amplitudenfunktion mit ihrer für die Rücktransformation erforderlichen Phaseninformation ist jedoch nicht zugänglich.

Man kann dennoch aus dem Informationsgehalt des Streubildes Rückschlüsse auf räumliche Strukturen des Streuers ziehen, indem man andere Verknüpfungen zwischen dem Realraum und dem mittels Streumethoden zugänglichen reziproken Raum nutzt. Für die Intensität  $I(\mathbf{q})$  gilt gemäß Gleichung 2.12

$$I(\mathbf{q}) = A(\mathbf{q})A(\mathbf{q})^* = I_e \int \int \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_2-\mathbf{r}_1)}dV_1dV_2. \quad (2.13)$$

Mit der Variablensubstitution  $\mathbf{r} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1$  erhält man

$$I(\mathbf{q}) = I_e \int \int \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_1 + \mathbf{r})e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}dV_1dV = \int P(\mathbf{r})e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}dV, \quad (2.14)$$

was wieder eine Fouriertransformation ist, diesmal jedoch die der Funktion  $P(\mathbf{r})$ , auch bekannt als die *Patterson Funktion*. Dabei handelt es sich um die Autokorrelation der Elektronendichte [Glatter]

$$P(\mathbf{r}) = \int \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_1 + \mathbf{r})dV_1. \quad (2.15)$$

Die Gleichung 2.14 liefert einen weiteren Zusammenhang zwischen dem realen Raum und dem reziproken Raum, diesmal ist es allerdings die Fouriertransformation der Streuintensität, und diese ist im Gegenteil zur Streuamplitude über das Streuexperiment zugänglich. Wendet man auf den in Gleichung 2.14 erhaltenen Ausdruck für die gestreute Intensität ebenfalls eine räumliche Mittelung an, so erhält man schließlich [Feigin]

$$I(q) = \langle I(\mathbf{q}) \rangle_{\Omega} = 4\pi \int_0^{\infty} \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr. \quad (2.16)$$

Eine Umkehrung der Fouriertransformation liefert  $\gamma(r)$ , die Abstandsverteilungsfunktion (engl.: *distance distribution function*), auch bekannt als *charakteristische Funktion* [Guinier55], für die gilt

$$\gamma(r) = \langle P(\mathbf{r}) \rangle_{\Omega} = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} q^2 dq. \quad (2.17)$$

Man erhält damit eine Verknüpfung zwischen einer Funktion des realen Raums - nämlich der Abstandsverteilungsfunktion  $\gamma(r)$  - und der experimentell direkt zugänglichen Intensitätsfunktion  $I(q)$  (siehe Gleichung 2.17). Es bietet sich daher an, den Informationsgehalt dieser Funktion in Bezug auf die Geometrie der die Streuung verursachenden Partikel auszuwerten. Anschaulich gibt die Abstandsverteilungsfunktion eines Partikels die Wahrscheinlichkeit an, sich im Abstand  $r$  von einem beliebigen Punkt des Partikels noch innerhalb des Partikels zu befinden. Eine der wenigen Partikelformen, für die sich die Abstandsverteilungsfunktion analytisch bestimmen läßt, ist die Kugel. Die (auf 1 normierte) Abstandsverteilungsfunktion  $\gamma_0(r)$  einer Kugel mit dem Radius  $R$  lautet (Verlauf in Abbildung 2.5 dargestellt):

$$\gamma_0(r) = 1 - \frac{3r}{4R} + \frac{r^3}{16R^3} \quad (2.18)$$

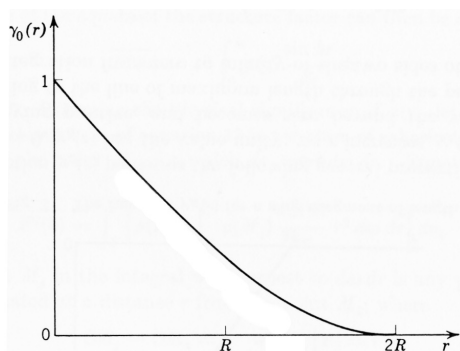


Abbildung 2.5: Normierte Abstandsverteilungsfunktion für ein kugelförmiges Partikel mit dem Radius  $R$  [Guinier55].



Aus der anschaulichen Bedeutung der Abstandsverteilungsfunktion  $\gamma_0(r)$  wird klar, weshalb  $\gamma_0(r) = 0$  für  $r > 2R$  ist: Die größtmögliche Entfernung zwischen zwei Punkten innerhalb einer Kugel ist gerade der Kugeldurchmesser. Die aus der Abstandsverteilungsfunktion abgeleitete Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  (engl.: *pair distance distribution function*) bietet einen großen praktischen Nutzen für die Dateninterpretation, da sie gemäß Gleichung 2.17 direkt aus den Messdaten berechnet werden kann und einige unmittelbare Aussagen über die Partikelstruktur erlaubt. Für die Paarverteilungsfunktion gilt:

$$p(r) = r^2\gamma(r) \quad (2.19)$$

Sie ist ein Maß für die Zahl der Volumenelemente, die sich im Abstand  $r$  von einem beliebig gewählten Volumenelement innerhalb des Partikels befinden. Auch diese Funktion besitzt nur dann von Null verschiedene Funktionswerte, wenn  $r \leq D$  ist, wobei  $D$  die maximale Ausdehnung des Partikels angibt.

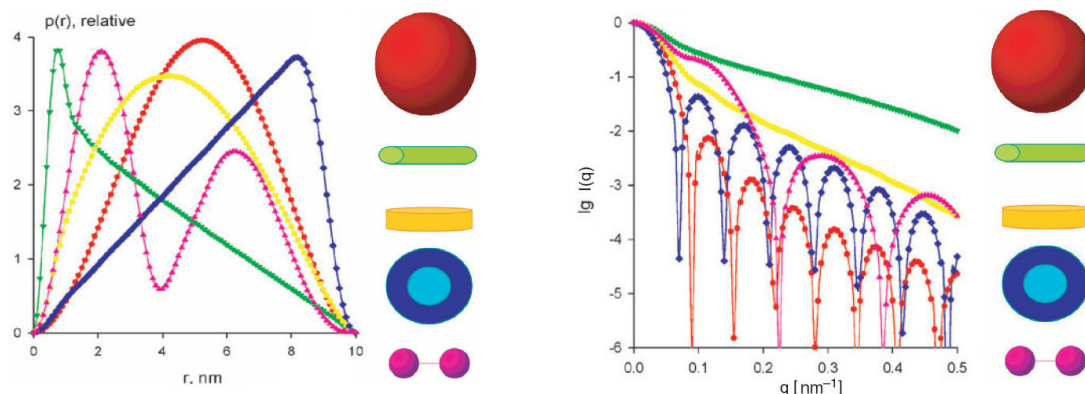


Abbildung 2.6: Abstandsverteilungsfunktionen einiger einfacher geometrischer Körper (links) und die diesen Abstandsverteilungsfunktionen zu Grunde liegende, experimentell bestimmte Streukurven. [Svergun03].

In der Abbildung 2.6 sind die Paarverteilungsfunktionen einiger einfacher, aber für gelöste Proteine typischer geometrischer Körper dargestellt, zusammen mit den gemessenen Streukurven, aus denen sie bestimmt wurden. Durch einen Vergleich der aus den eigenen Messdaten gewonnenen Abstandsverteilungsfunktion (oder Streukurven) mit diesen Beispieldaten läßt sich oft bereits eine grobe Aussage über die geometrische Struktur der in Lösung befindlichen Teilchen machen.

## 2.7 Übersicht Realraum - Fourierraum

Zusammenfassend erhält man für ein isotropes System aus homogenen Streuern die folgenden, auf Fouriertransformationen basierenden Verknüpfungen zwischen dem realen und dem reziproken Raum. Das Bindeglied zwischen dem realen und dem reziproken

Raum ist stets die (umkehrbare) Fouriertransformation (FT), jedoch wird die Streuamplitude  $A(\mathbf{q})$ , also die Funktion mit dem vollständigsten Strukturinformationsgehalt nur mittels Betragsquadratbildung und Orientierungsmittelung zur experimentell zugänglichen Intensität  $I(q)$ . Demzufolge ist der aus letzterer, durch Fourierrücktransformation erzielbare Informationsgehalt über die Struktur des Streuers, deutlich geringer.

Realer Raum		Reziproker Raum
$\rho(\mathbf{r})$	$\xleftrightarrow{FT}$	$A(\mathbf{q})$
$\downarrow$		$\downarrow$
$P(\mathbf{r})$	$\xleftrightarrow{FT}$	$I(\mathbf{q})$
$\downarrow$		$\downarrow$
$\gamma(r)$	$\xleftrightarrow{FT}$	$I(q)$

## 2.8 Die Guinier- und Porodnäherung

Vergleicht man die in Abbildung 2.6 dargestellten Streukurven, so fällt auf, dass trotz der stark unterschiedlichen Verläufe der Streukurven ihr Intensitätsabfall bei kleinen  $q$ -Werten (also unter kleinen Winkeln) sehr ähnlich ist und bei genauerer Analyse sogar stets mit einer Gaußfunktion angenähert werden kann. Diesen Umstand erkannte Guinier [Guinier55], und die nach ihm benannte Guiniernäherung liefert eine Approximation für den Intensitätsverlauf bei kleinen Winkeln. Für diese gilt

$$I(q) \simeq I(0)e^{-\frac{1}{3}R_G^2 q^2} \quad (2.20)$$

mit der Vorwärtsstreuung  $I(0)$  und dem Gyrationradius  $R_G$ .

Dabei ist der Gyrationradius oder Streumassenradius  $R_G$  ein Maß für die räumliche Ausdehnung der für die Streuung verantwortlichen Partikel und wie folgt definiert [Guinier55] [Feigin]:

$$R_G^2 = \frac{\int r^2 \rho(\mathbf{r}) dV}{\int \rho(\mathbf{r}) dV} = \frac{\int_0^D r^2 p(r) dr}{2 \int_0^D p(r) dr}. \quad (2.21)$$

Die Definition des Gyrationradius über die Wurzel der mittleren Abstandsquadrate aller Elektronen zum Ladungsschwerpunkt erfolgt also analog zur Definition des Trägheitsmoment in der Mechanik. Unter Ausnutzung der Gleichung 2.20 kann der Gyrationradius  $R_G$  aus der Streukurve  $I(q)$  in einer Auftragung  $\ln I(q)$  gegen  $q^2$  (Guinier-Plot) über die Steigung der darin linear abfallenden Messwerte bestimmt werden, wie in Abbildung 2.7 gezeigt. Die Gültigkeit der Guiniernäherung kann für sphärische und homogene Teilchen bis zum Wert  $q_{Max} R_G = 1.3$  angenommen werden [Svergun03] [Leclerc], wobei  $q_{Max}$  die obere Intervallgrenze des für die Anpassung verwendeten  $q$ -Bereiches angibt.

Für die in Strahlrichtung gestreute Intensität  $I(0)$ , auch Vorwärtsstreuung genannt, folgt gemäß den Gleichungen 2.13 und 2.8

$$I(0) = A(0)A(0)^* = (\rho V)^2 \quad (2.22)$$

mit einer auf absolute Skala (in Einheiten von  $\text{cm}^{-1}$  [Orthaber]) geeichten Intensität  $I$ , wobei  $V$  das Volumen des Partikels mit der (homogenen) Elektronendichtedifferenz  $\rho$  angibt. Nun ist der Wert von  $I(0)$  prinzipiell nicht experimentell bestimmbar, denn die Vorwärtsstreuung fällt stets mit dem transmittierten Teil des einfallenden Strahls zusammen. Ist der Gyrationradius allerdings bestimmt, so kann die Vorwärtsstreuung über eine Extrapolation der Daten im Guinierplot auf den Wert  $I(0)$  bestimmt werden, wie in Abbildung 2.7 dargestellt.

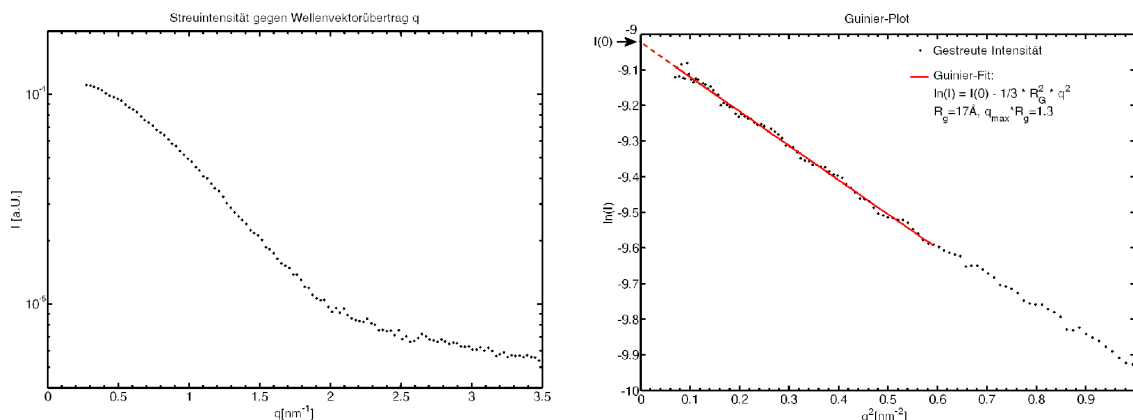


Abbildung 2.7: Links: Halblogarithmische Darstellung der an einer Proteinlösung gestreuten Intensität gegen den Wellenvektorübertrag  $q$ . Rechts: Der für die Guiniernäherung relevante  $q$ -Bereich ist aufgetragen als Guinierplot ( $\ln(I)$  gegen  $q^2$ ) zur Bestimmung des Gyrationradius  $R_G$  und der Vorwärtsstreuung  $I(0)$ .

Für einige beispielhafte geometrische Körper stehen die Dimensionen der Partikel in der folgenden Weise im Zusammenhang mit dem Gyrationradius [Mittelbach64]

<b>Form</b>	<b>Gyrationradius</b>
Kugel mit Radius $R$	$R_G^2 = \frac{3}{5} R^2$
Hohlkugel mit den Radien $R_1, R_2$	$R_G^2 = \frac{3}{5} \frac{R_2^5 - R_1^5}{R_2^3 - R_1^3}$
Ellipsoid mit den Halbachsen $A, B, C$	$R_G^2 = \frac{A^2 + B^2 + C^2}{5}$
Zylinder mit dem Radius $R$ und der Länge $L$	$R_G^2 = \frac{R^2}{2} + \frac{L^2}{12}$

Die Gleichung 2.20 ist im Prinzip gültig für jede beliebige Partikelform. Für elon-gierte oder abgeflachte Partikel können alternativ die Gyrationradien des Querschnitts  $R_C$  und der Dicke  $R_T$  bestimmt werden, für die die Näherungen

$$qI(q) = I_C(0)e^{-\frac{1}{2}R_C^2 q^2} \quad (2.23)$$

und

$$q^2 I(q) = I_T(0)e^{-R_T^2 q^2} \quad (2.24)$$

gelten [Svergun03]. Auch hierfür gilt die Beschränkung der Gültigkeit auf  $q_{Max}R_G < 1.3$ , was die Anwendbarkeit auf extreme Partikelformen ausschließt.

Neben der Guiniernäherung, welche für sehr kleine Winkel den Abfall der gestreuten Intensität approximiert, gibt es eine Approximation für den Abfall der gestreuten Intensität bei großen Winkeln. Porod [Porod51] hat gezeigt, dass für ein System aus monodispersen Partikeln mit glatter Oberfläche<sup>4</sup> die gestreute Intensität asymptotisch einem  $q^4$ -Gesetz gehorcht

$$I(q) \simeq 2\pi \frac{\rho^2 S}{q^4}, \quad (2.25)$$

wobei  $\rho$  wieder für die Elektronendichtedifferenz steht, und  $S$  die spezifische Oberfläche angibt ( $S$  sagt aus, wieviel Teilchenoberfläche in einer Gewichtseinheit Probe enthalten ist).

Man kann also zusammenfassend sagen, dass der Verlauf der Streukurve bei kleinen Winkeln unabhängig von der genauen Form der an der Streuung beteiligten Partikel ist und lediglich vom Gyrationradius  $R_G$  sowie von der Zahl der streuenden Teilchen abhängt. Die Streuung unter großen Winkeln hingegen wird hauptsächlich von der Oberflächenstruktur der Partikel beeinflusst.

In der Abbildung 2.8 ist die berechnete Streukurve einer Kugel über einen sehr großen Winkelbereich dargestellt und die Guinier- sowie die Porod-Approximationen sind eingezeichnet.

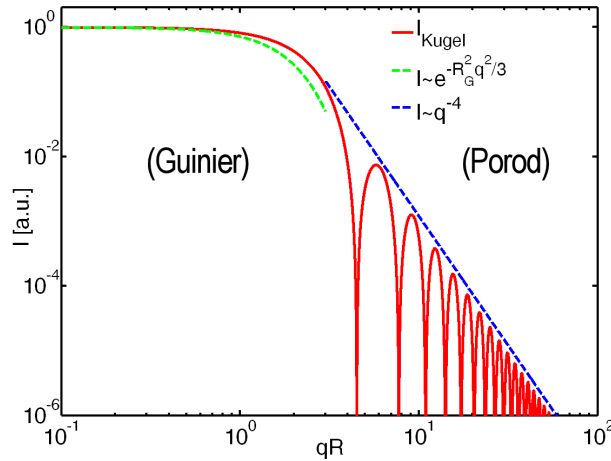


Abbildung 2.8: Berechnete Streukurve einer Kugel, dargestellt über einen sehr großen Winkelbereich. Die Guinier- und Porod-Approximationen sind ebenfalls eingezeichnet.

Die Porod-Näherung erweist sich als sehr hilfreich bei der Bestimmung der Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  gemäß Gleichungen 2.17 und 2.19. Für diese Berechnung muss

<sup>4</sup>Glatt bedeutet hier eine nicht-fraktale Oberflächenstruktur. Für eine stark zerfurchte Oberfläche ergeben sich Abweichungen von der  $q^4$ -Abhängigkeit [Malessa].

strenggenommen die Integration über den gesamten  $q$ -Bereich erfolgen, weil die Fourier-rücktransformation über einen endlichen  $q$ -Bereich Abschneideeffekte verursacht und das Endergebnis stark verändert. Dies setzt allerdings die Kenntnis der über den gesamten Raumwinkel gestreuten Intensität voraus, welche in einem Kleinwinkelstreuexperiment nicht gegeben ist (typischerweise ist  $qR < 10$ ). Mit Hilfe der Porod-Näherung kann die gestreute Intensität über den im Experiment zugänglichen Winkelbereich hinaus extrapoliert und so die Grundlage für eine sinnvolle Fourier-rücktransformation geschaffen werden.

Eine hilfreiche Größe bei der Bestimmung der Partikeldimensionen ist außerdem die Porod-Invariante  $Q$ , für die gilt [Porod51][Svergun03]

$$Q = \int_0^\infty q^2 I(q) dq = 2\pi^2 \rho^2 V \quad (2.26)$$

und aus der bei bekannter Elektronendichtedifferenz  $\rho$  und auf absolute Skala geeichter Intensität das Volumen  $V$  der (homogenen) Partikel errechnet werden kann.

## 2.9 Wechselwirkende Systeme, der Strukturfaktor

Bisher wurde die Streuung an idealen, nicht-wechselwirkenden Systemen betrachtet. Bei gering konzentrierten Lösungen handelt es sich in der Regel um Systeme, in den die einzelnen in Lösung befindlichen Partikel sehr weit voneinander entfernt sind und daher praktisch nicht miteinander wechselwirken. Die Partikel haben dann völlig unkorrelierte Abstände zueinander und die Entfernungen sind zudem sehr viel größer als die Kohärenzlänge der verwendeten Strahlung, daher kann es zwischen den Streuamplituden der einzelnen Partikel nicht zu Interferenzeffekten kommen. Die Streuintensität  $I(q)$  einer idealen Lösung aus  $n$  identischen, vollkommen ungeordneten und statistisch orientierten Teilchen ist demnach gleich der Streuintensität  $F(q)$  eines einzelnen in Lösung befindlichen Partikels (auch Formfaktor genannt), multipliziert mit der Zahl der Teilchen

$$I(q) = n \cdot F(q). \quad (2.27)$$

Sobald jedoch eine ausreichende Annäherung der in Lösung befindlichen Partikel auftritt und Wechselwirkungen auftreten, kann die Annahme einer völlig regellosen Abstandsverteilung nicht mehr zutreffen. So muss zum Beispiel allein schon ein Mindestabstand in der Größe des Durchmessers der Partikel gewahrt bleiben, denn die Partikel werden sich in aller Regel nicht durchdringen können. Durch abstoßende oder anziehende Wechselwirkungen werden sich zudem weitere kurzreichweitige Ordnungen ausbilden, und es kommt zu Interferenzen zwischen den Streuamplituden der einzelnen Partikel, wodurch wiederum die Gesamtamplitude verändert wird. Die gestreute Intensität setzt sich nunmehr zusammen aus dem Formfaktor und einem die Wechselwirkung zwischen den Partikel wiedergebendem Strukturfaktor  $S(q)$

$$I(q) = n \cdot F(q) \cdot S(q). \quad (2.28)$$

Der Strukturfaktor  $S(q)$  kann analog zu der Streuung an einem Molekül (siehe Gleichung 2.5) aufgestellt werden, indem das Konzept des Moleküls auf eine Anordnung von (komplexeren) Streuzentren ausgeweitet wird. Die Doppelsumme über die Atome innerhalb des Moleküls wird gegen eine einfache Summation der Abstände  $r$  zwischen den Streuzentren ersetzt [Torkkeli]. Liegt eine kontinuierliche Abstandsfunktion  $n(r)$  vor, geht die Summation in ein Integral über, und man erhält für den Strukturfaktor

$$S(q) = \int_0^\infty n(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr. \quad (2.29)$$

Existiert eine homogene Teilchendichte  $\varrho$ , dann kann die obige Gleichung umgeschrieben werden zu [Tardieu]

$$S(q) = 1 + \varrho \int_0^\infty 4\pi r^2 (g(r) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} dr, \quad (2.30)$$

worin  $g(r)$  die radiale Paarkorrelationsfunktion der gelösten Partikel ist und ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, im Abstand  $r$  von einem Teilchen ein anderes Teilchen zu finden. Eine anschauliche Darstellung der Funktion  $g(r)$  findet sich in der Abbildung 2.9.

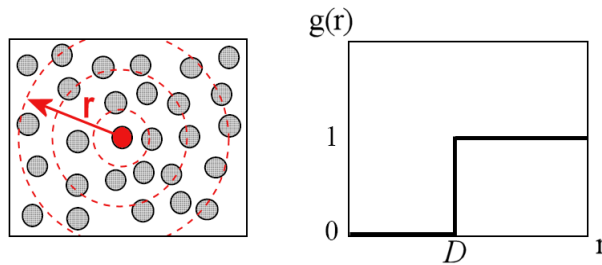


Abbildung 2.9: Veranschaulichung der Bedeutung der radialen Paarkorrelationsfunktion  $g(r)$ , die ein Maß für die Wahrscheinlichkeit ist, von einem beliebigen Teilchen im Abstand  $r$  ein anderes Teilchen zu finden. Für vollkommen zufällig verteilte, sich nicht durchdringende Teilchen mit dem Durchmesser  $D$  gilt stets  $g(r)=1$ , außer für  $r < D$ , wo  $g(r)=0$ .

Für  $q \rightarrow 0$  entspricht der Strukturfaktor gerade der normierten osmotischen Kompressibilität  $\chi = \beta(\partial\varrho/\partial p)_T$  wobei  $\beta = 1/k_B T$  ist (mit der Boltzmann-Konstante  $k_B$  und der absoluten Temperatur  $T$ ) [Hansen]. Bei abstoßender Wechselwirkung sind die Partikel gleichmäßig verteilt und  $S(q = 0)$  ist kleiner als 1. Falls anziehende Wechselwirkung vorliegt, entstehen Fluktuationen in der Partikeldichte und der Wert von  $S(q = 0)$  ist größer als 1. Eine Übersicht des Verlaufs von Strukturfaktoren für verschiedene Arten von Wechselwirkungen ist in der Abbildung 2.10 gegeben.

Die Paarkorrelationsfunktion  $g(r)$  kann bestimmt werden auf Basis der Ornstein-Zernicke (OZ) Integralgleichung [Belloni85] [Belloni88] [Hansen]. Die OZ-Beziehung

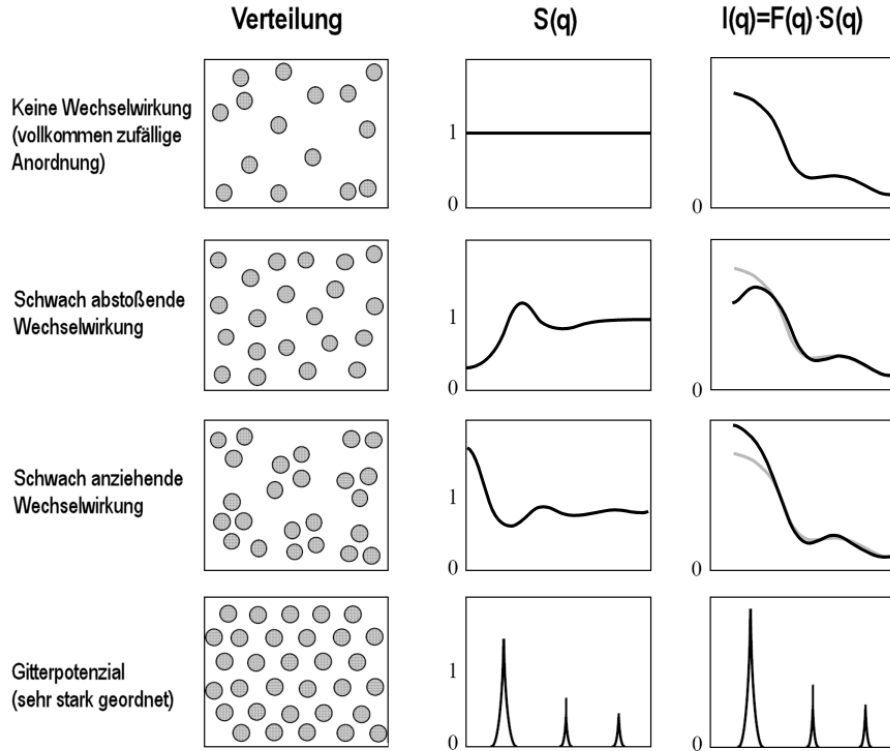


Abbildung 2.10: Während die an einer zufälligen Verteilung aus identischen Partikeln gestreute Intensität dem Formfaktor eines einzelnen Streuers gleicht, hat jede zwischen Teilchen wirkende Wechselwirkung Einfluss auf den Strukturfaktor und damit auf die gesamt-Streuintensität. Im Falle abstoßender Wechselwirkung ist im Vergleich zum wechselwirkungsfreien System ein Abfall der Intensität bei kleinen Winkeln zu beobachten, und ein Strukturpeak bildet sich aus. Bei anziehender Wechselwirkung steigt die Intensität bei kleinen Winkeln an, und bei einer stark geordneten Struktur erhält man eine Bragg-artige Intensitätsverteilung.

zwischen Fouriertransformationen (FT) der totalen und direkten Paarkorrelationen  $h(r) = g(r) - 1$  bzw.  $c(r)$  kann iterativ gelöst werden und lautet [Tardieu]

$$S(q) = 1 + FT\{h(r)\} = 1/(1 - FT\{c(r)\}). \quad (2.31)$$

Mit dem Wechselwirkungspotenzial  $V(r)$  gilt für die radiale Paarkorrelationsfunktion

$$g(r) = \exp\{-\beta V(r) + h(r) - c(r)\}, \quad (2.32)$$

und der Strukturfaktor kann berechnet werden aus den Fouriertransformierten und Integralen von  $g(r)$  [Hansen]. Diese Berechnung der radialen Paarkorrelationsfunktion geschieht typischerweise mit Hilfe numerischer Methoden, mit Ausnahme einiger einfacher Fälle, in denen die Lösung analytisch möglich ist.

Für kleine Proteine bei ausreichend hoher Ionenkonzentration des Lösungsmittels können die Coulomb-Wechselwirkungen vernachlässigt werden [Svergun03] - eine für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine und für die Bedingungen, unter den die Messungen stattfanden, gerechtfertigte Näherung. Das Wechselwirkungspotenzial lässt sich dann zufriedenstellend beschreiben durch ein rein anziehendes Yukawa-Potenzial, welches nur noch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den sich nicht durchdringenden, als massive Kugeln angenäherten Proteinen berücksichtigt (*Hard-Sphere-Potential*):

$$\begin{aligned} V(r) &= \infty && \text{für } r < D \\ &= -J \left( \frac{D}{r} \right) \exp\left\{-\frac{r-D}{d}\right\} && \text{für } r > D \end{aligned} \quad (2.33)$$

mit den Parametern  $d$  (Tiefe),  $J$  (Reichweite) und  $D$  (Proteindurchmesser).

Im allgemeineren DLVO-Modell (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) [Grimson] wird die Coulomb-Wechselwirkung als zusätzliches Störpotenzial berücksichtigt. Eine analytische Lösung ist zugänglich über die *random phase approximation* (RPA) mit einem Referenzsystem aus harten Kugeln mit dem Potenzial  $V(r)$ , und das Störpotenzial ist die Summe aus einem anziehenden Yukawa-Potenzial und einem abstoßenden Coulomb-Anteil. Eine ausführliche Berechnung findet sich in [Javid2007]. Ein anderer Ansatz, der auch stark wechselwirkende Teilchen beschreiben kann, ist gegeben in [Spinozzi].

In dem günstigsten Fall einer monodispersen Lösung aus näherungsweise kugelförmigen Partikeln mit schwacher Wechselwirkung ist es möglich, den Strukturfaktor direkt aus den Messdaten zu erhalten. Hierfür stellt man zunächst eine stark verdünnte Lösung her (Konzentration  $c_0$ ), in der die Wechselwirkung praktisch vernachlässigt werden kann. Für die Streuintensität  $I(q, c_0)$  dieser Lösung gilt dann die Gleichung 2.27. Dividiert man die Streuintensität  $I(q, c)$  einer höher konzentrierten Lösung durch die der verdünnten Lösung, kann der Strukturfaktor der höher konzentrierten Lösung unter Anwendung der Gleichungen 2.27 und 2.28 berechnet werden zu

$$S(q, c) = \frac{c_0 I(q, c)}{c I(q, c_0)}. \quad (2.34)$$

Diese Näherung gilt selbst für quasi-sphärische Partikel und/oder polydisperse Lösungen, allerdings in einem kleineren  $q$ -Bereich [Tardieu].



### 3 Proteine

Proteine, auch Eiweiße genannt, sind organische Makromoleküle, die aus unverzweigten Ketten von Aminosäuren bestehen. Sie machen in Zellen, Geweben und Organen mit mehr als 20% des Feuchtgewichts den bedeutendsten Anteil aus. Sie sind bei allen Lebewesen aus den 20 proteinogenen, natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren<sup>5</sup> aufgebaut und bestehen damit hauptsächlich aus Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen, die je nach Aminosäure in ihren Seitenketten an Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome gebunden sind. Die riesige strukturelle und funktionelle Vielfalt der Proteine entsteht durch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der 20 proteinogenen Aminosäuren über Peptidbindungen zu Polymeren und die Assoziation mit verschiedenen nicht-Proteinbestandteilen, wie z.B. Metallionen [Loeffler]. Die prinzipielle Struktur einer jeden Aminosäure sowie die aus mehreren Aminosäuren über Peptidbindungen zusammengesetzte Polypeptidkette - das Grundgerüst eines jeden Proteins - sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

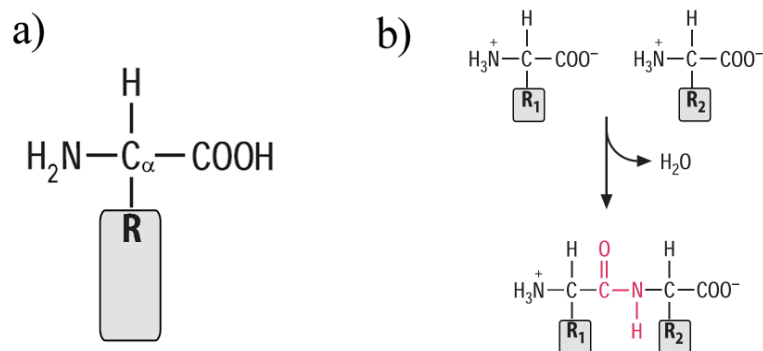


Abbildung 3.1: a) Prinzipielle Struktur einer  $\alpha$ -Aminosäure. Alle Aminosäuren unterscheiden sich nur in der Zusammensetzung der an das zentrale Kohlenstoffatom  $C_\alpha$  gebundenen Seitenkette R. b) Bildung einer Peptidbindung (rot) zwischen zwei Aminosäuren. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden und eine mehrere Hunderte oder Tausende Aminosäuren lange Polypeptidkette entstehen lassen.

Die Beschreibung der Konformation, also der räumlichen, dreidimensionalen Struktur eines Proteins geschieht auf vier Strukturebenen. Die **Primärstruktur** ist die Sequenz der gesamten Polypeptidkette eines Proteins (Monomers), also die Abfolge der über Peptidbindungen kovalent gebundenen Aminosäuren. Die **Sekundärstruktur** gibt die lokalen Strukturmerkmale an, die der Polypeptidkette aufgeprägt sind. Zu den wichtigsten Strukturelementen gehören die  $\alpha$ -Helix- und die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Die **Tertiärstruktur** gibt die dreidimensionale Struktur des gesamten Proteins an, welche

<sup>5</sup>Viele Organismen, darunter auch Menschen, benutzen darüber hinaus die erst während der Proteinbiosynthese aus Serin gebildete Aminosäure Selenocystein, so dass man eigentlich von 21 proteinogenen Aminosäuren sprechen muss. Neuerdings gibt es sogar Anzeichen für die Existenz einer 22sten proteinogenen Aminosäure Pyrrolysin [Atkins].

aus der räumlichen Anordnung der sekundären Strukturelemente zueinander hervorgeht. Schließlich bezeichnet die **Quartärstruktur** die räumliche Anordnung mehrerer gleichartiger oder unterschiedlicher, zu einem Polymer assoziierter Proteine, die gemeinsam ein komplexeres, zusammengesetztes Molekül bilden können (z.B. Dimer, wenn zwei Proteine zusammengesetzt sind).

Eine Übersicht der ersten drei Strukturebenen und eine Darstellung der  $\alpha$ -Helix sowie des  $\beta$ -Faltblattes sind in der Abbildung 3.2 gegeben.

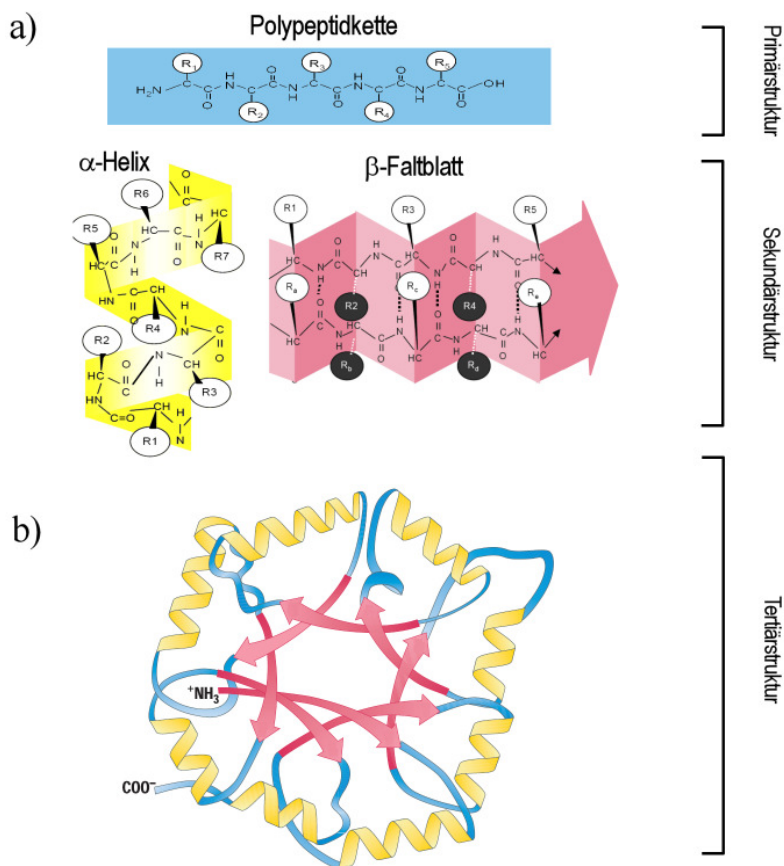


Abbildung 3.2: a) Darstellung der wichtigsten Elemente der Primär- und Sekundärstruktur eines Proteins. b) Die Tertiärstruktur ist die räumliche Anordnung der Elemente der Primär- und Sekundärstruktur einer Peptidkette, hier dargestellt als sog. Ribbon-Diagramm für das Protein Triosephosphatisomerase (entnommen aus [Loeffler]). Der Anfang und das Ende der Peptidkette ist mit den zugehörigen Atomkennzeichen angedeutet.

### 3.1 Das Lösungsverhalten im wässrigen Milieu

Für die Löslichkeit und die Struktur eines im wässrigen Lösungsmittel gelösten Proteins ist im Wesentlichen die Sequenz und die Art der Seitenketten (apolar, ungeladen polar,

geladen polar) verantwortlich. Diese bestimmt die Hydrophobizität der unterschiedlichen Regionen eines Proteins, also deren Affinität, Wechselwirkungen mit den polaren Molekülen der wässrigen Umgebung einzugehen. Proteinregionen, die hauptsächlich mit hydrophoben Aminosäuren besetzt sind, werden bevorzugt an Stellen des Proteins lokalisiert sein, zu denen Wasser keinen Zugang hat, also im Proteininneren, während die Regionen, die hauptsächlich hydrophil sind, bevorzugt an die dem Lösungsmittel exponierten Stellen treten werden. Aus diesem Wechselspiel ergibt sich die tertiäre Struktur eines in Lösung befindlichen Proteinmoleküls, welche durchaus stark von der kristallinen Konformation abweichen kann. Weitere an der Ausbildung der tertiären Struktur in Lösung beteiligte Effekte sind die elektrostatische (ionische) Wechselwirkung zwischen geladenen Aminosäuregruppen, die Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen permanenten Dipolmomenten einzelner Gruppen, intramolekulare Wasserstoffbrücken sowie Wasserstoffbrücken zwischen polaren Gruppen und Wassermolekülen sowie Disulfidbrücken zwischen nahegelegenen Cysteinresten und/oder Methioninresten <sup>6</sup>.

Aus der Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkung für die Entstehung der Tertiärstruktur eines gelösten Proteins wird klar, dass praktisch jede Strukturveränderung des umgebenden Lösungsmittels zu einer Änderung der Proteinkonformation führen kann. So kann der Zusatz von Cosolventien, also dem Lösungsmittel beigemengter Substanzen, in aller Regel eine Konformationsänderung verursachen. Die Beimischung von Ethanol beispielsweise führt zu einer als Denaturierung bezeichneten Verlust der Konformation weil sich die hydrophoben Alkoholmoleküle den hydrophoben Seitenketten der Peptidkette als Partner zu Wechselwirkungen anbieten und diese dadurch nicht mehr im Proteininneren lokalisiert bleiben müssen.

Eine wichtige Eigenschaft in wässriger Umgebung gelöster Proteine besteht in der generellen Tendenz zur Ausbildung einer sogenannten Hydratationssphäre. Diese stellt eine das Protein umschließende, wenige Wassermoleküllagen dicke Schale dar, in der das Wasser andere thermodynamische Eigenschaften hat als das weiter entfernte *bulk*-Wasser (siehe Abbildung 3.3).

Die Ausbildung der Hydratationssphäre wird begünstigt durch die stets vorhandenen, an der Oberfläche des Proteins angesiedelten polaren Gruppen, die die Entstehung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen fördern sowie durch die bevorzugt an der Oberfläche lokalisierten hydrophilen Gruppen. Beide Effekte verursachen eine Anordnung der Wassermoleküle innerhalb der Hydratationssphäre, die inkompatibel ist mit der normalen, tetrahedralen Struktur des Molekülnetzwerks des flüssigen Wassers [Franks] und die eine deutlich höhere Dichte des Hydratationswassers zur Folge hat: Sie liegt 10 bis 20% über der Dichte des *bulk*-Wassers (*bulk*-Wasser: 0.334 Elektronen/Å<sup>3</sup> [Durchschlag]), und für die Dicke der Hydratationsschale wird ein Wert von 1 – 3 Å angenommen, was einer bis zwei Wassermolekülschichten entspricht [Svergun98] [Merzel].

---

<sup>6</sup>Cystein und Methionin sind schwefelhaltige, proteinogene Aminosäuren.

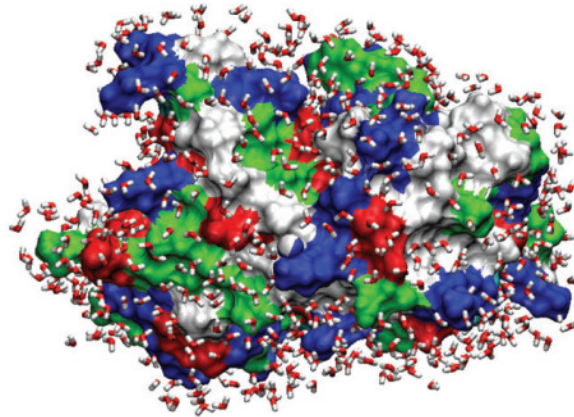


Abbildung 3.3: Simulierte Anordnung der Wassermoleküle in der Hydratationssphäre des Proteins Staphylokokken Nuclease. Die verschiedenartigen Typen der oberflächenlokalisierten Aminosäuregruppen sind farblich gekennzeichnet: apolar (weiß), geladen polar (rot, blau) und ungeladen polar (grün). Wassermoleküle in der Nähe hydrophiler Gruppen sind dichter gepackt als im bulk-Wasser (nicht dargestellt). Entnommen aus [Mitra]

### 3.2 Der Streukontrast in Lösung

Bereits in Kapitel 2.4 wurde gezeigt, dass lediglich die Differenz der Elektronendichte eines in Lösung befindlichen Partikels zu der des ihn umgebenden Mediums zum Streusignal unter Streuwinkeln  $2\theta > 0$  beiträgt. Wie in Abbildung 3.4 a) gezeigt, ist die mittlere Elektronendichte eines typischen Proteins um etwa 20% höher als die des umgebenden, ungestörten Wassers. Weil die stets vorhandene Hydratationssphäre aber einen erhöhten Elektronendichtewert aufweist, erscheint ein gelöstes Proteinmolekül im Streusignal größer als ein Protein, das ausschließlich vom *bulk*-Lösungsmittel umgeben wäre. Die Existenz der Hydratationsschale muss also stets bei der Bewertung der mittels SAXS-Methoden gewonnenen Geometriedaten berücksichtigt werden.

Die Dichtefluktuationen innerhalb eines Proteins können in der Regel nicht durch den üblicherweise in einem SAXS-Experiment abgedeckten Winkelbereich erfasst werden. Man kann daher vereinfachend für das Protein eine mittlere, homogene Elektronendichte  $\rho_p = \langle \rho_p(\mathbf{r}) \rangle_V$  annehmen (siehe Abbildung 3.4 b) ). Analog zum Proteinmolekül können das *bulk*-Lösungsmittel und das an der Hydratationsschale beteiligte Lösungsmittel jeweils als Medium konstanter Elektronendichte  $\rho_b$  bzw.  $\rho_s$  angesehen werden, da sich deren Dichtefluktuationen auf einer noch viel kleineren Längenskala abspielen.

Die in Abbildung 3.5 gezeigte, berechnete Streukurve für ein kugelförmiges Protein in Anwesenheit und Abwesenheit einer 2 Å dicken, konzentrischen Schale zeigt, welchen Einfluss der Beitrag der Hydratationssphäre auf die absoluten Intensitäten sowie auf die errechneten Guinieradien besitzt.

Für die an einem in Lösung befindlichen Proteinmolekül gestreute Intensität gilt

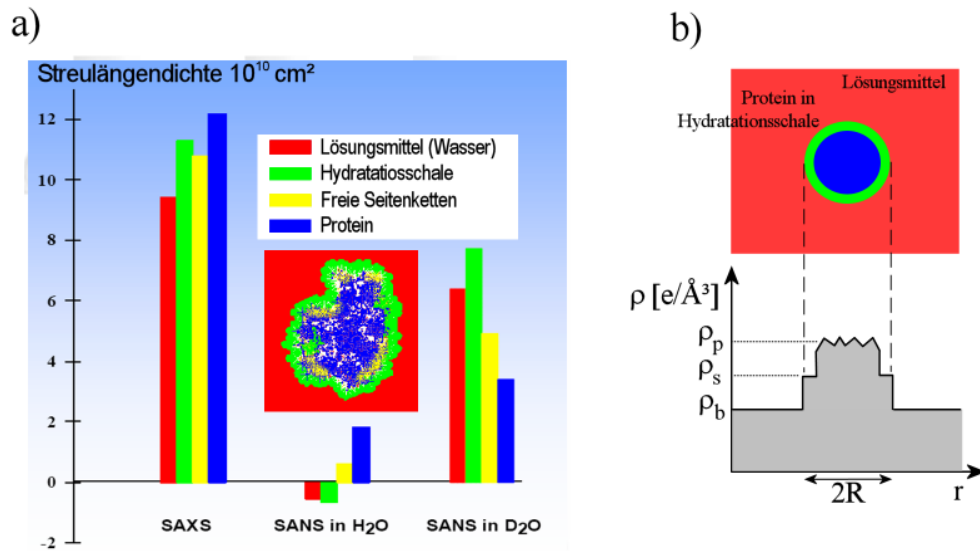


Abbildung 3.4: a) Typische Streulängendichten in einer wässrigen Proteinlösung für Röntgenstrahlung (SAXS) und Neutronen (SANS). Zwischen der mittleren Streulängendichte des Proteins (blau) und des bulk-Lösungsmittels (rot) liegt in aller Regel die der Hydratationsschale und der Aminosäureseitenketten an der Proteinoberfläche (Daten entnommen aus [Svergun98]). b) Für die Auswertung der Daten in einem SAXS-Experiment wird eine vereinfachte Dichteverteilung verwendet, bei der mittlere Elektronendichten  $\rho_p$ ,  $\rho_b$  und  $\rho_s$  für das reine Protein, die Hydratationsschale respektive das Lösungsmittel angenommen werden. Die Elektronendichtedifferenz zum Lösungsmittel ist dann die relevante Größe für den Streukontrast.

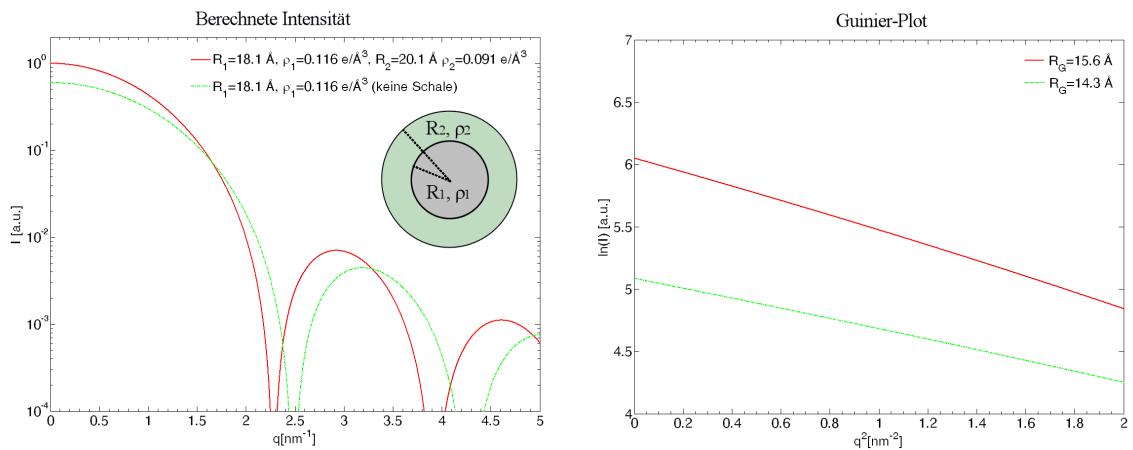


Abbildung 3.5: Links: Berechnete Streukurve an einer einzelnen Kugel (grün) sowie an einem System aus Kugel und Schale (rot). Die angegebenen Dimensionen und Elektronendichten (jeweils Differenz zum bulk-Wasser) entsprechen den typischen Werten für ein Lysozym-Proteinmolekül und dessen Hydratationsschale. Rechts: Berechnete Guinieradien für die beiden simulierten Systeme.

[Svergun98]

$$I(q) = \langle |A_p(\mathbf{q}) + (\rho_s - \rho_b)A_s(\mathbf{q}) - \rho_b A_b(\mathbf{q})|^2 \rangle_{\Omega} \quad (3.1)$$

mit  $A_p$  der Streuamplitude des Proteinmoleküls *in vacuo* (bestimmt aus den 3D-Atomkoordinaten),  $A_s$  der Streuamplitude der Hydratationsschale und  $A_b$  der Streuamplitude des am Ort des Proteins verdrängten Lösungsmittels. Die Mittelung über alle Orientierungen ist wieder mit  $\langle \rangle_{\Omega}$  gekennzeichnet.

Die gewünschte Observable in einem Kleinwinkelstreuexperiment ist jedoch nicht die Überlagerung aus Proteinstreuung und Lösungsmittelbeiträgen. Vielmehr ist das Ziel, die Streuintensität  $I_{\text{protein}}$  eines isoliert gedachten, von der Hydratationsschale umgebenen Proteinmoleküls zu erhalten, also die des gelösten Proteins jedoch ohne den Beitrag des *bulk*-Lösungsmittels. Dieses erreicht man, indem die am reinen Lösungsmittel gestreute Intensität  $I_{\text{solvent}}^{\text{exp}}$  von der an der Proteinlösung  $I_{\text{solution}}^{\text{exp}}$  gestreuten Intensität subtrahiert wird:

$$I_{\text{protein}}(q) \simeq I_{\text{solution}}^{\text{exp}}(q) - I_{\text{solvent}}^{\text{exp}}(q) * (1 - c) \quad (3.2)$$

Der Volumenanteil  $c$  des Proteins an der Proteinlösung berücksichtigt das im Falle der Streuung am reinen Lösungsmittel zusätzliche Lösungsmittelvolumen.

Die Gleichung 3.2 gilt exakt nur für den Fall eines Lösungsmittels vollkommen homogener Elektronendichte, welches konsequenterweise lediglich Vorwärtsstreuung unter dem Winkel  $2\theta = 0$  verursacht. Die Gültigkeit dieser Rechnung auch für den Fall eines realen Lösungsmittels, welches stets auch unter von Null verschiedenen Winkeln einen Streubeitrag liefert, ist in [Goodisman] begründet.

### 3.3 Faltung und Denaturierung

Nach der Proteinbiosynthese am Ribosom der Zelle, ebenso wie bei der chemischen Synthese im Labor, liegt das Proteinmolekül zunächst einmal als Polypeptidkette ohne ausgebildete Sekundär- und Tertiärstrukturelemente vor. Zwar enthält die Aminosäuresequenz keine Kodierung über die Strukturmerkmale höherer Hierarchiestufen, allerdings besitzt die Kette bereits bestimmte, lokale chemische Eigenschaften (z.B. hydrophobe, hydrophile, geladene Seitenketten) und provoziert so unter gegebenen Bedingungen von vorne herein eine bestimmte, stabile Tertiärstruktur (Anfinsen'sches Dogma<sup>7</sup>). Durch die Aminosäuresequenz bedingt, durch äußere Parameter begünstigt (Temperatur, pH-Wert etc.) sowie mittels Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel faltet die Polypeptidkette dadurch schnell (innerhalb von  $\mu\text{s}$  bis  $\text{s}$ ) zu einer wohldefinierten, dreidimensionalen Struktur, die das absolute Minimum in der freien Enthalpie des Systems Protein-Lösungsmittel darstellt - die **native** Konformation des Proteins entsteht. Die biologische Funktion eines Proteinmoleküls hängt sehr eng mit dieser nativen Konformation zusammen, deren Vorhersage aus der Aminosäuresequenz des Proteins bis heute nicht möglich ist.

