

Hochzeitaufgelöste Beugungsmessungen
an Häm-Proteinen
mittels Laue-Verfahren

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Physik
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dirk Kosciesza
aus Frankfurt am Main

Hamburg
1999

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. R.L. Johnson
Prof. Dr. E. Gerdau

Gutachter der Disputation: Prof. Dr. R.L. Johnson
Prof. Dr. J. Schneider

Datum der Disputation: 1.2.2000

Dekan des Fachbereichs
Physik und Vorsitzender
des Promotionsausschusses: Prof. Dr. F.-W. Büßer

Abstract

Conventional protein crystallography enables the space- and *time-average* of a protein structure to be determined. For a large number of proteins it is known, that essential aspects of their structure-function-relationship are related to *dynamical* changes in their conformation on the nanosecond time-scale. This thesis describes an experimental setup, that has been developed to allow stroboscopic, ns-time-resolved Laue-diffraction experiments for the structural investigation of extremely fast reactions at the wiggler-beamline BW6/DORIS at HASYLAB/DESY. The main component is a novel chopper-system based on a rotating mirror, which exploits the light-leverarm to a distant slit in order to create extremely short time-windows not previously achieved with choppers for white x-radiation before. The time-window allows single-bunch extraction in both single- and two-bunch mode of the storage-ring, making 6 weeks of beamtime a year available for time-resolved studies.

Excitation of photolytic reactions is achieved by a dye-laser-system that has been set up, capable of creating pulses from the UV to IR. Synchronisation between chopper, laser- and synchrotron-pulse is ensured by a special trigger-logic, holding the time-interval between the pulses constant to ± 0.8 ns in single- and ± 2.4 ns in double-bunch mode; in all cases the achievable time-resolution is dominated by the width of the laser-pulse of 7 ns. The time-interval between laser- and x-ray pulse is adjustable to any desired length and can be monitored with a specifically developed measurement setup. The appropriate excitation-conditions for complete photolysis in a time-resolved experiment on photoactive CO-Myoglobin have been estimated and an energy density of $9.3 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ at 658 nm was found. A test at this energy density verified, that the MbCO-crystal could survive over 50000 laser-pulses without any damage.

The functionality of the chopper-system was tested in a stroboscopic diffraction experiment on met-myoglobin, which represents the third Laue-experiment on a protein structure with ns-time-resolution worldwide. The measurements on the static and the excited structure were taken with 3500 single bunches per frame and yielded a completeness of 71%, despite the fact that only a 110° rotation range was accessible. Both datasets reached a Bragg-resolution of 1.65 \AA with an average positional error of $\approx 0.36 \text{ \AA}$. In addition electron density maps of good quality were calculated. The difference Fourier density between both structures contains five difference-peaks above a contour level of 4σ within the vicinity of the heme. The structural significance of these densities remains to be established.

The results of this work prove that it is possible to collect Laue-diffraction data with ns-time-resolution and high Bragg-resolution with the mirror-chopper-system at DORIS. Hence there will be a good chance of observing ultrafast changes after photodissociation of CO-myoglobin in future experiments, especially since the experiment on the photochemically inactive met-myoglobin verified, that thermal effects due to photon absorption do not affect the protein structure significantly.