---

<sup>7</sup>Dr. Christian Boehmer Anfinsen Jr., Nobelpreis in Chemie 1972

Die unvorstellbar hohe Anzahl verschiedener Konformationsmöglichkeiten, die ein ungefaltetes Protein mit typischerweise weit über Hundert Aminosäuresequenzen und sehr vielen Einfachbindungen in der Hauptkette besitzt, steht letztlich nur einer stabilen, gefalteten Konformation gegenüber. Der Verlauf der freien Enthalpie während der Faltung kann daher als Trichter im mehrdimensionalen Energieraum angesehen werden, in dessen globalem Minimum die native Konformation angesiedelt ist, wie in der Abbildung 3.6 dargestellt.

Die Hypothese des Faltungstrichters der freien Enthalpie (*folding funnel* [Leopold] [Dobson]) klärt das Levinthalsche Paradoxon [Levinthal], welches darin besteht, dass der Konformationsraum eines realen Proteins viel zu groß ist, als dass sich in endlicher Zeit durch zufällige Anordnung die native Struktur bilden könnte: Unabhängig von der Struktur der ungefalteten Anfangskonformation leitet die Energiefunktion die Polypeptidkette regelrecht zur nativen Konformation, denn je mehr sich die Energielandschaft verengt, umso weniger Konformationsmöglichkeiten verbleiben, und der weitere Faltungsprozess wird umso schneller, bedingt durch die steileren Wände.

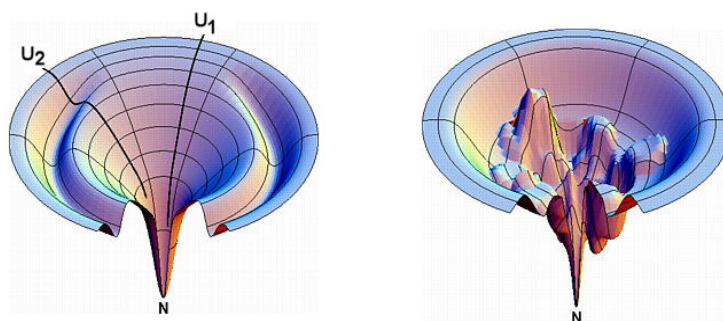
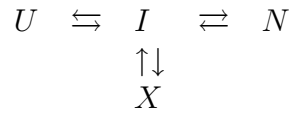
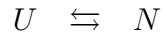


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Verlaufs der freien Enthalpie für die Faltung eines kleinen, robusten Proteins (links), welches ausgehend von seinen zahlreichen möglichen ungefalteten Zuständen  $U_x$  nur wenige intermediate Zustände annehmen kann (gekennzeichnet durch die Senke auf dem Faltungsweg von  $U_2$ ) bevor die native Konformation  $N$  erreicht ist. Der 'Energietrichter' eines größeren Proteins (rechts) weist eine sehr viel stärker zerklüftete Fläche auf, die eine große Zahl von möglichen Übergangszustände zur Folge hat [Dill].

Bei größeren Proteinen ( $> 100$  Aminosäuren) sind die Wände des Faltungstrichters stark zerklüftet, was den vielen nicht-nativen lokalen Minima der Faltungsenthalpie Rechnung trägt. Dadurch gelangt das Molekül in aller Regel nicht direkt von der vollständig ungefalteten Peptidkette  $U$  zur nativen Konformation  $N$ , vielmehr erfolgt die Konformationsbildung über mehrere intermediate Zwischenzustände  $I$  zur nativen Struktur und der gesamte Faltungsprozess dauert länger. Die Faltungsintermediate können sowohl Übergangszustände auf dem Weg zur nativen Konformation sein oder aber auch divergierende Konformationen  $X$ , die sich anschließend zugunsten der freien Enthalpie wieder zurückbilden. Schematisch kann dieser Vorgang durch die folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



Bei kleineren Proteinen hingegen lassen sich oft keine Faltungsintermediate nachweisen und ihre Faltungskinetik kann dann durch ein Zweizustandmodell ausreichend beschrieben werden [Brandts]:



Bei einem Zweizustandmodell lässt sich der Einfluss der verschiedenen äußeren Parameter auf die Stabilität der nativen Konformation näherungsweise über die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  bestimmen. Beschränkt man die Wahl der Denaturierungsparameter auf die thermodynamischen Größen Druck  $p$  und Temperatur  $T$ , so kann  $\Delta G$  in einer Taylor-Reihe entwickelt werden

$$\begin{aligned}
 \Delta G = & \Delta G_0 + \frac{\partial \Delta G}{\partial T}(T - T_0) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial T^2}(T - T_0)^2 & (3.3) \\
 & + \frac{\partial \Delta G}{\partial p}(p - p_0) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial p^2}(p - p_0)^2 \\
 & + \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial T \partial p}(T - T_0)(p - p_0) + \dots \quad ,
 \end{aligned}$$

wobei  $T_0$  und  $p_0$  die Temperatur und den Druck angeben, bei dem das Protein vollständig in der nativen Konformation vorliegt. Die Differenz der freien Enthalpie zwischen nativer und denaturierter Konformation bei Standardbedingungen ist durch  $\Delta G_0$  gegeben. Betrachtet man ein Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen ( $\Delta G = 0$ ) und vernachlässigt Terme höherer Ordnung, folgt für das Stabilitätsdiagramm ein elliptisches Aussehen [Malessa], wie in Abbildung 3.7 gezeigt. Die typische freie Enthalpie der Stabilisierung ist für ein mittelgroßes Protein selbst unter günstigen physiologischen Bedingungen in der Größenordnung von  $45 \pm 15$  kJ/mol, sie entspricht also der Bindungsenergie einiger weniger Wasserstoffbrücken [Loeffler]. Daher führen schon kleine Änderungen in den äußeren Bedingungen zu einem Verlust der Tertiärstruktur, durch welche die native Struktur definiert ist - das Protein **denaturiert**.

Die native Konformation eines Proteins ist in aller Regel bei physiologischem Druck und Temperatur gegeben (beim Menschen 1 bar und  $37^\circ\text{C}$ ). Ihre Stabilität nimmt sowohl zu höheren als auch niedrigeren Temperaturen hin ab. **Hitzedenaturierung** kann für die meisten Proteine schon bei einer moderaten Temperaturerhöhung (wenige zehn Grad über  $T_0$ ) beobachtet werden, u.a. da strukturgebende Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel aufgebrochen werden [Koizumi]. Die **Kältedenaturierung** ist schwieriger zu beobachten, da die für diese Konformationsänderung notwendigen Temperaturen häufig unter dem Gefrierpunkt des Lösungsmittels (Wasser) liegen. In beiden Fällen liegt eine Entfaltung des Proteins vor, die eine positive Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_P$  zur Folge hat [Brandts] und daher gut mit kalorimetrischen Methoden



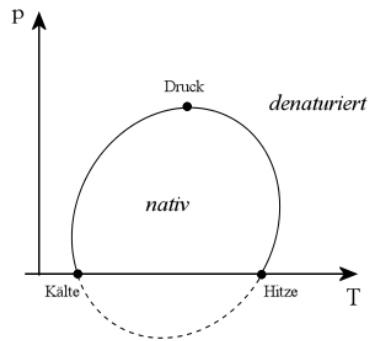


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung eines p-T-Stabilitätsdiagramms für ein globuläres (kompaktes, annähernd kugelförmiges) Protein. Die Zustände, unter den das Protein in der nativen Phase vorliegt, liegen innerhalb der Ellipse. Die Punkte markieren einige Zustände, unter den Hitze-, Kälte- und Druckdenaturierung einsetzen (übernommen aus [Malessa])

(DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) detektiert werden kann. Bei Proteinen mit einer Zweizustand-Faltungskinetik kann die Temperaturdenaturierung reversibel sein [Xie].

Eine Erhöhung des Drucks kann nur dann eine Denaturierung induzieren, wenn die denaturierte Konformation ein kleineres Volumen einnimmt als die native. Durch das Auffalten eines kompakten, globulären Proteins kann der hydrophobe Kern dem Lösungsmittel zugänglich gemacht werden, wodurch ein höherer Solvatationsgrad erreicht wird und die **Druckdenaturierung** begünstigt wird. Eine durch Druck induzierte Denaturierung ist in aller Regel vollständig reversibel, denn die kovalenten Bindungen der Primärstruktur werden nicht unterhalb von 20 kbar beeinflusst [Klink] - vorausgesetzt, im druck-denaturierten Zustand treten keine (irreversiblen) Aggregationseffekte auf.

Da die native Konformation hauptsächlich durch das Wechselspiel der Kräfte im System Protein-Wasser bestimmt wird, führen Änderungen der Eigenschaften des Lösungsmittels zur Änderung der freien Enthalpie und können so die Denaturierung des Proteins induzieren. Die **Cosolventien-induzierte Denaturierung** wird z.B. erreicht durch organische Lösungsmittel (z.B. Ethanol  $C_2H_6O$ ), welche die hydrophoben Wechselwirkungen schwächen und damit zur Strukturänderung führen. Ein weiterer typischer Denaturant ist Harnstoff (Urea  $CH_4N_2O$ ), da es Wasserstoffbrückenbindungen wegen seiner der Peptidbindung ähnlichen Struktur schwächen kann und somit Elemente der Sekundärstruktur stört. Die Cosolventien-induzierte Denaturierung kann unter bestimmten Bedingungen reversibel sein [Anfinsen].

Auch Änderungen des pH-Wertes des Lösungsmittels können zur Proteindenaturierung führen. Mit diesem Vorgang ist häufig auch eine Veränderung der Löslichkeit des Proteins verbunden, die zur Aggregation (regellose Zusammenklumpung der Proteinmoleküle, nicht zu verwechseln mit Polymerisation, also der Bildung geordneter Komplexe) bis hin zur Ausflockung des Proteins führen kann [Loeffler].

Zwei häufig auftretende Konformationen denaturierter Proteine, aber auch Kon-

formationen von intermediaten Zuständen beim Faltungsprozess, sind die mit *molten globule* (geschmolzenes Kügelchen) und *random coil* (ungeordnetes Knäuel) bezeichneten Strukturen (siehe Abbildung 3.8).

Die *molten globule* Konformation ist dadurch gekennzeichnet, dass das Protein eine seiner nativen Struktur ähnliche Kompaktheit besitzt und die Elemente der Sekundärstruktur weitgehend erhalten sind. Allerdings fehlen vielen Seitenketten die Tertiärstruktur-Wechselwirkungen des nativen Zustands, was dazu führt, dass das Protein erheblich flexibler ist als das vollständig gefaltete Molekül. Es ist sozusagen aufgequollen, was in der Tat auf das Eindringen von Lösungsmittel in das Proteininnere zurückzuführen ist. Diese Konformation wird unter milden Denaturierungskonditionen (niedriger pH-Wert, schwacher Denaturant, erhöhte Temperatur) induziert.

Liegt ein Protein als *random coil* vor, besitzt es keine erkennbaren Sekundärstrukturelemente mehr, es handelt sich also im Prinzip um eine zufällig gestaltete Peptidkette. Das Protein ist vollständig entfaltet, und die einzigen stabilen Bindungen sind die Peptidbindungen der Aminosäurekette.

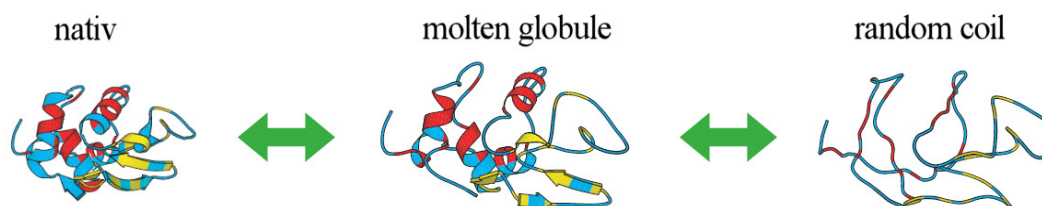


Abbildung 3.8: Durch Denaturierung gelangt ein Proteinmolekül (hier schematisch für das Protein Lysozym) von seiner nativen Konformation häufig zunächst in den *molten-globule* Zustand bevor es - bei Vorliegen ausreichend starker denaturierender Bedingungen - vollständig entfaltet und als *random coil* vorliegt. Der umgekehrte Weg spiegelt die Faltung des Proteinmoleküls unmittelbar nach der Biosynthese wieder.

## 3.4 Die untersuchten Proteine

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden an wässrigen Lösungen von drei Proteinen durchgeführt. Diese werden im Folgenden kurz charakterisiert.

### 3.4.1 Lysozym

Lysozym (auch *Muramidase*) ist ein Enzym (katalytisch wirkendes Protein), dessen biologische Funktion darin besteht, die Hydrolyse der  $\beta$ -1,4-glycosidischen Bindung zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und 2-Acetylamino-2-Desoxy-D-Glucose in den Zuckerketten des Peptidogluangerüsts der Zellwand von Gram-positiven Bakterien

zu katalysieren [Vocadlo]. Somit wirkt Lysozym antibakteriell, indem es die Bakterienzellwand so weit schwächt, dass sie dem hohen osmotischen Druck im Bakterium (typischerweise 3 – 15 bar [Lan]) nicht mehr standhalten kann.

Lysozym ist weit verbreitet in Flora und Fauna, wo es als natürliches Antibiotikum wirkt<sup>8</sup>. Bei Säugetieren findet es sich in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten, so z.B. im Speichel, im Schweiß, im Blut, in der Tränenflüssigkeit, in der Muttermilch aber auch in Geweben wie z.B. im Nierengewebe. Eine relativ hohe Lysozym-Konzentration kann im Hühnereiweiß gefunden werden, weshalb es hauptsächlich dort extrahiert wird (*hen-egg-white lysozyme*, *HEW-lysozyme*).

Hühnereiweiß-Lysozym ist ein globuläres Protein, es besteht aus einer einzelnen Peptidkette mit 129 Aminosäuren und besitzt in monomerer Form ein Molekulargewicht von 14388 Da<sup>9</sup> [Jolles]. Die Sekundärstrukturelemente des nativen Proteins sind vier  $\alpha$ -Helices und drei  $\beta$ -Faltblätter, und es bestehen vier Disulfidbrücken. Kristalle des Proteins lassen sich sehr einfach herstellen, was neben der sehr guten Verfügbarkeit die Ursache dafür ist, dass Hühnereiweiß-Lysozym das am besten strukturell charakterisierte Protein ist [Imoto].



Abbildung 3.9: Ribbon-Diagramm der Sekundär- und Tertiärstruktur von HEW-Lysozym [Rypniewski]

### 3.4.2 Insulin

Insulin ist ein für den Menschen sowie für alle Tiere lebenswichtiges Proteohormon (Protein mit Hormonwirkung), dessen wichtigste Funktion die Regelung der Glukosekonzentration im Blut ist. Nach Aufnahme kohlenhydratreicher Nahrung steigt der Glukosespiegel an, worauf als Reaktion die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse Insulin freisetzen, das im Blut zu allen Körperzellen gelangt. Es bindet dort an die Insulin-Rezeptoren und verursacht insbesondere in den Muskel- und Fettzellen eine Erhöhung

<sup>8</sup>Alexander Fleming hat das im Speichel vorkommende Lysozym bereits 1922 als Substanz mit antibiotischer Wirkung identifiziert [Fleming], also noch vor seiner Entdeckung des Penicillin.

<sup>9</sup>1 Da (Dalton) = 1 u (atomare Masseneinheit)

der Glukoseaufnahme in das Zellinnere, wo die Glukose gespeichert und zur Energiegewinnung genutzt wird. Darüber hinaus hat Insulin viele andere Funktionen, u.a. Einfluss auf den Fett- und Aminosäurestoffwechsel sowie auf den Kaliumhaushalt [Saltiel]. Die Insulinmoleküle verschiedener Spezies ähneln sich sehr stark. Das dem menschlichen Insulin ähnlichste ist das des Schweins (*porcine insulin*): Es unterscheidet sich in nur einer Aminosäure [Sonnenberg].

Insulin ist ein sehr kleines Protein und besteht aus zwei getrennten Peptidketten, die durch zwei Disulfidbrücken aneinander gebunden sind. Das Protein besitzt insgesamt 51 Aminosäuren und in monomerer Form ein Molekulargewicht von 5808 Da [Olsen] (*human insulin*). Die Sekundärstrukturelemente des nativen Proteins sind 2  $\alpha$ -Helices in der ersten Peptidkette und eine  $\alpha$ -Helix in der zweiten [Gursky]. In Lösung neigt Insulin leicht zur Bildung von Dimeren und höheren Oligomeren sowie zur Aggregatbildung.

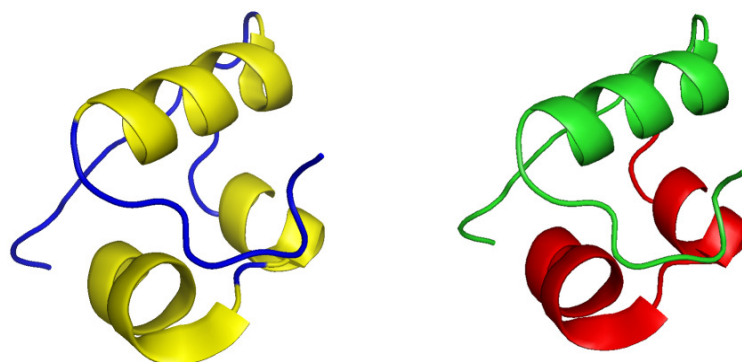


Abbildung 3.10: Links: Ribbon-Diagramm der Sekundär- und Tertiärstruktur von Insulin (*porcine insulin*). Rechts: Quartärstruktur der beiden Peptidketten, aus den das Insulin-Molekül aufgebaut ist (die einzelnen Peptidketten sind jeweils unterschiedlich eingefärbt). Erstellt aus dem PDB Eintrag 9INS [Gursky]

### 3.4.3 Staphylokokken Nuclease

Die Staphylokokken Nuclease (Abk. SNase, auch *Micrococcal Nuclease*) ist ein extrazelluläres Enzym, welches im V8-Strang des Bakteriums *Staphylococcus aureus* hergestellt wird. Es ist identisch mit der extrazellulären Nuclease A und seine biologische Funktion besteht darin, die Hydrolyse von DNA und RNA an der 5'-Position zu katalysieren [Cotton] und so DNA- und RNA-Reste abzubauen.

Das globuläre Protein besteht aus einer einzelnen Peptidkette mit 149 Aminosäuren und besitzt in monomerer Form ein Molekulargewicht von 16807 Da [Taniuchi]. Die Sekundärstrukturelemente des nativen Proteins sind drei  $\alpha$ -Helices und fünf  $\beta$ -Faltblätter wobei letztere den hydrophoben Kern des Proteins formen, es existieren keine Disulfidbrücken. Durch diese Eigenschaft ist SNase ein für Untersuchungen der Proteinfal-

tungsmechanismen sehr attraktives Modellprotein, dessen Faltungsdynamik sich sowohl unter Druck- als auch Hitzedenaturierung mit Hilfe eines zwei-Zustands-Modells beschreiben lässt [Panick98] [Byrne]. Bedingt durch die relativ kleine Größe, die gute Verfügbarkeit in hochreiner Form und die besonderen Eigenschaften wurde das Enzym sehr ausführlich in vielen Studien behandelt.

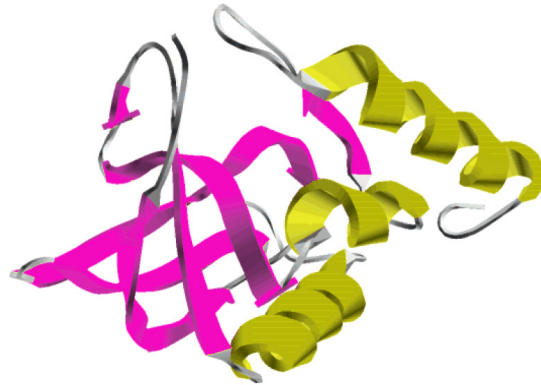


Abbildung 3.11: Ribbon-Diagramm der Sekundär- und Tertiärstruktur von nativer SNase (abweichende Farbe für die Peptidkette: grau) [Hynes]

## 4 Das SAXS-Instrument am DELTA

Das Ziel dieser Arbeit war, ohne Beeinträchtigung der bestehenden Instrumentierung der Strahllinie (engl. *beamline*) BL9 des DELTA-Elektronenspeicherrings, einen Aufbau für SAXS-Experimente zu implementieren, wobei ein 2-dimensional ortsauflösender Detektor zur Aufzeichnung der gestreuten Intensität dienen sollte (so wie schematisch bereits in Abbildung 2.3 dargestellt). Eine zusätzliche Rahmenbedingung folgte aus der vielseitigen Nutzung der Beamline BL9 nicht nur für SAXS-Experimente: Das Instrument musste so konzipiert werden, dass es mit relativ wenig Aufwand abgebaut und wieder aufgebaut werden könnte, selbstverständlich unter Beibehaltung der Präzision des Aufbaus.

Eine schematische Darstellung des Aufbaus der Beamline BL9 und des neuen SAXS-Instruments ist in der Abbildung 4.1 gegeben. Nach einem kurzen Überblick über die Spezifikationen des Speicherrings und der Beamline BL9 findet sich in den folgenden Unterkapiteln eine detaillierte Beschreibung der in der Abbildung dargestellten Komponenten des SAXS-Instruments.

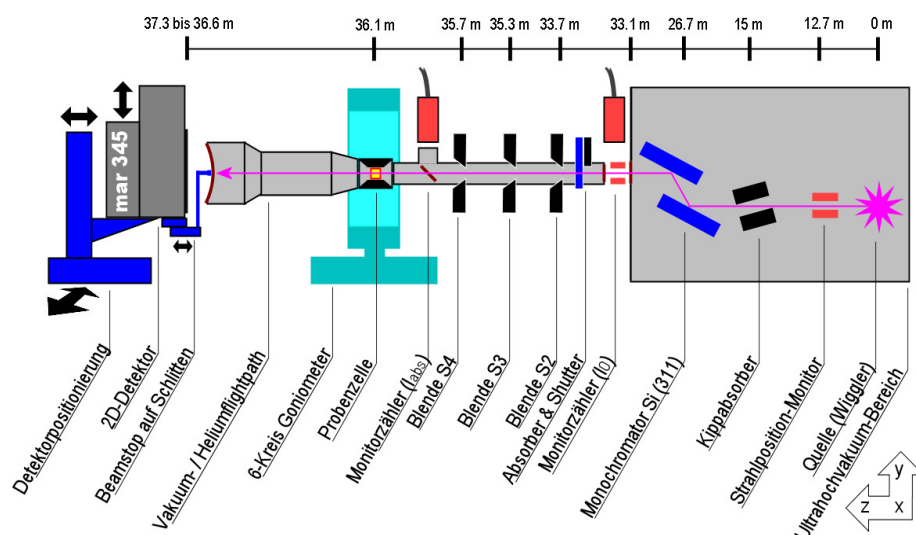


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau des SAXS-Instruments an der Beamline BL9 des DELTA [Krywka07].

### 4.1 Dortmunder Elektronen-Speicherring-Anlage (DELTA)

DELTA ist eine 1.5 GeV Synchrotronstrahlungsquelle der dritten Generation und wird vom Zentrum für Synchrotronstrahlung der Technischen Universität Dortmund betrieben. Der in Abbildung 4.2 gezeigte schematische Aufbau stellt die wesentlichen Komponenten der Speicherring-Anlage dar: den Linearbeschleuniger *Linac* zur Vorbeschleunigung der Elektronen auf etwa 75 MeV, dem Hauptbeschleunigerring *BoDo* zur

Beschleunigung auf max. 1.5 GeV und den 115.2 m langen Speicherring *Delta*. Während des Synchrotronnutzertreibs wird der Speicherring mit einem Elektronenstrom von typischerweise 120 mA betrieben und die Lebensdauer liegt bei 5 – 6 h. Weitere Details über das Synchrotron finden sich in [DELTA].

An insgesamt 13 Strahllinien (Beamlines BL0 bis BL12) kann Synchrotronstrahlung für experimentelle Zwecke sowie für Zwecke der Strahldiagnose bereitgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Verfertigung dieser Arbeit standen 5 Beamlines routinemäßig Nutzern für Forschungszwecke mit Synchrotronstrahlung zur Verfügung.

Zur Erzeugung der Synchrotronstrahlung ist der Speicherring ausgestattet mit Ablenkmagneten, zwei Undulatoren (U55, U250) und einem supraleitenden, asymmetrischen Wiggler (SAW). Die kritische Energie des SAW liegt bei 7.9 keV und der Strahlfächer besitzt eine Divergenz von  $25 \times 0.7 \text{ mrad}^2$  (horizontal  $\times$  vertikal bei 1.5 GeV) [DELTA]. Der Strahlfächer versorgt drei Beamlines mit Synchrotronstrahlung (BL8, BL9, BL10), wobei jede einzelne eine Winkelakzeptanz von 5 mrad besitzt.

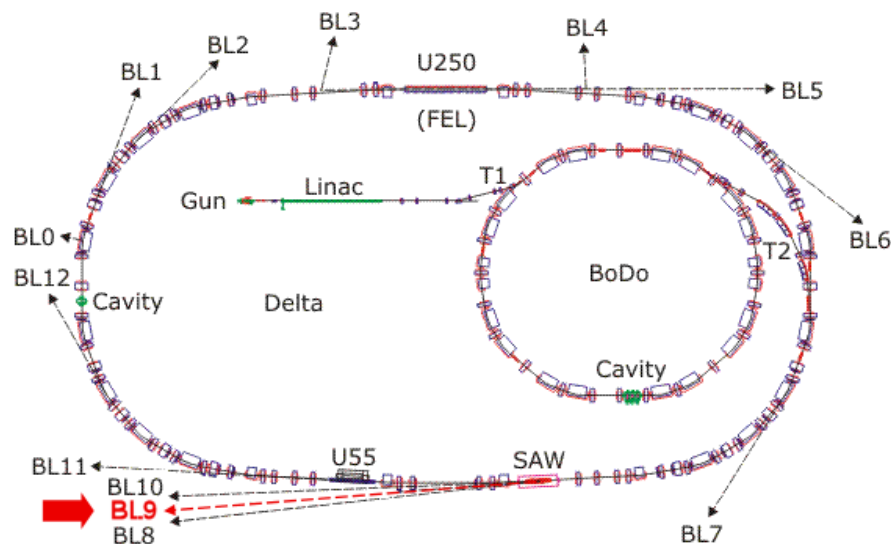


Abbildung 4.2: Aufbau der Dortmunder Elektron-Speicherring-Anlage DELTA [DELTA]. Die Beamline BL9 sowie die Strahlführung von der Quelle (SAW) sind rot hervorgehoben.

## 4.2 Die Beamline BL9

Die im Wiggler SAW erzeugte, weiße Synchrotronstrahlung wird anschließend durch einen Silizium(311)-Doppelkristallmonochromator (26.7 m vom Quellpunkt entfernt) monochromatisiert. Die Wellenlänge der monochromatisierten Strahlung kann im Bereich von 3.1 Å bis 0.41 Å frei gewählt werden, was einem Energieintervall von 4 keV bis

30 keV entspricht <sup>10</sup> - die typische Energieauflösung im Experiment ist  $\Delta E/E = 10^{-4}$ . Durch die Möglichkeit, den zweiten Monochromatorkristall sagittal zu biegen, kann eine variable Fokussierung der horizontalen Strahldimension erzielt werden. In einer Entfernung von 33.1 m vom Quellpunkt verläßt der Synchrotronstrahl den Hochvakuumbereich und tritt in die Experimentierhütte der Beamline BL9 ein. Der Photonfluss beträgt hier typischerweise  $10^9 - 10^{10}$  Photonen/s/mm<sup>2</sup> (bei 10 keV) [Krywka07].

Abbildung 4.3 zeigt eine Aufnahme, die den Zustand der Experimentierhütte der Beamline BL9 zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit wiedergibt. Kurz danach wurde die Experimentierhütte hinter dem Diffraktometer abgetrennt (gelb umrahmte Trennwand) um dahinter die Experimentierhütte der Beamline BL8 aufzubauen. Daraus resultierte eine sehr geringe Fläche, die zum Aufbau des Detektorsystems für Kleinwinkelstreuexperimente zur Verfügung stand. Diese starke räumliche Begrenzung war eine der wesentlichen Herausforderungen des im Zuge dieser Arbeit zu realisierenden SAXS-Aufbaus.

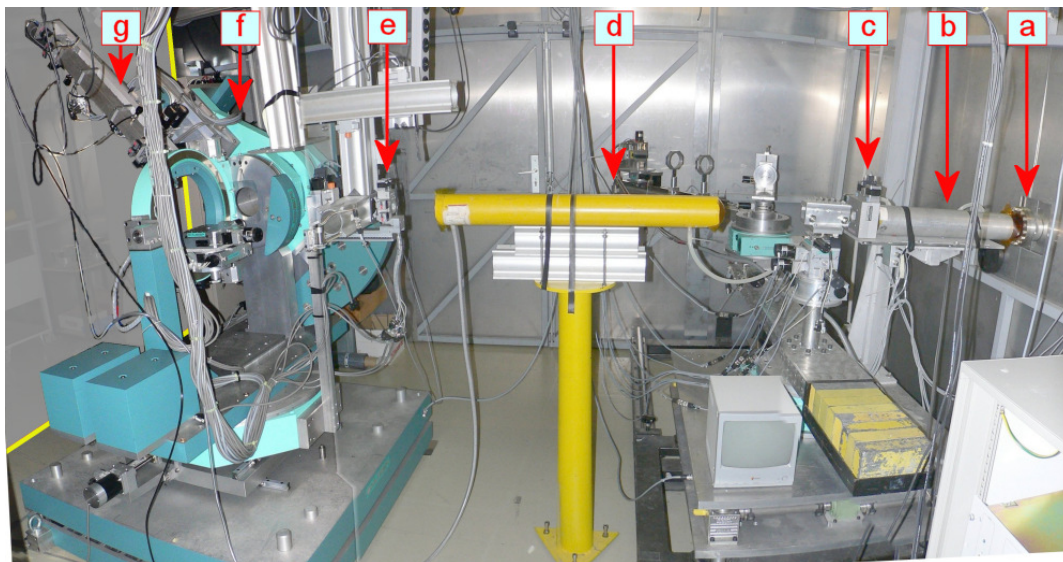


Abbildung 4.3: Zustand der Experimentierhütte der Beamline BL9 kurz vor Beginn dieser Arbeit (03/2005): Die Strahlrichtung verläuft von rechts nach links, beginnend mit der Strahleinlassöffnung (a). Hinter einem kurzen, heliumgefüllten Flightpath (b) befindet sich die erste Blende (c) gefolgt von einem weiteren Flightpath (d) und einer zweiten Blende (e). Ein Huber 6-Kreis Diffraktometer (f) dient der Probenjustage, und die gestreute Intensität wird mittels des am Ende des verkippbaren  $2\theta$ -Arms (g) befestigten Detektors aufgezeichnet [Krywka05].

<sup>10</sup>In dem Zeitraum der Entstehung dieser Arbeit konnten die höheren Harmonischen des Monochromators nicht vor dem Eintritt in die Experimentierhütte herausgefiltert werden. Die Präsenz von höherenergetischen Anteilen im Strahl musste also stets berücksichtigt werden.



### 4.3 Das Helium-/ Vakuumsystem

Die in einem SAXS-Experiment an Proteinlösungen aufgezeichnete, unter kleinen Winkeln gestreute Intensität rührt nicht ausschließlich von der untersuchten Probe. Einen nicht unerheblichen (in Summe sogar überwiegenden) Beitrag verursacht die parasitäre Streuung an Blenden und an durchstrahlten Gasstrecken. Die Transmission einer 1 m langen Luftstrecke ist in Abbildung 4.4 a) als Funktion der Energie der verwendeten Strahlung aufgetragen. Im für SAXS-Experimente an der Beamline BL9 typischen Energiebereich zwischen 10 und 15 keV variiert die Transmission zwischen 56% und 84%. Nicht nur den hierdurch verursachten Verlust an Intensität gilt es zu verhindern: Wie aus Abbildung 4.4 b) ersichtlich, ist die Absorption auch eine Folge der elastischen Streuprozesse, die ihrerseits Kleinwinkelstreuung an den Gasatomen verursachen (der Photoeffekt, in Folge dessen ebenfalls Absorption auftritt, ist verantwortlich für einen isotropen, niederenergetischen Streubeitrag). Ohne geeignete Gegenmaßnahmen entsteht ein starkes Halo um den direkten Strahl herum, welches bei SAXS-Experimenten an Proteinlösungen die Streuung der Proteine in aller Regel überstrahlt und so die aufgezeichneten Spektren bei kleinen Winkeln schwer auswertbar bis unbrauchbar macht.

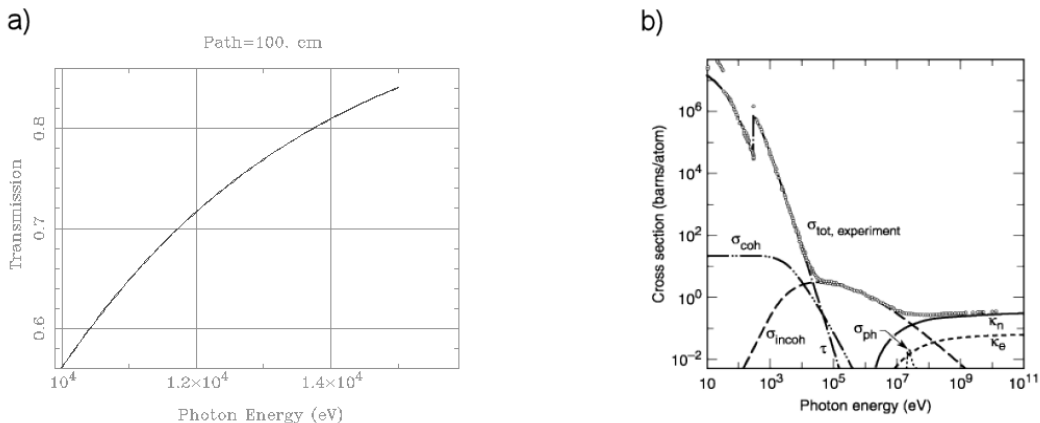


Abbildung 4.4: a) Transmission einer 1m langen Luftstrecke als Funktion der Photonenenergie [CXRO]. b) Zusammensetzung des totalen differentiellen Wirkungsquerschnitts  $\sigma_{tot}$  am Beispiel des Streuprozesses an einem Kohlenstoffatom in Abhängigkeit von der Photonenenergie:  $\tau$  Photoeffekt,  $\sigma_{coh}$  Rayleigh-Streuung,  $\sigma_{incoh}$  Compton-Streuung. Die Paarerzeugungsprozesse ( $\kappa_n$ ,  $\kappa_e$ ) spielen im relevanten Energiebereich ( $<10^6$  eV) keine Rolle [Kirz].

So besitzt Helium im Vergleich zur Luft eine sehr viel höhere Transmissiom und demzufolge eine sehr viel geringere Vorwärtsstreuung: In dem in Abbildung 4.4 dargestellten Energiebereich liegt diese stets über 99.6% [CXRO].

Wie man in Abbildung 4.3 erkennen kann, durchquerte der Röntgenstrahl vor dem Umbau der Experimentierhütte vom Ort des Eintritts in die Experimentierhütte bis zum Probenort (üblicherweise im Diffraktometer) größere Luftstrecken. Behelfsmäßig wurden zwar mit Helium gefüllte Rohre eingesetzt, die jedoch die Strahlstrecke nicht

vollständig abdecken konnten - darüber hinaus sind die Folien aus Polyimid (*Kapton*<sup>11</sup>), mit den die Rohrenden jeweils versehen waren, selbst starke Streuer.

Es wurde daher zunächst ein zweiteiliges Flightpath (sinngemäß "Strahlführung") entwickelt, welches wahlweise mit Helium gefüllt oder evakuiert werden kann. Es stellt eine durchgehende, evakuierte bzw. Helium-gefüllte Strecke vom Ort des Strahleintrittes in die Experimentierhütte bis zur Probenposition dar (Strang A). Ein zweiter Teil des Flightpaths (Strang B) deckt den Raum zwischen Probe und Detektor ab, wobei der gesamte vom Detektor erfasste Raumwinkel eingeschlossen ist.

Um im Heliumbetrieb der Heliumdiffusion durch die für den Strahldurchtritt notwendigen Kaptonfenster entgegenzuwirken, wird das Flightpath unter Helium-Durchfluss betrieben. Im Vakuumbetrieb ist eine permanent arbeitende Vakuumpumpe angeschlossen, die den Druck im Flightpath auf mehrere mbar reduziert.

**Strang A** Im Strang A sind optische Elemente wie Blenden und das Absorbersystem in das heliumgefüllte bzw. evakuierte Volumen integriert. Das System ist aufgebaut aus ISO-Kleinflansch-Bauteilen, einer Industrienorm für wiederverwendbare, vakuumdichte, leicht und schnell zu verschließende Rohrverbindungen. Die Verbindung der KF-Komponenten geschieht mit Hilfe von mit Quetschdichtungen (O-Ringen) versehenen Zentrierringen sowie äußeren Spannringen und erfolgt werkzeugfrei. Eine Übersicht des Helium/Vakuum-Systems bis zur Probenposition ist in Abbildung 4.5 wiedergegeben.

Das Eintritts-Kaptonfenster des Flightpaths befindet sich direkt hinter dem Monitorzähler für das Normierungssignal  $I_0$  (siehe Kapitel 4.4). Unmittelbar dahinter befindet sich der Auslass für das im Heliumbetrieb durchströmende Heliumgas, an dem mit Hilfe eines Sensors<sup>12</sup> der prozentuale Sauerstoffanteil in dem das System verlassenden Gasstrom gemessen wird, der so eine Kontrolle darüber ermöglicht, ob das Flightpath vollständig mit Helium gefüllt ist. Es folgt das Absorber- und Shutter-system (siehe Kapitel 4.5), die ortsfeste Eintrittsblende S2 (siehe Kapitel 4.6) und hinter einer segmentierten Rohrstrecke die strahldefinierende Blende S3, deren Position in Strahlrichtung variabel ist. Hinter der am Diffraktometer montierten und ebenfalls linear verschiebbaren Blende S4 (*guard slit*) schließen sich der Monitorzähler für das Normierungssignal  $I_{\text{abs}}$  (siehe Kapitel 4.4), der Helium-Einlass bzw. Vakuumpumpenanschluss und das den ersten Teil des Flightpaths abschließende Kaptonfenster an. Hinter dem Austrittsfenster erreicht der durch den Strang A des Flightpaths geführte Röntgenstrahl die Probenumgebung (siehe Kapitel 4.7).

**Strang B** Der Strang B des Flightpaths erstreckt sich von der Probenposition bis zum 2D-Detektor (siehe Kapitel 4.9) und ist in Abbildung 4.6 wiedergegeben. Unmittelbar hinter der Probenzelle befindet sich der Monitorzähler für das Normierungssignal  $I_{\text{tr}}$  (siehe Kapitel 4.4), und hinter einem kurzem Luftspalt schließt sich das mit einem Flansch versehene Eintritts-Kaptonfenster an ein aus Segmenten mit ansteigendem

---

<sup>11</sup>Kapton ist ein eingetragener Markenname von DuPont.

<sup>12</sup>Greisinger Electronic GOX-100, erhältlich über Conrad Electronic.

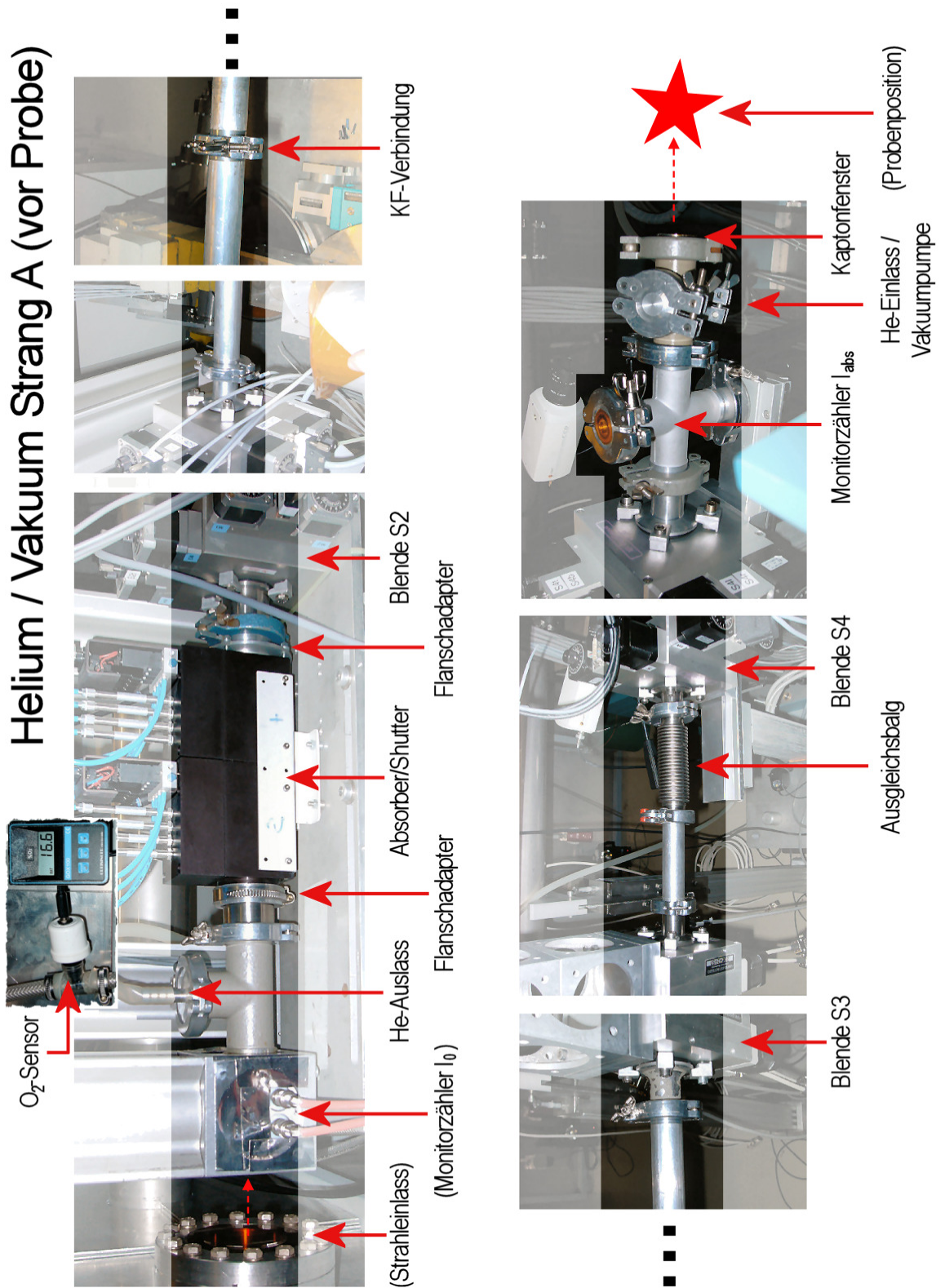


Abbildung 4.5: Helium/Vakuum-System, Strang A. In Klammern gesetzte Bauteile sind nicht Bestandteil des Helium/Vakuum-Systems.

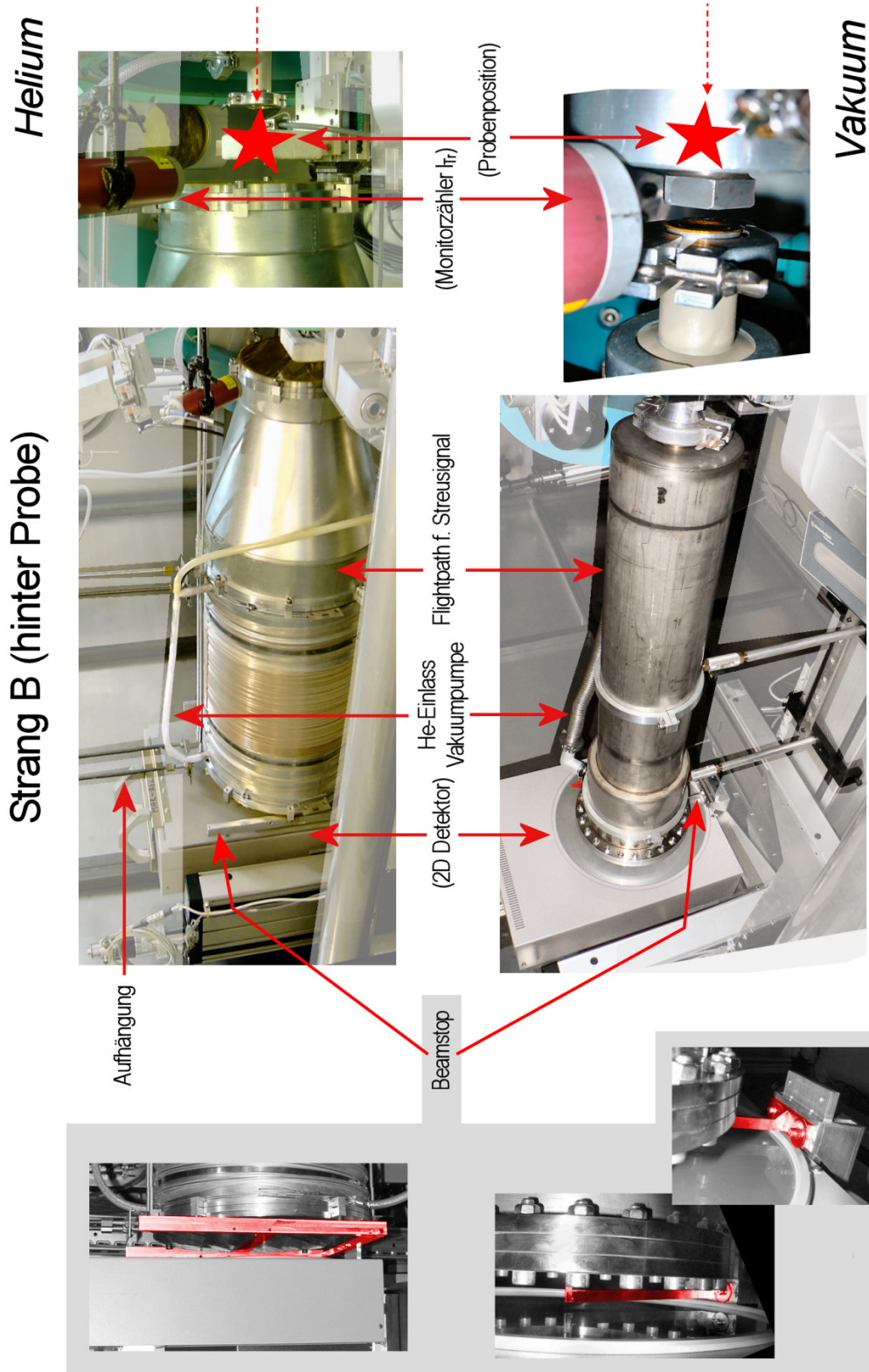


Abbildung 4.6: Helium/Vakuu-System, Strang B. In Klammern gesetzte Bauteile sind nicht Bestandteil des Helium/Vakuu-Systems.

Durchmesser aufgebautes Rohr an. Ein Anschluss für die Vakuumpumpe bzw. je zwei Anschlüsse für den Heliumein- und Auslass sind in das Rohrsystem integriert. An dem dem Detektor zugewandten Ende schließt ein Austritts-Kaptonfenster mit ausreichend großem Durchmesser das Rohr ab, und unmittelbar dahinter bildet ein Beamstop (siehe Kapitel 4.8) die letzte Komponente des Flightpath-Systems. Der dahinter positionierte 2D-Detektor zeichnet die gestreute und durch den Flightpath geführte Strahlung auf.

Anders als im Vakuumbetrieb wird im Heliumbetrieb für den letzten Teil des Flightpaths kein starres Rohr verwendet, vielmehr stellt ein flexibler, ausziehbarer Schlauch (Balg) den größten Teil des aus vier Komponenten (Eintrittsfenster, Kegelstutzen, Balg, Austrittsfenster) zusammengesetzten Helium-Flightpaths dar. Alle Komponenten des Balgs sind mit einem Klemmflanschsystem versehen und können so leicht zerlegt und ggfs. erweitert werden. Bedingt durch die Flexibilität des Balgs kann der Abstand zwischen Probe und Detektor in einem gewissen Rahmen frei variiert werden. Zu diesem Zweck erfolgt die Montage des Helium-Flightpaths hängend an einer mit Schlitten versehenen Deckenschiene, von denen Befestigungsstangen bis zur Höhe des Flightpaths herunterreichen. Bei Verwendung des Helium-Systems sollten für den Helium-Einlass oben liegende Gasanschlüsse verwendet werden und die unten liegenden für den Auslass. Dadurch kann das oben einströmende Helium die schwereren Gase der Luft durch die unten liegende Auslassöffnungen verdrängen und es kommt schneller zu einer homogenen Heliumatmosphäre innerhalb des voluminösen Flightpaths. Das durch die Auslassöffnung ausströmende Gas ist mit der Einlassöffnung des Strangs A zu verbinden, um so einen durchgehenden Helium-Fluss zu bilden.

Durch seinen großen End-Durchmesser (400 mm) kann das Helium-Flightpath die innerhalb des gesamten vom Detektor erfassten Raumwinkels gestreute Intensität aufnehmen und ermöglicht so Messungen in einem  $q$ -Bereich, der lediglich durch den Detektordurchmesser (345 mm) begrenzt ist.

Der End-Durchmesser des starren, einteiligen Rohres des Vakuum-Flightpaths liegt bei 200 mm, es schattet also einen Teil der Detektorfläche ab und begrenzt somit den im Experiment zugänglichen  $q$ -Bereich. Die Beschränkung auf diesen Durchmesser folgt aus der Reißfestigkeit des Fenstermaterials (im evakuierten Zustand). Der Probe-Detektor-Abstand bei der Verwendung des Vakuum-Systems ist durch die Länge des starren Rohres vorgegeben und liegt bei etwa 1.1 m.

Dennoch bietet das Vakuumsystem Vorteile gegenüber dem Heliumsystem: Zum einen entsteht im auf wenige mbar evakuierten Rohr weniger Streustrahlung im Vergleich zum Heliumsystem, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis im Detektorbild verbessert wird. Darüber hinaus ist das Vakuum-System nach dem Aufbau praktisch sofort einsatzbereit (der Abpumpvorgang dauert nur wenige Minuten). Im Gegenzug dazu dauert es beim Helium-System mehrere Stunden, bis der Rest-Sauerstoffanteil in dem das System verlassenden Gas einen Wert von weniger als 1% erreicht.

Andererseits ermöglicht die Verwendung des Helium-Systems die Realisierung von größeren Probe-Detektor-Abständen (zwischen 2 m und 3 m) und damit Messungen unter kleineren  $q$ -Werten. Durch die modulare Bauweise kann dazu das Flightpath an seinem kleinen Durchmesser durch einen zusätzlichen Verlängerungsbalg erweitert

werden, an dessen Ende dann das Eintrittsfenster angeflanscht wird. In dieser Konfiguration kann die Probenzelle Positionen einnehmen, die von unmittelbar hinter der Blende S3 (S4 entfällt dann) bis unmittelbar hinter der Blende S2 reichen (S3+S4 entfallen dann). In Abbildung 4.7 ist ein Aufbau abgebildet, in dem die Probenzelle unmittelbar hinter der Blende S2 positioniert ist, wenn auch mit einer älteren Version der Balge, die noch nicht mit Flanschanschlüssen versehen waren.