Kurzfassung

Die gewöhnliche Proteinkristallographie vermag das Raum- und *Zeitmittel* einer Proteinstruktur zu bestimmen, doch es ist für eine große Anzahl von Proteinen bekannt, daß wesentliche Aspekte ihrer Struktur-Funktionsbeziehung auf *dynamischen* Änderungen ihrer Konformation beruhen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein experimenteller Aufbau für den Wiggler-Strahl BW6/DORIS entwickelt, um stroboskopische Laue-Beugungsexperimente mit Nanosekundenzeitauflösung zur strukturellen Untersuchung extrem schneller Reaktionen zu ermöglichen. Hierzu wurde ein neuartiges Choppersystem konstruiert, das auf einem rotierenden Spiegel basiert, der extrem kurze Öffnungszeitfenster erzeugt, die mit anderen Choppern für weiße Röntgenstrahlung bisher nicht erreicht wurden. Die Zeitfenster von 440 ns Dauer (5%-Breite) erlauben die Extraktion einzelner Synchrotronpulse im Einzel- und Zweipuls-Modus von DORIS, womit 6 Wochen Strahlzeit pro Jahr für zeitaufgelöste Experimente zu Verfügung stehen. Zur Stimulation photolytischer Reaktionen wurde ein Lasersystem aufgebaut, mit dem Pulse vom UV bis ins IR erzeugt werden können. Die Synchronisation zwischen Choppersystem, Laser- und Synchrotronpuls regelt eine Triggerlogik, wobei der Zeitabstand der Pulse mittels einer adäquaten Meßanordnung überwacht wird. Die Anregungsbedingungen zur Laserpulsphotolyse von CO-Myoglobin wurden abgeschätzt, und ein Test an Myoglobinkristallen verifizierte, daß diese den berechneten Energiedichten standhalten. Die Funktionalität des Gesamtsystems wurde anhand eines zeitaufgelösten Experiments an met-Myoglobin demonstriert, das weltweit das dritte Laue-Beugungsexperiment an einer Proteinstruktur mit ns-Zeitauflösung darstellt. Die Messungen von statischer und angeregter Struktur erzielten hohe Vollständigkeit bei einer Bragg-Auflösung von bis zu 1,65 Å und einem mittleren Fehler auf die Atompositionen von $\approx 0,36$ Å. Es wurden sowohl Elektronendichtekarten als auch die Differenzfourierdichte zwischen beiden Strukturen berechnet, die oberhalb eines Kontourniveaus von 4σ fünf Differenzdichten in der Häm-Umgebung zeigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, daß mittels des Choppersystems Laue-Daten hoher Qualität an DORIS aufgenommen werden können und für Anregungsexperimente an MbCO gute Chancen bestehen, etwaige Konformationsänderungen zu identifizieren, insbesondere da das Experiment an met-Myoglobin gezeigt hat, daß thermische Effekte der Photonenabsorption die Proteinstruktur nicht relevant beeinflussen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Symbolverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	4
2.1 Synchrotronstrahlung	4
2.1.1 Bedeutung und Erzeugung von Synchrotronstrahlung	4
2.1.2 Zeitstruktur	4
2.2 Kristallstrukturanalyse auf der Grundlage von Laue-Beugung	7
2.2.1 Kristallstrukturbestimmung	7
2.2.2 Laue-Verfahren	8
2.2.3 Komplikationen bei der Auswertung von Laue-Daten	9
2.3 Zeitaufgelöste Beugungsexperimente	11
2.3.1 Zeitaufgelöste Beugungsmessungen unter Verwendung eines Synchrotronchoppers	11
2.3.2 Reaktionsinitiation durch Photolyse	13
2.3.3 Alternative Methoden zeitaufgelöster Röntgenbeugung	14
2.4 Myoglobin als Modellsystem	18
2.4.1 Physiologische Rolle	18
2.4.2 Statische Struktur und Reaktionskinetik	18
2.4.3 Erwartete Strukturänderungen	20
2.4.4 Eignung des Myoglobins für hochzeitaufgelöste Beugungsmes- sungen	22
3 Entwicklung eines Spiegelchoppers für Synchrotronstrahlung	23
3.1 Überblick über Chopperkonstruktionen	23
3.1.1 Scheibenchopper	24
3.1.2 Chopperkonstruktionen mit optischen Elementen	27
3.2 Experimenteller Aufbau des Spiegelchoppersystems am Strahl BW6 . .	29
3.3 Die Komponenten des Spiegelchoppersystems	29
3.4 Funktionsprinzip und Leistungsfähigkeit	36
3.4.1 Berechnung des Öffnungsprofils	37