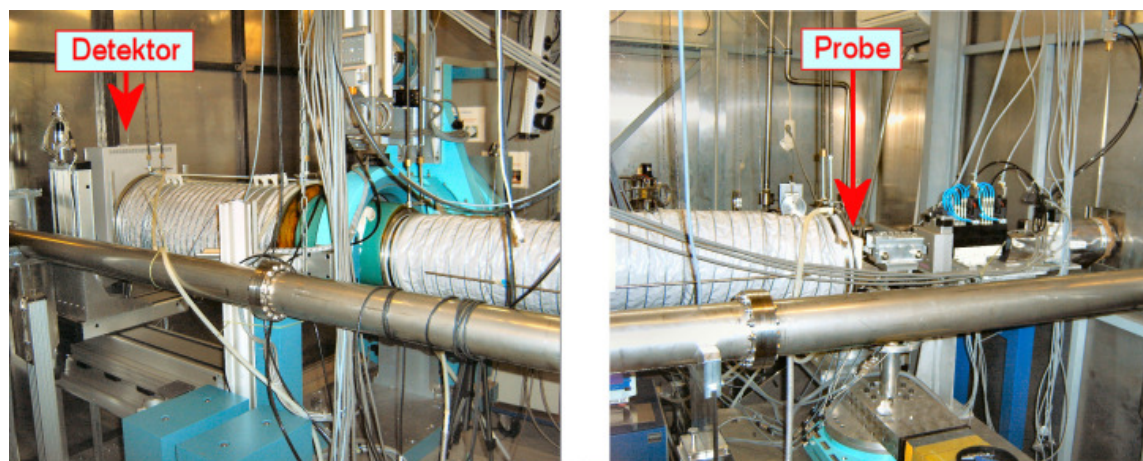


Abbildung 4.7: Konfiguration des Helium-Flightpaths für einen maximalen Probe-Detektor-Abstand von ca. 3.2 m. Das Photo zeigt eine ältere Version der Balgmodule, die aktuelle Version kann mittels Klemmflanschen unterbrechungsfrei durch das Diffraktometer geführt werden. Um ein Durchhängen zu verhindern unterstützt eine an der Deckenschiene aufgehangene Kugelkette den Verlängerungsbalg in regelmäßigen Abständen.

#### 4.4 Monitorzähler

Die an einer Probe gestreute, pro Zeiteinheit gemessene Intensität ist bedingt durch den exponentiellen Abfall des Elektronenstroms im Speicherring und der dadurch veränderlichen einfallenden Intensität eine Funktion der Zeit. Wie im Kapitel 3.2 gezeigt, setzt sich die gemessene Intensitätsverteilung aus der an den Proteinmolekülen, am Lösungsmittel, an der Probenzelle, an Gasstrecken und an Beamlinekomponenten gestreuten Intensitäten zusammen. Um den Beitrag der Proteinmoleküle zu erhalten, wird gemäß Gleichung 3.2 ein Untergrundabzug durchgeführt, indem von der an der Proteinlösung gemessenen Intensitätsverteilung die am reinen Lösungsmittel gemessene Intensitätsverteilung subtrahiert wird. Dadurch wird nicht nur der Beitrag des Lösungsmittels sondern auch die Beiträge aller anderen in beiden Messungen konstanten Einflüsse herausgerechnet.

Voraussetzung für einen erfolgreichen Untergrundabzug ist jedoch, dass die voneinander zu subtrahierenden Intensitäten auf die nicht-konstanten Einflüsse, wie die

bei jeder Messung variierende einfallende Intensität sowie die unterschiedliche Absorption der Proteinlösung und des Lösungsmittels, normiert werden. Die innerhalb der Messdauer  $\tau$  gemessene Streukurve  $I_{\text{exp}}(q)$  muss also sowohl auf die innerhalb der Zeit  $\tau$  einfallende Intensität  $I_{\text{in}}$  als auch auf die Transmission  $T$  der Probe normiert werden. Für die normierte Streukurve gilt dann

$$I_{\text{norm}}(q) = \frac{I_{\text{exp}}(q)}{I_{\text{in}}} \frac{1}{T} = \frac{I_{\text{exp}}(q)}{I_{\text{in}}} \frac{I_{\text{in}}}{I_{\text{tr}}} = \frac{I_{\text{exp}}(q)}{I_{\text{tr}}}, \quad (4.1)$$

wobei  $I_{\text{tr}}$  die innerhalb der Zeit  $\tau$  durch das Probenvolumen transmittierte Intensität darstellt. Wie in Abbildung 4.6 gezeigt, wird zur Bestimmung von  $I_{\text{tr}}$  ein NaI-Szintillationszähler verwendet (im Folgenden als Zählrohr bezeichnet), welches auf einen kurzen Luftspalt unmittelbar hinter der Probenzelle gerichtet ist und so die dort entstehende Luftstreuung misst, die näherungsweise proportional zur transmittierten Intensität ist<sup>13</sup>. Um diese Messung zu ermöglichen, muss konsequenterweise ein solcher Luftspalt (üblicherweise 1–2 cm Länge) existieren. Ausgehend davon, dass Gasstrecken prinzipiell auch Vorwärtsstreuung erzeugen, die sich mit der Proteinlösung überlagern, ist dies keine optimale Methode zur Messung des Signals  $I_{\text{tr}}$ .

Eine exakte Methode besteht darin, die transmittierte Intensität im Beamstop zu messen. Diese wird dort ohnehin absorbiert und eine Messung erfordert keine zusätzlichen Gasstrecken. Zu diesem Zweck wurde ein aktiver Beamstop entwickelt, der mit einer Röntgen-Photodiode ausgestattet ist und daher ein Signal proportional zu  $I_{\text{tr}}$  ausgeben kann (siehe Kapitel 4.8). Aus technischen Gründen ist die Benutzung eines solchen aktiven Beamstops nur für Messungen mit kurzen Messzeiten  $\tau$  (wenige Minuten) geeignet<sup>14</sup>.

Bei Messungen, die eine längere Belichtungsdauer erfordern, wird das Signal  $I_{\text{tr}}$  mittels der Luftstreuung gemessen. Falls jedoch ein Luftspalt nicht realisierbar ist, weil

---

<sup>13</sup>Diese Näherung gilt nur für schwach streuende Proben, also gering konzentrierte Proteinlösungen. Bei höher konzentrierten Lösungen verursacht die stärkere Streustrahlung einen nicht unerheblichen Beitrag zu der vom Zählrohr gemessenen Luftstreuung, und das Normierungssignal  $I_{\text{tr}}$  wird dadurch verfälscht.

<sup>14</sup>Die einfallende "weiße" Synchrotronstrahlung aus dem SAW deponiert eine hohe thermische Leistung im ersten Monochromatorkristall, welche nicht vollständig durch das Kühlsystem abgeleitet werden kann und die insbesondere unmittelbar nach einer Injektion zu einer verstärkten mechanischen Verformung dieses Monochromatorkristalls führt. Die Parallelstellung der Netzebenen zu denen des zweiten Monochromatorkristalls ist dann nicht mehr gegeben und die Braggbedingung nicht mehr exakt erfüllt. Dies macht sich letztendlich in einer starken Abnahme der Intensität in der Experimentierhütte bemerkbar. Während des Messbetriebes muss daher in regelmäßigen Abständen eine Korrektur der Monochromatoreinstellung erfolgen ("Monotune"). Dadurch verändert sich allerdings in aller Regel der Schwerpunkt der Intensitätsprofile des Strahls, und die innerhalb des von den Blenden vorgegebenen Fensters ausgeleuchtete Fläche ändert sich. Nun ist die detektierende Fläche der im Beamstop eingebauten Röntgendiode technisch bedingt stets kleiner als die Fläche des Beamstops, der wiederum nicht größer sein darf, als für die Abschattung des direkten Strahls nötig. Verändert sich also in Folge eines Monotunes der ausgeleuchtete Bereich des Beamstops, wird die aktive Fläche der Röntgendiode nur teilweise oder gar nicht mehr beleuchtet und das während der Messung aufgezeichnete Signal ist dann nicht mehr proportional zu  $I_{\text{tr}}$ .

z.B. das Vakuum-Flightpath direkt an die Probenzelle angeflanscht ist, besteht noch eine weitere Möglichkeit, das Normierungssignal  $I_{tr}$  auszuwerten: Wenn der Streubeitrag des in Lösung befindlichen Proteins gegenüber der Streuung des Lösungsmittels klein ist und insbesondere nur sehr schwache Streuung unter großen Winkeln verursacht, kann die über die gesamte Fläche des 2D-Detektors integrierte, während der Messung aufgezeichnete Intensität als Normierungssignal verwendet werden: Wenn beim Wechsel von Proteinlösung zum Lösungsmittel keine oder nur eine schwache Veränderung der Streuung unter großen Winkeln auftritt, dann verändert sich der Wert der gesamten vom Detektor erfassten, an der Probe gestreute Intensität in etwa umgekehrt proportional zur Transmission des Probenvolumens: Der Teil der Intensität, der im transmittierten Strahl fehlt, findet sich in der elastisch gestreuten und vom Detektor erfassten Intensität wieder.

Während das Normierungssignal  $I_{tr}$  für die Normierung der Messdaten von Erfordernis ist, sind für die Blendenjustage die Normierungssignale  $I_0$  (in die Experimentierhütte einfallende Intensität) und  $I_{abs}$  (der Probe zugeführte Intensität) essenziell. Deren Aufzeichnung geschieht mittels der entsprechend bezeichneten Monitor-Detektoren an den in Abbildung 4.5 gekennzeichneten Positionen. Ihr Aufbau ist in der Abbildung 4.8 schematisch dargestellt.

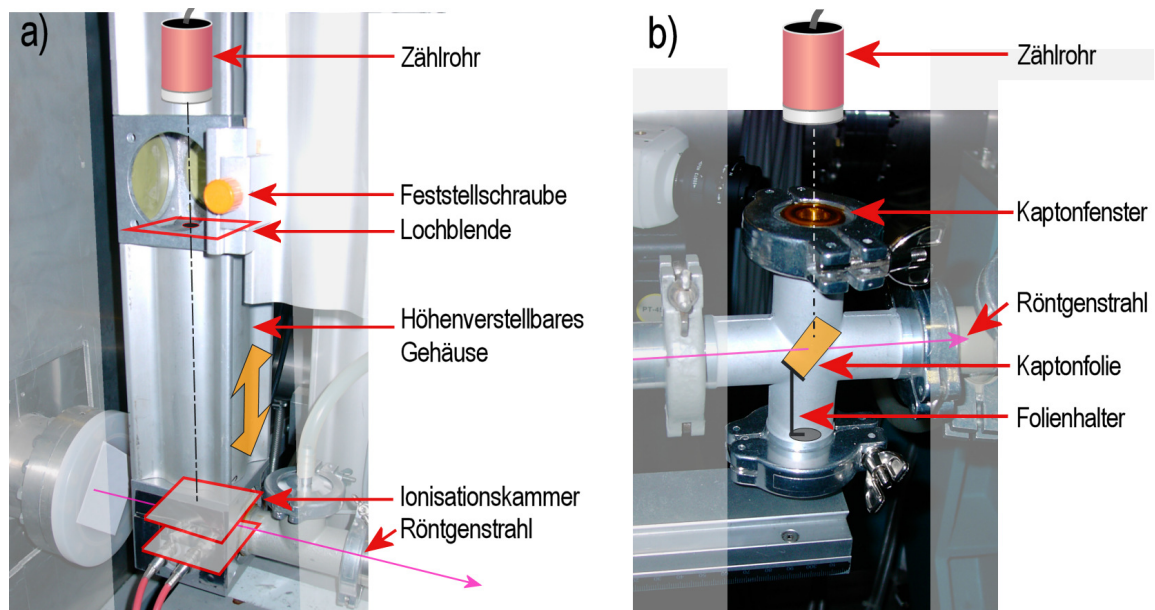


Abbildung 4.8: a) Aufbau der Messvorrichtung für das Monitor signal  $I_0$  (in die Experimentierhütte einfallende Intensität) b) Aufbau der Messvorrichtung für das Monitor signal  $I_{abs}$  (der Probe zugeführte Intensität)

Im Monitor  $I_0$  kann die Messung wahlweise mittels des Signals einer Ionisationskammer oder mittels eines Zählrohres erfasst werden, das die an Luft gestreute Intensität



registriert <sup>15</sup>. Beide Vorrichtungen sind in einem vertikal verschiebbaren, mittels einer Feststellschraube fixierbaren Gehäuse integriert. Befindet sich das Gehäuse am oberen Anschlag, passiert der Röntgenstrahl die Ionisationskammer. Falls sich das Gehäuse am unteren Anschlag befindet, verläuft der Röntgenstrahl oberhalb der Ionisationskammerplatten, und das im darüber liegenden Teil des Gehäuses eingebaute Zählrohr kann die an Luft gestreute Intensität messen. Um eine Sättigung des Detektors zu verhindern, befindet sich vor diesem eine Lochblende, die die Zahl der das Zählrohr erreichenden Röntgenphotonen begrenzt.

Für die Aufzeichnung des Monitorsignals  $I_{\text{abs}}$  kann keine Gasstreuung verwendet werden, da keine Gasstrecken im Bereich vor der Probenposition innerhalb des Vakuum-Flightpaths existieren, oder wie beim Helium-Flightpath, nur eine sehr schwache Streuung verursachen. Um dennoch eine Messung der der Probe zugeführten Intensität zu ermöglichen, ist innerhalb eines im Flightpath integrierten KF-Kreuzrohres eine dünne Kaptonfolie im Strahlengang fixiert. Durch ein Kaptonfenster verlässt die an der Folie gestreute Intensität den Helium-/Vakuumbereich und erreicht das Zählrohr für das Monitorsignal  $I_{\text{abs}}$ .

Die Messvorrichtungen für die Monitorsignale  $I_0$  und  $I_{\text{abs}}$  verursachen zwar eine schwache Vorwärtsstreuung; da diese jedoch in beiden Fällen vor der Probenposition entsteht, wird sie zum Großteil durch die Apertur der Probenzelle abgeschattet und macht sich nur schwach im Streubild am Ort des Detektors bemerkbar.

## 4.5 Das Absorber- und Shutterssystem

Eine SAXS-Messung an Proteinlösungen besteht - wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben - aus zwei getrennten Messungen, jeweils an der Proteinlösung und am reinen Lösungsmittel. Diese sind für den Untergrundabzug erforderlich, und eine korrekte Normierung der voneinander zu subtrahierenden Datensätze setzt neben den im vorigen Kapitel beschriebenen Bedingungen auch eine definierte Belichtungszeit  $\tau$  voraus, während der die Detektoren das Streusignal und das Monitorsignal aufzeichnen.

Ferner muss während einer Messung vermieden werden, dass der 2D-Detektor zu viele Photonen pro Pixel akkumuliert (z.B. bei sehr stark streuenden Proben) und so den linearen Messbereich verläßt, was die Daten letztlich unbrauchbar macht. Während der Einjustierung von optischen Komponenten (Blenden, Beamstop) muss überdies sichergestellt werden, dass der 2D-Detektor nicht unbeabsichtigt dem direkten Strahl ausgesetzt wird, da dies zu einer dauerhaften Beschädigung des Detektors führen kann.

Um die o.g. Forderungen zu erfüllen, wurde ein kombiniertes Shutter/Absorber-System <sup>16</sup> installiert, welches zum einen eine exakte Belichtungsdauer der Probe sicherstellt (Shutter-Funktion) und darüber hinaus die Abschwächung des einfallenden Strahls ermöglicht (Absorber-Funktion). Das verwendete System besteht aus zwei hin-

---

<sup>15</sup>Bei hohen Photonenenergien (>15 keV) ist die Streuung an Luft häufig nicht mehr ausreichend, um ein Normierungssignal genügender Statistik zu generieren. Die Verwendung der Ionisationskammer ist dann vorteilhaft.

<sup>16</sup>*XIA PF4* und *XIA PF2S2*, Hersteller: *Xray Instrumentation Associates*, USA

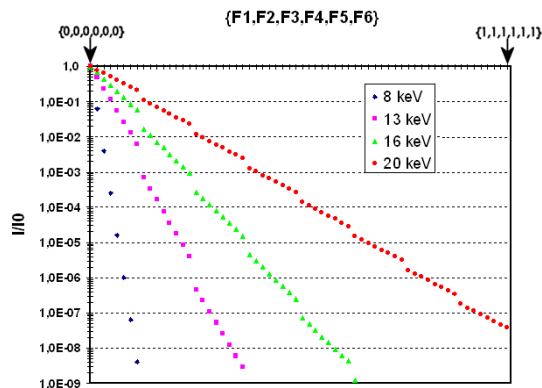


Abbildung 4.9: Absorptionsfaktor  $I/I_0$  als Funktion der im Absorber eingeschobenen Aluminiumfolien ( $F1=12.5\mu\text{m}$ ,  $F2=25\mu\text{m}$ ,  $F3=50\mu\text{m}$ ,  $F4=125\mu\text{m}$ ,  $F5=250\mu\text{m}$ ,  $F6=500\mu\text{m}$ ). Das Sextupel  $\{F1,F2,F3,F4,F5,F6\}$  wird von links nach rechts binär erhöht (1=“im Strahl”, 0=“nicht im Strahl”)

tereinandergeschalteten Einheiten, einer Absorbereinheit (PF4) mit vier Aufnehmern für Absorberfolien sowie einer Absorber/Shutter-Einheit (PF2S2) mit zwei weiteren Absorberfolienaufnehmern sowie zwei massiven Metallplatten für die Shutter-Funktion<sup>17</sup>. Jede der sechs Absorberfolienaufnehmer, ebenso wie die Shutterplatten können mittels pneumatisch betätigter Schieber in den Strahl hinein- und wieder herausgefahren werden.

Um eine fein abstimmbare Abschwächung über mindestens 9 Größenordnungen im Energiebereich von 8 bis 20 keV zu ermöglichen, wurden sechs Aluminiumfolien mit den Dicken  $12.5\mu\text{m}$ ,  $25\mu\text{m}$ ,  $50\mu\text{m}$ ,  $125\mu\text{m}$ ,  $250\mu\text{m}$  und  $500\mu\text{m}$  als Absorber eingesetzt. Die Absorberstärke in Abhängigkeit der in den Strahl geschobenen Folien für vier verschiedene Energien ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

Für die Shutter-Funktion sind zwei Metallplatten in Benutzung, von denen sich eine im stromlosen Zustand im Strahlengang befindet, also als Öffner dient, der bei Ausfall der Versorgungsspannung den Strahl unterbricht und die zweite analog dazu als Schließer dient. Die Verwendung von zwei Shutterplatten ermöglicht besonders kurze Belichtungszeiten von  $\tau_{\text{min}} \simeq 0.1\text{s}$ . Während bei der Verwendung einer einzigen Shutterplatte die Zeitspanne zwischen dem Öffnen und dem Schließen bedingt durch die Trägheit des pneumatisch-mechanischen Systems nach unten begrenzt ist, kann bei der Verwendung von zwei Shutterplatten im Prinzip eine beliebig kurze Belichtungszeit realisiert werden, die lediglich durch die Ansprechzeiten der Steuerelektronik begrenzt ist.

Die für die elektronische Ankopplung des Shutter/Absorber-Systems erforderlichen Komponenten sind im Anhang erläutert.

<sup>17</sup>Das Shutter/Absorber-Modul besitzt eine rechteckige Apertur mit einer Höhe von 10.5 mm und 21 mm Breite. Jede der beiden Shutterplatten besitzt eine Dicke von 3.2 mm und besteht aus Edelstahl.

## 4.6 Blenden

Das Blendensystem erfüllt den Zweck, den Strahlquerschnitt auf das für das Experiment erforderliche Maß (vorgegeben z.B. durch die Apertur der Probenzelle) zu kollimieren. Die Blendenklingen bestehen üblicherweise aus einem stark absorbierenden Material hoher Ordnungszahl (z.B. Wolfram), wodurch eine vollständige Absorption des abzuschattenden Strahls auch bei hohen Strahlenergien gewährleistet wird. Bei den an der Beamline BL9 im Einsatz befindlichen Blenden<sup>18</sup> sind die Blendenklingen aus Wolframcarbid. Die mehrere Millimeter dicken Blendenklingen besitzen an ihren Kanten jedoch ebene Flächen, an den der einfallende, durch die Blende abgeschattete Röntgenstrahl gestreut und unter kleinen Winkeln zum Teil reflektiert wird. Diese Reflexe können sehr intensiv sein, die unter kleinen Winkeln an der Probe gestreute Intensität überlagern und die dort gemessenen Daten unbrauchbar machen.

Neben der Strahlkollimation muss das Blendensystem daher auch die selbst verursachte Streustrahlung abschatten. Um diese Aufgabe zu erfüllen sind mehrere unabhängig arbeitende Blenden erforderlich. Während bei einem ideal parallelen Strahl eine Kombination aus zwei Blenden ausreichend wäre, erfordert der reale Synchrotronstrahl mit einer üblicherweise vertikal und horizontal verschiedenen Divergenz die Verwendung einer Anordnung aus drei Blenden: einer Eintrittsblende, einer strahldefinierenden Blende und einer sogenannten *guard slit* (zu deutsch: “Wächterblende”) [Fujisawa] [Wignall]. Die Anordnung und die Funktion der Blenden geht aus der Abbildung 4.10 hervor

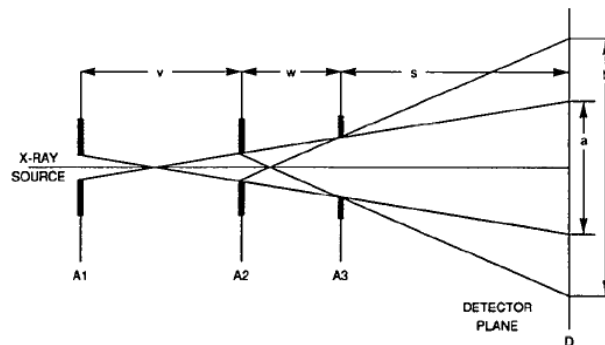


Abbildung 4.10: Strahlengang der parasitären Streuung an einem drei-Blenden-System aus Eintrittsblende (A1), strahldefinierender Blende (A2) und guard slit (A3). Die Bereiche a und b entsprechen den von parasitärer Streuung überdeckten Bereichen des Detektors (Längenskalen stark übertrieben). Entnommen aus [Wignall].

Die Eintrittsblende ist in der Nähe des Eintrittsortes des Röntgenstrahls in der Experimentierhütte positioniert (an der Beamline BL9 ist dies die Blende S2, siehe Abbildung 4.5) und schneidet zunächst die Seitenflanken des noch wenig fokussierten

<sup>18</sup>Hersteller *JJ XRay*, Dänemark

Strahls ab, also die bis dahin entstandene parasitäre Streuung. Die strahldefinierende Blende (S3) ist die eigentliche Kollimationsblende, da diese die gewünschte Strahlgeometrie vorgibt. Sie befindet sich auf halber Strecke bis zum Probenort. Die letzte, *guard slit* genannte Blende (S4) dient ausschließlich zur Abschattung der durch die strahldefinierende Blende verursachten Streustrahlung. Um dabei nicht selbst zu einer Quelle parasitärer Streuung zu werden, sollten die Klingen der *guard slit* den direkten Strahl nicht mehr berühren, jedoch so dicht wie möglich an ihn herangeführt sein. Weiterhin sollte diese letzte Blende unmittelbar vor der Probenposition positioniert sein, damit die von der zweiten Blende ausgehende Streustrahlung, welche unter kleinen Winkeln noch innerhalb des direkten Strahls durch die *guard slit* passieren kann, aus diesem möglichst nicht mehr austreten kann. Die letzte Bedingung ist im SAXS-Setup an der BL9 in der Regel nicht erfüllt, denn der Montageort der letzten Blende S4 befindet sich mit Rücksicht auf andere experimentelle Geometrien vor dem Diffraktometer, in welchem die Probenumgebung üblicherweise eingebaut ist.

Um die durch die strahldefinierende Blende S3 verursachte, parasitäre Streuung dennoch möglichst gering zu halten, wurde ein modifiziertes Profil der Blendenklingen umgesetzt, schematisch in Abbildung 4.11 gezeigt. Der maximale Einfallswinkel  $\alpha_c$  unter dem in Vakuum (oder Luft) Totalreflexion von Röntgenstrahlung an einer ebenen Grenzfläche mit der Elektronendichte  $\rho_e$  auftreten kann, ist

$$\alpha_c \simeq \sqrt{2\delta} = \sqrt{\rho_e r_e \pi^{-1} \lambda} \quad (4.2)$$

[Als-Nielsen], wobei  $\delta$  die Dispersion des Materials ist. Für eine Wolframcarbidge-Oberfläche folgt damit im Energiebereich von 10keV bis 15keV ein Wert  $\alpha_c = 0.4^\circ$  bis  $0.3^\circ$ .

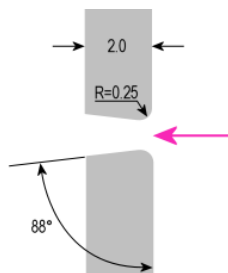


Abbildung 4.11: Querschnitt durch zwei gegenüberliegende Blendenklingen der strahldefinierenden Blende S3 (Strahlrichtung von rechts nach links). Angaben in mm bzw. Grad.

Der Anstellwinkel der Blendenkanten zur Strahlrichtung wurde von  $0.5^\circ$  auf  $2^\circ$  erhöht, zum einen um Reflexionen eines horizontal divergenten und horizontal unter Umständen überfokussierten (d.h. mit einem Fokus vor der Blende S4) Strahlenbündels an den Blendenkanten zu minimieren. Darüber hinaus wird durch den großen Anstellwinkel erreicht, dass die Bedingung für die Totalreflexion des Röntgenstrahls auch an den Klingenkanten einer üblicherweise nicht ideal senkrecht zum Strahl stehenden Blende nicht erfüllt ist.

Um eine Transmission der höherenergetischen Anteile im Strahl (höhere Harmonische, siehe Kapitel 4.2) durch die wegen des erhöhten Anstellwinkels zum Strahl hin zunehmend dünner werdenden Blendenklingen zu vermeiden, wurden die Klingenkanten mit einem Krümmungsradius von 0.25 mm abgerundet. Bei den Blenden S2 und S4 wurden die ursprünglichen Blendenprofile beibehalten (Anstellwinkel  $0.5^\circ$  und spitze Kanten).

Die Abbildung 4.12 zeigt schematisch sowohl die Strahlgeometrie als auch die Wirkung des Blendensystems, jeweils im vertikalen Schnitt (Blick von der Seite) und im horizontalen Schnitt (Blick von oben). In der Seitenprojektion besitzt der Strahl eine geringe, symmetrische Divergenz, und die Blenden können symmetrisch um die Mitte des Strahlprofils herum einjustiert werden. Die in der Abbildung ebenfalls dargestellten Strahlprofile an den Positionen der jeweiligen Blenden zeigen den sukzessive stärker kollimierten Strahl.

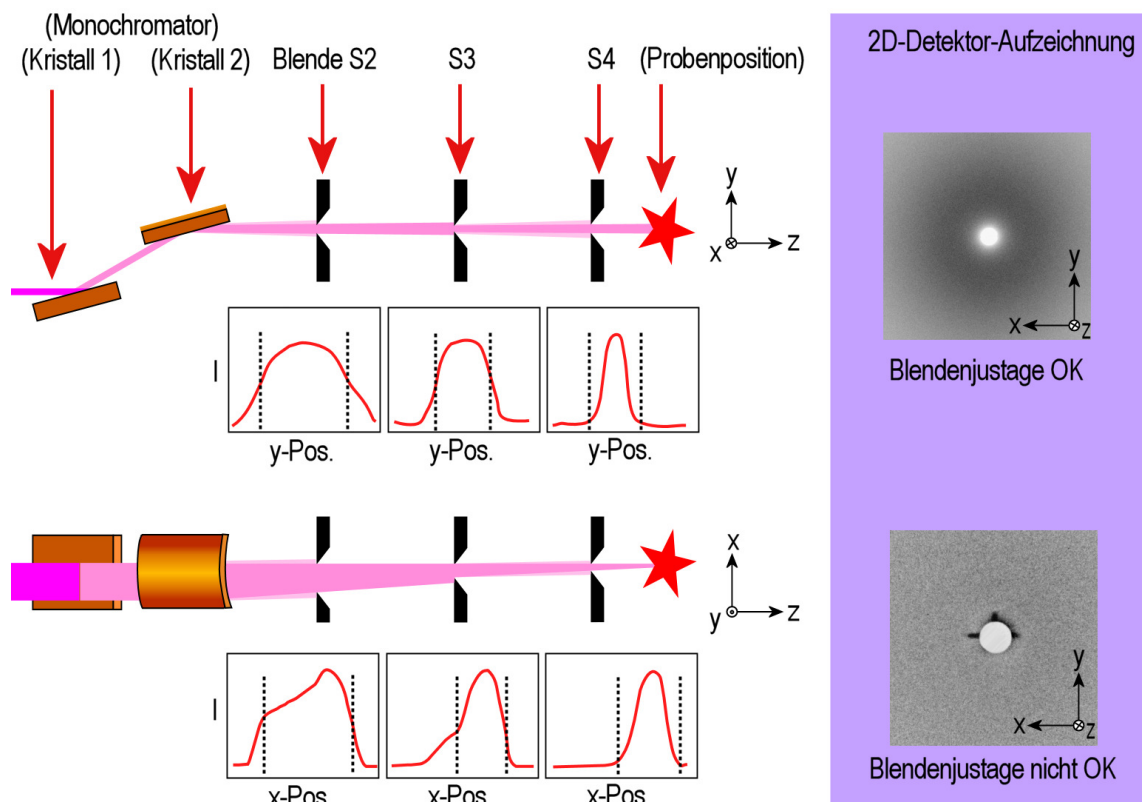


Abbildung 4.12: Seitenansicht (oben) und Draufsicht (unten) auf die Geometrie des Strahlverlaufs und die Blendeneinstellungen der Blenden S2, S3 und S4. Zu jeder Blendenposition ist ein Strahlprofil abgebildet, welches jeweils einen qualitativ optimalen Verlauf bei einer Fokussierung auf den Probenort darstellt. Die gestrichelten Linien geben die Bereiche wieder, die die Blenden eingrenzen sollten. Rechts: bei korrekter Blendeneinstellung sind im Bild des 2D-Detektors um den Beamstop herum (weißer Kreis) keine Reflexe zu sehen sondern lediglich ein symmetrisches Halo.

In der Draufsicht ist zu erkennen, dass das horizontale Strahlprofil einen asymmetrischen Verlauf besitzt. Die Ursache hierfür liegt darin, dass der aus dem SAW kommende Strahlfächer den Monochromator nicht genau mittig trifft, sondern seitlich versetzt (ebenfalls im Bild dargestellt). Dies hat zur Folge dass der zweite, nicht vollkommen gleichmäßig saggital gebogene Monochromatorkristall die beiden Randbereiche des Strahls unterschiedlich stark fokussiert, was sich letztlich darin äußert, dass das Strahlprofil mit zunehmender Entfernung nur in einer Richtung zusammenläuft. Es ist daher wichtig, bei der Blendenjustage darauf zu achten, nicht den Teil des Strahls abzuschatten, in den das Profil letztlich fokussiert wird. Ebenso sollte auch möglichst wenig von dem Teil des Strahls abgeschnitten werden, der sich später im Fokus wiederfindet. Die Bereiche, welche durch die jeweiligen Blenden eingegrenzt werden sollten, sind in der Abbildung durch gestrichelte Linien angedeutet.

Ist das Blendensystem korrekt einjustiert, sollte bei einer Aufzeichnung am 2D-Detektor um den Beamstop herum lediglich ein symmetrisches Halo zu erkennen sein. Falls Reflexe wie im unteren Detektorbild in der Abbildung 4.12 zu erkennen sind, deutet dies in der Regel darauf hin, dass die Blende S4 zu weit in das Strahlprofil hineinragt. Ein weitere mögliche Ursache kann ein ungünstiger Verlauf des Strahls in Bezug auf die Klingflächen der Blende S3 sein, insbesondere der Klinge, die dem wenig fokussierten Randbereich des Strahls zugewandt ist. Eine einseitige Korrektur dieser Blendeneinstellung schafft hier oftmals Abhilfe.

## 4.7 Probenumgebungen

Der Aufbau einer Probenzelle richtet sich in erster Linie nach den Parametern, deren Variation die Probenumgebung im Experiment ermöglichen soll. Wie bereits im Kapitel 3.3 argumentiert, sind Temperatur und Druck die beiden wichtigsten Größen, mit den sich der Entfaltungsprozess eines in Lösung befindlichen Proteins beeinflussen lässt. Während die Regelung der Temperatur in einem flüssigen Probenvolumen relativ unkompliziert ist, stellt die Forderung, Messungen unter Drücken von mehreren Tausend bar durchführen zu können, hohe Ansprüche an den Aufbau der Probenzelle. Im Zuge der Entstehung dieser Arbeit sind daher zwei getrennte Probenumgebungen entstanden, von denen die erste lediglich eine Regelung der Temperatur und die zweite sowohl eine Temperatur- als auch Druckregelung ermöglicht.

So unterschiedlich die beiden Probenumgebungen in ihrer Endausführung auch sind, vereint sie jedoch die Forderung an die Bauweise des für den Strahl sichtbaren Bereichs des Probenvolumens: In beiden Fällen sollte der Strahl beim Durchtritt durch das Probenvolumen möglichst wenig parasitäre Streuung generieren, ebenso sollte die an der Probe gestreute Strahlung möglichst ungehindert aus der Probenumgebung austreten können.

Bei SAXS-Messungen an Flüssigkeiten wird häufig ein Aufbau gewählt, in dem der Röntgenstrahl die zu untersuchende Flüssigkeit in einer Kapillare oder in einem Glasröhrchen durchleuchtet. An den runden Glaswänden können jedoch sowohl innen als auch außen, je nach Einfall des Röntgenstrahls starke Reflexe auftreten, die die

Datenauswertung erschweren können. Insbesondere unter dem Gesichtspunkt der stets variierenden Position des Strahlschwerpunkts (“Monotune”) im Experiment wäre eine solche Bauweise für den Einsatz an der Beamline BL9 ungünstig. Um parasitäre Streuung auch bei veränderlicher Strahlage zu vermeiden, bietet es sich an, das Probenvolumen durch flache, dünne Fenster einzugrenzen.

Für die an einer Probe der Dicke  $t$  gestreute Intensität  $I$  gilt

$$I \propto te^{-\mu t}. \quad (4.3)$$

Das Maximum dieses Ausdrucks liegt bei  $t = 1/\mu$ . Die Streuintensität nimmt also bei gleichbleibender einfallender Intensität ihren Maximalwert an, wenn die Dicke der Probe der Absorptionslänge  $1/\mu$  gleicht (also der Dicke, die einer Transmission von  $1/e$  entspricht) [Glatter]. Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung 4.13 a) dargestellt.

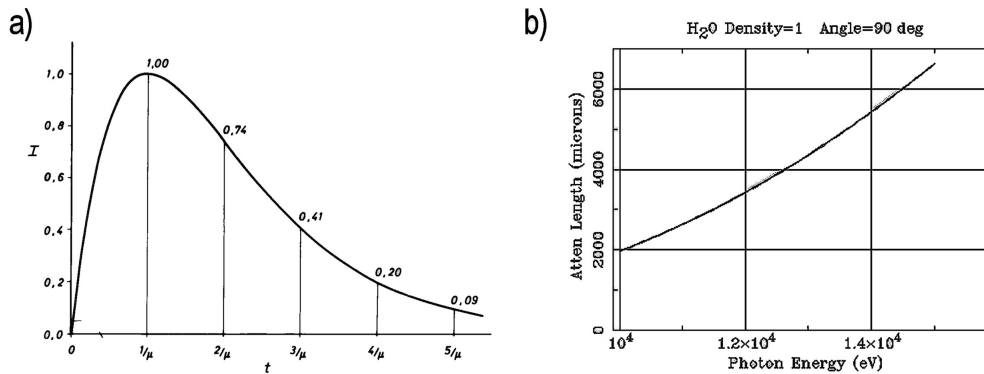


Abbildung 4.13: a) Abhängigkeit der an einer Probe gestreuten Intensität  $I$  von der Dicke der Probe  $t$ , aufgetragen in Einheiten der Absorptionslänge  $1/\mu$  (mit dem Absorptionskoeffizienten  $\mu$ ). Entnommen aus [Glatter] b) Absorptionslänge von Wasser als Funktion der Photonenenergie [CXRO]

Die in dieser Arbeit getätigten Messungen wurden an Lösungen von Proteinen durchgeführt, deren mittlere Dichte in der Größenordnung des sie umgebenden Lösungsmittels - also der des Wassers - liegt (siehe Abbildung 3.4). Für eine Abschätzung der optimalen Probendicke für diese Probensysteme reicht es also, die Absorptionslänge von Wasser auszuwerten, die in Abbildung 4.13 als Funktion der Photonenenergie aufgetragen ist. Um der Näherung nach vernachlässigbaren Mehrfachstreuungsprozessen gerecht zu werden, sollte die Probendicke möglichst gering sein. Gleichzeitig folgt aus einer geringen Photonenenergie eine stärkere Absorption des gestreuten Signals an Gasstrecken. Eine Probendicke von etwa 2 – 3 mm bei 10 – 11 keV erscheint daher als günstige Kombination. Um prinzipiell auch Probensysteme mit höherem Absorptionsvermögen untersuchen zu können, ermöglichen beide Probenumgebungen auch eine geringere Probendicke von ca. 1 mm.

### 4.7.1 Die Temperaturzelle

Eine detaillierte Darstellung des Aufbaus der Probenzelle ist in Abbildung 4.14 gegeben. Die Probenzelle besteht aus einem Probenelement, einem Sensorelement sowie einer U-förmigen Kühl-/Heizklemme, in die beide Elemente eingesetzt werden können. Während die Klemme im experimentellen Aufbau fest fixiert ist, kann das Probenelement für einen Probenwechsel leicht entnommen werden und anschließend wieder präzise in die ursprüngliche Position eingesetzt werden.

Dank ihres Innenprofils stellt die Kühl-/Heizklemme darüber hinaus eine große Kontaktfläche zur Wärmeübertragung bereit. Im Inneren der aus Kupfer gefertigten Klemme verläuft eine durchgehende Rohrleitung, welche an den Kreislauf eines Kühl-/Heizthermostaten <sup>19</sup> angeschlossen werden kann und so eine effiziente Temperierung der in die Klemme eingeschobenen Elemente ermöglicht.

Das Probenelement besteht im Wesentlichen aus einem goldbeschichteten Kupferträger (siehe Explosionszeichnung), in dessen mittleren, flachen Teil eine ovale Öffnung eingefräst ist. Diese Öffnung wird zu beiden Seiten durch dünne Folien (z.B. Kapton oder Mica <sup>20</sup>) abgegrenzt, die mittels Andruckringen und Andruckelementen (beides Kunststoff) abdichtend an die Metallfläche gepresst werden. In das so entstandene, ovale Volumen zwischen den Folien wird die zu untersuchende, flüssige Probe injiziert. Dazu besitzt der Probenträger zu beiden Seiten der ovalen Öffnung einen Befüllkanal, durch diesen mittels einer Injektionsnadel die Flüssigkeit in das Probenvolumen eingebracht und aus dieser wieder entnommen werden kann. Beide Befüllkanäle können an ihren äußeren Enden mittels kleiner, mit Dichtungen versehenen Schrauben verschlossen werden.

Die Flüssigkeit im Probenvolumen steht im direkten Kontakt zu den Metallflächen des Probenträgers, wodurch eine optimale Wärmeübertragung gewährleistet ist. Um chemische Reaktionen der Probenflüssigkeit mit den Metallflächen zu verhindern, sind diese mit Gold beschichtet. Da die Probenflüssigkeit auch im direkten Kontakt zu den Folien steht, die das Probenvolumen abgrenzen, muss vor jedem Experiment die Verträglichkeit der Probe mit dem Folienmaterial (ebenso wie mit der Goldoberfläche) überprüft werden.

Die Messung der Temperatur des Probenvolumens geschieht indirekt mittels des ebenfalls in die Kühlklemme einzusetzenden Temperatursensors. Dieser besitzt den gleichen Aufbau, wie das Probenelement, jedoch befindet sich am Ort der Probenflüssigkeit ein in Silikongel gebetteter *Pt100*-Temperatursensor. Das Temperaturelement ist so konstruiert, dass im eingebauten Zustand die wärmeübertragenden Kontaktflächen zur Kühlklemme beim Temperaturelement und beim Probenelement in etwa gleich groß sind. Bei einem ausreichend hohen Kühlmitteldurchfluss durch die Klemme ist der

---

<sup>19</sup>Der an der Beamline BL9 zur Verfügung stehende Kühlthermostat *Thermo Haake P1-C40P* arbeitet im Temperaturbereich  $-40^{\circ}\text{C}$  bis  $+150^{\circ}\text{C}$  je nach verwendetem Kühlmittel. Die Heizleistung beträgt 2.0 kW, die Kühlleistung max. 0.7 kW.

<sup>20</sup>Mica ist die englische Bezeichnung für Muskovit-Glimmer. Passende Mica-Plättchen mit einer Größe von  $20 \times 20 \text{ mm}^2$  und einer Dicke von  $25 - 30 \mu\text{m}$  sind erhältlich über die *Richard Jahre GmbH, Wilhelmshaven*.



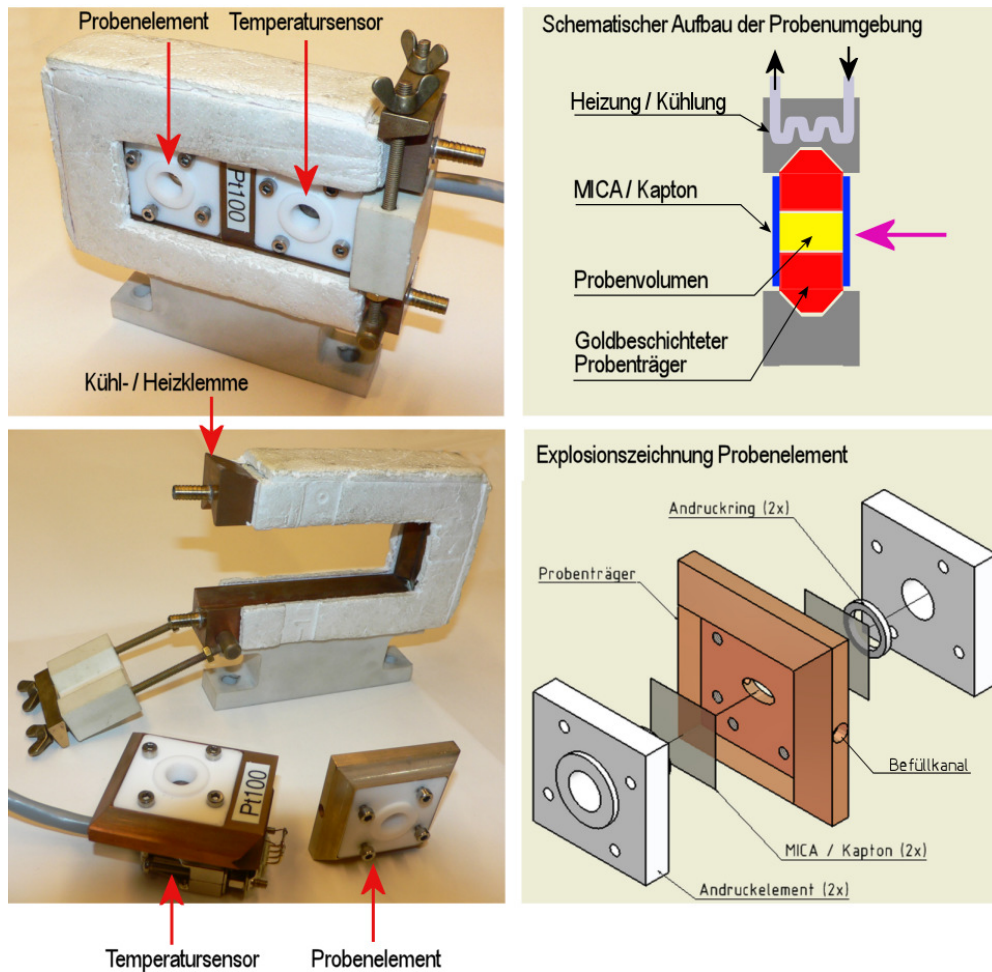


Abbildung 4.14: Aufbau, Zusammenbau und schematische Darstellung der Probenzelle für Temperatur-geregelte SAXS Messungen.

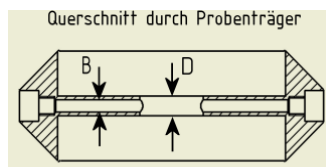
Temperaturgradient innerhalb der (nach außen thermisch isolierten) Klemme vernachlässigbar und man kann annehmen, dass die Temperatur am Ort des Temperatursensors die gleiche ist, wie am Ort der Probenflüssigkeit.

Eine direkte Messung im Probenvolumen wäre im Übrigen schwierig umzusetzen, da dieses sehr klein gehalten werden muss (in der Regel stehen nur geringe Proteinmengen zur Verfügung, weshalb Proteinlösungen nur in kleinen Mengen angemischt werden können). Darüber hinaus käme die Probe bei einem im Probenvolumen platzierten Sensor in direkten Kontakt mit zusätzlichen Materialien, und die Reinigung des Probenelements bei einem Probenwechsel würde erschwert.

Das Temperaturelement kann über eine Anschlussleitung direkt an den Sensoreingang des Kühltermostaten angeschlossen werden, so dass eine automatische Temperaturregelung erfolgen kann, wobei die Regelschleife auf die Temperatur der Probe sensitiv ist.

Das Probenelement steht in drei verschiedenen Typen zur Verfügung, die sich in der Dicke der ovalen Öffnung  $D$  (vorgegeben durch die Materialstärke im flachen Teil des Probenträgers) und im Durchmesser  $B$  des Befüllkanals unterscheiden (der Befüllkanal ist nur bei zwei der drei Typen vorhanden). Das in der folgenden Tabelle angegebene Gesamtvolumen  $V$  setzt sich zusammen aus dem Volumen der ovalen Probekammer und des beider Befüllkanäle (falls vorhanden).

	$D$	$B$	$V$
Probenelement 1	3 mm	1.5 mm	$200\mu\text{l}$
Probenelement 2	3 mm	2.0 mm	$240\mu\text{l}$
Probenelement 3	1 mm	n.v.	$47\mu\text{l}$



Abmessungen und Volumina der Probenträger

Alternativ zur Befüllung der flüssigen Probe direkt in den Probenträger kann die Probe auch in einer Kapillare untergebracht werden, welche dann in den (durchgehenden) Befüllkanal hineingeschoben werden kann. Um hier eine gewisse Flexibilität zu bieten, stehen Probenelemente mit zwei unterschiedlichen Durchmessern des Befüllkanals zur Verfügung. Es muss bei der Befüllung mit Kapillaren jedoch berücksichtigt werden, dass die Temperaturmessung wegen der stark eingeschränkten Wärmeübertragung ins Kapillareninnere sehr ungenau ist. Das Probenelement 3 besitzt keinen Befüllkanal und eignet sich daher nicht zur Aufnahme von flüssigen Proben. Es bietet jedoch die größte Flexibilität bei festen oder pulverförmigen Proben.

Konstruktionszeichnungen zu den Bauteilen der Probenzelle sowie eine Belegung des Verbindungskabels zum Kühlthermostaten finden sich im Anhang A.3 .

#### 4.7.2 Hochdruckzelle

Eine detaillierte Darstellung des Aufbaus der Probenzelle ist in Abbildung 4.15 gegeben. Sie besteht aus einem massiven Metallblock <sup>21</sup>, in den sämtliche Öffnungen für die Probenaufnahme, Druckversorgung und Temperaturkontrolle eingefräst sind. Die Probenzelle ermöglicht Messungen sowohl unter atmosphärischem Druck als auch unter Hochdruck von bis zu 7 kbar und eine von der Druckversorgung unabhängige Temperaturregelung.

Im Druckbetrieb ermöglichen zwei flache Diamantfenster vom Typ IIa <sup>22</sup> von je 1 mm Dicke den Durchtritt des Röntgenstrahls und bieten gleichzeitig die erforderliche Stabilität, um dem Druck standzuhalten. Im zusammengebauten Zustand besteht zwischen den beiden, auf den Trägerstempeln befestigten Diamantfenstern ein Spalt von 2 mm Dicke, in den senkrecht zur Strahlrichtung der an einem Ende flache, vergoldete Probenträger mit 1.8 mm Dicke eingeschoben werden kann (Probenträgermaterial:

<sup>21</sup>Material: Inconel 718, Werkstoffnummer 2.4668

<sup>22</sup>Typ IIa ist ein reiner, stickstofffreier Naturdiamant. Lieferant *De Beers Industrial Diamonds (Element Six)*, ehemals *Drukker Intl.*

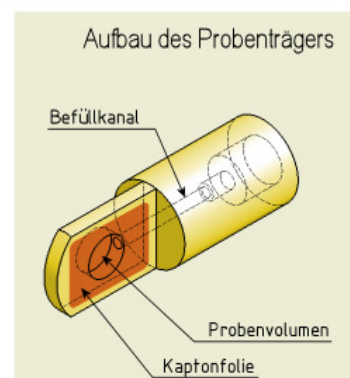
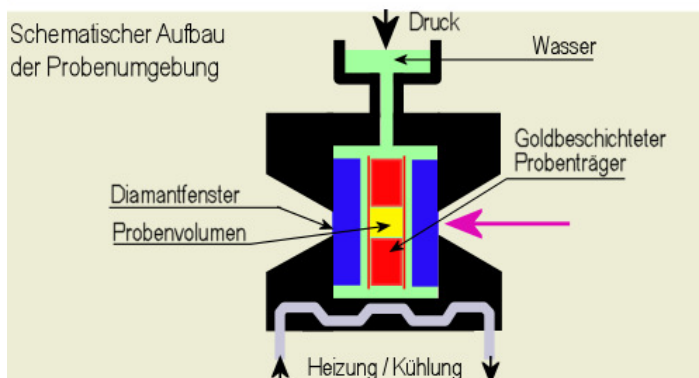
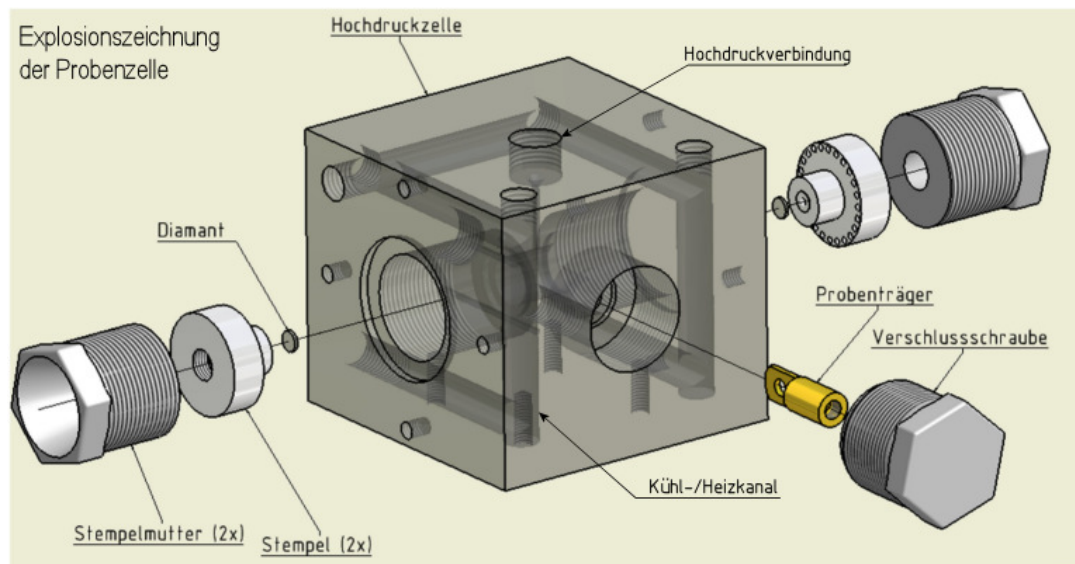
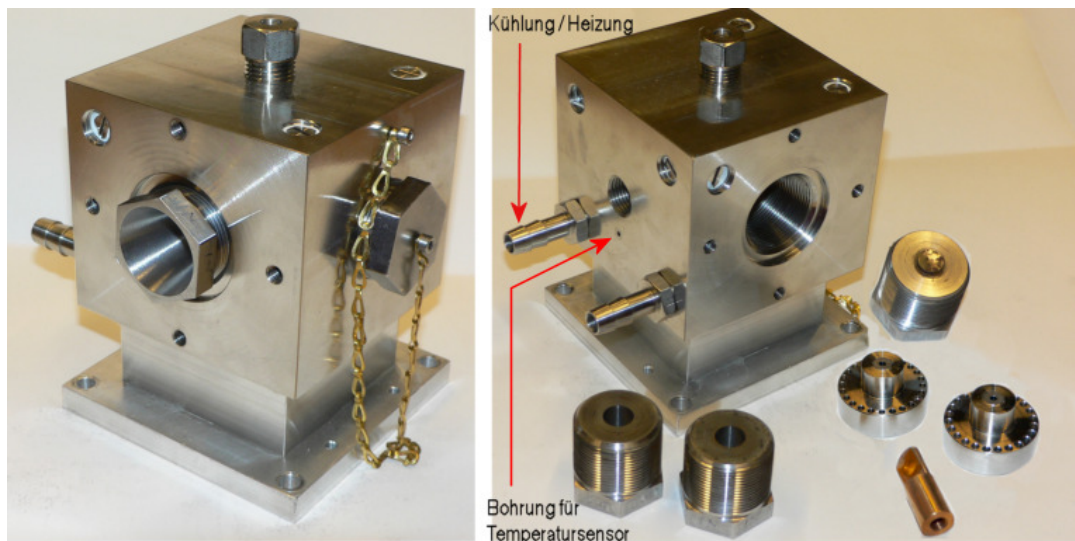


Abbildung 4.15: Aufbau, Zusammenbau und schematische Darstellung der Probenzelle für Temperatur- und Druckgeregelte SAXS Messungen.

Kupfer). Nach dem Verschließen der Probenbeladungsöffnung wird über eine der beiden Hochdruckverbindungen Wasser in die Zelle hineingepumpt und es umgibt den Probenträger mit dem darin eingeschlossenen Probenvolumen. Anschließend wird extern hydrostatischer Druck aufgebaut und die Probenflüssigkeit darüber unter Druck gesetzt. Die Messung des Drucks kann außerhalb der Probenzelle an jedem Ort des Leitungssystems erfolgen. Technische Details zu der Hochdruckzelle und all ihren Bauteilen finden sich im Anhang A.3 .

Die Transmission der (leeren) Probenzelle wird ausschließlich durch die der beiden Diamantfenster bestimmt, denn die Absorption der dünnen Kaptonfolien im Probenträger ( $25\ \mu\text{m}$ ) ist im relevanten Energiebereich vernachlässigbar klein. Die Transmission als Funktion der Energie im für SAXS-Experimente relevanten Bereich ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

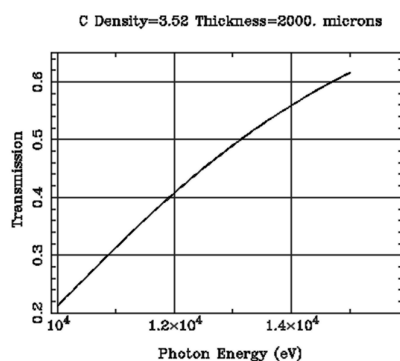


Abbildung 4.16: Transmission von 2mm Diamant (Dichte  $3.52\text{g}/\text{cm}^3$ ) als Funktion der Photonenenergie [CXRO].

Im Druckbetrieb liegt das Spaltmaß zwischen den Innenflächen der Diamantfenster und dem eingeschobenem Probenträger in der Größenordnung von jeweils nur  $100\ \mu\text{m}$ , wodurch parasitäre Streuung an dem druckübertragenden Medium (Wasser) minimiert wird. Dennoch ist der Spalt gerade groß genug, um den Probenträger einsetzen und wieder herausnehmen zu können, beides ohne die Diamantfenster entfernen zu müssen. Zur weiteren Reduktion von parasitärer Streuung, kann das Gehäuse der Probenzelle direkt an das Vakuum-Flightpath angeflanscht werden, wie in Abbildung 4.17 dargestellt.

Messungen unter Normaldruck können erfolgen, ohne dass Wasser in die Zelle hineingepumpt wird. Darüber hinaus können die stark absorbierenden Diamantfenster gegen dünne Kaptonfenster ersetzt werden, die auf separaten Stempeln aufgeklebt sind. In diesem Fall vergrößert sich der Spalt für die Aufnahme des Probenträgers von 2 mm auf 3 mm, entsprechend steht auch eine Probenträgervariante mit 2.8 mm Dicke zur Verfügung. Das in der folgenden Tabelle angegebene Gesamtprobenvolumen  $V$  setzt sich zusammen aus dem Volumen der Probenkammer und des Befüllkanals.

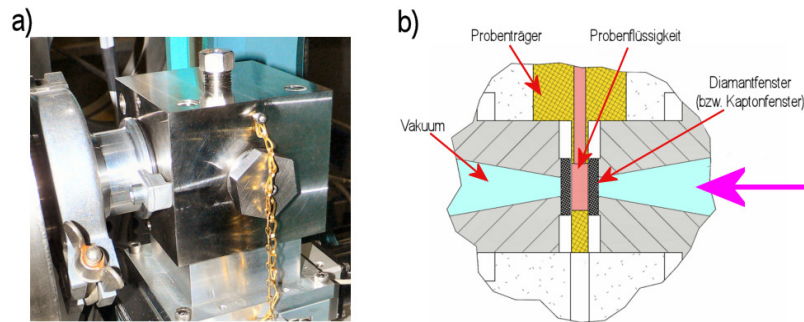
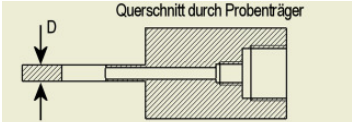


Abbildung 4.17: a) Die Druckzelle kann von beiden Seiten direkt an das Vakuumsystem angeflanscht werden. b) Im angeflanschten Zustand kann das gesamte Luftvolumen bis zu den beiden Diamantfenstern (bzw. Kaptonfenstern) evakuiert werden. Lediglich das Fenstermaterial und das Probenvolumen befinden sich dann noch im Strahlengang.

	$D$	$V$
Probenelement 1	1.8 mm	$55\mu\text{l}$
Probenelement 2	2.8 mm	$75\mu\text{l}$



Abmessungen und Volumina der Probenträger

Für die Temperaturregelung der Probe im Experiment ist der Probenzellenkörper mit einem weitläufigen Kühl-/Heizkanalsystem ausgestattet (Gesamtlänge ca. 50 cm), welches an den Kreislauf eines Kühlthermostaten angeschlossen werden kann und eine möglichst gleichmäßige Wärmeverteilung innerhalb des Probenzellenmaterials ermöglicht. Die Messung der Temperatur unmittelbar am Probenort ist technisch sehr schwierig umzusetzen, da für die Druckfestigkeit der Zelle ein geschlossenes System um die Probe herum unabdingbar ist. Daher besitzt der Probenzellenkörper an einer seiner Flächen eine Bohrung mit kleinem Durchmesser (2 mm), die knapp 9 mm entfernt vom eigentlichen Probenvolumen endet. Durch die massive Bauweise des Probenzellenkörpers kann angenommen werden, dass die Temperatur, die durch einen in diesen Kanal hineingeschobenen Temperatursensor gemessen wird, mit hoher Genauigkeit der am Probenort herrschenden entspricht.

Die Temperaturregelung ist unabhängig vom in der Zelle herrschenden Druck. Daher ermöglicht die Probenzelle prinzipiell auch temperaturgeregelte Messungen unter Normaldruck. Allerdings ist die Temperaturregelung bedingt durch die große Menge des das Probenvolumen umgebenden Metalls sehr träge. Für derartige Experimente empfiehlt sich daher die Verwendung der im vorigen Kapitel beschriebenen Probenzelle.

**Hochdruck-dichte Verschlüsse** Eine ideale Druckzelle hätte ein Probenvolumen, das in einem massiven Werkstück hineingearbeitet ist und der in dieser Zelle maximal erreichbare Druck wäre lediglich durch die Reissfestigkeit des das Probenvolumen

umgebenden Werkstoffs beschränkt. Für ein SAXS-Experiment im Energiebereich von 10k eV bis 15k eV sind jedoch zumindest zwei Fenster für den Durchtritt des Röntgenstrahls erforderlich. Es muss daher eine Verbindung zwischen zwei Materialien (also dem Probenzellenwerkstoff und dem Fenstermaterial Diamant) geschaffen werden, die bei den zu erreichenden hydrostatischen Drücken Dichtigkeit gewährleistet. Für Drücke bis etwa 40 kbar sind Diamant-Fenster des *Poulter*-Typs die geeignete Wahl [Sherman]. Dabei handelt es sich um eine selbstdichtende Verbindungsart, bei der der in der Zelle herrschende Druck die jeweils optisch glatten Oberflächen der Probenzelle und des Fenstermaterials aneinanderpresst.

Damit eine Verbindung zwischen zwei Grenzflächen einem Umgebungsdruck  $p$  standhält, muss der innerhalb der Kontaktfläche herrschende Druck höher sein als  $p$ . Der erforderliche, erhöhte Druck wird bei einem Fenster des *Poulter*-Typs dadurch erzielt, dass die Fläche, auf der der Druck lastet, größer ist als die das Fenster unterstützende Fläche. Die (kreisförmige) Apertur des Fensters bildet die Differenz.

Neben der möglichst glatten Grenzfläche ist die Bruchsicherheit des Fensters ein weiteres, entscheidendes Kriterium für die Dichtigkeit eines Fensters des *Poulter*-Typs. In diesem Zusammenhang besitzt die Form der unterstützenden Oberfläche einen besonderen Stellenwert. Wie in Abbildung 4.18 gezeigt, wirken auf den Rand eines Fensters, das auf einer glatten Fläche lastet, starke Kompressionskräfte, bedingt durch das Einsinken des Fensters in das unterstützende Material unter hohem Druck. Gleichzeitig wirken entlang der scharfen Kante der Aperturöffnung lokal hohe Drücke auf die Fläche des Fensters. Diese Einflüsse können leicht zu einem Bruch des Fensters führen.

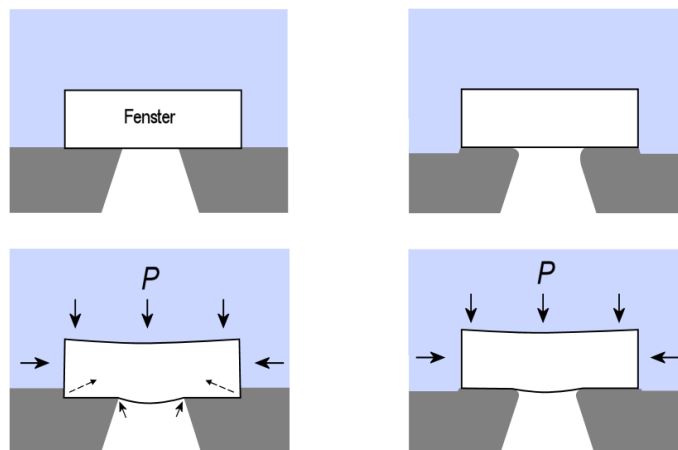


Abbildung 4.18: Links: Poulter-Typ Fenster auf ebenem Untergrund mit scharfen Aperturkanten und die bei hohem Umgebungsdruck entstehenden Kräfte auf das Fenstermaterial. Rechts: Erhabene Unterstüztungsfläche und abgerundete Kanten der Aperturöffnung reduzieren die Belastung des Fensters. Nach [Sherman].

Um das Einsinken in das unterstützende Material zu verhindern und die Gefahr des Fensterbruchs zu minimieren, ist in der Hochdruckzelle die geläppte unterstützende

Fläche der Diamantfensterträger (Stempel, siehe Abbildung 4.15) um 0.2 mm gegen die umgebende Fläche erhaben, und die Innenränder der Aperturöffnungen sind mit einem Radius von 0.5 mm abgerundet.

Eine dichte Verbindung der Stempel zum Probenzellenkörper wird wiederum mittels O-Ringen und des Anpressdrucks der Stempelmutter (siehe Abbildung 4.15) erzielt. Um die Dichtigkeit der Fenster auch bei geringen Drücken zu gewährleisten - wenn also der Anpressdruck des Fensters noch nicht ausreicht, um die Unebenheiten in den Grenzflächen auszugleichen und/oder das Fenster in Position zu halten - wird das Fenster auf die es unterstützende Fläche mit einer dünnen Schicht Epoxidharzkleber befestigt <sup>23</sup>.

**Kossel-Effekt** Es zeigt sich, dass die im Röntgenstrahl platzierten Diamantfenster unter Umständen im Detektorbild eine Vielzahl von hellen und dunklen Linien generieren können, die sehr stark an die Orientierung der Diamantfenster in Bezug auf die Strahlrichtung gekoppelt sind. Es handelt sich dabei um Parabeln oder Hyperbeln, also Schnittkurven der Detektorfläche mit Kegelflächen, deren Ursprung stets am Ort der Probe liegt. Diese sogenannten pseudo-*Kossel*-Linien entstehen durch Reflektionen von stark divergenten Wellenfeldern an Netzebenen des Diamantkristalls <sup>24</sup>.

Wie in Abbildung 4.19 a) schematisch dargestellt, wird auf der Oberfläche des Kristalls vom einfallenden Röntgenstrahl an der Stelle  $S$  eine Kugelwelle angeregt. In der willkürlichen Ausbreitungsrichtung  $SQ$  erfährt die Welle lediglich Absorption, am Ort  $Q$  registriert der Detektor daher eine diffus gestreute Welle. Wellenzüge der Richtung  $SP$ , die die Braggbedingung  $\lambda = 2d \sin \theta$  zur Netzebene  $H$  (Netzebenenabstand  $d$ ) erfüllen, werden jedoch zum Teil in Richtung  $PR$  reflektiert. Die reflektierten Photonen fehlen in der Richtung  $SP$  und in der Detektorebene kann an der Stelle  $P$  eine lokal erniedrigte Intensität gemessen werden. Im dreidimensionalen Bild bildet die Gesamtheit aller möglichen Strecken  $SP$  die Fläche eines Kegels mit dem Öffnungswinkel  $\pi - \theta$  und die Schnittkurve mit der Detektorfläche entspricht einer dunklen Linie im Detektorbild.

Die Kugelwelle trifft jedoch auch auf eine zweite, parallele Netzebene  $H'$ . Die an dieser Netzebene gestreuten Wellenzüge können den Detektor erreichen und an der Stelle  $P'$  wird eine erhöhte Intensität gemessen. An den Stellen, an denen der Kegel aus der Gesamtheit der Strecken  $H'P'$  die Detektorebene schneidet, findet man im Detektorbild eine helle Linie.

Bei kleinen Winkeln  $\theta$  fallen die Richtungen  $SP$  und  $SH'$  mit denen der Wellenzüge des leicht divergenten, einfallenden Strahls zusammen und die Reflexe werden sehr intensiv. Bei ungünstigen Einfallswinkeln des Röntgenstrahls auf die Oberfläche des

---

<sup>23</sup>Durch die Druck- und Hitzebelastung im Hochdruckexperiment wird die Klebeverbindung zunehmend rissig und es entstehen Leckagen, die letztlich zum Druckverlust führen. Um diese zu vermeiden, empfiehlt sich eine Erneuerung der Klebeverbindung in regelmäßigen Abständen.

<sup>24</sup>Der *Kossel*-Effekt tritt auf, wenn die innerhalb eines Kristalls entstehende Röntgenstrahlung an den Netzebenen reflektiert wird [Kossel] [Cowley]. Hier liegt die Quelle zwar nicht innerhalb des Kristalls sondern in unmittelbarer Nähe, das Entstehungsprinzip ist jedoch das selbe.

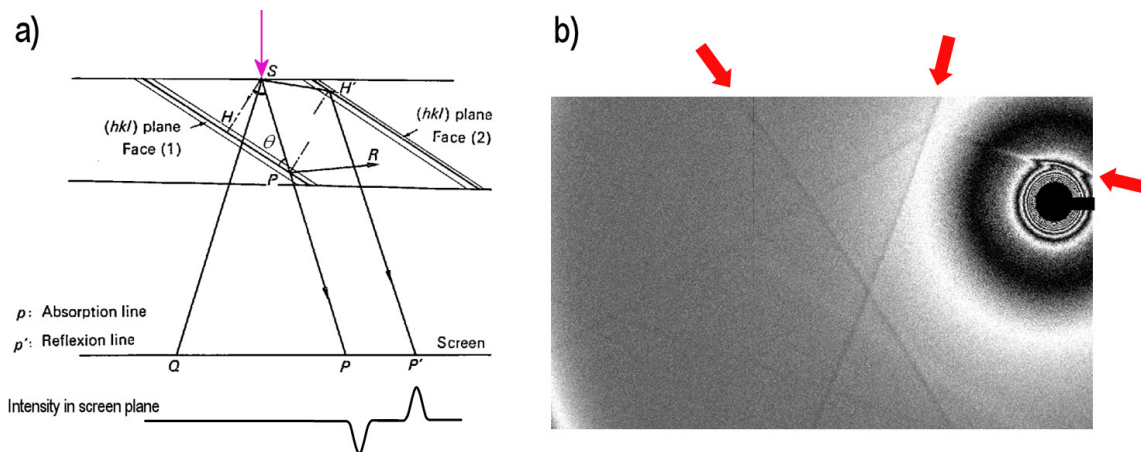


Abbildung 4.19: a) Schematische Darstellung der Entstehung der pseudo-Kossel-Linien (Beschreibung siehe Text), modifiziert aus [Tixier]. b) Pseudo-Kossel-Linien im Detektorbild eines SAXS-Experiments.

Kristalls kann es daher zu starken Reflexen unter kleinen Winkeln zum einfallenden Strahl, also in der Nähe des Beamstops kommen. In Abbildung 4.19 b) sind in einem realen Detektorbild einige *Kossel*-Linien gekennzeichnet, darunter ein intensiver Reflex oberhalb des Beamstops.

Beim Einbau der Diamantfenster in die Probenzelle und deren anschließender Einjustierung in den Strahl muss die Gefahr der intensiven *Kossel*-Reflexe stets berücksichtigt werden. Da die *Kossel*-Reflexe starr an die Orientierung der Diamanten gekoppelt sind, muss bei starken Reflexen eine Änderung der Orientierung erfolgen und anschließend die (günstige) Orientierung beibehalten werden können. Zu diesem Zweck besitzen die Diamantfensterträger (Stempel) eine Anordnung aus Öffnungen, in die im eingebauten Zustand Bolzen im Probenzellenkörper hineinragen und welche die in  $15^\circ$  Schritten wählbare Orientierung fixieren. Feinere Schrittweiten können mit Hilfe der Rotations-Freiheitsgrade des Diffraktometers realisiert werden.

## 4.8 Der Beamstop

Der Beamstop (zu deutsch: Strahlfänger) absorbiert den durch die Probe transmittierten Teil des intensiven Synchrotronstrahls vor Erreichen des Detektors und schützt letzteren so vor einer Sättigung und Beschädigung. Der Beamstop sollte so positioniert werden, dass der transmittierte Strahl unmittelbar nach dem Verlassen des Helium- bzw. Vakuum-Flightpaths absorbiert wird, so dass in dem Luftspalt hinter dem Austrittsfenster und damit unmittelbar vor dem Detektor keine Luftstreuung entstehen kann.

Neben der Luftstreuung ist das Folienmaterial des Austrittsfensters eine weitere Quelle von unerwünschter Streuung. Falls der Beamstop nicht unmittelbar gegen



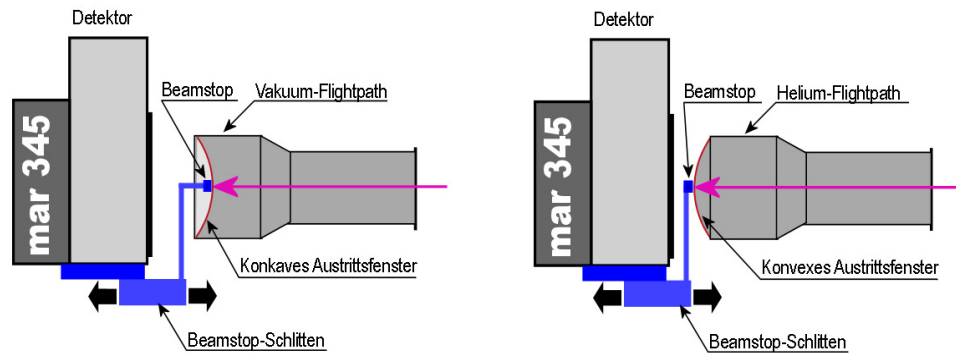


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der verschiedenen Anforderungen an die Bauform des Beamstops im Vakuum- (links) und im Heliumbetrieb (rechts).

das Austrittsfenster gedrückt wird, wird die von der Folie ausgehende Weitwinkel-Streuung (*Wide Angle X-Ray Scattering*, WAXS) nicht vollständig vom Beamstop abgeschattet. Neben des intensiven WAXS-Streumusters wird dann eine charakteristische Doppelschatten-Struktur im Detektorbild sichtbar, wie in Abbildung 4.21 gezeigt.

Bedingt durch die unterschiedliche Geometrie des Austrittsfensters je nach Betriebsmodus (konvex bei Helium- und konkav bei Vakuumbetrieb) sind die Anforderungen an die Bauform des Beamstops unterschiedlich (siehe Abbildung 4.20). Dies hat zu der Entwicklung zweier Beamstop-Halter geführt, jeweils ein eigener für den Helium- und den Vakuumbetrieb. Der eigentliche Beamstop ist in beiden Fällen eine aus Blei gefertigte Scheibe mit einem Durchmesser von mindestens 8 mm. Ein kleinerer Beamstop kann mit den derzeitigen Fokussierungseigenschaften der Beamline nicht verwendet werden. Die dem Strahl zugewandte Seite der Beamstop-Scheibe besitzt einen erhöhten Rand, der verhindert, dass die an der Beamstop-Oberfläche entstehende Streuung in die Richtung des Detektors abstrahlen kann. Der Beamstop wird über den jeweiligen Beamstop-Halter an einer Fortführung der den Detektor tragenden Konstruktion befestigt und kann so mit Hilfe der Detektorfreiheitsgrade (siehe nächstes Kapitel) relativ zum Strahl positioniert werden.

Im Helium-Betrieb ist durch den Helium-Überdruck das nach außen gewölbte (konvexe) Austrittsfenster leicht zugänglich. Der Beamstop kann dann auf einem Kapton-Streifen (Dicke  $25 \mu\text{m}$ ) aufgeklebt werden, der wiederum in einem U-förmigen Klemmrahmen eingespannt ist (siehe Abbildung 4.22). Da die Breite des Klemmrahmens größer ist als der Durchmesser der aktiven Detektorfläche und die dünne Kapton-Folie praktisch keine Absorption verursacht, ermöglicht der vor dem Detektor befestigte Beamstop-Halter eine Platzierung des Beamstops ohne zusätzliche Abschattungseffekte, und der Beamstop kann ohne Schwierigkeiten so positioniert werden, dass er leicht gegen das nach außen gewölbte Austrittsfenster (an der Stelle des Strahldurchtritts) gedrückt wird. Da der auf der Folie befestigte Beamstop nicht starr an den Träger gekoppelt ist, bietet er eine gewisse Flexibilität in Bezug auf die Veränderung der Aus-

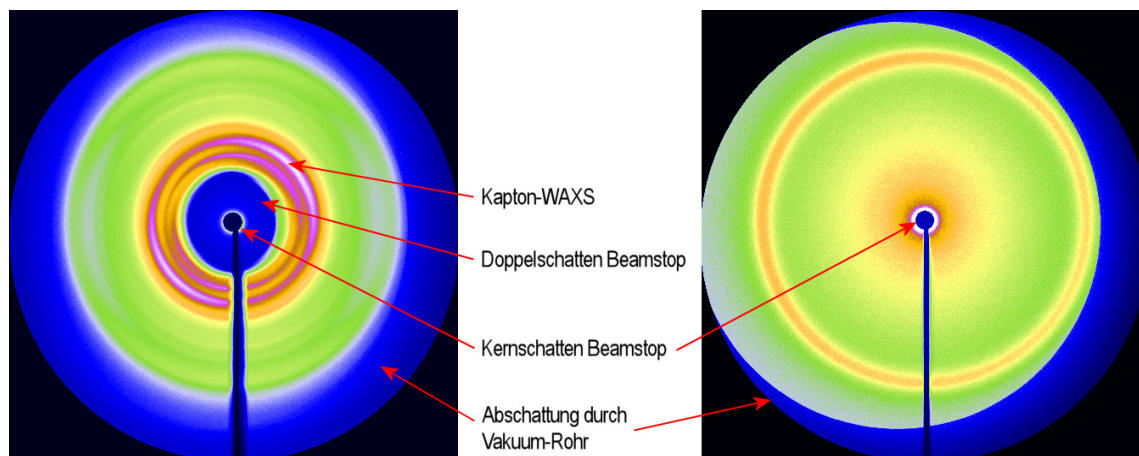


Abbildung 4.21: Links: Wegen eines Spaltes zwischen Beamstop und Austrittsfenster verursacht die WAXS-Streuung des Fenstermaterials ein starkes, im Detektor sichtbares Streubild. Deutlich ist die Doppelstruktur des Beamstoppschattens zu erkennen. Rechts: Beamstop ist spaltfrei am Austrittsfenster platziert. Es ist nur noch der Kernschatten zu erkennen sowie ein äußerer Ring, der durch die Kaptonfolien des Probenträgers verursacht wird.

trittsfensterwölbung (z.B. wegen Druckänderung).

Im Vakuum-Betrieb ist - bedingt durch die ca. 3 cm in das Innere des Flightpaths gewölbte Kaptonfolie - die oben beschriebene Konstruktion nicht anwendbar. Der Beamstop ist in diesem Fall auf einem starren L-förmigen Ausleger befestigt (siehe Abbildung 4.22), der weit genug in das Innere des Flightpath-Rohres hineinragt um den Beamstop zum Kontakt mit dem Austrittsfenster zu bringen. Im Falle eines ungewollten Gaseinbruchs in das Vakuumsystem würde die sich entspannende Austrittsfensterfolie jedoch einen in dieser Position fixierten, starren Beamstop-Ausleger beschädigen oder durch die punktuelle Krafteinwirkung des gegen sie drückenden Beamstops selbst beschädigt werden. Um das zu verhindern, ist der Beamstop-Ausleger nicht starr mit der den Detektor tragenden Konstruktion verbunden, sondern auf einem Präzisionsschlitten befestigt, der eine Bewegung parallel zur Strahlrichtung über eine Länge von 30 mm ermöglicht und der senkrecht zur Bewegungsrichtung spielfrei ist (da beide Beamstop-Träger die selben Befestigungsbohrungen besitzen, kann prinzipiell auch der Helium-Beamstop ohne jeden Nachteil auf dem Schlitten befestigt werden).

Für Zwecke der Aufzeichnung des Normierungssignals  $I_{tr}$  besitzt der Vakuum-Beamstop zugleich die Funktion eines Detektors für die durch ihn absorbierte Strahlung. Zu diesem Zweck wurde innerhalb des Beamstops eine Röntgendiode<sup>25</sup> eingebaut, welche einen zur Intensität proportionalen Strom liefert. Die Diode ist empfindlich auf Röntgenstrahlung im Energiebereich von 10 eV bis 10 keV, prinzipiell aber auch auf

<sup>25</sup>Röntgendiode XUV-005 von *OSI Optoelectronics*, beziehbar über *AMS Technologies, Martinsried*. Vor dem Einbau in den Beamstop wurde das Diodengehäuse (Durchmesser 9.1 mm) mechanisch bearbeitet, um dessen maximale Ausdehnung auf unter 8 mm zu verkleinern.

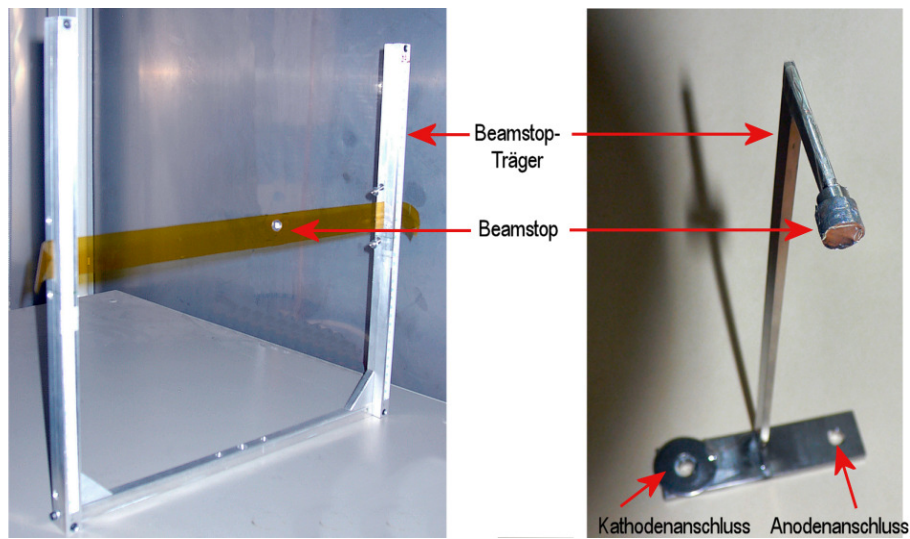


Abbildung 4.22: Links: Beamstop auf Kaptonfolie, eingespannt in U-förmiger Klemme (Beamstop für Heliumbetrieb) Rechts: Beamstop auf L-förmigem Ausleger (Beamstop für Vakuumbetrieb). Die Anschlüsse für die Röntgenodiode können am Befestigungsfuss abgegriffen werden. Der Anodenanschluss geschieht über den leitenden Beamstophalter.

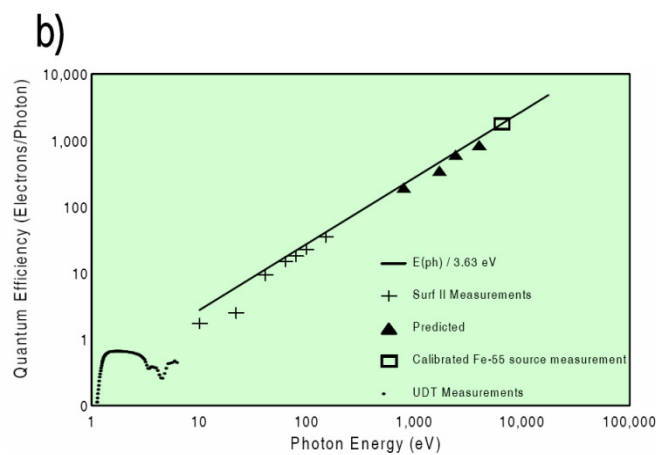
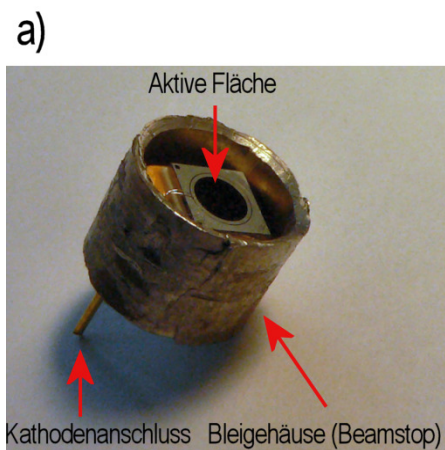


Abbildung 4.23: a) Aktiver Beamstop mit eingebauter Röntgenodiode (im noch nicht verschlossenen Zustand). Der Anodenanschluss kann direkt am Bleigehäuse erfolgen. b) Quanteneffizienz der verwendeten Röntgenodiode als Funktion der Photonenergie (entnommen aus der technischen Dokumentation, *OSI Optoelectronics*)

sichtbares Licht und befindet sich im eingebauten Zustand daher hinter einer dünnen Abdeckung aus Aluminiumfolie. Die Steuerung und Auslese des Diodenstroms erfolgt über einen Stromverstärker und einen Spannungs-Frequenzwandler. Die aktive Fläche der Diode hat einen Durchmesser von 2.6 mm, sie ist also deutlich kleiner als der sie einschließende Bleikörper (Durchmesser 9 mm). Eine vergrößerte Abbildung des Beamstops mit der darin eingebauten Röntgendiode sowie die Quanteneffizienz als Funktion der Photonenergie sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

## 4.9 Das Detektorsystem

Wie bereits zu Beginn des Kapitels 4 angedeutet, wurde im Rahmen der Umbaumaßnahmen der Beamline BL9 im Jahr 2005 die Experimentierhütte zweigeteilt, um Raum für die Experimentierhütte der Beamline BL8 zu schaffen. Im Zuge dieser Arbeiten wurde die Fläche hinter dem Diffraktometer auf das notwendigste beschränkt: In der waagerechten Stellung des  $2\theta$ -Armes verbleiben nur wenige Zentimeter bis zur Trennwand.

Für SAXS-Experimente an Proteinlösungen ist die Verwendung eines 2-dimensional-ortsauflösenden Detektors unumgänglich. Eine Positionierung der Probe im Diffraktometer ist sehr vorteilhaft, allerdings kann selbiges nicht innerhalb der Experimentierhütte verfahren. Es musste daher ein Aufbau realisiert werden, der den zu verwendenden 2D-Detektor dennoch im Raum hinter dem Diffraktometer positionieren kann, ihn mit den erforderlichen translatorischen Freiheitsgraden versieht und zugleich die Möglichkeit bietet, ihn vollständig aus dem Schwenkbereich des Diffraktometers wieder zu entfernen. Das Auslegersystem, aufgebaut aus mehreren Linearführungsschienen und Linearantrieben<sup>26</sup> konnte diesen Anforderungen gerecht werden. Abbildung 4.24 veranschaulicht, wie das Auslegersystem den auf dem roten Podest zu fixierenden 2D-Detektor innerhalb des Einflussbereichs des Diffraktometers positionieren kann.

Die durch gelbe Pfeile gekennzeichneten Freiheitsgrade entsprechen Linearantrieben, welche mittels Schrittmotoren über die Beamline-Software gesteuert werden können. Rote Pfeile entsprechen manuell zu bedienenden Linearführungsschienen, die ein einfaches Herausschieben des Detektorauslegers aus dem Einflussbereich des Diffraktometers ermöglichen. Auf dem untersten Schienenpaar angebrachte Wellensperren sowie ein auf der untersten Ebene des Diffraktometers angebrachter Stopper gewährleisten eine genügend genau reproduzierbare, manuelle Positionierung des Auslegers in  $x/z$ -Richtung vor der weiteren Positionierung mittels der Linearantriebe. Die Linearführungsschienen sind nach Maßgabe des Herstellers spielfrei.

Bei den drei übereinander montierten Linearantrieben handelt es sich um Kugelgewindevorschübe mit einem Vortrieb von 2.5 mm je Antriebswellenumdrehung. Die Verfahrwege der Linearantriebe sind 440 mm für die  $x$ - und  $y$ -Richtung und 725 mm für die  $z$ -Richtung und beidseits durch Endschalter gesichert. Der Antrieb erfolgt mittels

---

<sup>26</sup>Hersteller der Linearführungsschienen und Kugelgewindevorschübe ist die *iselautomation KG, Eichenzell*.

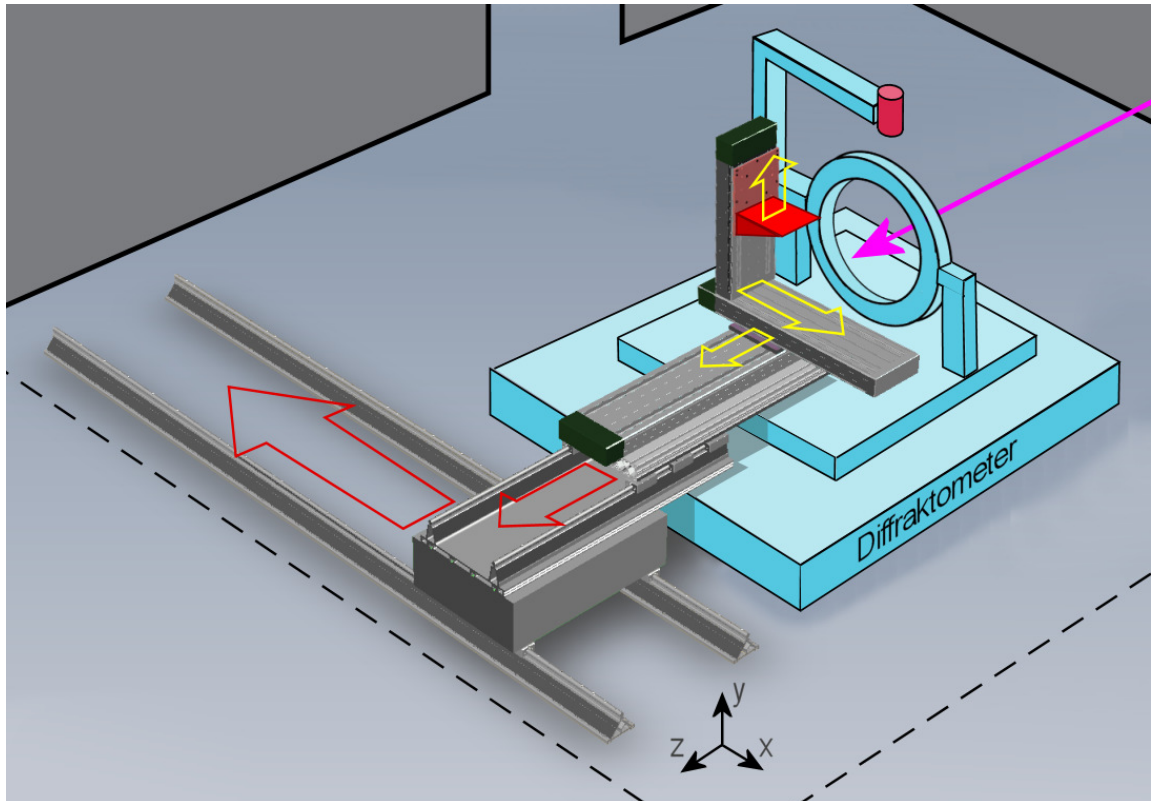


Abbildung 4.24: Schematische Darstellung des in das Diffraktometer hineingefahrenen Positionierungs-Auslegers für den 2D-Detektor, relativ zum Grundriss der Experimentierhütte der BL9 (Diffraktometer nicht maßstabsgerecht). Elektrisch getriebene Linearantriebe sind durch gelbe Pfeile gekennzeichnet, manuell verschiebbare Linearführungen durch rote.

Zweiphasen-Schrittmotoren <sup>27</sup>, für die x- und z-Richtungen direkt, für die y-Richtung 8fach untersetzt <sup>28</sup>. Aus dem Vortrieb der Kugelgewindenvorschübe folgt im 1/20-Schrittbetrieb der Schrittmotoren über die verwendeten Sincos-Endstufen für die Linearantriebe der x- und z-Richtungen eine Genauigkeit von  $< 1 \mu\text{m}$ , für die y-Richtung sogar  $< 0.1 \mu\text{m}$ . Da der Kugelgewindenvorschub nicht selbsthemmend ist, und Schrittmotoren im stromlosen Zustand nur ein geringes Hemmdrehmoment besitzen, erfordert der vertikal aufgestellte Linearantrieb für die y-Richtung eine Antriebswellenbremse, die im stromlosen Zustand geschlossen ist. Die Bremse <sup>29</sup> ist über eine Ansterelektronik an die zugehörige Sincos-Endstufe gekoppelt. Die Ansterelektronik ist im zugehörigen Endstufengehäuse eingebaut und versorgt die Bremse einerseits mit der Betriebsspan-

<sup>27</sup>Schrittmotoren **ZSS 52.200.2,5** von *Phytron Elektronik GmbH, Gröbenzell*. 200 Schritte, maximaler Strom pro Phase  $I_{\text{Max}} = 2.5 \text{ A}$ , Drehmoment  $N_{\text{Max}} \simeq 0.3 \text{ N m}$  bei 1 kHz im bipolaren Halbschrittbetrieb (entspricht 2.5 Umdrehungen/Sekunde).

<sup>28</sup>Planetenge triebe **PLG 52/8** von *Phytron Elektronik, Gröbenzell*.

<sup>29</sup>Motorbremse **KEB02** von *Phytron Elektronik, Gröbenzell*. Hemm-Drehmoment  $N_{\text{Max}} = 0.75 \text{ N m}$ .

nung, andererseits synchronisiert sie die Bremse mit dem Schrittmotorbetrieb. Sobald der Linearantrieb aktiviert wird, öffnet die Bremse mit der Flanke des ersten Spannungspulses und schließt wieder nach dem letzten Spannungspuls. Eine elektronische Schaltung und weitere Details zur Ansteuerung der Bremse sind im Anhang zu finden.

Durch elastische Biegung erfährt der Ausleger mit angebautem Detektor eine vertikale Auslenkung von etwa 0.7 mm bei einer um 1 m ausgefahrenen Detektorposition, relativ zum vollständig eingefahrenen Zustand (also sowohl über Linearantriebe als auch manuelle Verschiebung). Die Detektorfläche erfährt dann im Vergleich zum eingefahrenen Zustand eine Verkipfung von etwa  $0.4^\circ$ . Sowohl die horizontale Auslenkung als auch die Verkipfung verhalten sich in etwa linear zur Detektorposition. Technische Zeichnungen, genaue Details zu den Typenbezeichnungen und Spezifikationen der verwendeten Baugruppen finden sich im Anhang.

Das verwendete 2-dimensional ortsauflösende Detektorsystem ist ein Image-Plate-Detektor des Typs *MAR345* mit einer kreisförmigen aktiven Fläche (Durchmesser 345 mm). Für die Auflösung des Detektors kann softwareseitig zwischen  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  und  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  gewählt werden, und die Übertragung der Daten erfolgt über eine Standard 10/100 Mbit Ethernet Netzwerkverbindung [Marresearch]. Das intrinsische Rauschen des Detektorsystems ist im Vergleich zu CCD-Detektoren sehr gering und liegt bei  $(5 + 0.001/\text{s}) \text{Counts}/\text{Pixel}$  [Vainio], die Effizienz (*Detective Quantum Efficiency*) liegt fast bei 100% für Photonenenergien unterhalb von 20 keV [Thoms]. Die Sättigung des Detektors ist erreicht bei 131000 *Counts/Pixel* und folgt aus der Datentiefe der Ausleseelektronik von 17bit. Wesentlich höhere Belichtungsdichten von  $10^{10}$  Photonen/ $\text{mm}^2$  und mehr müssen unbedingt vermieden werden, da sie zu langfristigen bis hin zu irreversiblen Beschädigung des Detektors führen können. Bei einem Image-Plate-Detektor handelt es sich um einen Offline-Scanner, d.h. die Auslese der metastabilen Belichtung der photoaktiven Platte (Funktionsprinzip siehe z.B. [Rigaku] [Thoms]) geschieht erst nach der Belichtungszeit, gefolgt von einem zusätzlichen Löschzyklus.

Die mit der Zeit fortschreitende Abnahme der Intensität der Aufzeichnung bezeichnet man als *Fading*. Die Abnahme folgt in etwa einem Zerfallsgesetz mit einer Halbwertszeit von etwa 100 h [Amemiya]. Bei Belichtungszeiten von einer Stunde und mehr muss daher der bereits im Prozentbereich liegende Abfall der aufgezeichneten Intensität berücksichtigt werden.

## 5 Weitere Strahlungsquellen

Die im Rahmen dieser Arbeit getätigten Messungen wurden nicht nur an der Beamline BL9 des DELTA sondern auch an zwei weiteren Synchrotron- und an einer Laborquelle durchgeführt. Dies einerseits, um Referenzdaten zu den am SAXS-Setup der BL9 im Zuge seiner Entstehung gemessenen Daten zu erhalten. Darüber hinaus ermöglichte die Nutzung der Synchrotronquelle APS - bedingt durch den viel höheren Fluss und die daraus folgende kürzere Belichtungszeit pro Messung - Hochdruck-Experimente mit deutlich gesteigertem Probendurchsatz. Im Folgenden werden die drei externen Quellen kurz vorgestellt.

### 5.1 Die SAXS Laborquelle (Universität Helsinki)

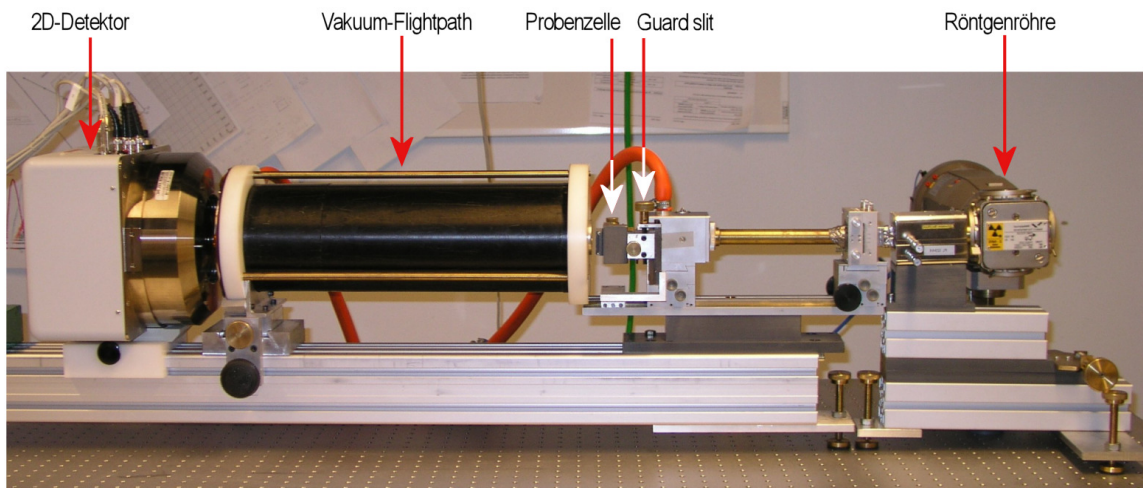


Abbildung 5.1: SAXS-Setup mit Laborröntgenquelle am physikalischen Institut der Universität Helsinki, Finnland.

Das physikalische Institut der Universität Helsinki besitzt ein SAXS-Setup für flüssige Proben mit einer kommerziellen Laborröntgenquelle, an der im August 2006 Messungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Es verwendet eine *PANalytical Fine Focus* Röntgenröhre mit einer Kupfer-Anode und einer *Montel* 2-dimensional kollimierenden, parabolischen, monochromatisierenden Optik (Göbelspiegel). Der Abstand zwischen Anode und Probenposition beträgt 53 cm, zwischen Probenposition und dem Detektor 49.8 cm. Der Detektor ist ein *Bruker AXS Histar* 2-dimensional auflösender Vieldrahtproportionalzähler (Gasdetektor) mit einer räumlichen Auflösung von 200  $\mu\text{m}$ . Ein Vakuumflightpath deckt die Strahlstrecke zwischen Anode und Detektoreintrittsfenster ab. Das Normierungssignal  $I_{\text{Tr}}$  wird mittels eines semitransparenten Beamstops gemessen, d.h. ein geringer Teil des direkten Strahls wird durch den Beamstop transmittiert und vom 2D-Detektor erfasst. Die Photonenergie beträgt 8.05keV

(Cu  $K\alpha$ -Fluoreszenz) und der Photonenfluss am Ort der Probe liegt bei  $1.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Die flüssige Probe mit einer Dicke von 1 mm wurde in einen durch zwei Kaptonfenster begrenzten Metallträger eingefüllt. Abbildung 5.1 zeigt eine Aufnahme des gesamten Setups.

## 5.2 Die BioCAT Beamline an der Advanced Photon Source APS

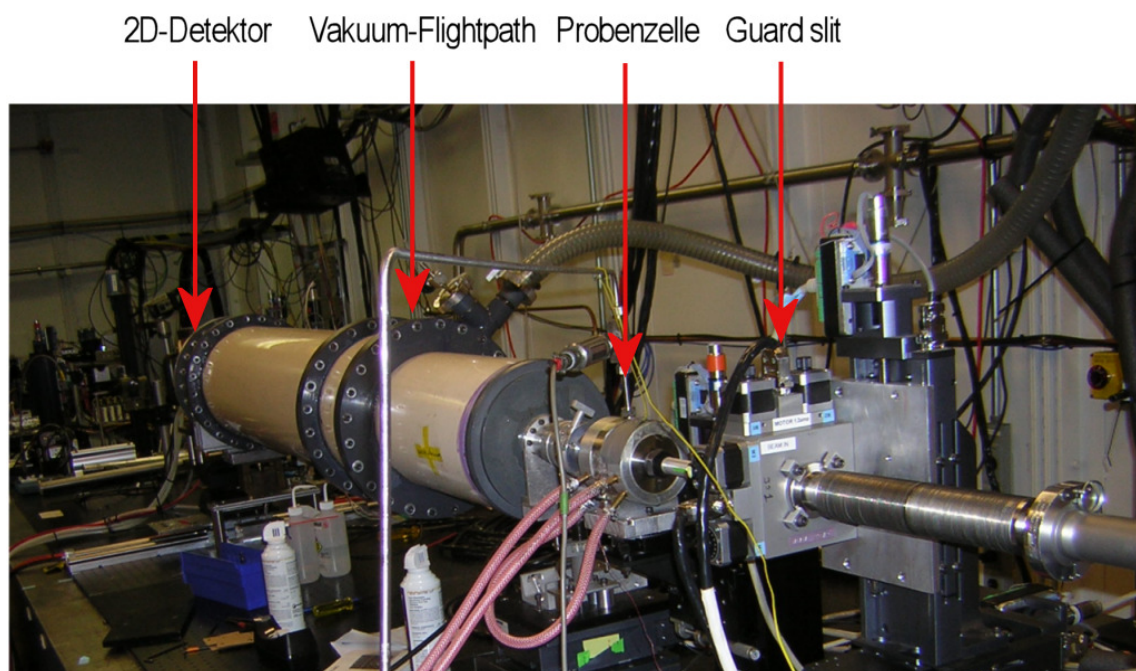


Abbildung 5.2: SAXS-Setup der Beamline 18 ID (BioCAT) an der APS, USA.

Die Beamline 18 ID (BioCAT) der *Advanced Photon Source (APS)*, Argonne, USA ist eine Undulator-Beamline, die speziell für biologische Probensysteme konzipiert wurde. Undulatorquellen zeichnen sich durch einen besonders hohen Photonenfluss, der an der 18 ID am Ort der Probe in der Größenordnung von  $2.2 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$  bei 10keV liegt. Der Strahl kann am Ort des Detektors auf eine Größe von  $35 \mu\text{m} \times 135 \mu\text{m}$  fokussiert werden [Fischetti].

Der Abstand zwischen Undulatorquelle und Probenposition beträgt 63 m, zwischen Probenposition und dem Detektor 1.9 m. Der verwendete Detektor ist eine *Aviex* CCD-Kamera mit einer räumlichen Auflösung von  $79 \mu\text{m}$ . Zur Unterdrückung von parasitärer Gasstreuung ist ein evakuierter Flightpath im Einsatz, innerhalb dessen das Normierungssignal  $I_{\text{Tr}}$  mittels eines mit einer Röntgendiode ausgestatteten Beamstops gemessen wird. Das Experiment wurde bei einer Photonenergie von 12keV durchgeführt und fand im Juli 2006 statt. Es wurde eine ältere Version der Hochdruckzelle verwendet,



bei der die Orientierung der Diamantfenster nicht fixierbar war und bei der die flüssige Probe in einen Kunststoffspacer eingefüllt und anschließend durch zwei aufgeklebte Kaptonfenster abgegrenzt wurde. Die so präparierten Proben hatten eine Dicke von etwa 0.8 mm. Abbildung 5.2 zeigt eine Aufnahme des gesamten Setups.

### 5.3 Die BW4 Beamline am Hamburger HASYLAB

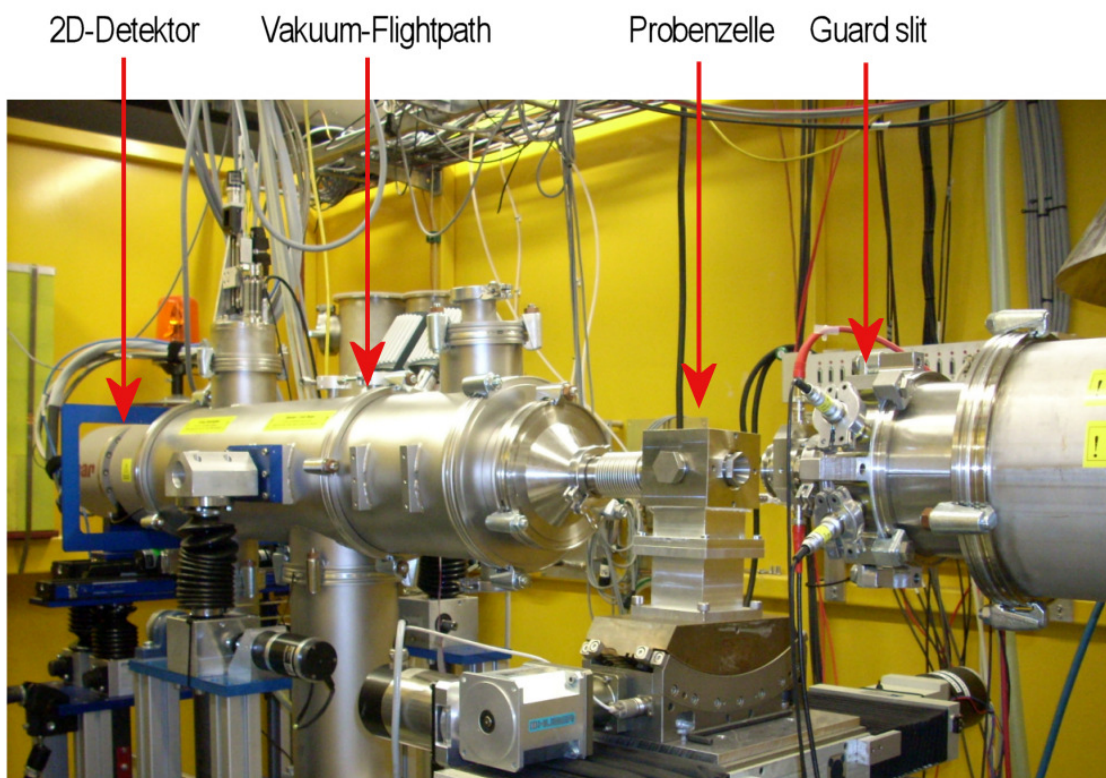


Abbildung 5.3: SAXS-Setup an der Beamline BW4 des HASYLAB.

Die Beamline BW4 des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HasyLab) ist eigentlich eine Beamline für USAXS-Experimente (Ultra Small Angle Xray Scattering), also für SAXS-Messungen unter besonders kleinen Winkeln. Hierzu ermöglicht sie einen besonders großen Abstand zwischen Probe und Detektor von maximal 13 m, kürzere Abstände sind jedoch prinzipiell auch realisierbar. Die Beamline BW4 ist an einer Wigglerquelle angeschlossen, am Ort der Probe wurde der Photonenfluss mit  $10^{11} \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Der Strahl wird am Ort des Detektors auf eine Größe von typischerweise  $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$  fokussiert [Roth]. Der Abstand zwischen Undulatorquelle und Probenposition beträgt 63 m, im August 2007 wurden bei einem Probe-Detektor-Abstand von 1.1 m und bei einer Photonenenergie von 8.9 keV Hochdruck-SAXS Messungen mit der neu entwickelten Hochdruckzelle durchgeführt. Der verwendete Detektor ist

eine *marCCD165* CCD-Kamera mit einer räumlichen Auflösung von  $79\ \mu\text{m}$ . Zur Unterdrückung von parasitärer Gasstreuung ist ein evakuierter Flightpath im Einsatz, und das Normierungssignal  $I_{\text{T}}$  wird mittels eines innerhalb des Vakuumflightpaths installierten und mit einer Röntgendiode ausgestatteten Beamstops gemessen. Die verwendete Hochdruckzelle ist im Kapitel 4.7.2 beschrieben, die Dicke der flüssigen Probe betrug damit 1.8 mm. Abbildung 5.3 zeigt eine Aufnahme des gesamten Setups.

## 6 SAXS an Proteinsystemen

Im Folgenden werden Messungen vorgestellt, die sowohl mit Hilfe des im Zuge dieser Arbeit entstandenen Aufbaus als auch an externen Quellen (APS, Hasylab, Helsinki) gemessen worden sind. Prinzipiell wurde vor der eigentlichen Datennahme in jedem Experiment eine oder mehrere Kalibrationsmessungen durchgeführt, die der Bestimmung der Geometrie des Aufbaus dienen sowie der Überprüfung des im Experiment nutzbaren  $q$ -Bereichs.

Es wurden SAXS-Messungen an wässrigen Lösungen der bereits vorgestellten Proteine (Lysozym, Insulin, Staphylokokken Nuclease) durchgeführt. Bei allen drei Proteinen erfolgte zunächst über die Messung des Formfaktors eine geometrische Charakterisierung der Konformation des Proteins in Lösung. Messungen an Lösungen mit erhöhten Proteinkonzentrationen sowie in Anwesenheit verschiedener Cosolventien dienen der Bestimmung des Strukturfaktors und damit der Messung der konzentrations- und Cosolvens-abhängigen Einflüsse auf das intermolekulare Wechselwirkungspotenzial von Lysozym und Insulin. Für das Protein SNase wurden die Einflüsse der Cosolventien auf die Stabilität des Proteins gegen druck- und hitzeinduzierte Denaturierung bestimmt.

### 6.1 Kalibrationsmessungen

Die wesentlichen, weil neben der Photonenenergie für eine anschließende  $q$ -Raum-Eichung unerlässlichen, geometrischen Größen eines SAXS-Aufbaus sind der Probe-Detektor-Abstand ( $D_{SD}$ ), die Position des direkten Strahls auf dem Detektor und die Winkel der Verkippung des Detektors gegen die Strahlrichtung. Diese Parameter können mittels des Streubildes einer polykristallinen Pulverprobe mit bekannten Netzebenenabständen bestimmt werden: Sämtliche erforderliche Information steckt dann in der Position, Separation und Verzerrung der Diffraktionsringe. Eine für die Kalibrierung von SAXS-Aufbauten häufig verwendete Substanz ist Silberbehinat<sup>30</sup> ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}$ ), da sie wegen ihrer relativ großen Einheitszelle ( $d_{001} = 58.380 \text{ \AA}$ ) im Diffraktionsspektrum dicht zusammenliegende Ringe generiert, von denen auch bei großen Entfernungen noch mehrere im Detektorbild zu sehen sind.

Abbildung 6.1 zeigt das (radial integrierte) SAXS-Spektrum einer Silberbehinat-Pulverprobe, welches unter Verwendung des Helium-Setups der Beamline BL9 aufgezeichnet worden ist. Vor der Integration erfolgte die Berechnung der geometrischen Parameter des Aufbaus sowie die Eichung der  $q$ -Achse aus den 2D-Rohdaten des Silberbehinatspektrums mit Hilfe des Programmpaketes Fit2D [Hammersley], welches die Peakpositionen an die bekannten Netzebenenabstände anpasst. Die Fitparameter dabei sind der Probe-Detektor-Abstand ( $D_{SD}$ ), die Position des direkten Strahls auf dem Detektor und die Winkel der Verkippung des Detektors<sup>31</sup> gegen die Strahlrichtung. Als

---

<sup>30</sup>Silberbehinat (engl. *Silver Behenate*) kann bezogen werden z.B. über *Rose Chemicals LTD, London*.

<sup>31</sup>Ein typischer Wert für die Detektorverkippung beträgt z.B.  $(\text{rot}, \text{tilt}) = (160^\circ, -0.2^\circ)$  wobei *rot* einer Drehung um die Strahlachse und *tilt* der eigentlichen Verkippung entspricht.

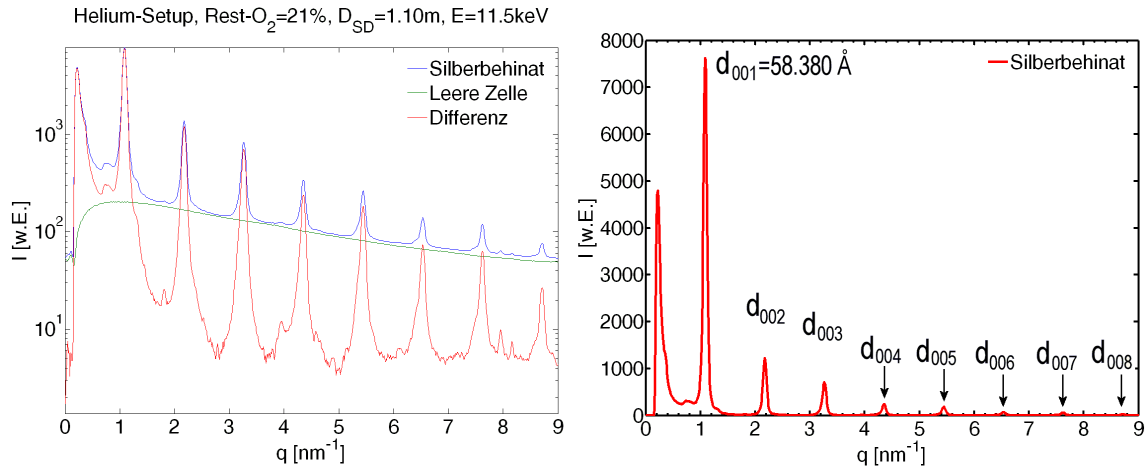


Abbildung 6.1: Links: Rohdaten und Differenzsignal einer Silberbehinat-Pulverprobe im Helium-Setup, gemessen an der Beamline BL9. Die Messung wurde vor der Befüllung des Flightpaths mit Helium durchgeführt. Rechts: Darstellung auf linearer Intensitätsskala mit Bezeichnungen der zu den Peaks korrespondierenden Netzebenenabständen. Die Belichtungszeit betrug  $\tau=600$ s.

Eingabeparameter der Fitroutine werden die Wellenlänge und ein Startwert für  $D_{SD}$  eingetragen.

Der in einem SAXS-Experiment vom Detektor erfasste  $q$ -Bereich ist in aller Regel nicht vollständig nutzbar. Insbesondere in der Nähe des Beamstops kann oft ein Halo des direkten Strahls sichtbar sein, verursacht durch die Vorwärtsstreuung von Fenstern und Gasstrecken oder es können Reflexe an Blenden auftreten. Wenn diese Streubeiträge zu groß werden, können sie im Differenzspektrum einer SAXS-Messung nicht vollständig entfernt werden und die aufgezeichneten Daten können in dem betroffenen Bereich verfälscht sein. Zur Bestimmung des nutzbaren  $q$ -Bereichs eignet sich das Streubild von reinem Wasser, da dieses innerhalb des im SAXS-Experiment typischerweise zugänglichen  $q$ -Bereichs eine konstante Streuintensität (in absoluten Einheiten  $I = 1.632 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ ) liefert [Orthaber] [Hura]. Sobald eine deutliche Abweichung vom konstanten Intensitätsverlauf zu beobachten ist, sollte der betroffene Bereich nicht zur Datenauswertung herangezogen werden.

SAXS-Spektren an Wasser, gemessen in der Hochdruckzelle und mit dem Vakuum-Setup der Beamline BL9 sind beispielhaft in den Abbildungen 6.2 (mit eingesetzten Diamantfenstern) und 6.3 (ohne Diamantfenster) dargestellt. In beiden Fällen wurde jeweils die leere und die mit Wasser gefüllte Probenzelle gemessen, um im Nachhinein durch Untergrundabzug allein den Streubeitrag des Wassers zu erhalten. In den Rohdaten sind bei etwa  $4 \text{ nm}^{-1}$  die typischen, durch die Kaptonfolien des Probenträgers hervorgerufenen Peaks zu erkennen.

Der nutzbare  $q$ -Bereich läßt sich aus dem Verlauf des Wasser-Differenzspektrums abschätzen. Beim Setup mit eingesetzten Diamantfenstern ist ein starker Abfall der Differenzintensität für etwa  $q < 0.5 \text{ nm}^{-1}$  zu erkennen, so dass die dort aufgezeichnete

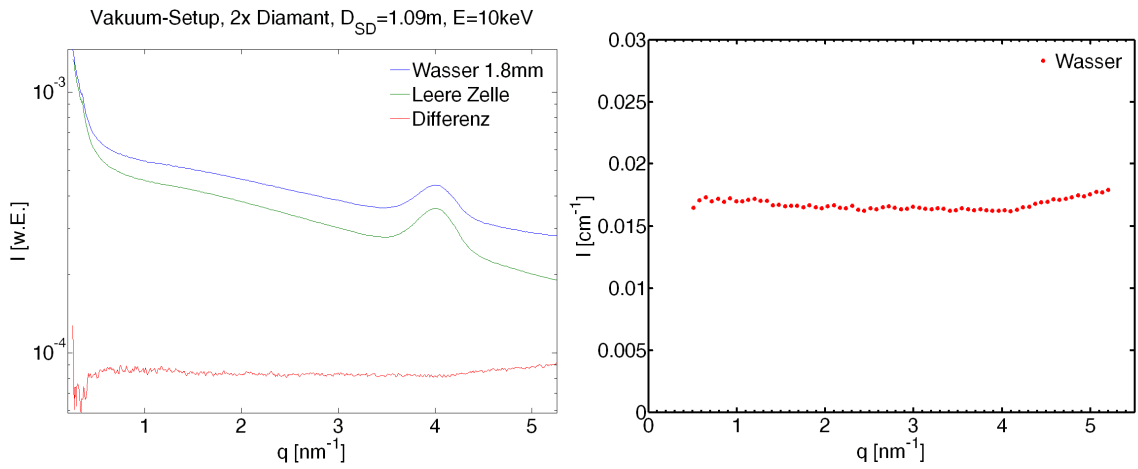


Abbildung 6.2: Links: Rohdaten und Differenzsignal für Wasser im Vakuum-Setup (mit Diamantfenstern),  $p=1\text{bar}$  Rechts: Daten über 10 Messwerte gemittelt und auf absolute Intensität geeicht. Die Belichtungszeit betrug  $\tau=900\text{s}$ .

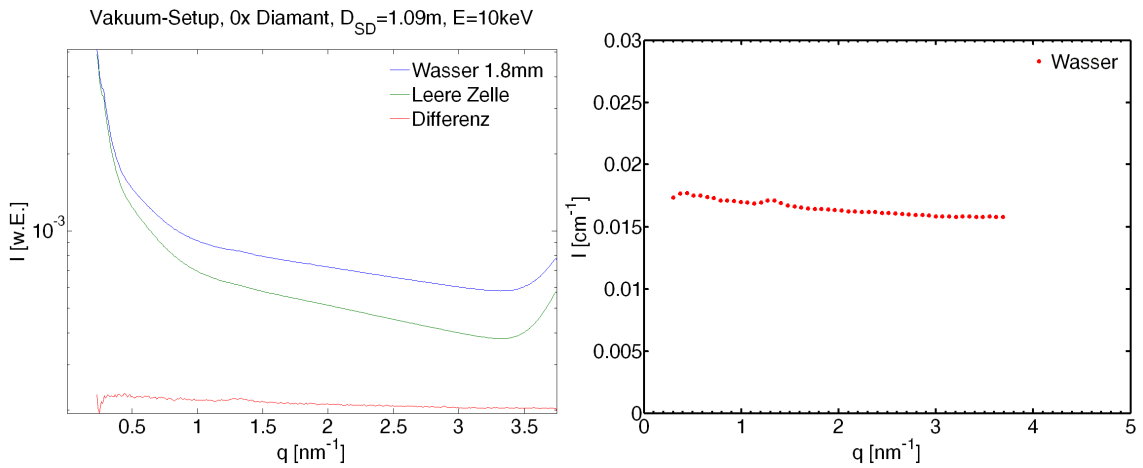


Abbildung 6.3: Links: Rohdaten und Differenzsignal für Wasser im Vakuum-Setup (ohne Diamantfenster, stattdessen sind die Stempel mit Kaptonfenstern versehen),  $p=1\text{bar}$ . Rechts: Daten über 10 Messwerte gemittelt und auf absolute Intensität geeicht. Die Geometrie des Setups ist die gleiche wie in der darüberliegenden Abbildung, der kleinere dargestellte  $q$ -Bereich rührt lediglich von einer eingeschränkten Detektor-Auslesebereich. Die Belichtungszeit betrug  $\tau=900\text{s}$ .

ten Daten verworfen werden müssen. Im Setup ohne Diamantfenster ist der nutzbare Bereich etwas größer, erst ab etwa  $q < 0.25 \text{ nm}^{-1}$  müssen die Daten unberücksichtigt bleiben. In beiden Abbildungen sind auf der rechten Seite die Differenzspektren dargestellt, bei denen jeweils über 10 Messpunkte gemittelt wurde.

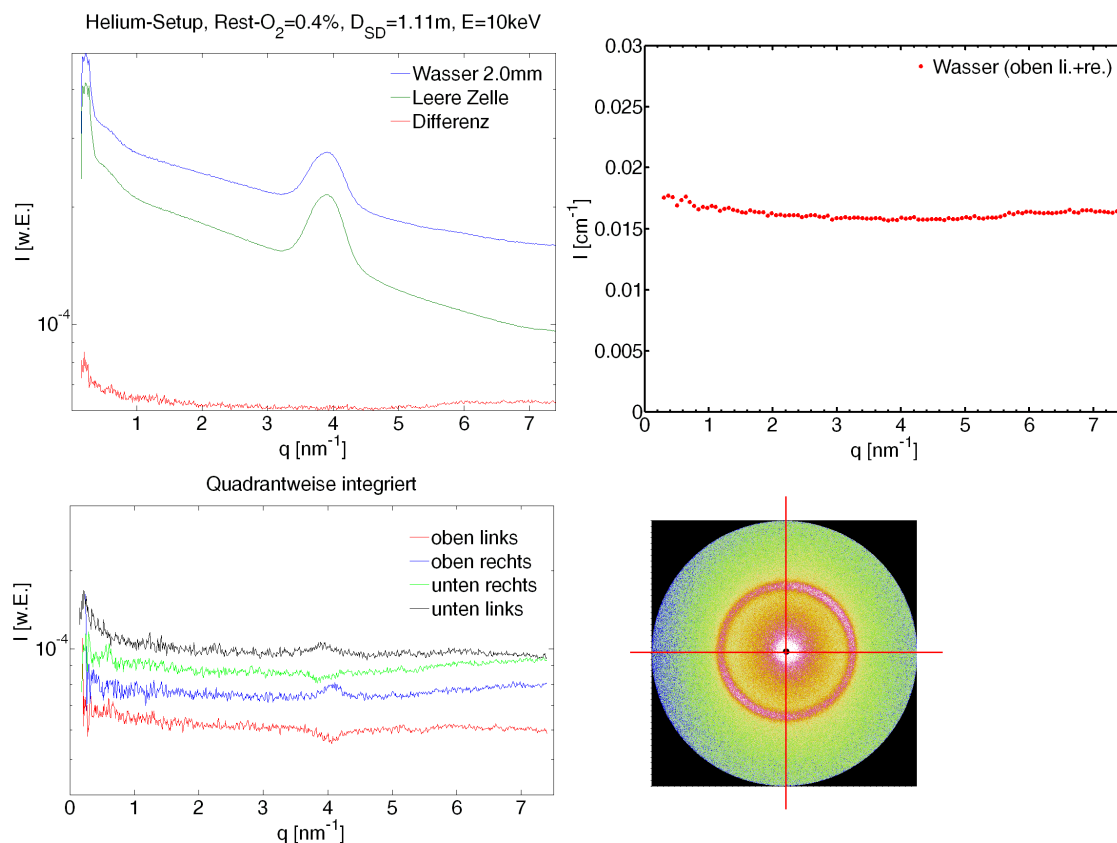


Abbildung 6.4: Oben links: Rohdaten und Differenzsignal für Wasser im Helium-Setup. Oben rechts: Daten über 10 Messwerte gemittelt und auf absolute Intensität geeicht. Unten: Quadrantweise integriertes 2D-Bild offenbart Anisotropien im Streubild.

Abbildung 6.4 zeigt eine für das Helium-Setup der Beamline BL9 typische Wasser-Kalibrationsmessung. Bedingt durch den größeren Durchmesser des Flightpaths ist der maximal zugängliche  $q$ -Bereich deutlich größer und nur durch den Durchmesser der Detektorfläche begrenzt. Der Verlauf des Differenzsignals bei kleinen  $q$ -Werten deutet auf Asymmetrien im Halo um den direkten Strahl hin. Die ebenfalls gezeigte, quadrantenweise Auswertung des 2D-Detektorbildes (nur jeweils ein Quadrant wurde bei der radialen Integration berücksichtigt) deutet auf leichte Anisotropien, insbesondere bei größer werdenden  $q$ -Werten hin. Derartige Anisotropien können hauptsächlich durch ein stark asymmetrisches Strahlprofil hervorgerufen werden, allerdings können auch unvollständig mit Helium gefüllte Bereiche im Flightpath (z.B. entstanden durch Verwirbelungen) die Ursache sein. Durch eine geeignete Einschränkung des für die ra-

diale Integration der Daten zu nutzenden Bereichs (Ausmaskierung) kann in aller Regel dennoch praktisch der gesamte erfassbare  $q$ -Bereich für die Datenauswertung genutzt werden. Wie im oberen rechten Diagramm der Abbildung 6.4 gezeigt, ist die Qualität des Wasserspektrums deutlich besser, wenn nur über die obere Hälfte des Detektorbildes integriert wird, in diesem Fall kann der Bereich  $0.2 \text{ nm}^{-1} < q < 7.4 \text{ nm}^{-1}$  genutzt werden.

Im Allgemeinen sind die Grenzen des nutzbaren  $q$ -Bereichs allerdings nicht allein von der Wahl des Fenstermaterials oder des Flightpath-Typs abhängig. Je nach Einstellung der Blenden und der Fokussierungseinstellungen des Monochromators kann die Intensitätsverteilung innerhalb des vom Beamstop abgeschatteten Bereichs stark variieren, insbesondere kommt es bei stark asymmetrischen Intensitätsprofilen des direkten Strahls oder bei einem nicht mittig auf den Strahl positionierten Beamstop zu starken, asymmetrischen Halos im Streubild. Diese wirken sich letztendlich einschränkend auf den nutzbaren  $q$ -Bereich aus, der daher nach jedem neuen Aufbau des SAXS-Instruments neu zu überprüfen ist.

Abbildung 6.5 zeigt die Roh- und Differenzdaten für Wasser, gemessen an der Laborquelle in Helsinki und an der Beamline BW4 des Hasylab. Während die an der Laborquelle aufgezeichneten Daten für  $q < 0.5 \text{ nm}^{-1}$  prinzipiell nicht mehr vertrauenswürdig sind, offenbaren die Hasylab-Daten eine ausgezeichnete Strahl- und Blendenjustage - erst der Beamstop begrenzt den nutzbaren  $q$ -Bereich, der damit bei  $q = 0.14 \text{ nm}^{-1}$  endet.

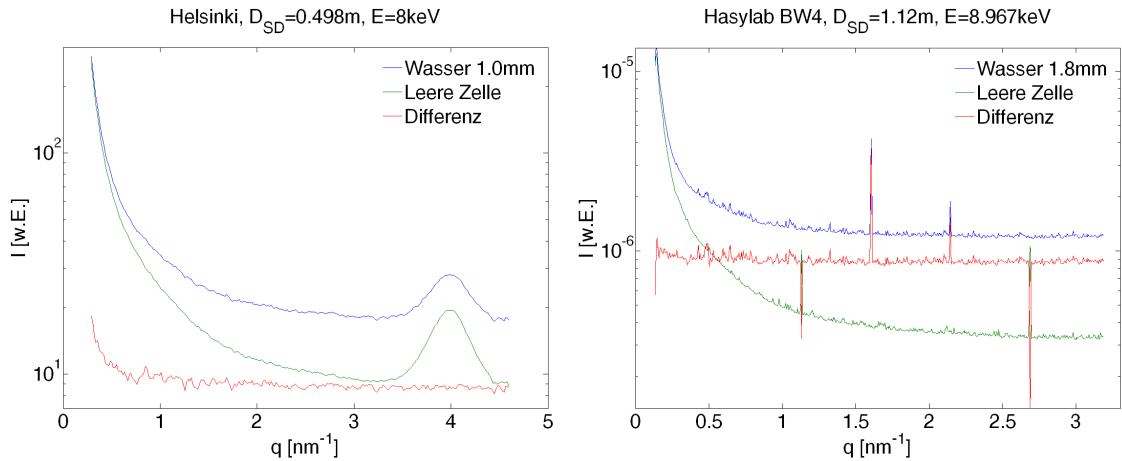


Abbildung 6.5: Rohdaten und Differenzsignal für Wasser, gemessen an der Laborquelle Helsinki (links,  $\tau=1200\text{s}$ ) und an der Beamline BW4 des Hasylab (rechts,  $\tau=1800\text{s}$ ). Die Peaks im Differenzsignal rühren von fehlerhaften Pixeln des Detektors und können ignoriert werden.

## 6.2 Messungen an Lysozym

Es wurden Messungen an unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Lysozymbiosungen durchgeführt, jeweils mit und ohne Zugabe von Cosolventien. Die Messungen an reinen Lysozymbiosungen (ohne Zugabe von Cosolventien) waren die ersten, die am neuen SAXS-Setup der Beamline BL9 durchgeführt wurden. Lysozym gehört zu den am besten charakterisierten Proteinen, es stehen daher hochauflösende 3D-Molekülmodelle in der *Protein Data Bank [PDB]* zur Verfügung, mit deren Hilfe die Qualität der an der Proteinlösung aufgezeichneten Daten überprüft werden konnte.

Die mit Cosolventien versetzten Lösungen wurden mit dem Ziel untersucht, erstmalig die Effekte der Cosolventien auf den Strukturfaktor  $S(q)$  zu bestimmen. Die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Proteinen in einer typischerweise an Cosolventien sehr reichen intrazellulären Umgebung spielen eine wichtige Rolle für die funktionelle Stabilität der Proteine. Darüber hinaus werden Aggregations-, Fibrillations- und Kristallisationseffekte von gelösten Proteinen wesentlich von dem empfindlichen Gleichgewicht zwischen van-der-Waals Kräften, hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Hydratationseffekten gesteuert, die *in summa* letztendlich die intermolekulare Wechselwirkung ausmachen. Neben den Messungen an der Beamline BL9 wurden Referenzmessungen an der Laborquelle der Universität Helsinki durchgeführt.

Das verwendete Lösungsmittel, eine 0.01M Citrat-Puffer-Lösung in bidestilliertem und entionisiertem Wasser, wurde mit 1M Salzsäure auf einem pH-Wert von 4.6 eingestellt. Bei diesem pH-Wert besitzt Lysozym eine Nettoladung von +10 und die geladenen Aminosäurereste sind gleichmäßig über die Proteinoberfläche verteilt [Javid2007b].

Als Cosolventien dienten Natriumchlorid, Glycerin und 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE). Durch Zugabe von Lysozym wurden 1, 4 und 10 prozentige Konzentrationen hergestellt (Gewichtsanteil an Lösung, abgekürzt %wt für *weight percent*, 1%wt entspricht 10mg/l). Dialysiertes und gefriergetrocknetes Hühnereiweiß-Lysozym (*HEW lysozyme*) wurde bezogen über Sigma-Aldrich.

### 6.2.1 Der Formfaktor

Abbildung 6.6 zeigt die Roh- und Differenzspektren für eine 1%wt Lysozymbiosung, gemessen mit dem Helium-Setup an der Beamline BL9. Wie in Kapitel 3.2 gezeigt, entspricht dieses Differenzsignal gerade dem Streubeitrag der in Lösung befindlichen Proteinmoleküle (siehe Gleichung 3.2).

Auf der rechten Seite der Abbildung ist der aus dem 3D-Proteinmodell 6LYZ [PDB] mit Hilfe des Programms CRY SOL [Svergun95] errechnete Formfaktor an das Protein-Streusignal angepasst. Bei der Berechnung des Formfaktors verwendet CRY SOL im Wesentlichen die Gleichungen 2.11 und 2.12, wobei das Proteinmolekülmodell zusätzlich mit einer 3 Å dicken Schicht umgeben wird, die eine gegenüber der Elektronendichte des Wassers ( $\rho_s = 0.334 e^- / \text{Å}^3$ ) um den Fitparameter  $\Delta\rho = \rho_b - \rho_s$  erhöhten Wert besitzt. Durch die Umhüllung des Proteinmodells mit dieser Schicht wird die Hydratationsschicht des gelösten Proteinmoleküls simuliert, deren Beitrag gemäß Gleichung



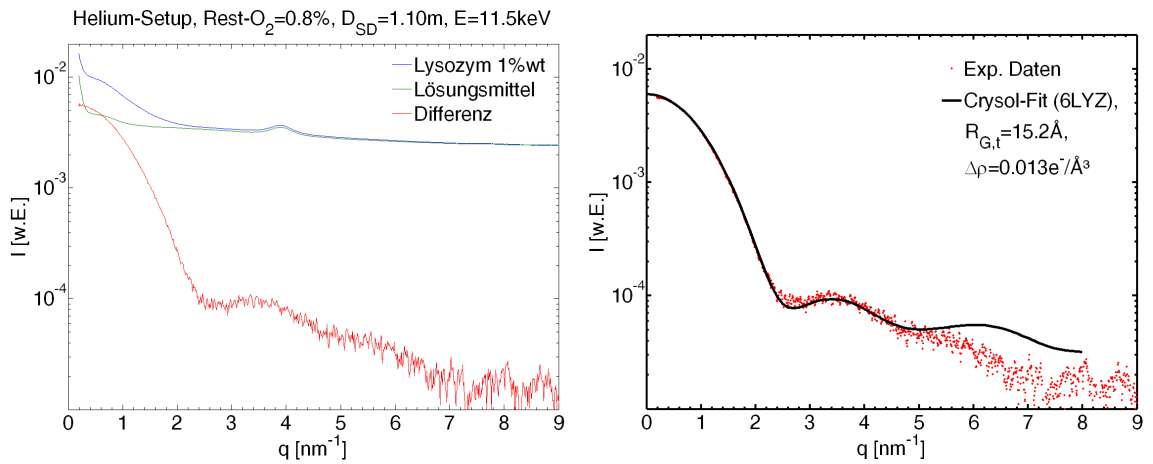


Abbildung 6.6: Links: Rohdaten und Differenzsignal für Lysozym 1%wt in 0.01M Citrat-Pufferlösung bei pH=4.6, T=25°C. Rechts: Formfaktor (schwarz) berechnet aus dem 3D-Molekülmodell 6LYZ [PDB], angepasst an die experimentellen Daten. Die Belichtungszeit betrug  $\tau=1800\text{s}$ .

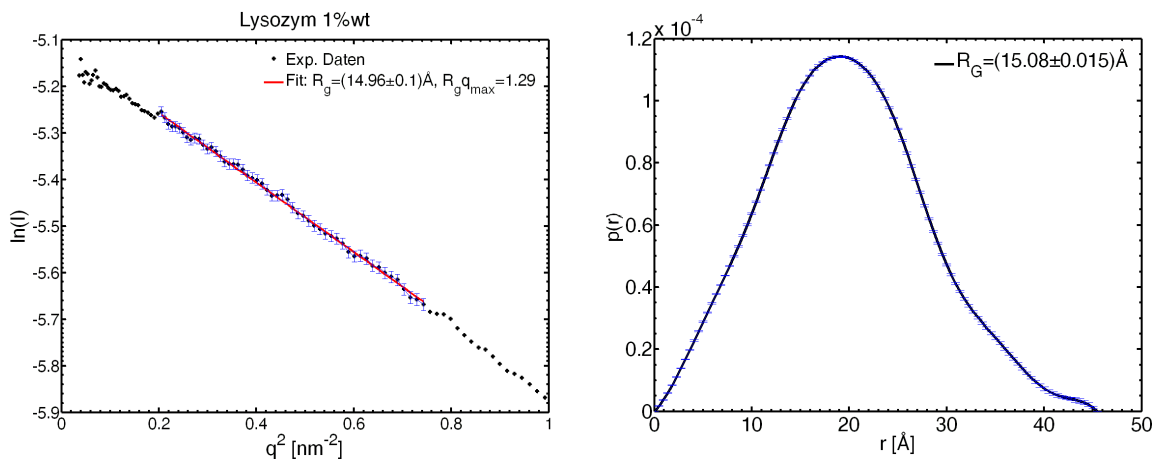


Abbildung 6.7: Links: Guinierplot der Lysozym 1%wt-Streukurve und linearer Guinier-Fit (rot) mit dem daraus berechneten Wert für  $R_G$  (im Fitbereich sind statistische Fehler der Messdaten eingeblendet). Rechts: Aus den Streudaten berechnete Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  sowie der aus dieser errechnete Wert für  $R_G$ .

3.2 im Differenzsignal enthalten ist. Der theoretische Gyrationradius  $R_{G,t}$  aus dem so erhaltenen Modell eines gelösten Proteins, ebenso wie der erhaltene Wert für  $\Delta\rho$  sind ebenfalls in der Abbildung angegeben.

Man kann eine gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem berechneten Intensitätsverlauf bis zu einem Wert von ca.  $q = 5 \text{ nm}^{-1}$  feststellen. Gemäß Gleichung 2.28 ist die Übereinstimmung der Daten ein Beleg dafür, dass die 1%wt Lysozym-Lösung im Rahmen der Empfindlichkeit des Experiments als wechselwirkungsfrei angesehen werden kann: Für den Strukturfaktor gilt offenbar  $S(q) \simeq 1$  und die gestreute Intensität ist damit direkt proportional zum Formfaktor.

Die Abweichung der experimentellen Daten von der berechneten Streukurve für größere  $q$ -Werte (für die selbst in wechselwirkenden Systemen  $S(q) \simeq 1$  gilt) kann dadurch erklärt werden, dass sich die Struktur des in Lösung befindlichen Proteinmoleküls leicht gegenüber der im 3D-Proteinmodell 6LYZ enthaltenen Struktur des kristallinen Proteins unterscheidet. Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, ist die tertiäre Struktur des gelösten Proteinmoleküls im Wesentlichen abhängig von den Wechselwirkungen des Moleküls mit dem Lösungsmittel. Im Proteinkristall fehlen diese Wechselwirkungen, weshalb von einer unterschiedlichen Konformation des kristallinen Proteins gegenüber der in Lösung ausgegangen werden muss. Weil die Abweichungen in den Spektren erst bei größeren  $q$ -Werten sichtbar werden, kann man jedoch annehmen, dass die Unterschiede in den beiden Konformationen nur auf kleinen Längenskalen zu finden sind. Ein für diese Abweichung verantwortlicher systematischer Fehler (z.B. ein Beitrag der Beamline) kann ausgeschlossen werden, denn die SAXS-Spektren von reinem Wasser weisen bei großen  $q$ -Werten eher einen Anstieg als einen Abfall gegenüber der erwarteten konstanten  $q$ -Abhängigkeit auf.

Aus den experimentellen Daten wurde der Gyrationradius der gelösten Proteinmoleküle über eine gewichtete, lineare Regression des in Abbildung 6.7 (links) dargestellten Guinierplots gemäß Gleichung 2.20 berechnet, und man erhält einen Wert von  $R_G = (14.96 \pm 0.1) \text{ \AA}$ .

Die Fehlerbalken der einzelnen Messpunkte sind berechnet aus den statistischen Fehlern der Pixelzählraten im Detektorbild <sup>32</sup> und aus den statistischen Fehlern der Normierungsintensitäten, die für die Differenzbildung der Streusignale der Proteinlösung und Lösungsmittelstreuung erforderlich sind. In den mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung für  $R_G$  erhaltenen Fehler fließt daher zwar der statistische Fehler der Messwerte ein, jedoch nicht evtl. vorhandene systematische Fehler (verursacht z.B. durch Probenverunreinigungen, Konzentrationsschwankungen, Präparationsfehler etc.). Aus einem Vergleich von mehreren, an gleichen Proteinlösungen gemessenen Spektren und der Schwankung der daraus berechneten Werten für  $R_G$  kann für den Gesamtmessfehler von  $R_G$  ein Wert von etwa  $0.5 \text{ \AA}$  angenommen werden. Für alle fortan berechneten Gyrationsradien ist zunächst stets nur der aus den statistischen Fehlern errechnete Messfehler angegeben. Wann immer sich dieser im Rahmen von zu erwar-

---

<sup>32</sup>Die im Detektorbild des MAR-Detektors ausgegebenen Zählraten entsprechen einer etwa 1.4fach höheren Photonenzahl [Hendrix] (bei einer Photonenergie von etwa  $11 - 13 \text{ keV}$ , die Effizienz des Detektors liegt in diesem Energiebereich bei annähernd 100%).

tenden Werten als zu klein erweist, wird explizit auf den eigentlich höheren, möglichen Gesamtmessfehler hingewiesen.

Für die Auswertung des Guinierplots wurde der Bereich  $q^2 < 0.2 \text{ nm}^{-2}$  ausgelassen, da - wie im letzten Kapitel aufgezeigt - im Bereich  $q < 0.5 \text{ nm}^{-1}$  eine systematische Abweichung der Daten auftreten kann. Der so erhaltene Wert für  $R_G$  stimmt im Rahmen des Gesamtmessfehlers mit dem theoretischen Wert  $R_{G,t} = 15.2 \text{ \AA}$  überein, ebenso wie mit dem experimentell bestimmten Wert aus [Svergun98], für den gilt  $R_G = (15.4 \pm 0.2) \text{ \AA}$ .

Der von CRY SOL errechnete Wert für den Dichteunterschied der Hydratationschicht  $\Delta\rho = 0.013e^-/\text{\AA}^3$  zum *bulk*-Wasser weist auf eine etwa 4% höhere Dichte hin und ist damit um die Hälfte kleiner als in [Svergun98] ( $\Delta\rho = 0.025e^-/\text{\AA}^3$ ). Diese starke Abweichung bei ansonsten sehr gut übereinstimmenden Werten von  $R_G$  kann nur durch eine andere Struktur des Lösungsmittels erklärt werden: Die Lysozymproben [Svergun98] wurden in einem 40mM Natriumacetat-Puffer bei pH 3.8 angemischt. Sowohl die deutlich höhere Konzentration des Puffers als auch der stark abweichende pH-Wert können unmittelbaren Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem ihm umgebenden Wasser haben - und damit auf die Hydratationsschicht.

Die in Abbildung 6.7 (rechts) dargestellte Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  wurde mit Hilfe des Programms GNOM [Svergun92] durch direkte Fouriertransformation aus der Streukurve erhalten, deren Daten zuvor über jeweils fünf Messpunkte gemittelt wurden. Der  $q$ -Bereich der Daten für die direkte Fouriertransformation wurde auf  $0.5 \text{ nm}^{-1} < q < 7 \text{ nm}^{-1}$  eingeschränkt, wobei sich die obere Grenze durch die für größere  $q$ -Werte zu stark verrauschten Daten erklärt. GNOM extrapoliert die beschränkten experimentellen Daten gemäß der Porodnäherung ( $I \propto q^{-4}$ ), um das Fourierintegral über einen möglichst großen  $q$ -Bereich durchführen zu können. Der in Abbildung 6.7 angegebene Wert für  $R_G = (15.08 \pm 0.015) \text{ \AA}$  wurde gemäß Gleichung 2.21 aus der Paarverteilungsfunktion berechnet. Es handelt sich hierbei um eine im Vergleich zu dem über die Guiniernäherung errechneten Wert für  $R_G$  genauere Messgröße, da in diese der gesamte experimentell erfasste  $q$ -Bereich über das Fourierintegral eingeht. Der Wert stimmt mit dem aus der Guiniernäherung erhaltenen Wert im Rahmen des Gesamtmessfehlers überein.

Vergleicht man die experimentell bestimmte Paarverteilungsfunktion mit den in der Abbildung 2.6 dargestellten, fällt eine starke Ähnlichkeit zu der Paarverteilungsfunktion einer Kugel auf. Allerdings besitzt das Lysozymmolekül offenbar eine im Vergleich zur Kugel elongierte Form, was die Ursache für den Ausläufer bei den größten Abständen  $r$  ist.

Mit Hilfe des Programms DAMMIN [Svergun99] wurde aus der Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  eine *ab initio* Strukturrekonstruktion durchgeführt. DAMMIN führt zunächst eine Rücktransformation der Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  durch und erhält darüber eine rauschfreie Streukurve  $\tilde{I}(q)$ . Anschließend generiert es eine aus zusammenhängenden Kügelchen (sog. Dummy-Atomen) aufgebaute Kugel mit dem Durchmesser  $D = r_{Max}$  wobei  $r_{Max}$  der größte Wert ist, für den  $p(r) \neq 0$  ist. Zuletzt werden einzelne Dummy-Atome innerhalb des Kugelvolumens so lange entfernt (und ggfs. wieder hin-

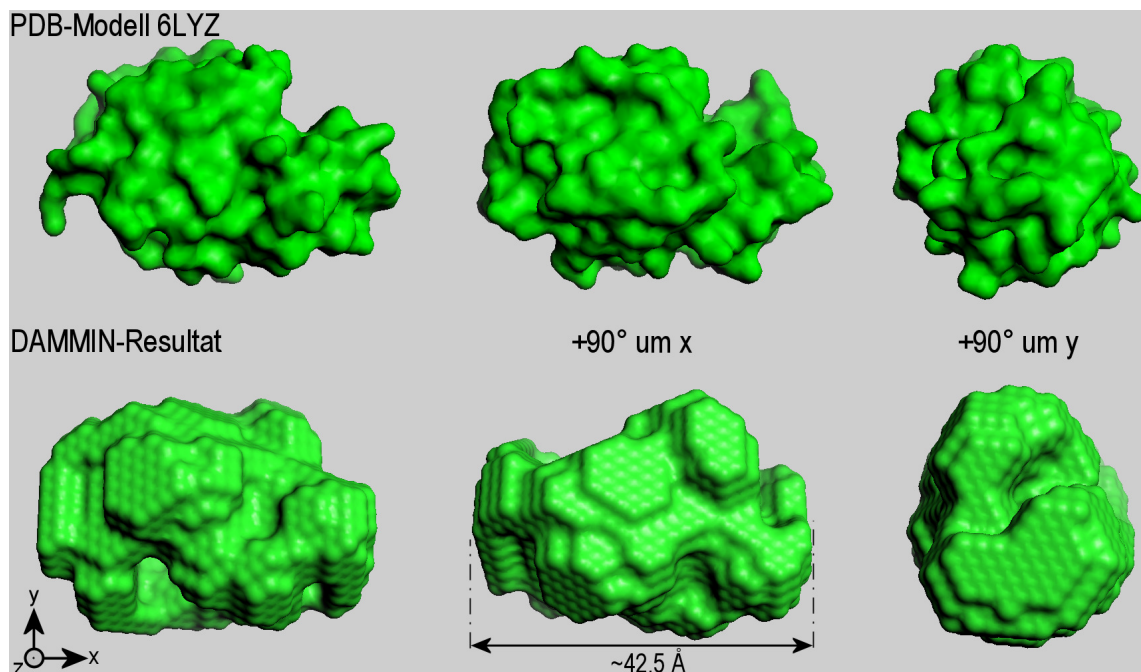


Abbildung 6.8: Vergleich des Lysozym-3D-Molekülmodells 6LYZ [PDB] mit der aus den experimentellen Daten mittels DAMMIN [Svergun99] errechneten Molekülform. Die 3D-Darstellungen wurden erzeugt mit PyMOL [PyMOL].

zugefügt) bis der Formfaktor dieser Struktur mit der Streukurve  $\tilde{I}(q)$  übereinstimmt.

Abbildung 6.8 (oben) zeigt die Einhüllende der im Molekülmodell 6LYZ [PDB] enthaltenen Atompositionen im Vergleich mit der mittels DAMMIN erhaltenen Struktur sowie um die  $x$ - und  $y$ -Achse nacheinander im Uhrzeigersinn rotierte Darstellungen. Die Tertiärstruktur, insbesondere die relativen Abmessungen des Moleküls sowie dessen Kompaktheit werden gut wiedergegeben. Man erkennt deutlich eine gegenüber einer Kugel stark elongierte, eher ellipsoidale Form.

Um die Qualität der am SAXS-Aufbau der Beamline BL9 erhaltenen Spektren zu verifizieren, wurden einige der an Lysozymlösungen durchgeführten Messungen an einem externen SAXS-Instrument wiederholt. Abbildung 6.9 (links) zeigt einen Vergleich der an der Beamline BL9 mit der an der Laborquelle der Universität Helsinki aufgezeichneten SAXS-Spektren einer 1%wt Lysozymlösung (gleiches Lösungsmittel und pH-Wert). Die Spektren sind annähernd deckungsgleich und zur besseren Übersicht gegeneinander vertikal verschoben. Es fällt allerdings die sehr viel höhere Streuung der an der Laborquelle aufgezeichneten Messpunkte auf, insbesondere bei höheren  $q$ -Werten, dies trotz einer Belichtungszeit von 80 Minuten. Die stärkere Streuung und die ihr zugrunde liegende geringe Zählrate macht sich auch im Guinierfit bemerkbar (Abbildung 6.9 rechts). Auch wenn der Wert für  $R_G$  mit dem aus den Delta-Daten berechneten vergleichbar ist, liegt die relative Fehler der Messgröße etwas höher.

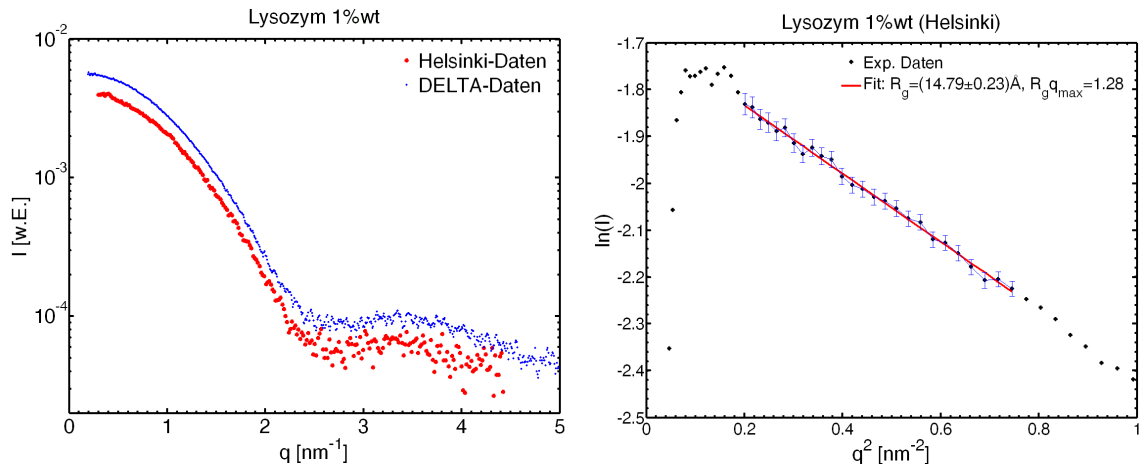


Abbildung 6.9: Links: Vergleich der SAXS-Spektren einer 1%wt Lysozymbilösung gemessen an der Beamline BL9 (rot,  $\tau=1800\text{s}$ ) und an der Laborquelle Helsinki (blau,  $\tau=4800\text{s}$ ). Rechts: Guinierplot und Guinierfit der Helsinki-Daten.

## 6.2.2 Der Strukturfaktor

Wie im letzten Kapitel gezeigt, lässt sich die Streukurve der puren 1%wt Lysozymbilösung über einen weiten  $q$ -Bereich sehr gut an den aus 3D-Moleküldaten berechneten Formfaktor anpassen. Man kann also im Rahmen der Genauigkeit des Experiments von einem wechselwirkungsfreien System ausgehen. Die Streukurven, die durch Messungen an höher konzentrierten Lösungen (4%wt und 10%wt) erhalten wurden, sind in Abbildung 6.10 (links) dargestellt. Mit steigender Konzentration kann man einen systematischen Abfall der unter kleinen Winkeln gestreuten Intensität und die Entstehung eines Maximums bei  $q \simeq 1 \text{ nm}^{-1}$  beobachten. Dieser Strukturpeak oder Korrelationspeak ist charakteristisch für eine repulsive Wechselwirkung zwischen schwach geladenen und bei geringer Ionenstärke gelösten Partikeln - so wie es bei der untersuchten Lysozymbilösung der Fall ist [Strandner].

Wenn die Streukurve einer ausreichend verdünnten, also wechselwirkungsfreien Lösung vorliegt, kann der Strukturfaktor  $S(q, c)$  einer Lösung mit der Proteinkonzentration  $c$  gemäß Gleichung 2.34 aus der an dieser Lösung sowie aus der an der verdünnten Lösung (Konzentration  $c_0$ ) gemessenen Streukurve berechnet werden. Die für pure Lysozymbilösungen mit den Konzentrationen 4 und 10wt% aus den Streudaten berechneten konzentrationsabhängigen Struktur Faktoren  $S(q, c)$  sind in der Abbildung 6.10 (rechts) dargestellt. Für die Berechnung von  $S(q, c)$  diente in beiden Fällen die Streukurve der 1%wt Lysozymbilösung als wechselwirkungsfreies Referenzsystem.

Falls die in Lösung befindlichen Proteinmoleküle miteinander repulsiv wechselwirken, streben sie tendenziell eine Maximierung ihrer mittleren Abstände an. Dies hat eine reduzierte osmotische Kompressibilität zur Folge, die sich letztlich über einen Wert von  $S(q \rightarrow 0) < 1$  bemerkbar macht [Strandner] [Tardieu]. Diesen Verlauf von

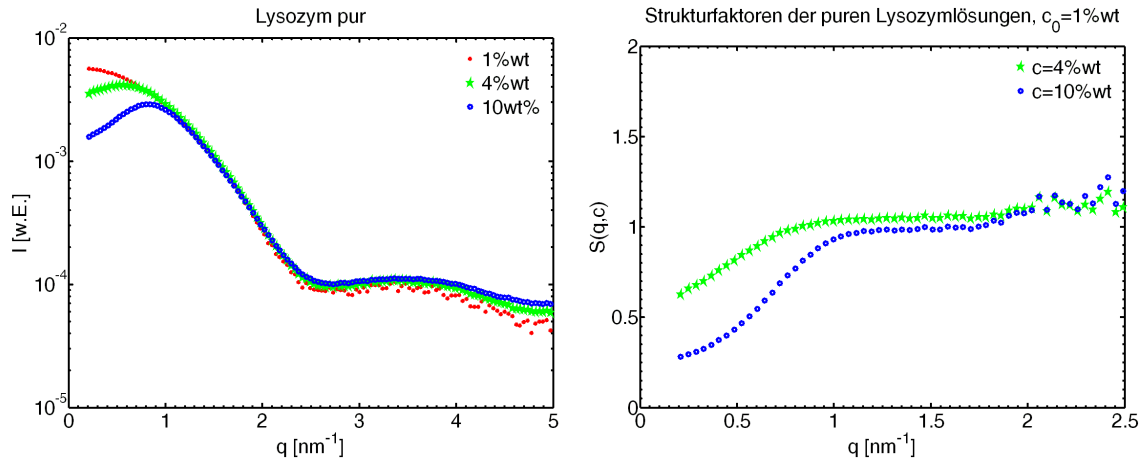


Abbildung 6.10: Links: Streukurven gemessen an Lysozymlösungen unterschiedlicher Konzentration (1, 4 und 10%wt, gemessen mit den Belichtungszeiten  $\tau=1800, 1200$  und  $900\text{s}$ ). Rechts: Aus den Messdaten berechneter, konzentrationsabhängiger Strukturfaktor  $S(q,c)$ . Auf beiden Seiten dargestellte Daten sind über jeweils 5 Messpunkte gemittelt.

$S(q)$  findet man für die höher konzentrierten Lysozymlösungen, wobei eine deutliche Zunahme des repulsiven Charakters der intermolekularen Wechselwirkung mit ansteigender Proteinkonzentration zu beobachten ist, erkennbar am kleiner werdenden Wert für  $S(q \rightarrow 0)$ .

Die Beimischung eines Cosolvens, welches mit dem Protein wechselwirken kann, verändert in aller Regel die intermolekulare Wechselwirkung (siehe Kapitel 3.3). In Abbildung 6.11 (links) sind die Streukurven von Lysozymlösungen erhöhter Konzentration (4 bzw. 10%wt) dargestellt, sowohl für pure Lösungen als auch für Lösungen mit zugefügten Cosolventien (NaCl, Glycerin, TFE). Die aus diesen Streukurven berechneten Strukturfaktoren (mit der puren, 1%wt Lysozymlösung als Referenzsystem) sind ebenfalls in Abbildung 6.11 (rechts) dargestellt und erlauben eine Aussage darüber, wie sich die Präsenz des jeweiligen Cosolvens auf die intermolekulare Wechselwirkung der Lysozymmoleküle auswirkt.

Unter Zugabe von NaCl ist bereits ab der kleinsten NaCl-Konzentration ( $c = 0.05M$ ) in den Streukurven der 4%wt Lysozymlösungen ein Anstieg der Intensität für  $q \rightarrow 0$  zu beobachten. Mit zunehmender Konzentration setzt sich dieser Trend fort und bei der höchsten Konzentration ( $c = 0.25M$ ) ist der Strukturpeak praktisch nicht mehr zu erkennen. Eine genauere Aussage ermöglichen die berechneten Strukturfaktoren: Bereits bei  $c = 0.05M$  ist im Vergleich zum Strukturfaktor der puren 4%wt Lysozymlösung (siehe Abbildung 6.10) eine deutlich abgeschwächte repulsive Wechselwirkung erkennbar. Dieser Effekt lässt sich auf die Ladungsabschirmung zurückführen, welche die Salzionen auf die geladenen Proteinmoleküle ausüben [Ravindra]. Konsequenterweise wird die Wechselwirkung mit steigender NaCl-Konzentration immer weniger repulsiv und erreicht bei  $c = 0.25M$  einen leicht anziehenden Charakter.

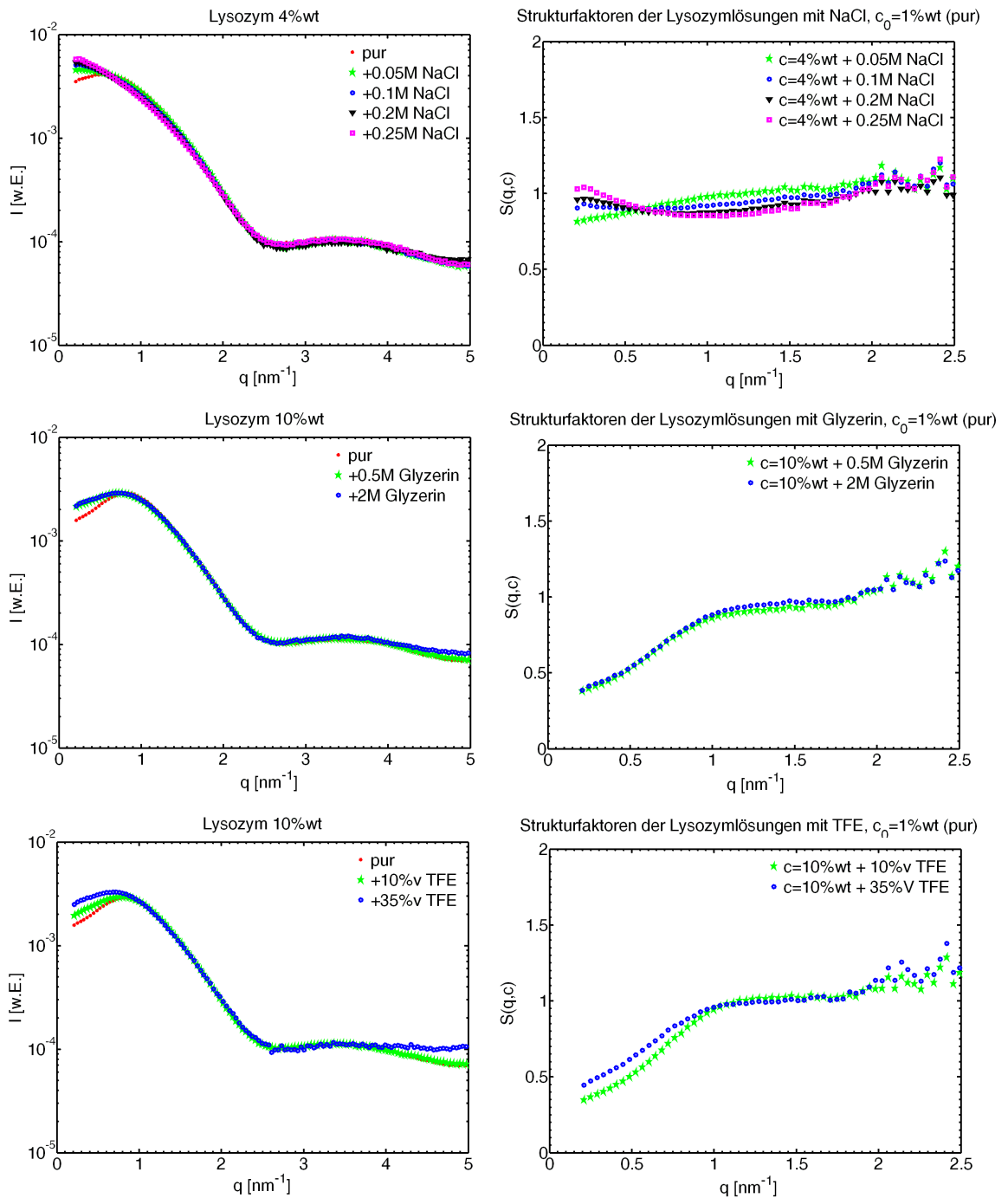


Abbildung 6.11: Links: Streukurven gemessen an erhöht konzentrierten Lysozylösungen, die unterschiedlich hohe Konzentrationen an Cosolventien enthalten. Mit zunehmender Konzentration der Cosolventien erkennt man ihren Einfluss auf den Strukturpeak der jeweiligen puren Lösung. Rechts: Aus den Messdaten berechneter, konzentrationsabhängiger Strukturfaktor  $S(q, c)$ . Auf beiden Seiten dargestellte Daten sind über jeweils 5 Messpunkte gemittelt.

Die Zugabe von Glycerin hat einen relativ schwachen Effekt auf den Strukturfaktor der 10%wt Lysozymlösung (vgl. Abbildung 6.10), der zudem unabhängig von der Glycerinkonzentration (0.5M bis 2M) ist. Der Einfluss von Glycerin auf das Protein ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass das Cosolvens durch seine stark hydrophile Wechselwirkung bevorzugt an Wasser bindet und thermodynamisch ein Ausschluss der Glycerinmoleküle aus der Hydratationsschicht des Proteins günstiger ist [Herberhold]. Das Protein wird dadurch zwar strukturell stabilisiert [Javid2007b] mit zunehmender Konzentration ändert sich jedoch nicht die Dichte der Glycerinmoleküle in der Hydratationsschicht des Proteinmoleküls.

In Gegenwart von TFE ändert sich der Verlauf der Streukurve nicht nur für  $q \rightarrow 0$ . Während für größere  $q$ -Werte das Streubild der 10%v (Volumenanteil) TFE-Lösung noch mit der Cosolvens-freien Lösung übereinstimmt, kann man bei der 35%v TFE-Lösung bereits für  $q > 4 \text{ nm}^{-1}$  eine deutliche Divergenz der Spektren feststellen. Es ist bekannt, dass Alkohole in der Lage sind, Änderungen der Sekundärstruktur herbeizuführen, bei gleichzeitiger Stabilisierung der Tertiärstruktur [Hirota]. Dies führt bei hoher Cosolventkonzentration mitunter zu einer *molten globule* Konformation. Da das Spektrum der 35%v TFE-Lösung erst bei relativ großen  $q$ -Werten von dem der reinen Lösung abweicht, kann man beim vorliegenden System von nur geringen Änderungen der Sekundärstruktur ausgehen, die zudem erst bei der höheren Konzentration (35%v) auftreten. Insgesamt wirkt das Cosolvens abschwächend auf das abstoßende intermolekulare Potenzial, was durch den Anstieg der Werte von  $S(q \rightarrow 0)$  belegt wird.

Um den Einfluss der Cosolventien auf die geometrischen Parameter der in Lösung befindlichen Proteinmoleküle zu bestimmen, wurden Messungen an Cosolventienenthaltenden 1%wt Lysozymlösungen durchgeführt. Abbildung 6.12 zeigt den Gyrationradius  $R_G$ , bestimmt aus Guinierplots der Streukurven in Abhängigkeit von der Konzentration der beigemengten Substanzen.

Die Zugabe von NaCl zum Lösungsmittel führt (innerhalb des Gesamtmessfehlers von 0.5 Å) bis zu einer Konzentration von 0.2M zu keiner deutlichen Veränderung von  $R_G$ . In [Svergun98] wurde ein ähnliches Verhalten bis zu der maximal untersuchten Konzentration von 0.15M festgestellt. In höherer Konzentration (0.2M) ist jedoch eine leichte Vergrößerung von  $R_G$  zu erkennen. Da keine durch NaCl verursachte Änderung der Proteinkonformation zu erwarten ist [Svergun98], muss der Effekt eher auf die bei der höchsten Konzentration vorhandene, leicht anziehende Wechselwirkung und eine dadurch einsetzende Aggregation der Proteine zurückgeführt werden.

In der Gegenwart von Glycerin zeigt sich auch bei einer hohen Konzentration von 2M keine Veränderung in  $R_G$ , so dass von einer höchstens sehr schwachen Wechselwirkung zwischen Glycerin und den Lysozymmolekülen ausgegangen werden muss. Diese Aussage deckt sich mit den aus den gemessenen Strukturfaktoren gewonnenen Erkenntnissen. Die Zugabe von TFE führt bei der Konzentration von 10%v zunächst zu keiner erkennbaren Veränderung von  $R_G$ , jedoch ist bei 35%v eine starke Zunahme zu beobachten, die durch eine TFE-induzierte, partielle Entfaltung des Proteins und Ausbildung einer *molten globule* Konformation erklärt werden kann.



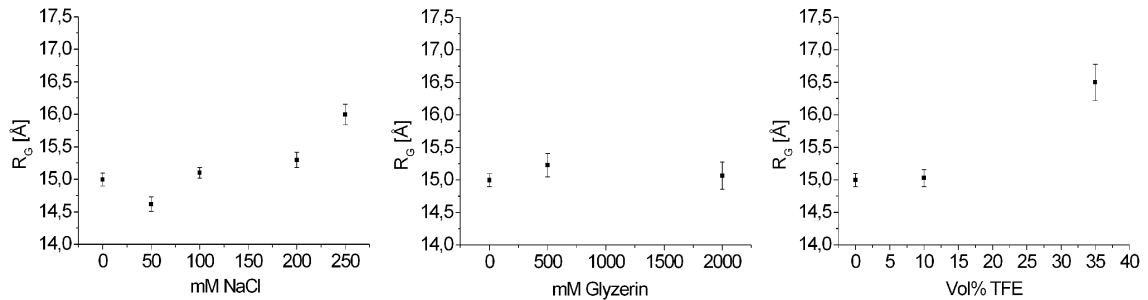


Abbildung 6.12: Gyrationradius  $R_G$  von Lysozym in 1%wt Lösung als Funktion der Konzentration des jeweiligen Cosolvens.

### 6.3 Messungen an Insulin

Es wurden Messungen an unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Insulinlösungen durchgeführt, jeweils mit und ohne Zugabe von Cosolventien. Die Messungen, welche an den puren und mit Cosolventien versetzten Lösungen durchgeführt wurden, dienten zunächst der geometrischen Charakterisierung der Konformation des Proteins. Weiterhin wurden erstmalig die Strukturfaktoren  $S(q)$  im sauren Milieu bestimmt, sowohl unter Ladungsabschirmung (NaCl) als auch unter Einfluss von Ethanol, welches in der verwendeten Konzentration zu einer überwiegenden monomeren Population führt [Dzwolak]. Die Messungen wurden ausschließlich an der Beamline BL9 durchgeführt.

Als Lösungsmittel wurde bidestilliertes und entionisiertes Wasser verwendet, das mit 1M Salzsäure auf einen pH-Wert von 2.1 eingestellt wurde. Bei diesem pH-Wert ist die Neigung des Insulins zur Ausbildung von Oligomeren (Dimere  $\rightarrow$  Tetramere  $\rightarrow$  Hexamere) gehemmt, und das Protein liegt hauptsächlich als Dimer vor. Darüber hinaus erfährt das Molekül eine Konformationsänderung, die eine Aggregation der monomeren (nicht-nativen) Spezies veranlasst und darüber die Entstehung von unlöslichen amyloiden Faserstrukturen fördert [Whittingham]. Die Amyloidogenese von Proteinen wird als ursächlich für mehrere neurodegenerative Erkrankungen, wie die Alzheimer'sche oder Parkinson'sche Krankheit angesehen [Selkoe].

Als Cosolventien dienten Natriumchlorid und Ethanol. Durch Zugabe von Insulin wurden Lösungen mit den Konzentrationen 0.5, 1, 4, 10 und 20 wt% hergestellt. Gefriergetrocknetes Rinder-Insulin (*bovine insulin*) wurde bezogen über Sigma-Aldrich.

#### 6.3.1 Der Formfaktor

Abbildung 6.13 zeigt die Roh- und Differenzdaten für 1%wt und 0.5%wt Insulinlösungen, gemessen mit dem Helium-Setup an der Beamline BL9. Die Messungen an den jeweiligen Konzentrationen fanden zeitlich voneinander getrennt in zwei verschiedenen Experimenten statt und mit einer leicht unterschiedlichen Photonenenergie, weshalb der maximal zugängliche  $q$ -Bereich verschieden groß ist.

Auf der rechten Seite der Abbildung ist der aus dem 3D-Modell 2A3G [PDB] eines Insulindimers mit Hilfe des Programms CRY SOL [Svergun95] errechnete Formfaktor an die jeweilige, experimentell erhaltene Streukurve angepasst. Der theoretische Gyrationradius  $R_{G,t}$ , in den der Elektronendichtekontrast  $\Delta\rho$  der 3 Å dicken Hydratationsschicht als Fitparameter eingeht, ebenso wie der auf diese Weise berechnete Wert für  $\Delta\rho$  sind ebenfalls in der Abbildung angegeben.

Für die beiden Konzentrationen beobachtet man einen in unterschiedlicher Weise übereinstimmenden Verlauf des berechneten Spektrums mit den experimentellen Daten. Die berechnete Streukurve gibt den Verlauf der Daten der 1%wt Lösung zwar bis zu einem Wert von ca.  $q = 5 \text{ nm}^{-1}$  gut wieder, es ist jedoch bei kleineren  $q$ -Werten eine leichte Abweichung der experimentellen Daten von der berechneten Streukurve zu erkennen - im Allgemeinen ein Hinweis auf das Vorhandensein von interpartikulären Wechselwirkungen und einen dadurch verursachten Beitrag von  $S(q) \neq 1$ .

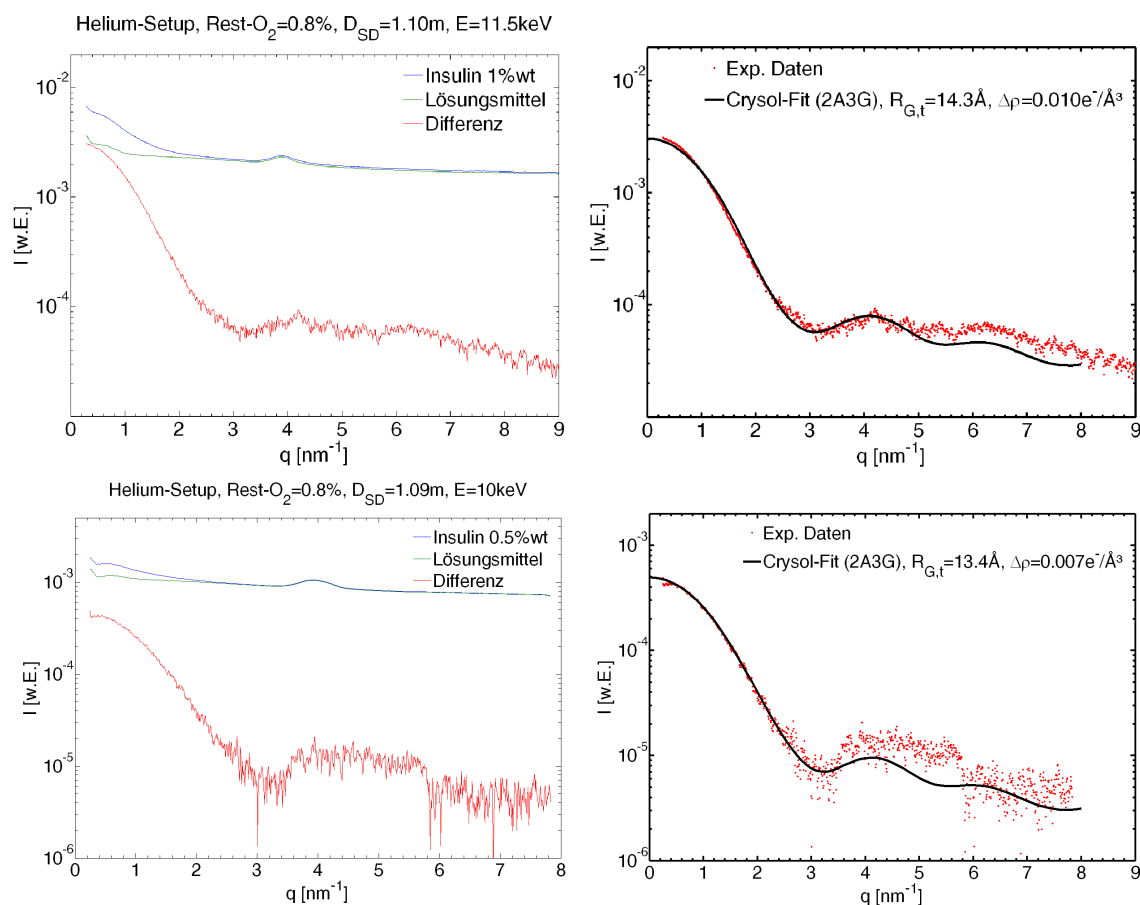


Abbildung 6.13: Links: Rohdaten und Differenzsignal für Insulin 1 und 0.5%wt Lösungen bei pH 2.1, T=25°C. Rechts: Formfaktor (schwarz) berechnet aus dem 3D-Molekülmodell 2A3G [PDB], angepasst an die experimentellen Daten. Die Belichtungszeit betrug  $\tau=1800\text{s}$ .

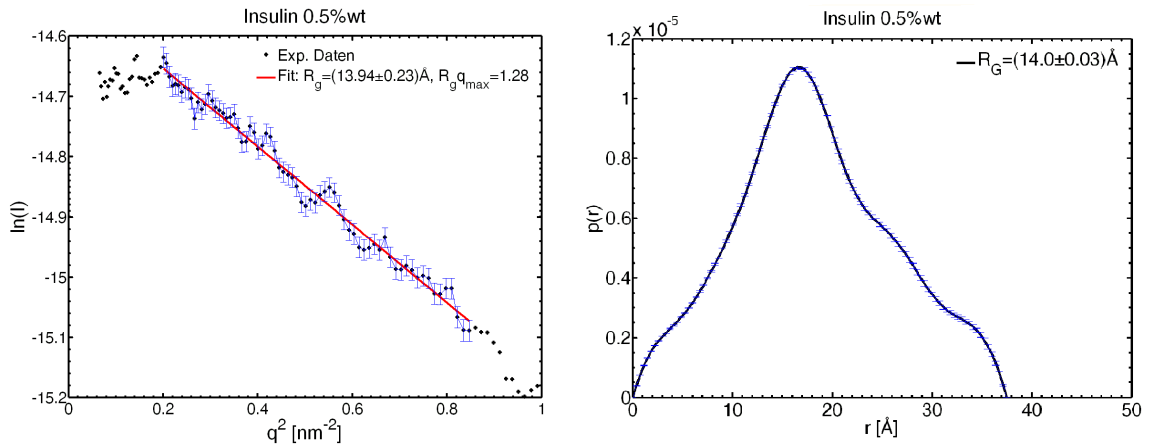


Abbildung 6.14: Links: Guinierplot der Insulin 0.5%wt Streukurve sowie linearer Guinier-Fit (rot) mit dem erhaltenen Wert für  $R_G$  (im Fitbereich sind die statistischen Fehler der Messdaten eingebildet). Rechts: Aus den Streudaten berechnete Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  sowie der aus dieser errechnete Wert für  $R_G$ .

Für die 0.5%wt Konzentration findet man insbesondere im Bereich bis zum ersten lokalen Minimum der Streukurve eine deutlich bessere Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem berechneten Verlauf, so dass erst bei dieser reduzierten Konzentration eine vernachlässigbare Wechselwirkung zwischen den gelösten Insulinmolekülen angenommen werden kann. Allerdings fällt eine starke Abweichung der experimentellen Daten im Bereich  $3.5 \text{ nm}^{-1} < q < 6 \text{ nm}^{-1}$  auf, für größere  $q$ -Werte kann jedoch im Rahmen der (statistischen) Schwankung der Messpunkte wieder eine gute Übereinstimmung beobachtet werden. Eine leicht unterschiedliche Tertiärstruktur des in Lösung befindlichen, untersuchten Proteins im Vergleich zu der im verwendeten 3D-Molekülmodell enthaltenen, ist die wahrscheinlichste Erklärung für diese Abweichung.

Aus den experimentellen Daten wurde der Gyrationradius der gelösten Proteinmoleküle über eine lineare Regression des in Abbildung 6.14 (links) dargestellten Guinierplots berechnet, und man erhält einen Wert von  $R_G = (13.94 \pm 0.23) \text{ \AA}$ . Der so erhaltene Wert für  $R_G$  stimmt im Rahmen des Gesamtmessfehlers mit dem theoretischen Wert  $R_{G,t} = 13.4 \text{ \AA}$  (fast) überein. Der in [Jansen] berichtete Wert für Insulindimere liegt im Vergleich zum theoretischen (aus einem Dimermodell errechneten) Wert von  $14.9 \text{ \AA}$  (ohne Fehlerangabe) etwas höher, jedoch muss auch hier von einem vergleichbar großen Fehler ausgegangen werden.

Der mit CRY SOL errechnete Wert für den Dichteunterschied der Hydratationsschicht  $\Delta\rho = 0.007 e^- / \text{Å}^3$  zum *bulk*-Wasser weist auf eine nur etwa 2% höhere Dichte hin und ist damit deutlich kleiner als der aus Messungen an Lysozym erhaltene Wert. Verursacht durch den sehr geringen pH-Wert kann auch hier die starke Wechselwirkung des sauren Lösungsmittels mit dem Proteinmolekül als mögliche Ursache für die abweichende Struktur der Hydratationsschicht angesehen werden. Die in Abbildung

6.14 (rechts) dargestellte Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  wurde mit Hilfe des Programms GNOM [Svergun92] durch direkte Fouriertransformation aus der Streukurve erhalten. Die Daten wurden zuvor über jeweils 5 Messpunkte gemittelt. Der für die Fouriertransformation verwendete  $q$ -Bereich war  $0.5 \text{ nm}^{-1} < q < 7.8 \text{ nm}^{-1}$ , und der in Abbildung 6.14 angegebene Wert für  $R_G = (14.0 \pm 0.03) \text{ \AA}$  wurde gemäß Gleichung 2.21 aus der Paarverteilungsfunktion berechnet. Hierbei zeigt sich der Vorteil der Bestimmung des Gyrationradius aus der Paarkorrelationsfunktion besonders deutlich: Der so erhaltene relative Fehler des Messwertes von  $R_G$  ist mehr als 7 mal kleiner im Vergleich zu dem über einen Guinier-Plot bestimmten Wert.

Vergleicht man die erhaltene Paarverteilungsfunktion mit den in der Abbildung 2.6 dargestellten, so ist ersichtlich, dass keine Ähnlichkeit mit einer kugelförmigen Partikelform mehr erwartet werden kann. Der Verlauf von  $p(r)$  auf der rechten Schulter der Kurve deutet eher auf eine stark nicht-isotrope Partikelform hin, die eine ausgeprägte Substruktur besitzt. Diese Modellvorstellung deckt sich mit der erwarteten Struktur des Insulindimers, welches aus zwei Proteinen zusammengesetzt ist.

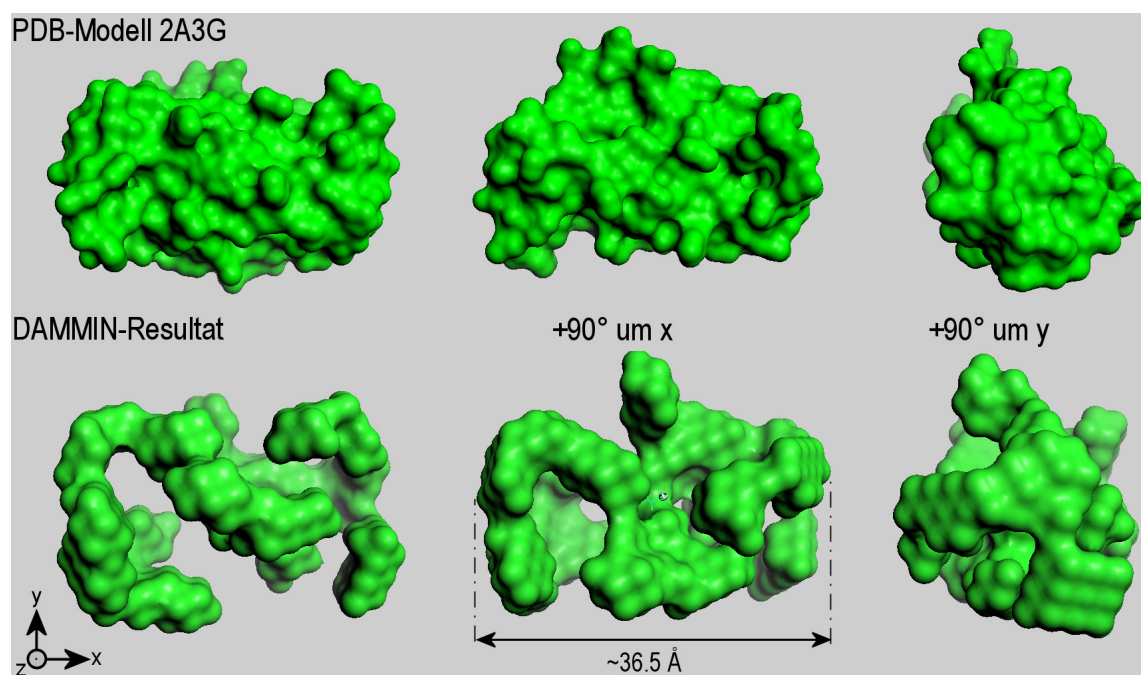


Abbildung 6.15: Vergleich des Insulindimer-3D-Molekülmodells 2A3G [PDB] mit der aus den experimentellen Daten mittels DAMMIN [Svergun99] errechneten Molekülform. Die 3D-Darstellungen wurden erzeugt mit PyMOL [PyMOL].

Mit Hilfe des Programms DAMMIN [Svergun99] wurde aus der Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  eine *ab initio* Strukturrekonstruktion durchgeführt. Abbildung 6.15 (oben) zeigt die Einhüllende der im Molekülmodell eines Insulindimers 2A3G [PDB] enthaltenen Atompositionen im Vergleich mit der mittels DAMMIN erhaltenen Struktur sowie

um die  $x$ - und  $y$ -Achse nacheinander im Uhrzeigersinn rotierte Darstellungen. Während die relativen Abmessungen des Moleküls gut wiedergegeben werden, erkennt man eine stark abweichende Tertiärstruktur des Proteins, die zudem einen wesentlich geringeren Kompaktheitsgrad aufweist.

Eine über DAMMIN erhaltene Rekonstruktion muss zwar nicht zwingend die exakte Form des realen Proteins wiedergeben, denn der Zusammenhang zwischen der Form eines Partikels und der aus der richtungsgemittelten Streamplitude erhaltenen Streuintensität ist nicht eineindeutig. Dennoch müssen diejenigen Strukturmerkmale als wahrscheinlich angesehen werden, die DAMMIN bei mehreren Durchläufen wiederholt errechnet (wie hier geschehen). Man erkennt in der linken Darstellung des DAMMIN-Resultats eine sich andeutende zweifache Punktsymmetrie (P2-Symmetrie): Die Projektion des Modells ähnelt in etwa einem um  $90^\circ$  nach links gedrehten "S". Da bei der Rekonstruktion keinerlei Angaben über Symmetrie an DAMMIN übergeben wurden, handelt es sich hierbei offenbar tatsächlich um eine mit derartiger Symmetrie versehene Partikelform - wie sie bei einem Dimer auch zu erwarten ist. Die deutliche Abweichung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur rührt daher, dass die Struktur 2A3G aus einem Proteinkristall erhalten wurde, der bei einem pH-Wert von 6.2 kristallisiert worden war (Vgl. Eintrag in [PDB]). Bei einem pH-Wert von 2.1 besitzt das Protein jedoch offenbar eine abweichende Konformation.

### 6.3.2 Der Strukturfaktor

Wie im letzten Kapitel gezeigt, kann man erst bei der  $0.5\%wt$  Insulinlösung von einem im Rahmen der Genauigkeit des Experiments wechselwirkungsfreien System sprechen. Die Streukurven, die durch Messungen an höher konzentrierten Lösungen (1, 4, 6 und  $10\%wt$ ) erhalten wurden, sind in Abbildung 6.16 (links) dargestellt. Mit steigender Konzentration kann die Entstehung eines Maximums bei  $q \simeq 0.8 \text{ nm}^{-1}$  beobachtet werden. Anders als bei Lysozym geht die Entstehung dieses Strukturpeaks nicht mit einem systematischen Abfall der unter kleinen Winkeln gestreuten Intensität einher. So erkennt man in Abbildung 6.16 (rechts) in den gemäß Gleichung 2.34 berechneten Struktur Faktoren (mit der Streukurve der  $0.5\%wt$  Insulinlösung als wechselwirkungsfreiem Referenzsystem) ein mit zunehmender Konzentration der Insulinlösung ebenfalls größer werdendes Maximum. Die Position  $q_{\max}$  des Maximums ist offenbar unabhängig von der Insulinkonzentration, was ein Hinweis darauf ist, dass statt einer dichter werdenden, homogenen räumlichen Verteilung der Insulinmoleküle es vielmehr zur Bildung von Clustern kommt, deren Größe mit zunehmender Konzentration steigt. Die dadurch zunehmende Cluster-Cluster-Wechselwirkung macht sich dann im steigenden Wert von  $S(q_{\max})$  bemerkbar [Strandner] [Javid2007c].

In Abbildung 6.17 (links) sind die Streukurven von Insulinlösungen der höchsten Konzentration ( $10\%wt$ ) dargestellt, sowohl für die pure Lösung als auch für Lösungen mit zugefügten Cosolventien (NaCl und Ethanol). Die aus diesen Streukurven berechneten Struktur Faktoren (mit der puren  $0.5\%wt$  Insulinlösung als Referenzsystem) sind in Abbildung 6.17 (rechts) dargestellt.

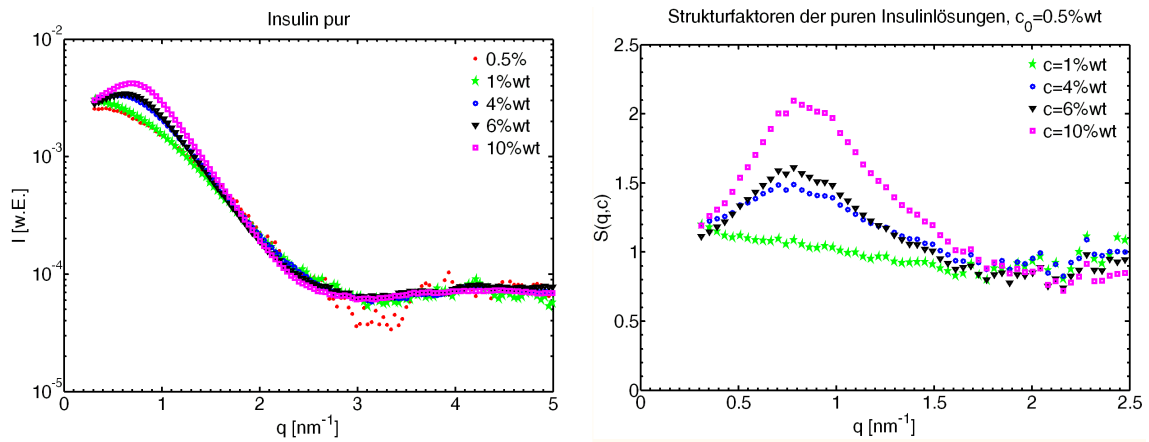


Abbildung 6.16: Links: Streukurven gemessen an Insulinlösungen unterschiedlicher Konzentration (0.5, 1, 4, 6 und 10%wt, gemessen mit der Belichtungszeit  $\tau=1800\text{s}$ ). Rechts: Aus den Messdaten berechneter, konzentrationsabhängiger Strukturfaktor  $S(q,c)$ . Auf beiden Seiten dargestellte Daten sind über jeweils 5 Messpunkte gemittelt.

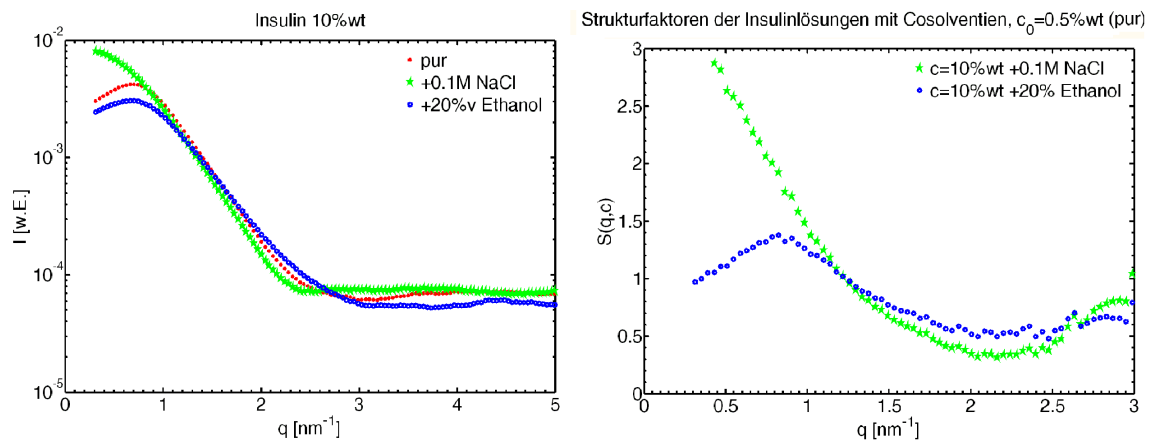


Abbildung 6.17: Links: Streukurven gemessen an erhöht konzentrierten Insulinlösungen, unter Zugabe von Cosolventien. Rechts: Aus den Messdaten berechneter, konzentrationsabhängiger Strukturfaktor  $S(q,c)$ . Auf beiden Seiten dargestellte Daten sind über jeweils 5 Messpunkte gemittelt.

Unter Zugabe von NaCl ( $c = 0.1M$ ) ist in der Streukurve der 10%wt Insulinlösung ein Anstieg der Intensität für  $q \rightarrow 0$  zu beobachten. Dieser Effekt konnte bereits bei Lysozym beobachtet werden, jedoch in einer wesentlich schwächeren Ausprägung. Dementsprechend erkennt man im Strukturfaktor der NaCl-haltigen Insulinlösung einen viel größeren Wert für  $S(q \rightarrow 0)$  und damit einen Beleg für eine starke, kurzreichweitige, attraktive Wechselwirkung, die durch die ladungsabschirmende Wirkung der  $Cl^-$  Ionen verursacht wird. Ein Anstieg der Population der Lösung mit stark polydispersen, oligomeren Spezies ist die Folge [Javid2007c]. Die bei größeren  $q$ -Werten nicht mehr korrelierenden Streukurven der reinen und mit NaCl versetzten Lösungen weisen auf eine deutlich unterschiedliche Tertiärstruktur der dimeren und höher-oligomeren Spezies.

In Gegenwart von Ethanol kann man eine Änderung der Streukurve sowohl für  $q \rightarrow 0$  als auch für größere  $q$ -Werte beobachten. Es wurde berichtet, dass unter den gegebenen Bedingungen (pH 2.1 und 20%v Ethanol) Insulin hauptsächlich in der monomeren Form vorliegt [Dzwolak]. Es gelang jedoch nicht, eine ausreichende Übereinstimmung zwischen der Streukurve einer 0.5%wt Insulinlösung mit 20%v Ethanol und dem aus dem Insulin-Monomer-Modell 1PID [PDB] berechneten Streukurve zu erreichen. Daraus folgt, dass das Monomer in Anwesenheit von Ethanol in einer abweichenden Konformation vorliegen muss, eine *molten globule* Konformation ist hier naheliegend. Wie schon bei Lysozym beobachtet man auch in der Streukurve der 10%wt Insulinlösung eine leichte Abschwächung des Strukturpeaks in Gegenwart einer hohen Alkohol-Konzentration. Ein Vergleich des Strukturfaktors mit dem der reinen Lösung deutet auch hier auf eine Abschwächung der Wechselwirkung in einer mit Ethanol vermischten Lösung. Eine Abweichung der Streukurven bei relativ großen  $q$ -Werten kann ebenfalls beobachtet werden, so dass auch hier von geringen Änderungen der Sekundärstruktur des Insulins im Vergleich zur reinen Lösung ausgegangen werden muss.

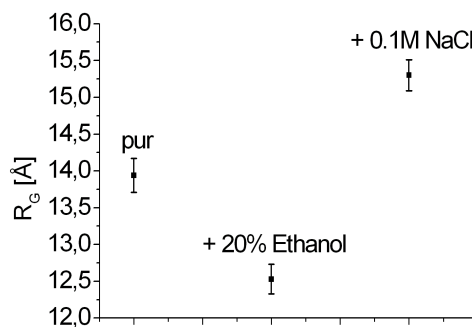


Abbildung 6.18: Gyrationradius  $R_G$  von Insulin in 0.5%wt Lösung in Anwesenheit verschiedener Cosolventien.

Um den Einfluss der Cosolventien auf die geometrischen Parameter der in Lösung befindlichen Proteinmoleküle zu bestimmen, wurden Messungen an Cosolvens-haltigen 0.5%wt Insulinlösungen durchgeführt. Abbildung 6.18 zeigt die Gyrationradien  $R_G$ ,

bestimmt aus Guinierplots für die pure 0.5%wt Insulinlösung sowie in Anwesenheit von 20%v Ethanol und 0.1M NaCl. In der mit Ethanol versetzten Lösung erhält man für den Gyrationradius  $R_G = (12.5 \pm 0.3) \text{ \AA}$  der damit deutlich über dem in [Jansen] für ein Insulinmonomer berichteten Wert (11.1 Å, ohne Fehlerangabe) liegt. Da der erhaltene Wert für ein Dimer jedoch viel zu hoch ist, muss von einer nicht vollständigen Monomer-Population unter den genannten Bedingungen ausgegangen werden. Unter Zugabe von NaCl erkennt man eine gegenüber dem Dimer (pure Lösung) erhöhten Wert des Gyrationradius, für den gilt  $R_G = (15.3 \pm 0.2) \text{ \AA}$ . Eine Zunahme des Anteils an oligomerer Spezies in Folge der durch die Ladungsabschirmung verursachten, attraktiven Wechselwirkung ist also bei einer - im Vergleich zu Lysozym - bereits viel niedrigeren NaCl-Konzentration zu beobachten.

## 6.4 Messungen an Staphylokokken Nuclease

Es wurden Messungen an gering konzentrierten, wässrigen Lösungen von Staphylokokken Nuclease (SNase) durchgeführt, jeweils mit und ohne Zugabe von Cosolventien, bei Normalbedingungen und unter erhöhten Werten für Temperatur und Druck.

Die Messungen, welche an den puren und mit Cosolventien vermischten Lösungen durchgeführt wurden, dienten der Bestimmung der Einflüsse der Cosolventien auf die Denaturierungseigenschaften des Proteins. Sie hatten das Ziel, erstmalig mittels SAXS-Methoden die sich in Anwesenheit von Cosolventien unter denaturierenden Bedingungen ausbildenden Konformationen mit den des in purer Lösung denaturierten Proteins zu vergleichen. Die den Faltungs- und Entfaltungsprozessen zugrundeliegende Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der Erforschung von Erkrankungen, die gerade ihren Ursprung in fehlgefalteten Proteinen besitzen.

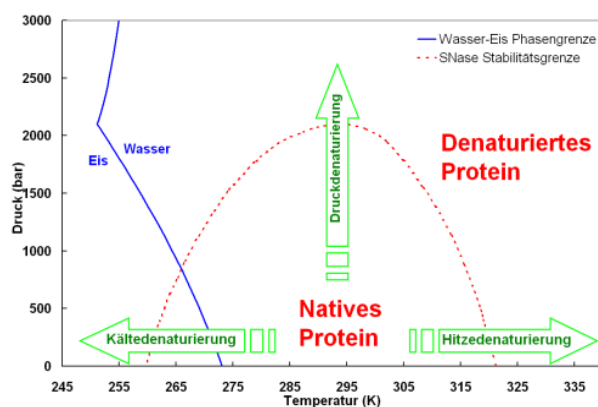


Abbildung 6.19: p,T-Stabilitätsdiagramm für den Wild-Typ Staphylokokken Nuclease. Durch Änderung des p,T-Zustands kann eine Entfaltung induziert werden, und das native Protein denaturiert. Im Gegensatz zu der Wasser-Eis-Phasengrenze (Schmelzkurve) ist die Stabilitätsgrenze nicht scharf definiert. Die Schmelzkurvedaten sind entnommen aus [Wagner], die Daten für die Stabilitätsgrenze aus [Panick98].



Es ist bekannt, dass Proteine sowohl bei relativ zu physiologischen Bedingungen erhöhter oder erniedrigter Temperatur als auch erhöhtem Druck eine Denaturierung erfahren, die sowohl mit einer Änderung der tertiären als auch sekundären Struktur einhergeht. Die durch druck- und temperaturinduzierte Entfaltung hervorgerufene Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur von SNase wurden ausführlich in [Panick98] untersucht. Abbildung 6.19 zeigt ein Stabilitätsdiagramm, in dem die Zustände erkennbar sind, unter denen das Protein SNase in einer reinen Lösung in seiner nativen (physiologisch gefalteten) und denaturierten (beliebig entfalteten) Konformation existiert. Um den Einfluss der verschiedenen Cosolventien auf die Stabilität des Proteins zu untersuchen, war das Ziel dieses Experiments, die relative Verschiebung der Stabilitätsgrenze entlang der drei verschiedenen Denaturierungswege (Hitzedenaturierung, Kältedenaturierung und Druckdenaturierung) zu bestimmen.

Ein Großteil der Messungen wurde unter Verwendung einer älteren Version der Hochdruckzelle an der Beamline ID18 der APS und zu geringeren Teilen mit der neuen Hochdruckzelle (siehe Kapitel 4.7.2) an den Beamlines BL9 des Delta und BW4 des Hasylab durchgeführt.

Das verwendete Lösungsmittel, eine 0.05M Bis-Tris-Puffer-Lösung<sup>33</sup> in bidestilliertem und entionisiertem Wasser, wurde mit 1M Salzsäure auf einem pH-Wert von 5.5 eingestellt. Das Bis-Tris-Buffer-System ist in der Lage, den pH-Wert auch bei erhöhtem Druck konstant zu halten. Der pH-Wert wurde gewählt, um die gemessenen Daten mit den aus [Panick99] vergleichen zu können.

Als Cosolventien dienten Glycerin, Sorbitol, Kaliumsulfat, 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE), Harnstoff (Urea) und Trimethylamin-N-Oxid (TMAO). Durch Zugabe von SNase wurden Lösungen mit den Konzentrationen 0.5 und 1%wt hergestellt. Das Protein wurde vom Lehrstuhl der Physikalischen Chemie I, Prof. Dr. Roland Winter zur Verfügung gestellt und nach der Methode von Shortle und Lin [Shortle] hergestellt.

#### 6.4.1 Der Formfaktor

Abbildung 6.20 zeigt die Roh- und Differenzdaten für eine 0.5%wt Lysozymbilösung, gemessen an der Beamline BW4 des Hasylab. Wie in Kapitel 3.2 gezeigt, entspricht dieses Differenzsignal gerade dem Streubeitrag der in Lösung befindlichen Proteinmoleküle (siehe Gleichung 3.2).

Auf der rechten Seite der Abbildung ist der aus dem 3D-Modell 1EYO [PDB] von Staphylokokken Nuclease (wild-Typ) mit Hilfe des Programms CRY SOL [Svergun95] errechnete Formfaktor an die experimentell erhaltene Streukurve angepasst. Der theoretische Gyrationradius  $R_{G,t}$  in den der Elektronendichtekontrast  $\Delta\rho$  der 3 Å dicken Hydratationsschicht als Fitparameter eingeht, ebenso wie der auf diese Weise berechnete Wert für  $\Delta\rho$  sind ebenfalls in der Abbildung angegeben.

Man kann eine sehr gute Übereinstimmung des berechneten Spektrums mit den experimentellen Daten im  $q$ -Bereich  $0.3 \text{ nm}^{-1} < q < 3.2 \text{ nm}^{-1}$  feststellen (das 3D-

<sup>33</sup>“Bis-Tris” ist die Kurzform von *2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2"-nitrilotriethanol* mit einem Molekulargewicht von 209,24 g/mol

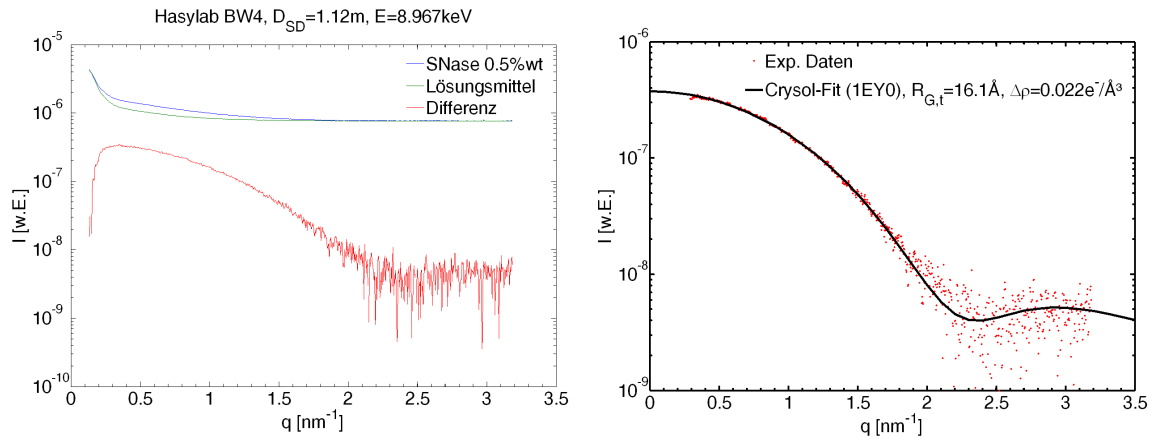


Abbildung 6.20: Links: Rohdaten und Differenzsignal für SNase 0.5%wt in 50mM Bis-Tris-Pufferlösung bei pH 5.5,  $T=26^\circ\text{C}$ . Rechts: Formfaktor (schwarz) berechnet aus dem 3D-Molekülmodell 1EY0 [PDB], angepasst an die experimentellen Daten. Die Belichtungszeit betrug  $\tau=1800\text{s}$ .

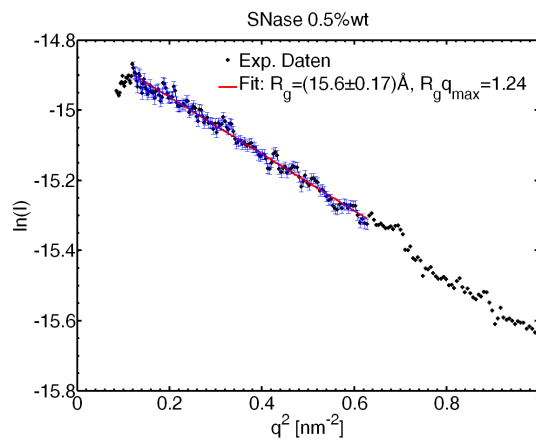


Abbildung 6.21: Guinierplot der SNase 0.5%wt Streukurve sowie linearer Guinier-Fit (rot) mit dem erhaltenen Wert für  $R_G$  (im Fitbereich sind die statistischen Fehler der Messdaten eingeblendet).

Molekülmodell 1EY0 wurde aus einem Proteinkristall erhalten, der bei einem pH-Wert von 7 kristallisiert worden war [PDB]). Aus den experimentellen Daten wurde der Gyrationradius der gelösten Proteinmoleküle über eine lineare Regression des in Abbildung 6.14 (links) dargestellten Guinierplots berechnet, und man erhält einen Wert von  $R_G = (15.6 \pm 0.17) \text{ \AA}$ . Der so erhaltene Wert für  $R_G$  stimmt im Rahmen des Gesamtmessfehlers mit dem theoretischen Wert  $R_{G,t} = 16.1 \text{ \AA}$  überein, ebenso wie mit dem in [Panick98] berichteten Wert von  $R_G = (17 \pm 1) \text{ \AA}$ .

Der von CRY SOL errechnete Wert für den Dichteunterschied der Hydratationsschicht  $\Delta\rho = 0.022e^-/\text{\AA}^3$  weist auf eine etwa 7% höhere Dichte im Vergleich zum *bulk*-Wasser hin und ist damit deutlich höher als bei den beiden anderen, in dieser Arbeit untersuchten Proteinen. Die Dichtedifferenz ist damit aber immer noch geringer als der in der Literatur häufig zitierte Bereich von 10% bis 20%. Die strikte Einhaltung der 3 \AA-Dicke für die Hydratationsschicht bei der Modellierung der Daten durch CRY SOL kann mitunter eine Ursache für die durchweg zu kleinen, errechneten Elektronendichten der Hydratationsschicht sein <sup>34</sup>.

#### 6.4.2 Die Denaturierung

Um den Einfluss der Cosolventien auf die Denaturierungseigenschaften des Proteins untersuchen zu können, wurden SAXS-Messungen an Proteinlösungen unter verschiedenen Drücken und Temperaturen durchgeführt. Zu Referenzzwecken wurden druck- und temperaturabhängige Streukurven an einer reinen Proteinlösung aufgezeichnet.

**Druckdenaturierung** Die druckabhängige Referenz-Messung erfolgte in 1 kbar Schritten bis zu einem Maximaldruck von 4 kbar. Bevor die jeweilige Messung gestartet wurde, folgte nach jeder Druckänderung zunächst eine Wartezeit von 30 min, um die Population der durch Druck entfalteten Spezies einen Gleichgewichtszustand erreichen zu lassen. In [Woenckhaus] wurde gezeigt, dass für einen positiven Drucksprung (von 1.5 kbar nach 3 kbar) der zeitabhängig gemessene Gyrationradius gemäß einer exponentiellen Funktion mit einer Zeitkonstante von 14 min relaxiert. Ein Gleichgewichtszustand stellt sich zwar erst nach etwa 1 h ein, jedoch ist nach dem Ablauf der ersten 30 min nur noch eine minimale Änderung des Gyrationradius zu verzeichnen.

Abbildung 6.22 (links) zeigt die bei den oben genannten Drücken aufgezeichneten Streukurven, auf der rechten Seite der Abbildung 6.22 sind die zugehörigen Guinierplots dargestellt.

Mit zunehmendem Druck erkennt man zunächst eine deutliche Abnahme der gestreuten Intensität. Dies hat zwei Ursachen: Zum einen sinkt die Transmission der ca. 2 mm dicken, hauptsächlich aus Wasser bestehenden Probe um ca. 5% pro 1 kbar Druck (Kompressibilität von Wasser  $\kappa_{25^\circ C} = 46.1 \times 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$ ). Da jedoch die Kompressibilität des Lösungsmittels höher als die des Proteins ist, sinkt darüber hinaus der Streukontrast des gelösten Proteins mit zunehmendem Druck.

---

<sup>34</sup>Falls die Hydratationsschichten in Wirklichkeit eine geringere Dicke besitzen erhält man einen zu geringen Wert für  $\Delta\rho$ .

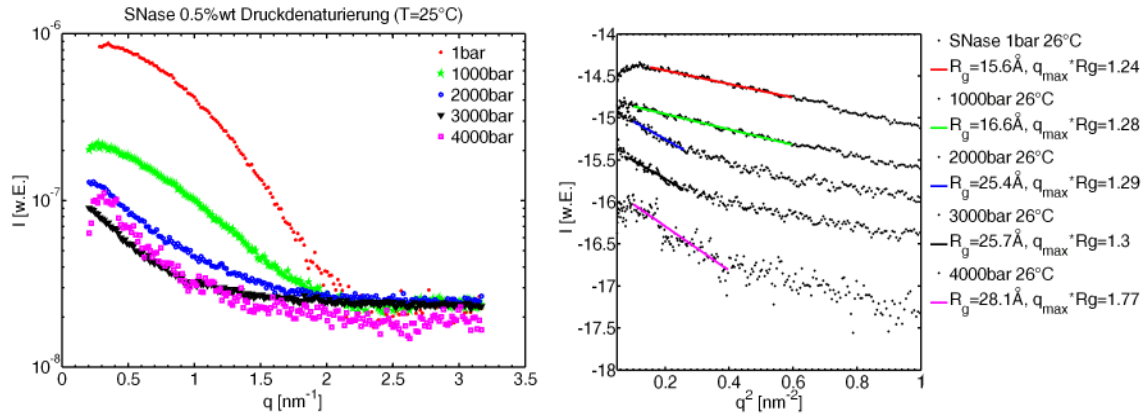


Abbildung 6.22: Links: Streukurven gemessen an einer reinen SNase 0.5%wt Lösung bei unterschiedlichen hydrostatischen Drücken (Belichtungszeit jeweils  $\tau=1800\text{s}$  nach einer Wartezeit von  $\Delta t=1800\text{s}$  nach Druckänderung). Rechts: Guinierplot der druckabhängigen Streukurven (im Plot nimmt der Druck von oben nach unten zu) sowie lineare Guinier-Fits (farblich gekennzeichnet) mit den so erhaltenen Werten für  $R_G$ .

Ungeachtet der absoluten Intensitäten fällt bereits in den Streukurven eine deutliche Veränderung des Kurvenverlaufs ab einem Druck von 2 kbar auf. In den Guinierplots macht sich dies deutlicher bemerkbar, denn oberhalb dieses Druckes erhöht sich der Gyrationradius  $R_G$  von ca.  $16 \text{ \AA}$  auf über  $25 \text{ \AA}$ . Die Zunahme des Gyrationradius dokumentiert eine starke Veränderung der tertiären Struktur, das Protein verliert seine globuläre Konformation und verformt sich zu einer stark ellipsoidalen Form. Es verliert dabei auch einen Großteil seiner Sekundärstrukturelemente, eine vollständig entfaltete *random coil* Konformation bildet sich jedoch nicht aus [Panick98].

Bedingt durch den abnehmenden Streukontrast fällt die Genauigkeit der  $R_G$ -Messung mit steigendem Druck deutlich ab, wie an den in Abbildung 6.24 gezeigten Fehlerbalken zu erkennen ist. Bei der Bestimmung des Gyrationradius für die 4 kbar Messung musste der Fitbereich sogar über den zulässigen Bereich von  $q_{\text{max}} R_G \leq 1.3$  hinaus erweitert werden, um an den stark streuenden Messpunkten überhaupt eine sinnvolle, lineare Regression durchführen zu können.

Die Reversibilität dieser druckinduzierten Denaturierung ist abhängig vom maximal ausgeübten Druck: Wird nach einem Maximaldruck von 2 kbar der Normaldruck wiederhergestellt, lässt sich die zuvor aufgezeichnete Streukurve wiederherstellen. Bei einem Maximaldruck von 3 kbar sind für  $q > 2 \text{ nm}^{-1}$  bereits Unterschiede in den Streukurven feststellbar. Erreicht der Druck 4 kbar behält die Streukurve trotz der Wiederherstellung des Normaldruckes in etwa einen Verlauf, wie er sonst nur oberhalb von 2 kbar auftritt. Dies deckt sich mit den in [Panick98] berichteten Resultaten. Offenbar treten durch die Konformationsänderung, die bei diesem Druck auftritt, Aggregationen von Proteinen auf, die nach der Druckentlastung irreversibel sind und eine Zurückfaltung des Proteins in seine native Konformation verhindern.

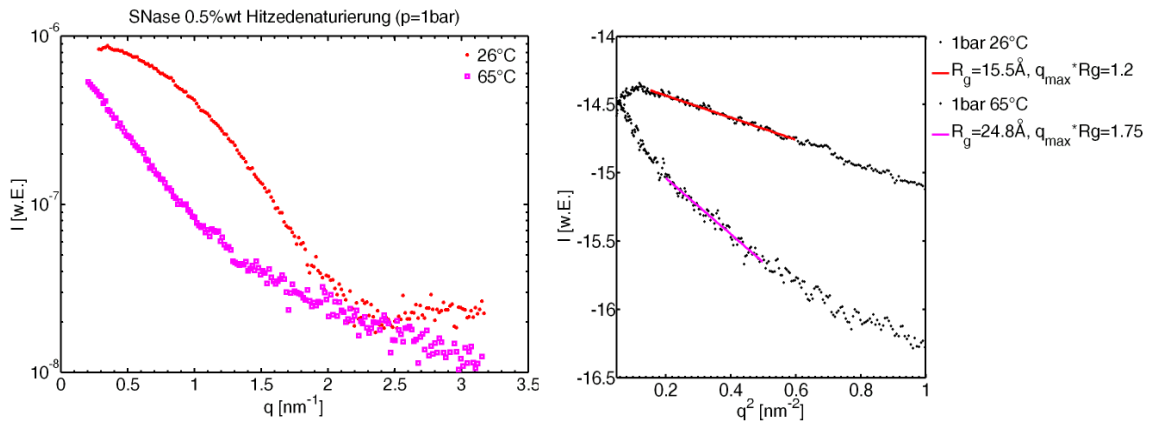


Abbildung 6.23: Links: Streukurven gemessen an einer reinen SNase 0.5%wt Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen (Belichtungszeit jeweils  $\tau=1800\text{s}$ ). Rechts: Guinierplot der temperaturabhängigen Streukurven (im Plot nimmt die Temperatur von oben nach unten zu) sowie lineare Guinier-Fits (farblich gekennzeichnet) mit den so erhaltenen Werten für  $R_G$ .

**Hitzedenaturierung** Für die Referenzmessung der hitzeinduzierten Denaturierung wurde die SAXS-Messung an einer reinen Proteinlösung bei  $65^\circ\text{C}$  durchgeführt. Eine Wartezeit nach der Temperaturerhöhung war nicht erforderlich, da im Gegensatz zur druckinduzierten Denaturierung die Population der durch Wärme entfalteten Spezies innerhalb von wenigen Sekunden einen Gleichgewichtszustand erreicht [Malessa]. Der aus der bei  $65^\circ\text{C}$  aufgezeichneten Streukurve erhaltene Wert für den Gyrationradius  $R_G$  stimmt mit dem bei 2 kbar erhaltenen überein: Demnach ist in beiden Fällen ein überwiegender Großteil der Proteinpopulation denaturiert.

Wie in [Panick98] gezeigt wurde, entsteht durch die Hitzedenaturierung eine in ihrer Sekundärstruktur gegenüber der Druckdenaturierung noch stärker gestörte Konformation. Auch hier ist jedoch keine *random coil* Konformation zu erwarten, vielmehr eine recht stark ausgeprägte hantelförmige Tertiärstruktur. Die durch eine Temperatur von  $65^\circ\text{C}$  hervorgerufene Denaturierung ist nicht reversibel, sie verursacht offenbar ebenfalls eine anschließende Proteinaggregation.

**Kältedenaturierung** Kältedenaturierung unter atmosphärischem Druck an SNase wurde in Anwesenheit von destabilisierenden Cosolventien, im sauren Milieu oder an instabilen SNase-Mutationen beobachtet [Griko] [Antonino]. Wegen des Wasser-Eis-Phasenübergangs ist es jedoch nicht möglich in einer flüssigen Phase unter Normaldruck die in purer Lösung und bei moderatem pH-Wert für die Kältedenaturierung des Wild-Typs SNase erforderliche, tiefe Temperatur zu erreichen (vgl. Abbildung 6.19). Cosolventien, die eine Absenkung des Gefrierpunktes des Lösungsmittels um die mindestens erforderlichen  $10^\circ\text{C}$  bewirken könnten, müssten in einer Konzentration beigemischt werden, die bereits selbst einen starken Einfluss auf die Konformation des Proteins hätte. Um eine durch Kälte induzierte Denaturierung des Proteins in einer reinen Lösung zu

untersuchen, wurden daher Messungen unter erhöhtem Druck ( $p = 1.5$  kbar) durchgeführt, bei dem der Gefrierpunkt des Wassers mit etwa  $-14^\circ\text{C}$  ausreichend abgesenkt ist. Es wurden Messungen bei den Temperaturen  $0^\circ\text{C}$ ,  $-5^\circ\text{C}$  und  $-10^\circ\text{C}$  durchgeführt, mit einer Wartezeit von mindestens 5 min nach jeder Temperaturänderung.

Die Auswertung der temperaturabhängigen Gyrationen brachte jedoch einen im Rahmen des Messfehlers konstanten Wert von  $17 \text{ \AA}$  hervor und damit einen im Vergleich zur Raumtemperatur nur leicht erhöhten und mit fallender Temperatur konstanten Wert. Die Streukurve, die nach Erhöhung des Drucks und vor dem Absenken der Temperatur aufgezeichnet wurde, blieb auch nach anschließender Erwärmung auf Raumtemperatur und Wiederherstellung des Normaldrucks erhalten - die bei Normaldruck und Raumtemperatur erhaltene Streukurve war also nach den Messungen unter 1.5 kbar und  $-10^\circ\text{C}$  nicht rekonstruierbar.

Eine möglicherweise für die Denaturierung erforderliche, noch niedrigere Temperatur konnte mit der Hochdruckzelle aus Sicherheitsgründen nicht eingestellt werden (zu hohe Gefahr des Einfrierens der Flüssigkeit in der Probenzelle und eines dadurch möglichen Bruchs der Diamantfenster). Eine weitere Erhöhung des Drucks würde zwar eine tiefere Temperatur ermöglichen, jedoch würde dann bereits eine durch Druck induzierte Denaturierung einsetzen.

**Cosolventien-Einflüsse** Um die Einflüsse der Cosolventien Glycerin, Sorbitol, Kaliumsulfat, TFE, Urea und TMAO auf die Denaturierungseigenschaften zu bestimmen, wurden die druck- und temperaturabhängigen SAXS-Messungen an in Anwesenheit der jeweiligen Cosolventien wiederholt. Für die meisten Cosolventien wurden Lösungen mit einer unterschiedlich hohen Cosolvenskonzentration untersucht, um eine ggfs. vorhandene, konzentrationsabhängige Wirkung auf das Protein feststellen zu können. Wenn eine Destabilisierung des Proteins zu erwarten war, wurde ein geringerer Maximaldruck gewählt, bei einer stabilisierenden Wirkung wurden die Messungen über einen größeren Druckbereich durchgeführt und in den meisten Fällen wurde zusätzlich die hitzeinduzierte Denaturierung bei  $65^\circ\text{C}$  gemessen.

Abbildung 6.24 zeigt die druck- (schwarz) und temperaturabhängigen (grün) Gyrationen  $R_G$  bei verschiedenen Cosolvenskonzentrationen. Im Vergleich zu den bei Normaldruck erhaltenen Messwertfehlern sind die der bei höheren Drücken erhaltenen viel größer. Die Ursache dafür ist zunächst der mit zunehmendem Druck fallende Elektronendichtekontrast zwischen Protein und Lösungsmittel. Die Dicke der in der älteren Version der Probenzelle verwendeten Probenträger war zudem deutlich kleiner (und nicht immer reproduzierbar), was ein insgesamt schwächeres Streusignal und damit ein stärker verrauschtes Differenzsignal zur Folge hatte - und ebenfalls ursächlich für die vereinzelt, mit einem höheren Fehler versehenen Messungen unter Normaldruck war. Die mit 'pur' und 'TMAO' gekennzeichneten Diagramme hingegen enthalten mit der neuen Probenzelle gemessene Daten.

Wie bereits erwähnt, beobachtet man einen starken Anstieg des Wertes von  $R_G$  in einer reinen SNase-Lösung ab einem Druck von etwa 2 kbar von etwa  $16 \text{ \AA}$  auf über  $25 \text{ \AA}$ . Durch Messungen mit einer höheren Druckauflösung in [Panick98] konnte der

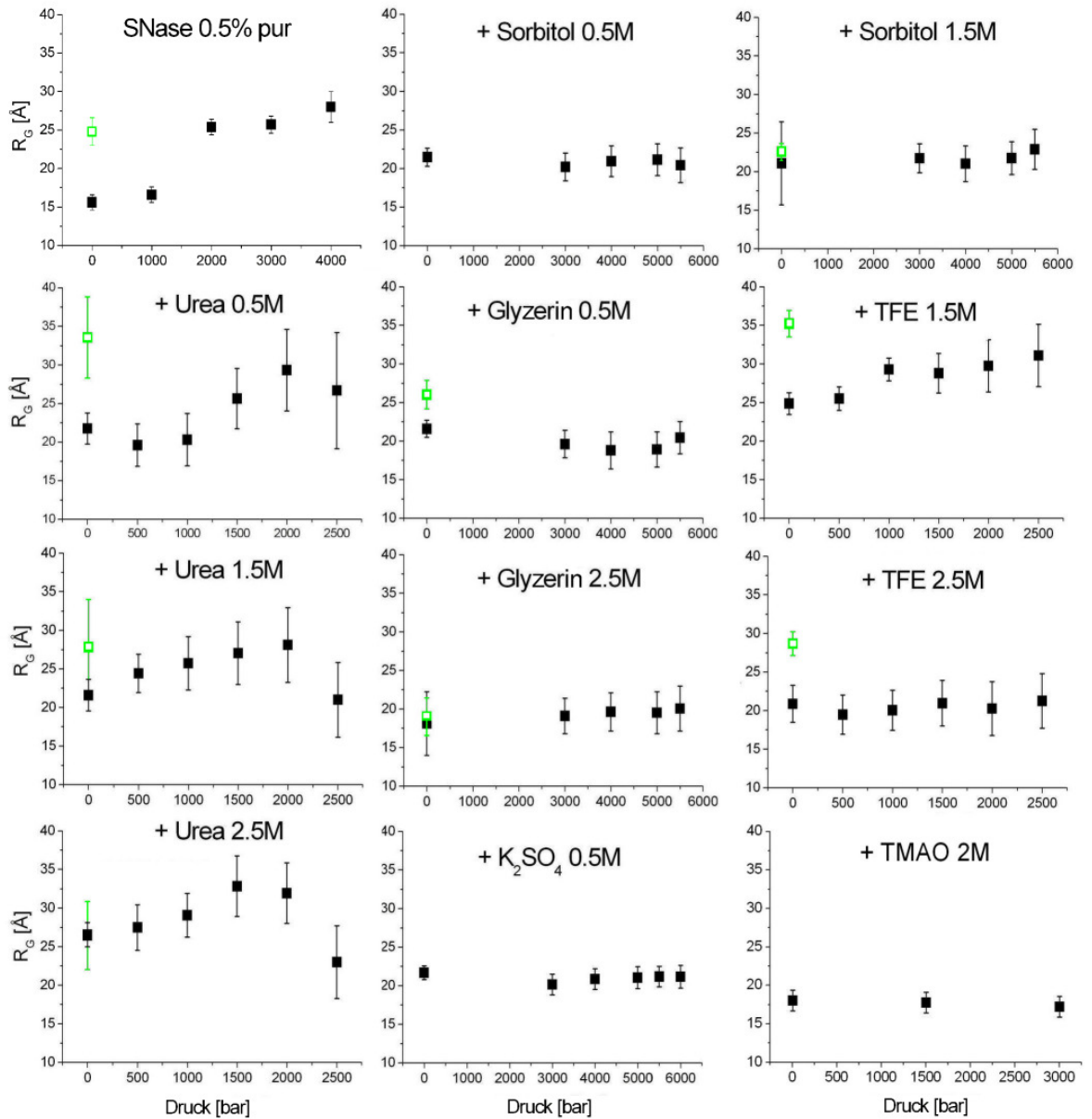


Abbildung 6.24: Druckabhängige Gyrationradien  $R_G$  für die pure SNase 0.5%wt Lösung (in 50mM Bis-Tris-Puffer bei pH 5.5) sowie für Lösungen mit unterschiedlich stark konzentrierten Cosolventien, gemessen bei  $T=26^\circ\text{C}$  (schwarze, gefüllte Vierecke). Die grünen, leeren Vierecke kennzeichnen die bei  $T=65^\circ\text{C}$  gemessenen Werte für  $R_G$  (entspricht Hitzedenaturierung).

Druck, bei dem die Entfaltung einsetzt, auf einen Wert von ca.  $p_e = 1.8$  kbar bestimmt werden. Bei höheren Drücken verändert sich der Wert von  $R_G$  offenbar nicht mehr, das System befindet sich also in einem Gleichgewichtszustand.

Die Zugabe von Urea zur Lösung führt zu einem mit steigender Konzentration reduzierten Wert für  $p_e$  sowie zu einer partiellen Entfaltung bereits unter Normaldruck. Bei einer Urea-Konzentration von  $0.5M$  kann man das Einsetzen der Denaturierung bereits bei einem Druck von unterhalb 1.5 kbar beobachten, und unter Normaldruck besitzt das Protein mit  $R_G \simeq 22 \text{ \AA}$  einen vergrößerten Wert des Gyrationradius. Mit steigender Konzentration von Urea wird dieser Effekt verstärkt: Der unter Normaldruck gemessene Gyrationradius steigt bei gleichzeitiger Abnahme des Drucks, unter dem die durch Druck induzierte Denaturierung einsetzt. Bei einer Urea-Konzentration von  $2.5M$  misst man bei Normaldruck einen Wert von  $R_G \simeq 27 \text{ \AA}$  und bereits eine Erhöhung des Drucks auf 0.5 kbar resultiert in einem Anstieg von  $R_G$ . Der bei 2 kbar gemessene Wert des Gyrationradius liegt mit  $R_G \simeq 32 \text{ \AA}$  deutlich über dem in einer reinen Lösung gemessenen Wert bei gleichem Druck. Allerdings ist das Verhältnis der Gyrationradien bei Normaldruck und bei hohem Druck in Anwesenheit von Urea stets geringer als in der reinen Lösung.

Der im hitzedenaturierten Zustand bei der höchsten Urea-Konzentration erhaltene Wert für  $R_G$  weist im Rahmen des Fehlers keine Tendenz auf, die eine Abhängigkeit von der Urea-Konzentration erkennen lässt. Angesichts der relativ schlechten Statistik der bei  $65^\circ C$  gemessenen Werte für die gesamte Urea-Messreihe muss diese Aussage jedoch ggfs. verifiziert werden.

Von Urea ist bekannt, dass es vornehmlich an die an der Proteinoberfläche positionierten Peptidbindungen bindet und eine partielle Entfaltung fördert, da dadurch noch mehr Stellen dem Cosolvens ausgesetzt werden, an den es Bindungen eingehen kann. Dadurch entsteht mit zunehmender Konzentration eine *random coil* Struktur [Herberhold], die durch anschließenden Druckeinfluss nicht mehr in dem selben Maße entfalten kann wie die native Struktur. Das erklärt einerseits den größer werdenden Wert von  $R_G$  bei Normaldruck und andererseits die kleinere, durch Druck induzierte, relative Zunahme von  $R_G$ .

Der Abfall des Wertes von  $R_G$  bei 2.5 kbar, der in den Daten sichtbar ist und tendenziell mit höherer Urea-Konzentration stärker wird, kann ebenfalls auf diesen Effekt zurückgeführt werden. Durch die immer stärkere Entfaltung erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass durch Einfluss der Röntgenstrahlung Bindungen innerhalb der Peptidkette aufgebrochen werden (Strahlungsschäden) und das Protein fragmentiert, was sich letztendlich in einem Abfall der mittleren Größe und damit auch des Gyrationradius bemerkbar macht.

Für die beiden Zuckerarten Sorbitol und Glycerin beobachtet man einen stark stabilisierenden Effekt der Cosolventien auf die Tertiärstruktur von SNase, der innerhalb des erfassten Druckbereichs keine Abhängigkeit von der Konzentration der Cosolventien aufweist (Konzentrationen  $0.5, 1.5$  und  $2.5M$ ). Zwar lässt sich bereits bei Normaldruck ein leicht erhöhter Wert des Gyrationradius feststellen (im Rahmen der Messfehler liegt er stets bei  $R_G \simeq 22 \text{ \AA}$ ), dieser bleibt jedoch über einen weiten Druckbereich von



bis zu 5.5 kbar im Rahmen der Messgenauigkeit konstant. Die bei  $65^\circ\text{C}$  gemessenen Werte für  $R_G$  liegen überwiegend deutlich unterhalb des an der reinen Lösung gemessenen und weisen damit auf einen auch bezüglich der Hitzeinduzierung stabilisierenden Effekt hin.

Die Stabilisierung des Proteins gegen druck- und hitzeinduzierte Denaturierung in Gegenwart der beiden Zuckerarten läßt sich zurückführen auf einen Effekt, den man als *preferential hydration* bezeichnet. Die stark hydrophilen Moleküle wechselwirken stark mit Wassermolekülen und besitzen eine nur geringe Affinität, Bindungen mit den polaren Gruppen der Proteinoberfläche einzugehen. Es kommt dadurch zu einem Ausschluss der Cosolventienmoleküle aus der Hydratationsschicht des Proteins [Mitra]. Dies resultiert in einer Zunahme der freien Enthalpie der Stabilisierung  $\Delta G_0$  [Herberhold], so dass ein höherer Druck bzw. eine höhere Temperatur erforderlich ist, um die Denaturierung zu induzieren. Die leicht erhöhten Werte von  $R_G$  bereits bei Normaldruck können durch die ebenfalls stabilisierte Hydratationsschicht erklärt werden, die eine gegenüber dem Cosolvens-freien Lösungsmittel größere Dicke besitzt.

In Anwesenheit von Kaliumsulfat ( $0.5M$  Konzentration) erfährt das Protein ebenfalls einen stark stabilisierenden Effekt, mit einem im selben Maße bei Normaldruck erhöhten Wert des Gyrationradius ( $R_G \simeq 22 \text{ \AA}$ ), der bis zu einem Druck von 6 kbar unverändert bleibt. Dieser Effekt wird durch die ladungsabschirmende Wirkung der Sulfationen hervorgerufen, die eine Reduktion der Nettoladung der positiv geladenen Aminosäureseitenketten zur Folge hat und das Protein dadurch in sich stabilisiert [Mitra].

Die Messungen an Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Alkohols TFE zeigen ein Zweiphasenverhalten. Bei der geringeren Konzentration von  $1.5M$  ist eine Destabilisierung zu beobachten, gekennzeichnet durch den bei Normaldruck deutlich erhöhten Wert des Gyrationradius ( $R_G \simeq 25 \text{ \AA}$ ) und einer bereits unterhalb von 1 kbar einsetzenden, druckinduzierten Denaturierung, die oberhalb von 1 kbar zu einem nur noch leicht höheren Wert von  $R_G \simeq 30 \text{ \AA}$  führt. Bei der höheren TFE-Konzentration ( $2.5M$ ) hingegen erhält man einen wie schon bei Glycerin, Sorbitol und Kaliumsulfat beobachteten, stabilisierenden Effekt, mit einem bei Normaldruck bereits leicht erhöhten Wert des Gyrationradius ( $R_G \simeq 21 \text{ \AA}$ ), der über den untersuchten Druckbereich (hier nur bis 2.5 kbar) im Rahmen der Genauigkeit der Messung konstant bleibt.

Es ist bekannt, dass Alkohole in der Lage sind, Änderungen der Sekundärstruktur herbeizuführen, bei gleichzeitiger Stabilisierung der Tertiärstruktur [Hirota]. Dies führt bei hoher Cosolventkonzentration mitunter zu einer *molten globule* Konformation. Diese ist eine mögliche Erklärung für den deutlich erhöhten Wert von  $R_G$  bei der TFE-Konzentration von  $1.5M$ , der zudem mit steigendem Druck nur noch wenig ansteigt (bedingt durch den bereits bei Normaldruck hohen entfalteten Anteil). Die höhere TFE-Konzentration ( $2.5M$ ) hingegen besitzt offenbar eine stabilisierende Wirkung auf eine kleinere Konformation, die bis zu einem Druck von 2.5 kbar keine druckinduzierte Entfaltung erfährt. Die für beide TFE-Konzentrationen durch hitzeinduzierte Denaturierung allerdings deutlich höheren Werte des Gyrationradius deuten allerdings auf eine möglicherweise unter höheren als den gemessenen Drücken doch noch einsetzende bzw. weiter zunehmende druckinduzierte Entfaltung.

Für das letzte untersuchte Cosolvens TMAO erkennt man innerhalb des Druckbereichs bis 3kbar nicht nur eine gegen druckinduzierte Denaturierung stark stabilisierende Wirkung auf das Protein, dieses scheint darüber hinaus eine der nativen sehr ähnliche Konformation beibehalten zu können. Die Streukurven der Messungen an SNase in Gegenwart von TMAO (hier nicht gezeigt) besitzen einen im Vergleich zu den an Cosolvens-freien Lösungen erhaltenen Streukurven sehr ähnlichen Verlauf, und auch der Gyrationradius liegt mit  $R_G \simeq 17 \text{ \AA}$  viel näher an dem des von Cosolventien unbeeinflussten, globulären Proteins.

Von TMAO ist bekannt, dass es in der Lage ist, biologisch relevante, native Konformationen von Proteinen selbst in Anwesenheit stark denaturierender Substanzen (wie z.B. hoher Konzentrationen von Urea) wiederherzustellen<sup>35</sup>, indem es die entfaltete Konformation destabilisiert und das Gleichgewicht in Richtung der nativen Konformation verschiebt [Mello]. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine auch bezüglich der Druckdenaturierung stark stabilisierende Wirkung von TMAO hin.

Eine zusammenfassende Übersicht der Effekte der Cosolventien auf die Konformationsstabilität des Proteins SNase ist in der folgenden Tabelle gegeben:

Cosolvens	Effekt auf Druckdenaturierung	Effekt auf Hitzedenaturierung
Urea	destabilisierend (konz.abh.)	destabilisierend (konz.abh.)
Sorbitol	stabilisierend (konz.unabh.)	stabilisierend (konz.unabh.)
Glyzerin	stabilisierend (konz.unabh.)	stabilisierend (konz.unabh.)
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	stabilisierend	- nicht untersucht -
TFE	zweiphasig	stabilisierend
TMAO	stabilisierend	- nicht untersucht -

Zusammenfassung der Cosolvenseinflüsse auf die Stabilität des Proteins SNase

<sup>35</sup>Die Zugabe von TMAO zur Lösung einer instabilen, unter Normalbedingungen bereits voll entfaltenen SNase-Mutation (T62P) induziert eine vollständige Rückfaltung [Baskakov].

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modularer Aufbau entwickelt, welcher an der Vielzweck-Beamline BL9 der Dortmunder Elektronenspeicherringanlage DELTA Experimente zur Messung der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) an flüssigen Proben ermöglicht. Die Konzeptionierung des Aufbaus ermöglicht eine leichte Aufbau- und Zerlegbarkeit des SAXS-Instruments, welches zudem an die beschränkten räumlichen Gegebenheiten angepasst ist und die vielfältige Nutzung der Strahllinie BL9 für andere Arten von Experimenten nicht beeinträchtigt. Das SAXS-Instrument kann in zwei Betriebsmodi (Helium- oder Vakuum-Setup) verwendet werden. Für die Aufzeichnung der gestreuten Intensität wird ein 2-dimensional ortsauflösender Detektor (MAR345) verwendet.

Zur Aufnahme der flüssigen Probe stehen zwei verschiedene Probenumgebungen zur Verfügung: Eine Temperaturzelle steht zur Verfügung für Messungen unter Normaldruck und/oder wenn eine möglichst verzögerungsfreie Temperierung der Probe notwendig ist. Für druckabhängige Messungen und/oder falls die flüssige Probe nur in einer kleinen Menge zur Verfügung steht, kann die Hochdruckzelle verwendet werden, in der das flüssige Probenvolumen einem Druck von bis zu 7 kbar ausgesetzt werden kann.

Für die Eichung der geometrischen Parameter des SAXS-Setups nach dessen Auf- oder Umbau wird die Kalibriersubstanz Silberbehinat verwendet. Mit Hilfe von Messungen an reinem Wasser können die im jeweiligen Experiment minimal und maximal zugänglichen  $q$ -Werte bestimmt werden.

Es wurden Messungen an wässrigen Lösungen der Proteine Lysozym, Insulin und Staphylokokken Nuclease (SNase) an der Beamline BL9 durchgeführt und um zusätzliche Messungen an externen Strahlungsquellen ergänzt (HASYLAB, APS, Universität Helsinki).

Sowohl die Kalibriermessungen als auch die an externen Strahlungsquellen aufgezeichneten Daten belegen eine hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der mit dem neuen SAXS-Instrument der Beamline BL9 gemessenen Daten. Sowohl im Hinblick auf den zugänglichen  $q$ -Bereich als auch auf das Signal-Rausch-Verhältnis ist das SAXS-Instrument der Beamline BL9 durchaus vergleichbar mit den an externen Quellen (fest) installierten Aufbauten. Dies ist insbesondere gerade wegen der Tatsache, dass das SAXS-Instrument der Beamline BL9 einem häufigen Auf- und Wiederabbau unterliegt, nicht zuletzt ein Beleg für die hohe Präzision der Komponenten des SAXS-Instruments und die daraus resultierende, sehr gute Reproduzierbarkeit des Aufbaus.

Die an Lysozym durchgeführten Messungen ermöglichten eine ausführliche Charakterisierung des in Lösung befindlichen Proteins. Es wurde der Gyrationradius  $R_G$  bestimmt und die Streukurve konnte mit sehr guter Übereinstimmung an ein vorhandenes 3D-Molekülmodell angepasst werden. Mittels direkter Fouriertransformation der Streukurve konnte die Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  der in Lösung befindlichen Proteinnmoleküle bestimmt werden, die auf eine ellipsoidale tertiäre Struktur des Lysozymmoleküls deutete. Diese Erkenntnis konnte durch eine *ab initio* Strukturrekonstruktion

des Proteinmoleküls und durch den Vergleich des aus den 3D-Moleküldaten erhaltenen Proteinmodells bestätigt werden. Eine konzentrationsabhängige, intermolekulare Wechselwirkung zwischen in Lösung befindlichen Proteinmolekülen konnte über die zugehörigen Strukturformfaktoren  $S(q, c)$  bestimmt werden. Die Analyse der aus den Streukurven berechneten Strukturformfaktoren ergab ein repulsives, mit steigender Konzentration stärkeres Wechselwirkungspotenzial. Eine Veränderung des Wechselwirkungspotenzials in Anwesenheit verschiedener Cosolventien (NaCl, Glycerin, TFE) konnte über die berechneten Strukturformfaktoren  $S(q, c)$  erstmalig bestimmt werden. In einer NaCl-haltigen Lösung wird die repulsive Wechselwirkung der Lysozymmoleküle mit steigender NaCl-Konzentration zunehmend geschwächt und schließlich in eine attraktive Wechselwirkung gewandelt. Die Anwesenheit von Glycerin, ebenso wie von TFE hat eine nur leicht abschwächende Wirkung auf das repulsive Wechselwirkungspotenzial. Im Falle des Alkohols TFE konnte jedoch darüber hinaus eine Störung der Tertiär-Struktur des Proteins nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Gyrationradien des Proteins in niedrigkonzentrierten Lösungen in Anwesenheit der genannten Cosolventien zeigte eine einsetzende Aggregation der Proteine mit zunehmender NaCl-Konzentration sowie eine bei hoher TFE-Konzentration stark vergrößerte Konformation auf. Für Glycerin konnte keine Auswirkung auf den Wert von  $R_G$  beobachtet werden.

Eine ähnliche Charakterisierung wurde an dem amyloidogenen Protein Insulin in seiner dimeren Konformation durchgeführt. Neben der Bestimmung des Gyrationradius  $R_G$  konnte die Streukurve mit größtenteils guter Übereinstimmung an ein 3D-Dimermodell angepasst werden. Mittels direkter Fouriertransformation der Streukurve konnte die Paarverteilungsfunktion  $p(r)$  der in Lösung befindlichen Proteinmoleküle bestimmt werden, die auf eine von der Kugelform stark abweichende tertiäre Struktur des Insulindimers deutete. Diese Erkenntnis konnte durch eine *ab initio* Strukturrekonstruktion des Proteinmoleküls und durch den Vergleich des aus den 3D-Moleküldaten erhaltenen Proteinmodells bestätigt werden. Eine konzentrationsabhängige, intermolekulare Wechselwirkung zwischen in Lösung befindlichen Proteinmolekülen konnte für Lösungen mit einer Konzentration von bereits mehr als 0.5%wt bestimmt werden. Die Analyse der aus den Streukurven berechneten Strukturformfaktoren ergab ein attraktives Potenzial, welches die Entstehung von Clustern mit einer konzentrationsabhängigen Größenverteilung fördert. Eine Veränderung des Wechselwirkungspotenzials in Anwesenheit verschiedener Cosolventien (NaCl, Ethanol) konnte über die berechneten Strukturformfaktoren  $S(q, c)$  erstmalig bestimmt werden. In einer NaCl-haltigen Lösung wird die attraktive Wechselwirkung deutlich verstärkt, und es kommt zur Bildung von höheren Oligomeren. Die Anwesenheit von Ethanol schwächt das repulsive Potenzial hingegen und fördert darüber hinaus die Zersetzung der Dimere in Monomere. Die Analyse der Gyrationradien des Proteins in niedrigkonzentrierten Lösungen in Anwesenheit der genannten Cosolventien lieferte einen für eine vorwiegende Monomerpopulation des Proteins in Anwesenheit von Ethanol zutreffenden Gyrationradius. Für NaCl konnte bereits in Anwesenheit einer geringen Konzentration ein deutlicher Anstieg des Wertes von  $R_G$  beobachtet werden, der so auf eine Aggregation der Insulindimere deutet.

Die Messungen am Protein SNase wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Einflüsse

verschiedener Cosolventien auf die Eigenschaften dessen druck- und temperaturinduzierten Denaturierung zu bestimmen. Die Streukurve der reinen Proteinlösung unter Normaldruck und Raumtemperatur konnte gut an ein existierendes Proteinmodell angepasst werden. Es wurden Messungen unter erhöhtem Druck von bis zu 6 kbar sowie bei erhöhter Temperatur ( $65^{\circ}\text{C}$ ) an reinen SNase Lösungen sowie an Lösungen, die die Cosolventien Glycerin, Sorbitol, Kaliumsulfat, TFE, Urea und TMAO enthielten, durchgeführt. Eine anschließende, erstmalige Analyse der druck- und temperaturabhängigen Gyrationenradien in diesen Lösungen ermöglichte eine Bestimmung der stabilisierenden oder destabilisierenden Einflüsse der Cosolventien.

Eine durch Kälte induzierte Denaturierung konnte für das Protein SNase im Rahmen der zugänglichen Druck- und Temperaturwerte nicht beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit den bekannten Wirkungen der genannten Cosolventien auf in wässriger Lösung befindliche Proteine wurde für Urea-haltige Lösungsmittel eine mit der Urea-Konzentration zunehmende, sowohl bei Einfluss von Druck als auch Hitze destabilisierende Wirkung auf die Konformation des Proteins festgestellt. Für die beiden Zuckerarten Glycerin und Sorbitol wurde erwartungsgemäß eine stark gegen Druck und Temperatur stabilisierende Wirkung beobachtet. Eine ähnliche Wirkung besitzt das Salz Kaliumsulfat, für das ebenfalls eine stark stabilisierende Wirkung zu erwarten war. Unter Zugabe des Alkohols TFE zeigte sich ein zweiphasiges Verhalten, das bei kleiner Konzentration destabilisierend und bei höherer Konzentration stabilisierend auf die durch Druck induzierte Denaturierung wirkt. In beiden Fällen konnte jedoch eine stärkere, durch Hitzeeinwirkung induzierte Entfaltung beobachtet werden. Die Anwesenheit des stark stabilisierenden Cosolvens TMAO resultierte in einer gegenüber der nativen Konformation fast unveränderten Struktur, die zudem über einen im Vergleich zur Cosolvens-freien Proteinlösung größeren Druckbereich erhalten blieb.

Zusammenfassend hat sich der im Zuge dieser Arbeit entwickelte Aufbau in jeder Hinsicht bewährt, sowohl für Messungen unter Normalbedingungen als auch unter für biologische Systeme extremen Parametern, wie erhöhter Temperatur sowie hohem Druck. Für eine weitere Optimierung der an diesem Aufbau künftig zu erzielenden Ergebnisse wäre insbesondere eine Verbesserung der Stabilität des Strahlschwerpunkts nach Injektionen wünschenswert. In Kombination mit dem aktiven Beamstop wären damit auch bei längeren Messungen deutlich zuverlässigere Normierungswerte zugänglich, die sich letztendlich positiv auf die Qualität der in SAXS-Experimenten an Proteinlösungen typischen Differenzspektren auswirken würde.



# A Technischer Anhang

In den folgenden Kapiteln sind technische Zeichnungen, Abbildungen, Schaltpläne und relevante Zusatzinformationen zu einigen im Zuge dieser Arbeit entwickelten Komponenten zu finden. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Komponenten(syteme):

- die elektronische Ankopplung der Absorber/Shutter-Elektronik
- die Streustrahlung-führenden Komponenten des Vakuum- und Heliumflightpaths
- die Hochdruckzelle und die Temperaturzelle
- der Detektorausleger
- die elektronische Bremsensteuerung
- die Patchfelderweiterung

## A.1 Die Absorber/Shutter-Elektronik

Die Steuermodule (2x XIA PFCU-4), welche die pneumatischen Ventile des Shutter/Absorbersystems betätigen, werden über rückseitige Eingänge elektronisch gesteuert (eine manuelle Steuerung ist über die Bedienelemente an der Frontblende möglich). Die elektronische Ankopplung an den Beamline-Computer erfolgt über eine dreistufige Signalkette, wie schematisch in Abbildung A.1 gezeigt. Über eine serielle Schnittstelle wird über die Beamline-Software ein 16-Kanal-Register adressiert, in dem 8 Kanäle für die Steuerung des Systems zur Verfügung stehen (6 Absorber + 2 Shutter). Das Register stellt an seinen Ausgangsports je nach Zustand (an oder aus) ein *high* bzw. *low* Signal nach der NIM-Pegelnorm<sup>36</sup> bereit. Diese werden über einen NIM-TTL-Wandler an die TTL-Pegel angepasst<sup>37</sup>. Allerdings sind die Ausgänge des NIM-TTL-Wandlers nicht kurzschlussfest, d.h. sie sind nicht in der Lage, an den niederohmigen TTL-Eingängen der PFCU-Module die für ein *high* Signal erforderliche Potenzialdifferenz aufrecht zu erhalten.

Aus diesem Grund ist ein Pegelwandler zwischengeschaltet, welcher das TTL-Signal des NIM-TTL-Wandlers über eine Emitterschaltung nutzt, um den jeweiligen *PFCU*-Eingang auf das Potential der Masse zu legen und damit das jeweilige Ventil zu steuern. Der in einem Gehäuse untergebrachte 8-Kanal-Pegelwandler ist über Koaxial-Buchsen (TTL Input) sowie SUB-D-Buchsen (*PFCU* Output) mit dem NIM-TTL-Wandler und den *PFCU*-Modulen zu verbinden. Eine zweite Reihe Koaxialbuchsen stellt den Status jedes Ventils als TTL-Signal zur Verfügung (Status Output). Die Schaltung und weitere Details zum Aufbau des sind in der Abbildung A.2 dargestellt.

---

<sup>36</sup>NIM, *Nuclear Instrumentation Module*, Eingangspegel (an  $50\ \Omega$ ):  $U_E < -0.6\ \text{V}$  entspricht *high* (max.  $0.018\ \text{mA}$ );  $U_E > -0.2\ \text{V}$  entspricht *low* (max.  $1\ \text{mA}$ ).

<sup>37</sup>TTL, *Transistor Transistor Logic*, Eingangspegel:  $U_E > 2.0\ \text{V}$  entspricht *high* (max.  $0.04\ \text{mA}$ );  $U_E < 0.8\ \text{V}$  entspricht *low* (max.  $1.6\ \text{mA}$ ).

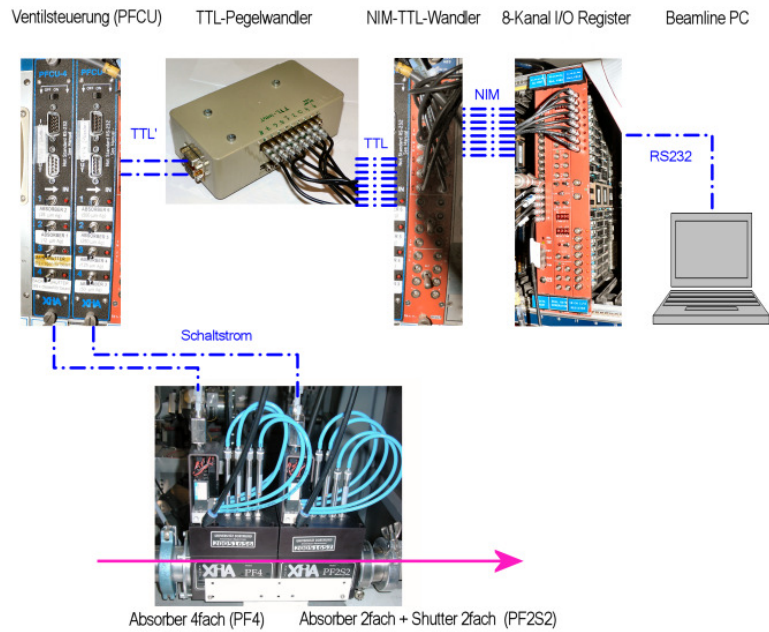
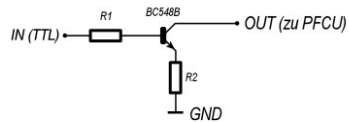
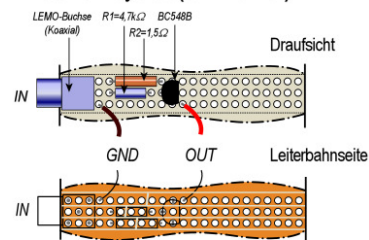


Abbildung A.1: Signalweg des Absorber-/Shuttersystems

Schaltung (ein Kanal)



Platinenlayout (ein Kanal)



Innenaufbau

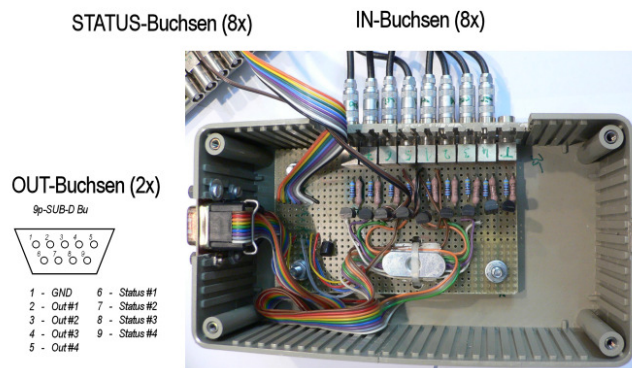


Abbildung A.2: Aufbau des TTL-Pegelwandlers



## A.2 Helium- und Vakuum-Flightpath

Die folgende Abbildung zeigt die Komponenten des Helium-Flightpaths (Strang B), die alle miteinander verflanscht werden können.

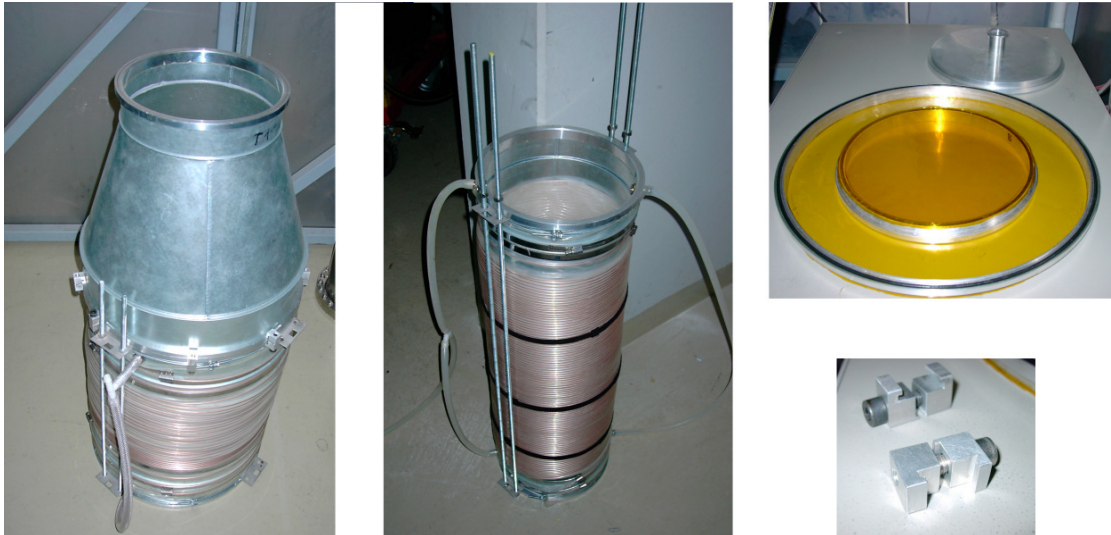


Abbildung A.3: Links: großer Balg mit angeflanschem Reduzierstück und Stabilisationsstangen. Mitte: kleiner Verlängerungsbalg mit Stabilisationsstangen. Rechts oben: großes sowie kleines Kaptonfenster (vorne) und mit einem KF-Flansch versehene Abschlusskomponente (hinten). Rechts unten: Klemmelemente zum Verflanschen der Flightpathkomponenten.

Die folgende Abbildung zeigt die Komponenten des Vakuum-Flightpaths (Strang B), das mit seinem kleinen Ende direkt an die Hochdruck-Probenzelle angeflanscht werden kann.



Abbildung A.4: Links+Mitte: Vakuum-Rohr. Rechts: Auf Trägerring aufgeklebtes Kaptonfenster, das mittels einer CF-200 Kupferdichtung und des Andruckrings mit dem Vakuumrohr verbunden wird.

### A.3 Die Hochdruck- und Temperaturzelle

Es folgen technische Zeichnungen der Hochdruckzelle und der Temperaturzelle (für eine Übersicht der einzelnen Bauteile siehe Kapitel 4.7.2 bzw. 4.7.3) sowie relevante Zusatzinformationen.

Für die Verbindung der Hochdruckzelle mit dem Pumpensystem <sup>38</sup> stehen zwei Standard-Hochdruckanschlüsse mit konusförmigen Anpressflächen zur Verfügung [Sherman], [Bradley]. Abbildung A.5 zeigt einen Querschnitt durch einen solchen Hochdruckanschluss. Die hochdruckfeste Dichtungswirkung zur Rohrleitung wird erzielt durch die leicht unterschiedlichen Anstellwinkel der an beiden Komponenten vorhandenen Konusflächen zur Symmetrieachse. Im zusammengesetzten Zustand besteht die Kontaktfläche zwischen beiden Konusflächen im Wesentlichen aus einem dünnen Kreisring, dementsprechend hoch ist der Druck innerhalb dieser Kontaktfläche, wenn die maximale Anpresskraft der *Gland*-Mutter erzielt wird (erforderliches Anzugsdrehmoment: 45 N m).

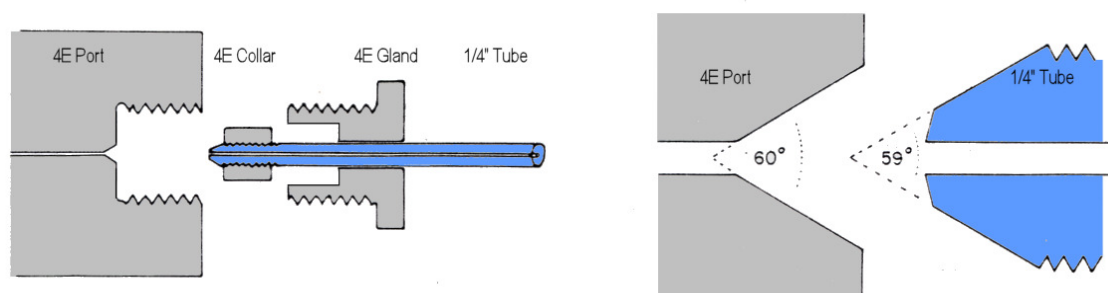


Abbildung A.5: Links: Schnittbild eines Hochdruckanschlusses (Bezeichnungen gemäß *NovaSwiss* 7kbar-Spezifikationen) Rechts: Vergrößerung der *Tube-Port*-Kontaktfläche.

<sup>38</sup>Hersteller des Pumpensystems ist die Firma *NovaSwiss, Schweiz* (<http://www.novaswiss.com>)

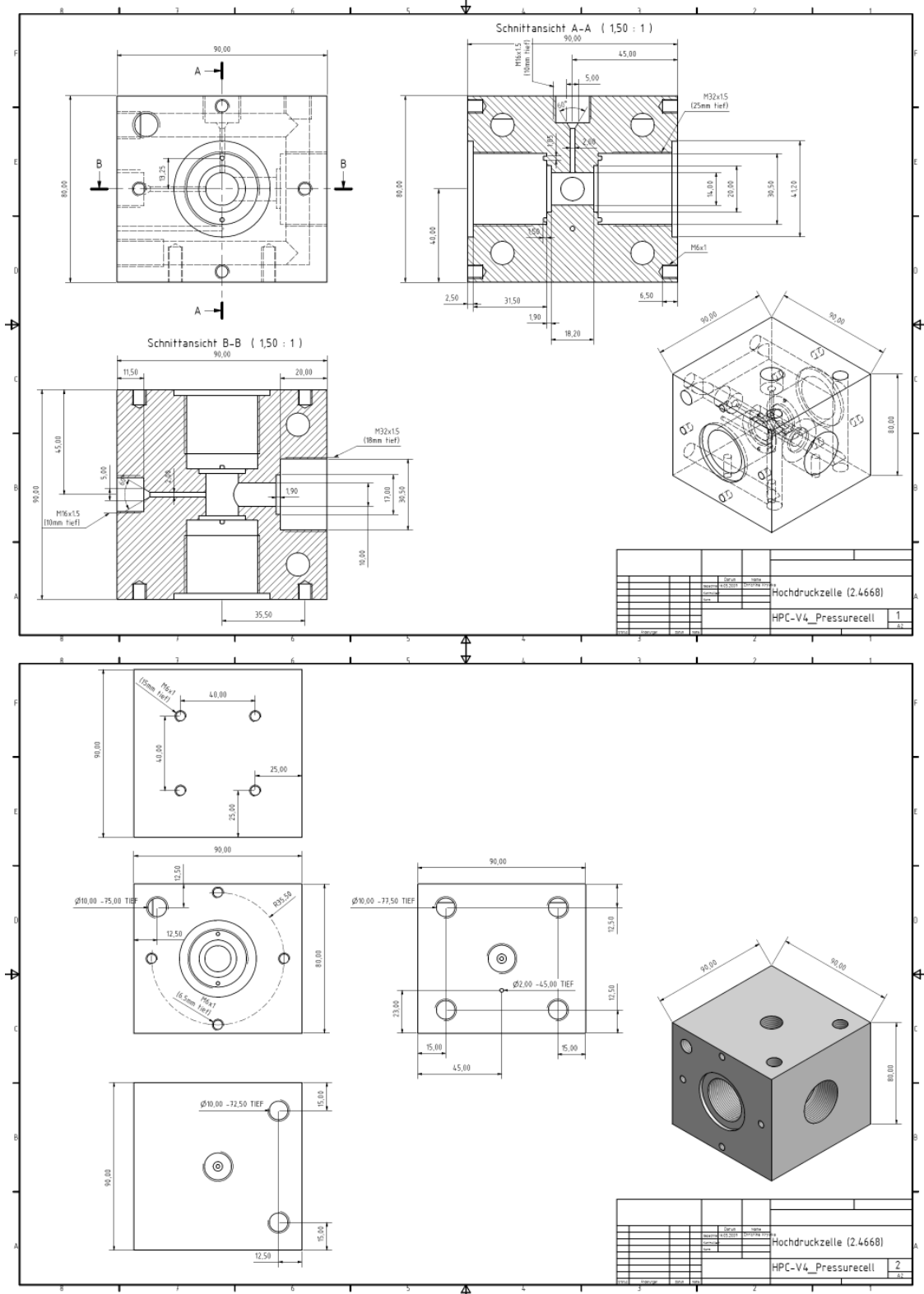


Abbildung A.6: Technische Zeichnungen der Hochdruckzellenkomponenten

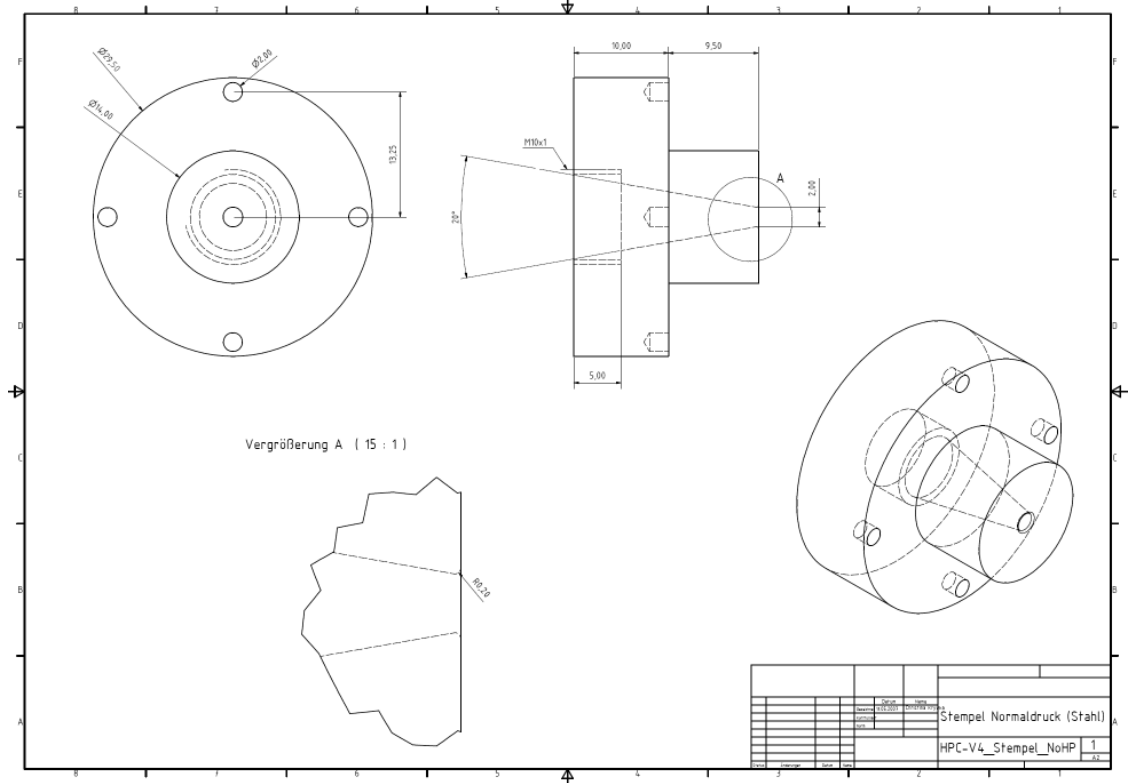
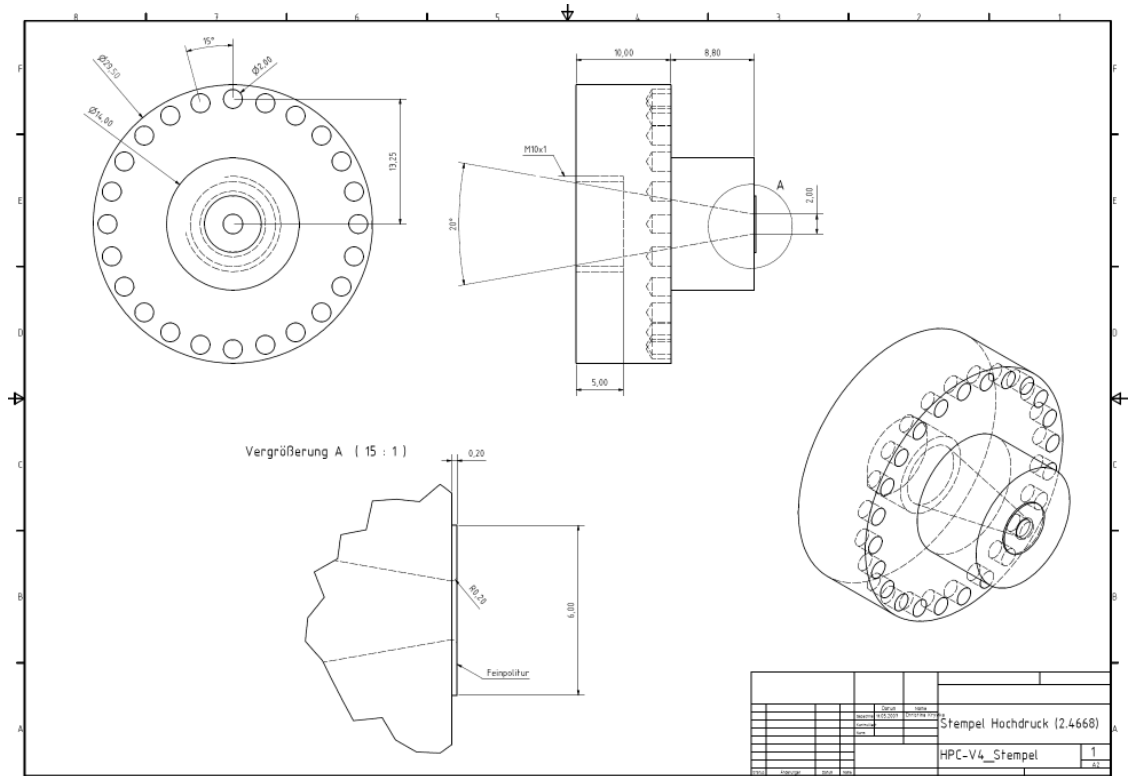


Abbildung A.7: Technische Zeichnungen der Hochdruckzellenkomponenten

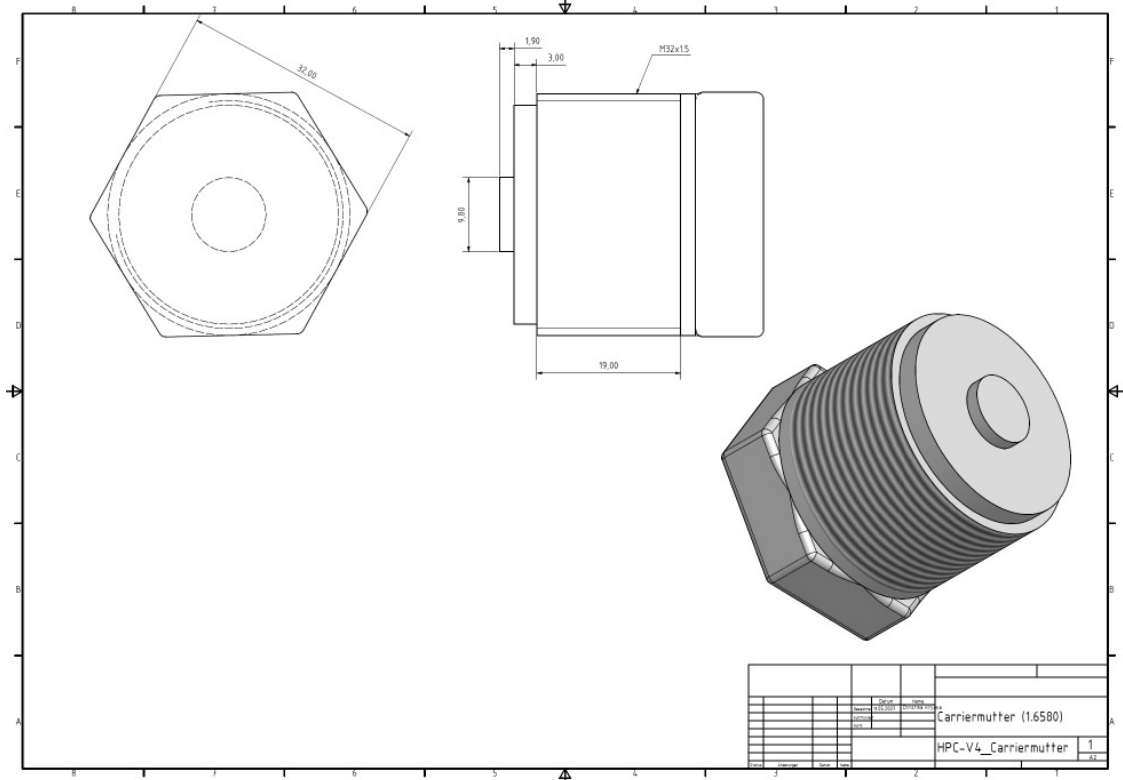
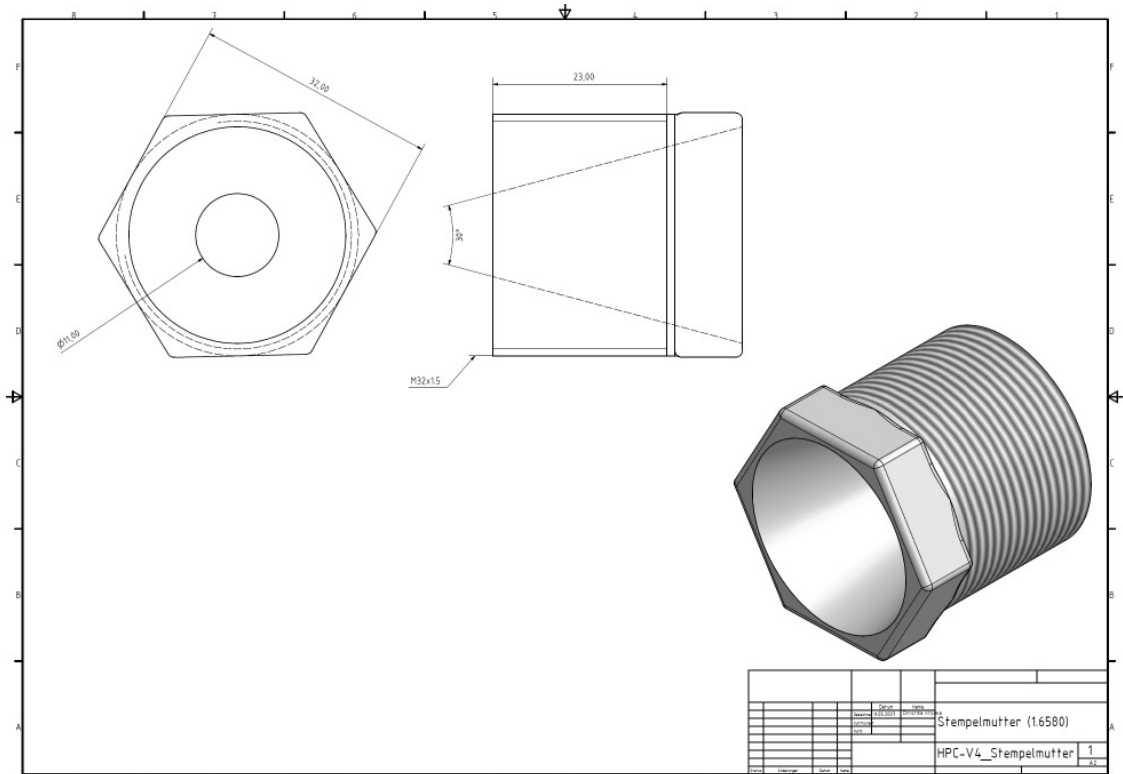


Abbildung A.8: Technische Zeichnungen der Hochdruckzellenkomponenten

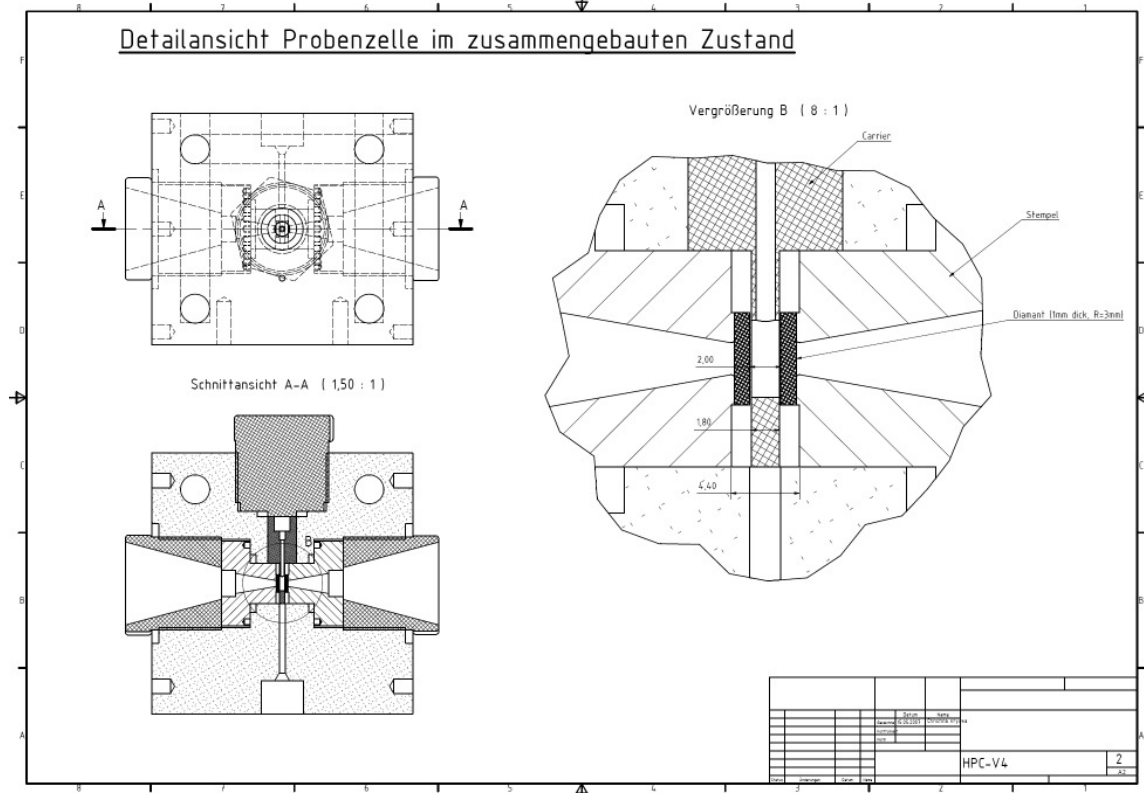
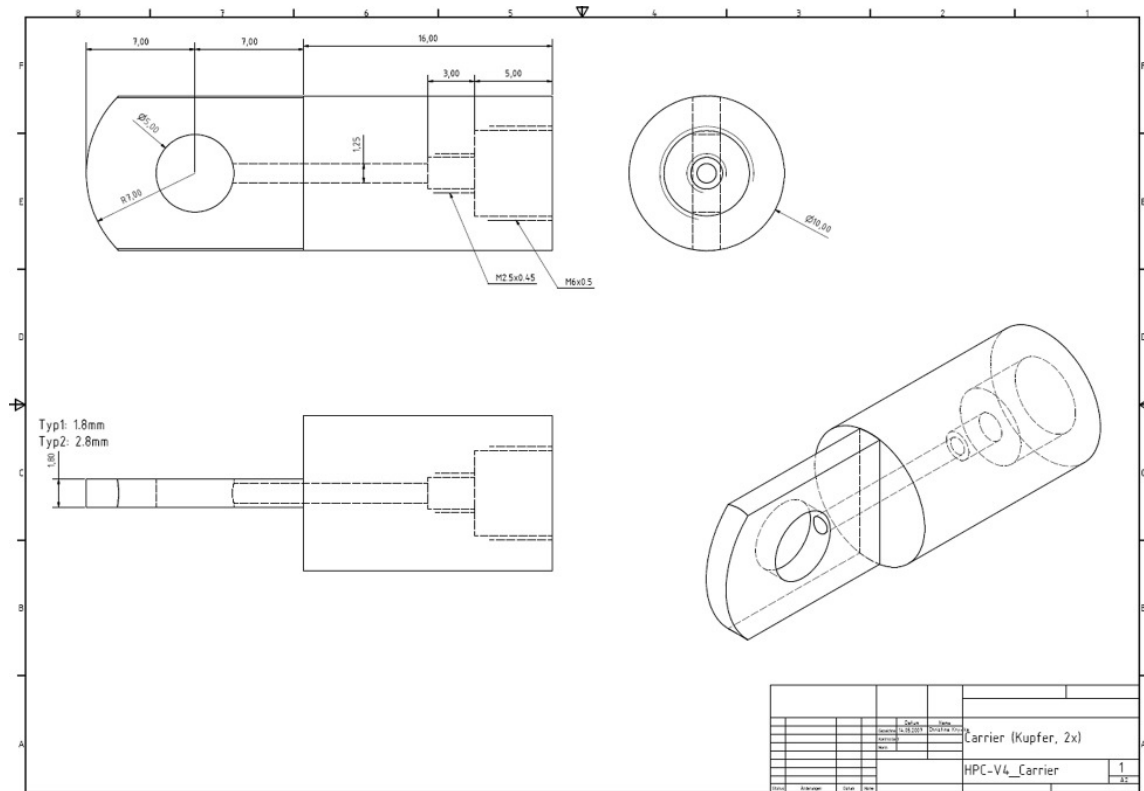


Abbildung A.9: Technische Zeichnungen der Hochdruckzellenkomponenten



## A.4 Der Detektorausleger

Bei den Komponenten des Detektorpositionierungssystems handelt es sich um Bauteile der Hersteller Iselautomation KG (Linearantriebe und Führungsschienen) und Phytron-Elektronik GmbH (Schrittmotoren, Getriebe, Bremse), deren mechanische Anpassung aneinander mittels zusätzlich entwickelter Bauteile erfolgte (Motorflansche, Verbindungselemente). Ausführliche technische Details zu den zugekauften Komponenten können anhand deren Typbezeichnungen über die jeweiligen Hersteller erhalten werden.

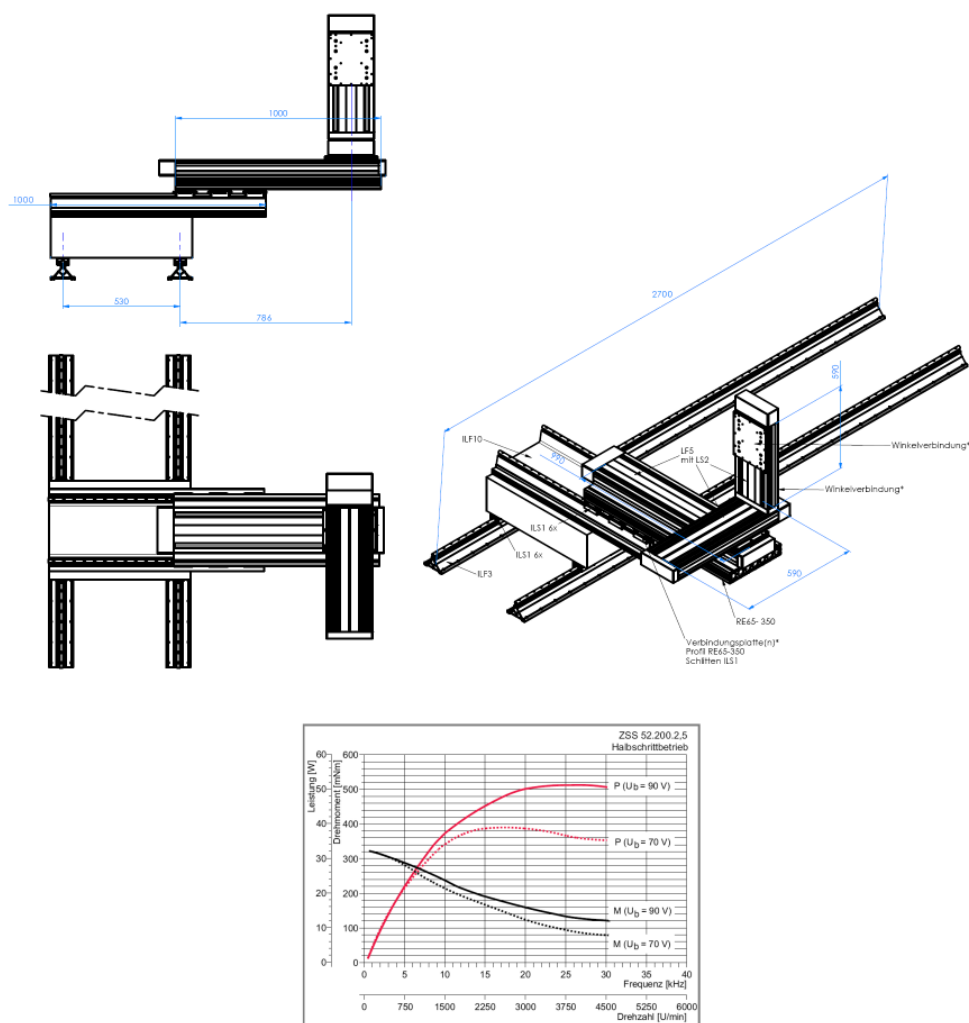
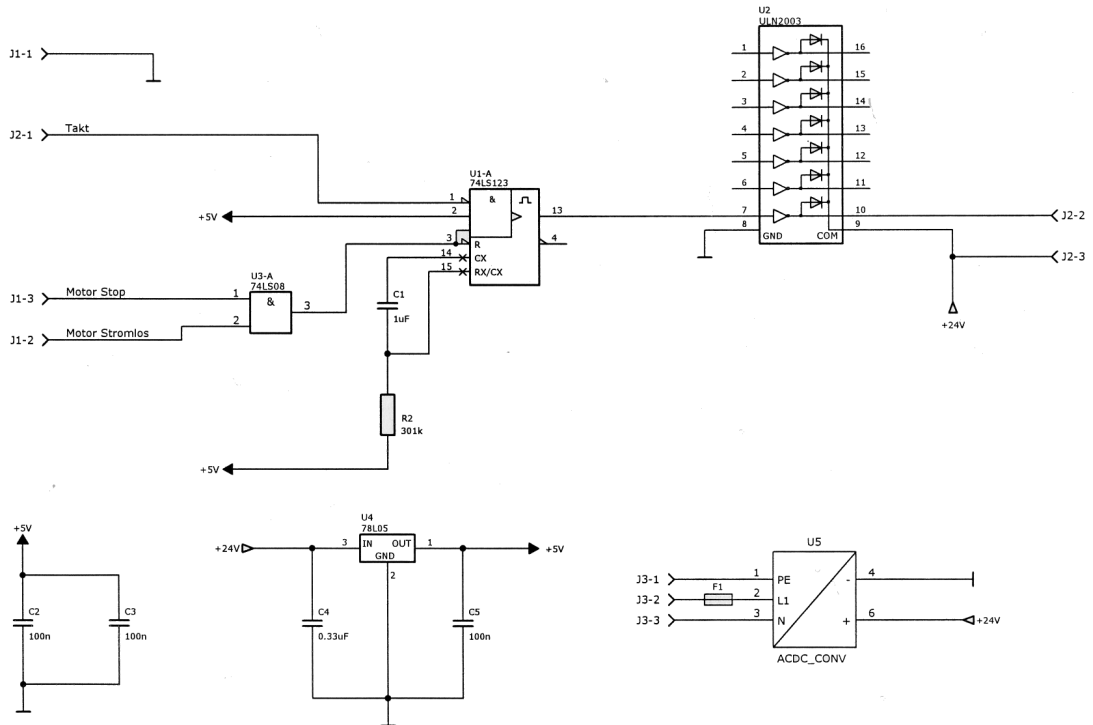


Abbildung A.11: Oben: Aufbau und Dimensionen der Komponenten des Detektorauslegers. Die Bezeichnungen der Bauteile entsprechen den des Herstellers iselautomation KG, Eichenzell. Unten: Kennlinien der im Detektorausleger eingebauten Schrittmotoren (für den y-Antrieb ist das Drehmoment durch die 8fache Untersetzung entsprechend höher). Entnommen aus dem Datenblatt der ZSS-Motoren, Phytron-Elektronik GmbH.



## A.5 Die Bremssteuerung




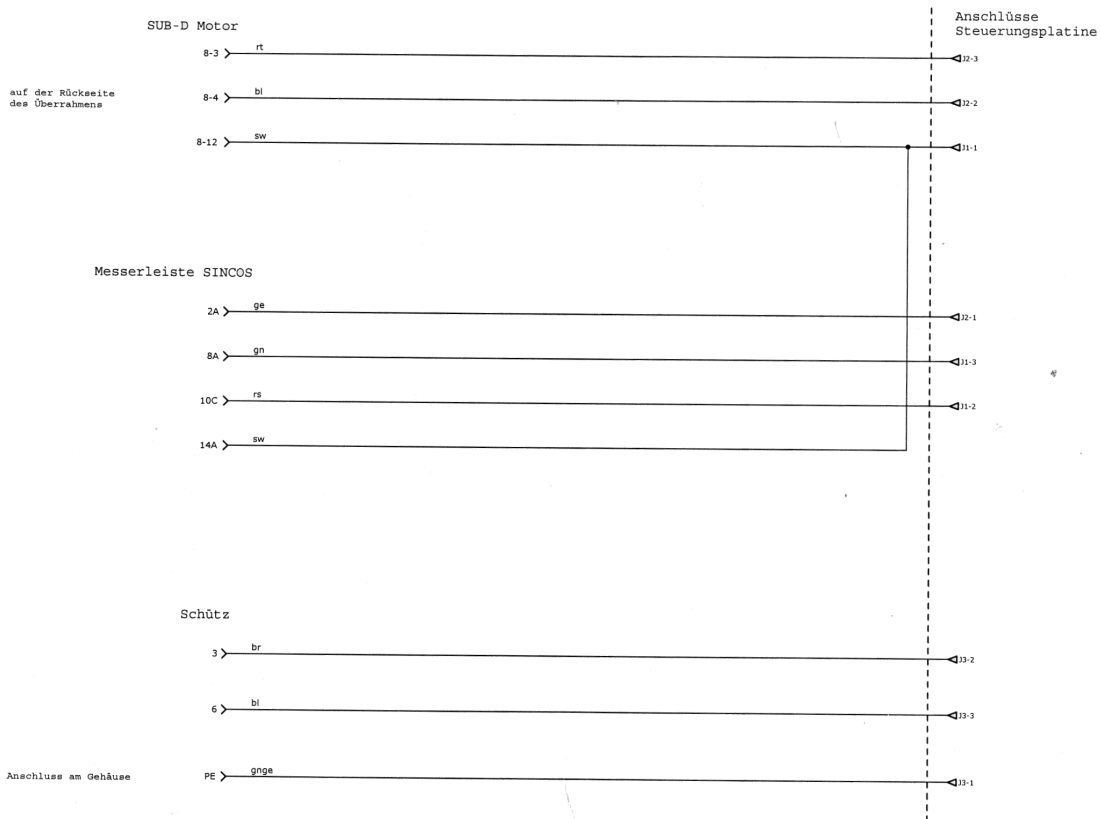
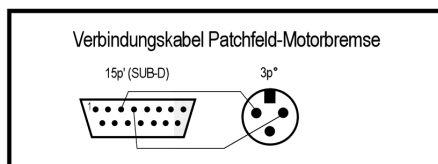
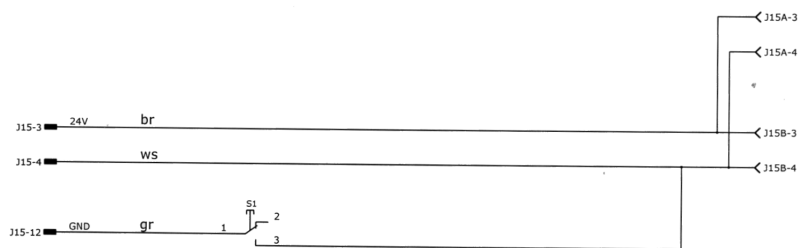
 Institut fuer Physik Elektronik Entwicklung		Steuerung Motorbremse Platine	
Bearbeiter: B. Krumm Filename: Bremsensteuerung.sch			
Version: 1.1	Datum: 27.07.2005	Auftr. Nr.:	E1a-EE/08/05 Blatt 1(2)

Abbildung A.12: Schaltplan der Steuerelektronik für die Synchronisation der Bremsenöffnung mit dem Schrittmotorbetrieb (entwickelt von der elektronischen Werkstatt der TU-Dortmund).



	Institut fuer Physik Elektronik Entwicklung	<b>Steuerung Motorbremse</b> <b>Verdrahtung Übertrahmens</b>	
	Bearbeiter: B. Krumm Filename: Bremsensteuerung.sch		
Version: 1.1   Datum: 08.09.2005	Auftr. Nr.: E1a-EE/08/05   Blatt 2(2)		



	Institut fuer Physik Elektronik Entwicklung	<b>Steuerung Motorbremse</b> <b>Patchfeld</b>	
	Bearbeiter: B. Krumm Filename: Patchfeld.sch		
Version: 1.1   Datum: 07.09.2005	Auftr. Nr.: E1a-EE/08/05   Blatt 1(1)		

Abbildung A.13: Verdrahtung der Steuerelektronik innerhalb der Motorendstufe und zum Patchfeld (entwickelt von der elektronischen Werkstatt der TU-Dortmund).

## A.6 Die Patchfelderweiterung

Die Schnittstelle zwischen der Verkabelung innerhalb der Experimentierhütte der Beamlinie BL9 und den außerhalb aufgestellten Schrittmotorendstufen bildet das sogenannte Patchfeld. Zum Beginn des Aufbaus des SAXS-Setups war das bestehende Patchfeld voll belegt, für die Verkabelung der Linearantriebe des Detektorsystems wurde daher eine Erweiterung erforderlich. Abbildung A.14 zeigt das zu diesem Zweck gebaute 15-fache Patchfeld.

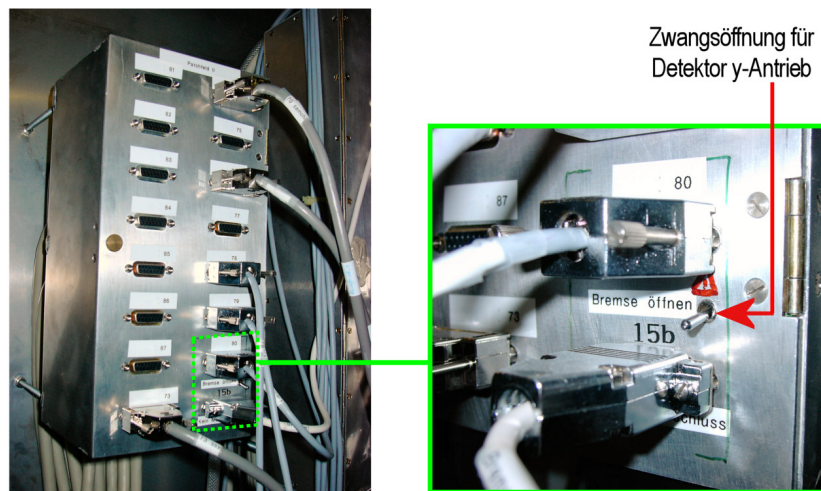


Abbildung A.14: Links: 15-fache Patchfelderweiterung (Ports für zusätzliche Schrittmotorantriebe, mit kombiniertem Dual-Port #15. Rechts: Vergrößerung des Port 15, bestehend aus zwei Anschlüssen (Schrittmotoranschluss oben, Bremsenanschluss unten) und Kippschalter zur Bremsenöffnung.

Die in den Kapiteln 4.9 und A.5 beschriebene Bremse des y-Antriebs des Detektors wird über eine separate, entsprechend beschriftete Buchse angeschlossen, die sich unterhalb der Motoranschlußbuchse für den y-Antrieb befindet. Zwischen den beiden Buchsen befindet sich ein Kippschalter, durch dessen Betätigung die (selbstschließende) Bremse zwangsgeöffnet werden kann. Um die Öffnung ausführen zu können, muss die Endstufe für den y-Antriebs des Detektors (Motor-Alias MARY) mit Spannung versorgt sein. Die Bremsenöffnung darf jedoch nur betätigt werden, wenn der Motor ebenfalls an das Patchfeld angeschlossen ist, da der Schrittmotor im stromlosen Zustand kein ausreichendes Haltemoment besitzt und es somit zu einer Abwärtsbewegung des Detektors kommen kann.

Für die Spannungsversorgung der Bremse werden ungenutzte Leitungen in der Verkabelung zwischen der modifizierten Schrittmotorendstufe und dem Patchfeld verwendet. Auf der Rückseite des Patchfeldes gibt es daher keinen separaten Eingang für die Bremsensteuerung. Eine Pinbelegung des von der modifizierten Endstufe zum Patchfeld führenden Kabels sowie die des Anschlusskabels vom Patchfeld zur Bremse findet in der Abbildung A.13 .

## Literatur

- [Als-Nielsen] ALS-NIELSEN, J.; MCMORROW, D.: Elements of Modern X-Ray Physics, *Wiley, UK* (2001)
- [Amemiya] AMEMIYA, Y.: *J. Synchrotron Rad.* **2**, 13 (1995)
- [Anfinsen] ANFINSEN, C.B.: *Science*, **181**, 223 (1973)
- [Antonino] ANTONINO, L.C; KAUTZ, R.A.; NAKANO, T.; FOX, R.O.; FINK, A.L.:*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7715 (1991)
- [Atkins] ATKINS, J.F.; GESTELAND, R.: *Science*, **296**, 1409 (2002)
- [Baskakov] BASKAKOV, I.; BOLEN, D.W.: *J. Biol. Chem.* **273**, 4831 (1998)
- [Belloni85] BELLONI, L.: *J. Chem. Phys.*, **99**, 43 (1985)
- [Belloni88] BELLONI, L.: *Chem. Phys.*, **88**, 5143 (1988)
- [Bradley] BRADLEY, C.C.: High Pressure Methods in Solid State Research, *Butterworths, UK* (1969)
- [Brandts] BRANDTS, J.F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4291 (1964)
- [Byrne] BYRNE, M.; STITES, W.E.: *Biophysical Chemistry*, **125**, 490 (2007)
- [Cotton] COTTON, F.A; HAZEN, E.E.; LEGG, M.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 2551 (1979)
- [Cowley] COWLEY, J.M.: Diffraction Physics, 2ed., *Elsevier North Holland, USA* (1981)
- [CXRO] BERKELEY LAB CENTER FOR XRAY OPTICS, <http://www.cxro.msdl.gov/>
- [Debye] DEBYE, P.: *Annalen der Physik*, **46**, 809 (1915)
- [DELTA] HOMEPAGE DES DELTA, <http://www.delta.uni-dortmund.de>
- [Dobson] DOBSON, C.M.: Mechanisms of Protein Folding 2nd ed., *Oxford University Press, UK* (2000)
- [Dill] DILL, K.A.; CHAN, H.S.: *Nature Struct. Biol.*, **4**, 10 (1997)
- [Durchschlag] DURCHSCHLAG, H.; ZIPPER, P.: *Eur. Biophys. J.* **32**, 487 (2003)
- [Dzwolak] DZWOLAK, W.; GRUDZIELANEK, S.; SMIRNOVAS, V.; RAVINDRA,R.; NICOLINI, C.; JANSEN, R.; LOKSZTEJN, A.; POROWSKI, S.; WINTER, R.: *Biochemistry*, **44**, 8948 (2005)

- [Feigin] FEIGIN, L.A.; SVERGUN, D.I.: Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering, *Plenum Press, USA* (1987)
- [Fischetti] FISCHETTI, R.; STEPANOV, S.; ROSENBAUM, G.; BARREA, R.; BLACK, E.; GORE, D.; HEURICH, R.: *J. Synchrotron Rad.* **11**, 399 (2004)
- [Fleming] FLEMING, A.: *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, **93**, 306 (1922)
- [Franks] FRANKS, F.: Characterization of Proteins, *Humana Press, UK* (1988)
- [Fujisawa] FUJISAWA, T.; INOUE, K.; OKA, T.; IWAMOTO, H.; URUGA, T.; KUMASAKA, T.; INOKO, Y.; YAGI, N.; YAMAMOTO M.; UEKI T.: *J. Appl. Cryst.*, **33**, 797 (2000)
- [Glatter] GLATTER, O.; KRATKY, O.: Small Angle X-ray Scattering, *Academic Press, UK* (1982)
- [Goodisman] GOODISMAN, J.; BRUMBERGER, H.: *Mh. Chem.*, **104**, 598 (1973)
- [Griko] GRIKO, Y.V.; PRIVALOV, P.L.; STURTEVANT, J.M.; VENYAMINOV, S.Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3343 (1988)
- [Grimson] GRIMSON, M.J.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **79**, 817 (1983)
- [Guinier55] GUINIER, A.; FOURNET, G.: Small Angle Scattering of X-Rays, *Wiley, USA* (1955)
- [Guinier63] GUINIER, A.: X-Ray Diffraction, *W.H. Freeman, USA* (1963)
- [Gursky] GURSKY, O.; LI, Y.; BADGER, J.; CASPAR, D.L.D.: *Biophys.J.* **61**, 604 (1992)
- [Hammersley] HAMMERSLEY, A.P.; SVENSSON, S.O.; HANFLAND, M.; FITCH, A.N.; HAEUSERMANN, D.: *High Pressure Research*, **14**, 235 (1996)
- [Hansen] HANSEN, J.P.; MCDONALD, I.R.: Theory of Simple Liquids 2ed., *Academic Press, UK* (1986)
- [Hendrix] HENDRIX, J. (Geschäftsführer der Marresearch GmbH) Persönliche Mitteilung (2008)
- [Herberhold] HERBERHOLD, H.; ROYER, C.A.; WINTER, R.: *Biochemistry.*, **43**, 3336 (2004)
- [Hirota] HIROTA, N.; MIZUNO, K.; GOTO, Y.: *J. Mol. Biol.*, **275**, 365 (1998)

- [Hura] HURA, G.; RUSSO, D.; GLAESER, R.M.; HEAD-GORDON, T.; KRACK, M.; PARRINELLO, M.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 1981, (2003)
- [Hynes] HYNES, T.R.; FOX, R.O.: *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **10**, 92 (1991)
- [Imoto] IMOTO, T.: (2001) 'Lysozyme' in: Encyclopedia of Life Science, <http://www.els.net>, *John Wiley & Sons*
- [Jansen] JANSEN, R.; DZWOLAK, W.; WINTER, R.: *Biophys. J.*, **88**, 1344 (2005)
- [Javid2007] JAVID, N.: *Dissertation*, Universität Dortmund (2007)
- [Javid2007b] JAVID, N.; VOGT, K.; KRYWKA, C.; TOLAN, M.; WINTER, R.: *Chem. Phys. Chem.* **8**, 679 (2007)
- [Javid2007c] JAVID, N.; VOGT, K.; KRYWKA, C.; TOLAN, M.; WINTER, R.: *Phys. Rev. Lett.* **99**, 028101 (2007)
- [Jolles] JOLLES, J., JAUREGUI-ADELL, J., BERNIER, I., JOLLES, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 668, (1963)
- [Kirz] KIRZ, J.: Section 3.1, in X-Ray Data Booklet 2nd ed., LNBL, *University of Berkeley, USA* (2001)
- [Klink] KLINK, B.U.; WINTER, R.; ENGELHARD, M.; CHIZHOV, I.: *Biophys. J.*, **83**, 3490 (2002)
- [Koizumi] KOIZUMI, M.; HIRAI, H.; ONAI, T.; INOUE, K.; HIRAI, M.: *J. Appl. Cryst.*, **40**, 175 (2007)
- [Kossel] KOSSEL, W.; LOECK, V.; VOGES, H.: *Z. Phys.* **94**, 139 (1935)
- [Krywka05] KRYWKA, C.: *Diplomarbeit*, Universität Dortmund (2005)
- [Krywka07] KRYWKA, C.; STERNEMANN, C.; PAULUS, M.; JAVID, N.; WINTER, R.; AL-SAWALMIH, A.; YI, S.; RAABE, D.; TOLAN, M.: *J. Synchr. Rad.* **14**, 244 (2007)
- [Krishnamurti] KRISHNAMURTI, P.: *Indian J. Phys.*, **5**, 473 (1930)
- [Lan] LAN, G.; WOLGEMUTH, C.W.; SUN, S.X.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16110 (2007)
- [Leclerc] LECLERC, E.; CALMETTES, P.: *Phys. Rev. Lett.* **78**, 150 (1997)

- [Levinthal] LEVINTHAL, C.: *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, **65**, 44 (1968)
- [Leopold] LEOPOLD, P.E.; MONTAL, M; ONUCHIC, J.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8721 (1992)
- [Loeffler] LOEFFLER, G.; PETRIDES, P.E.; HEINRICH, P.C.: *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Aufl., *Springer Berlin Heidelberg*, (2007)
- [Malessa] MALESSA, R.: *Dissertation*, Universität Dortmund (1998)
- [Marresearch] Spezifikationen des MAR345 Detektors, <http://www.marresearch.com>
- [Merzel] MERZEL, F.; SMITH, J.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 5378 (2002)
- [Mello] MELLO, C.C.; BARRICK, D.: *Protein Sci.*, **12**, 1522 (2003)
- [Mittelbach64] MITTELBACH, P.: *Acta Phys. Austriaca*, **19**, 53 (1964)
- [Mitra] MITRA, L.; SMOLIN, N.; RAVINDRA, R.; ROYER, C.; WINTER, R.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 1249 (2006)
- [Olsen] OLSEN, H.B.; LUDVIGSEN, S.; KAARSHOLM, N.C.: *Biochemistry* **35**, 8836 (1996)
- [Orthaber] ORTHABER, D.; BERGMANN, A.; GLATTER, O.: *J. Appl. Cryst.* **33**, 218 (2000)
- [Panick99] PANICK, G.; VIDUGIRIS, G.J.A.; MALESSA, R.; RAPP, G.; WINTER, R.; ROYER, C.A: *Biochemistry*, **38**, 4157 (1999)
- [Panick98] PANICK, G.; MALESSA, R.; WINTER, R.; RAPP, G.; FRYE, K.J.; ROYER, C.A: *J. Mol. Biol.*, **275**, 389 (1998)
- [PDB] RCSB PROTEIN DATA BANK, <http://www.rcsb.org>
- [Porod48] POROD, G.: *Acta Phys. Austriaca*, **2**, 255 (1948)
- [Porod51] POROD, G.: *Kolloid Zeitschrift*, **124**, 83 (1951)
- [Porod52] POROD, G.: *Kolloid Zeitschrift*, **125**, 51,109 (1952)
- [PyMOL] DELANO, W.L.: The PyMOL Molecular Graphics System, <http://www.pymol.org>
- [Ravindra] RAVINDRA, R.; WINTER, R.: *Z. Phys. Chem.*, **217**, 1221 (2003)
- [Rigaku] Zur Funktionsweise von Image Plate Detektoren, <http://www.rigaku.com/protein/IP-AppNote.pdf>

- [Roth] ROTH S. V.; DOEHRMANN R.; DOMMACH M.; KUHLMANN M.; KRUEGER, I.; GEHRKE, R.: *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 085106 (2006)
- [Rypniewski] RYPNIEWSKI, W.R.; HOLDEN, H.M.; RAYMENT, I.: *Biochemistry* **32**, 9851 (1993)
- [Saltiel] SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R.: *Nature*, **414**, 799 (2001)
- [Selkoe] SELKOE, D.J.: *Nature*, **426**, 900 (2003)
- [Sherman] SHERMAN, W.F.; STADTMULLER, A.A.: Experimental Techniques in High Pressure Research, *Wiley, UK* (1987)
- [Shortle] SHORTLE, D.; LIN., B.: *Genetics*, **110**, 539 (1985)
- [Sonnenberg] SONNENBERG, G.E.; BERGER, M.: *Diabetologia*, **25**, 457 (1983)
- [Spinozzi] SPINOZZI, F.; GAZZILLO, D.; GIACOMETTI, A.; MARIANI, P.; CARSUGHI, F.: *Biophys. J.*, **82**, 2165 (2002)
- [Strandner] STRADNER, A.; SEDGWICK, H.; CARDINAUX, F.; POON, W.C.K.; EGELHAAF, S.U.; SCHURTENBERGER, P.: *Nature*, **432**, 492 (2004)
- [Svergun92] SVERGUN, D.I.: *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495 (1992)
- [Svergun95] SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M.H.J.: *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768 (1995)
- [Svergun98] SVERGUN, D.I.; RICHARD, S.; KOCH, M.H.J.; SAYERS, Z.; KURPIN, S.; ZACCAI, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2267 (1998)
- [Svergun99] SVERGUN, D.I.: *Biophys. J.* **76**, 2879 (1999)
- [Svergun03] SVERGUN, D.I.; KOCH, M.H.J.: *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1735 (2003)
- [Taniuchi] TANIUCHI, H., ANFINSEN, C., SODJA, A.: *J. Biol. Chem.* **242**, 4736, (1967)
- [Tardieu] TARDIEU, A.; LE VERGE, A.; MALFOIS, M.; BONNETE, F.; FINNET, S.; RIES-KAUTT, M.; BELLONI, L.: *J. Crystal Growth*, **196**, 193 (1999)
- [Tixier] TIXIER, R.; WACHE, C.: *J. Appl. Cryst.* **3**, 466 (1970)
- [Torkkeli] TORKKELI, M.: *Dissertation*, University of Helsinki (2000)
- [Thoms] THOMS, M.: *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. A* **378**, 598 (1996)
- [Thomson] THOMSON, J.J.: Conduction of Electricity through Gases, *Cambridge University Press, UK* (1903)



- [Vainio] VAINIO, U.: Persönliche Mitteilung, Universität Helsinki (2006)
- [Vocadlo] VOCADLO, D.J.; DAVIES, G.J.; LAINE, R.; WITHERS, S.G.: *Nature* **412**, 835 (2001)
- [Wagner] WAGNER, W.; SAUL, A.; PRUSS, A.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* **23**, 515 (1994)
- [Whittingham] WHITTINGHAM, J.L.; SCOTT, D.J.; CHANCE, K.; WILSON, A.; FINCH, J.; BRANGE, J.; DODSON, G.G.: *J. Mol. Biol.* **318**, 479 (2002)
- [Wignall] WIGNALL, G.D.; LIN, J.S.; SPOONER, S.: *J. Appl. Cryst.* **23**, 241 (1990)
- [Woenckhaus] WOENCKHAUS, J.; KOEHLING, R.; THIYAGARAJAN, P.; LITRELL, K.; SEIFERT, S.; ROYER, C.A.; WINTER, R.: *Biophys. J.* **80**, 1518 (2001)
- [Xie] XIE, L.; JING, G.-Z.; ZHOU, J.-M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **328**, 122 (1996)

## B Danksagung

Mein größter Dank gilt natürlich zunächst einmal Prof. Metin Tolan für die Vergabe des sehr interessanten Themas, mit dem er mir darüber hinaus die Möglichkeit gegeben hat, während der vergangenen drei Jahre genau die Dinge zu tun, die mir am meisten Spaß machen: basteln und eine Menge Geld ausgeben. Nun darf ich dank ihm im schönen Kiel sogar in der gleichen Art und Weise weitermachen.

Prof. Roland Winter möchte ich für die wunderbare Zusammenarbeit danken. Seine zahlreichen, hilfreichen Ideen und Anreize waren für den biologischen Teil dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung. Nicht zu vergessen sind seine scheinbar unerschöpflichen Proteinbestände: Er ahnte sicher nicht welche gigantischen Proteinmengen ihm dank dieser Kooperation abhanden kommen würden.

Der Beamline-Crew, bestehend aus Dr. Christian Sternemann und Dr. Michael Paulus, gebührt mein Dank für die wirklich tolle Unterstützung in Messzeiten, Konstruktionsphasen und natürlich auch für die Korrektur dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Martin Schroer bedanken, der als erster in den zweifelhaften Genuss des Korrekturlesens des Theorieteils dieser Arbeit kam.

Für die langjährige Zellengenossenschaft, stets aufmunternde Worte in manch schwierigen Zeiten und für die Unterstützung bei diversen Messzeiten danke ich meiner Büronachbarin Saskia Schmacke.

Überhaupt möchte ich allen Mitgliedern des Lehrstuhls E1a für die wirklich wundervolle Arbeitsatmosphäre danken. Es hat wirklich sehr viel Spaß gemacht, Teil dieser tollen Arbeitsgruppe zu sein.

Ohne die Mitarbeiter von Prof. Winter, Vytautas Smirnovas sowie Michael Šulc, wäre die APS-Messzeit kein leichtes Spiel gewesen. Dafür und für die unzähligen Leihgaben diversen Equipments möchte ich mich bei ihnen bedanken.

Für die wunderbare Unterstützung bei den Messungen in Helsinki und für die wertvollen Tips in Bezug auf die Erkundung der finnischen Landschaft bedanke ich mich bei Ulla Vainio und Kaisa Kisko.

Ein herzliches Dankeschön gebührt natürlich auch der gesamten DELTA-Crew für die Bereitstellung des Synchrotronstrahls an unserer heimischen Quelle.

Ich danke Susanne Fricke aus der mechanischen Werkstatt der Physik für die Fertigung der unzähligen Komponenten, insbesondere für die Herstellung der Hochdruckprobenzelle aus der wohl härtesten Substanz im Universum, bei deren Verarbeitung sie nach eigenen Worten sogar noch selbst was lernen konnte.

Ebenso gilt mein Dank der elektronischen Werkstatt der Physik für die reibungslose Entwicklung und Fertigung der Bremsenelektronik.

Marius, einem wunderbaren Freund, danke ich nicht nur für die Korrektur meiner sicher furchtbaren Interpunktion.

Meine Dankbarkeit möchte ich außerdem auch der *Fakir Speichertherme S 2kW* aussprechen, für die vielen kuschelig warmen Abende und Wochenenden in meinem Büro, auch innerhalb der (viel zu häufigen) nicht-Heiz-Perioden zwischen den Jahren (und zwischen den Tagen).

Einen ganz besonderen Dank verdienen meine Eltern, die mich ausnahmslos in allem was ich tat immer unterstützt haben. Ich möchte meinem Vater dafür danken, dass er mir schon in ganz jungen Jahren häufig und gerne die Welt erklärte. Damit legte er den entscheidenden Grundstein für meine Begeisterung für Physik - und damit auch für diese Arbeit.



Abbildung B.1: *Möge Betty Blume der Beamline noch lange Zeit erhalten bleiben und das Leid der Beamline-Nutzer ein kleines bisschen erträglicher machen!*

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ausschließlich unter Anleitung meiner wissenschaftlichen Betreuer und Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Sie wurde weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Dortmund, den 11.3.2008

.....  
(Christina Krywka)