3.4.2	Experimentelle Bestimmung des Öffnungsprofils	39
3.4.3	Experimentelle Bestimmung des Öffnungszeitfensters	41
3.5	Vorchopper und langsamer Strahlverschluß	43
3.6	Synchronisation	45
3.6.1	Die Synchronisation des Spiegelchoppersystems	46
3.6.2	Überprüfung der Synchronisation	52
4	Das Lasersystem zur photolytischen Anregung	59
4.1	Experimenteller Aufbau des Lasersystems	59
4.2	Anregungsbedingungen	61
4.2.1	Abschätzung einer geeigneten Anregungswellenlänge	61
4.2.2	Abschätzung der Energiedichte	62
4.2.3	Messung des Energiedichteprofiles	63
4.2.4	Zerstörschwelle des Kristalls	65
4.2.5	Abschätzung der Temperaturerhöhung	66
5	Nanosekunden-zeitaufgelöstes Laue-Experiment an met-Myoglobin	68
5.1	Experimentelle Durchführung	68
5.1.1	Justierung des Choppers	68
5.1.2	Probenmontage	69
5.1.3	Datennahme	71
5.2	Prozessierung der Laue-Daten	72
5.3	Datenanalyse	77
5.3.1	Analyse der Beugungsdaten	77
5.3.2	Vergleich der Datenqualität zu einem früheren ns-zeitaufgelösten Beugungsexperiment an Myoglobin	80
5.3.3	Analyse der Strukturdaten	81
6	Diskussion und Ausblick	87
7	Zusammenfassung	92
A	Berechnung des Akzeptanzwinkels	94
	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	105

Abbildungsverzeichnis

2.1	Beschleunigermodi an Synchrotronspeicherringen	5
2.2	Ewald-Konstruktionen für monochromatische und polychromatische Datennahme	7
2.3	Streak und Lauekegel auf einem Laue-Bild	10
2.4	Zeitskala struktureller Änderungen in Makromolekülen	11
2.5	Schematischer Zeitverlauf eines Anregungsexperiments	12
2.6	Strukturmodell des Myoglobins	19
2.7	Strukturunterschiede zwischen deoxy-Mb und MbCO	21
3.1	Scheibenchopper mit Rotationsachse parallel und senkrecht zur Strahl- achse	25
3.2	Experimenteller Aufbau an der BW6	30
3.3	Photographie des Spiegelchoppers	31
3.4	Röntgenreflektivität des Goldspiegels in Abhängigkeit von Energie und Anstellwinkel	33
3.5	APD und Szintillationsdetektor	35
3.6	Strahlengang am Chopperspiegel	37
3.7	Vertikale Divergenz der Synchrotronstrahlung	38
3.8	Öffnungsprofil bei unterschiedlichen Blendenöffnungen	39
3.9	Öffnungsprofil in Abhängigkeit von Scheibenposition und Blende K0 . .	40
3.10	Zeitfenster des Spiegelchoppers in Abhängigkeit von der Rotationsperiode	41
3.11	Einzelschüßaufnahmen eines extrahierten Pulszuges	42
3.12	Pulsdiagramm des Triggers	47
3.13	Öffnungsprofil von Spiegel- und Scheibenchopper und die korrespondie- renden Logikpulse TWM und TWD	49
3.14	Logikpulse und Transmission des elektromagnetischen Strahlverschlusses	49
3.15	Schaltung der Triggerlogik	50
3.16	Schematische Darstellung möglicher Triggersituationen	51
3.17	Stabilität der Spiegelrotation	54
3.18	TWM- und TWD-Puls und Verteilung der korrespondierenden Phasen- fluktuation	55
3.19	Verschiebung der Zündzeitpunkte der Laser	56
3.20	Zeitabstand zwischen Laser- und Synchrotronpuls	57
4.1	Pulsform der Laserpulse	60
4.2	Absorptionslänge von MbO ₂	62

4.3	Polarisationsabhängiges Absorptionsspektrum von MbCO und Spektren von MbCO und metMb.	63
4.4	Laserbrennfleck und Strahlengänge am Probenort	64
4.5	Energiedichteprofil der Laserstrahlung	65
5.1	Experimenteller Aufbau am Probenort	70
5.2	Laue-Aufnahme von met-Mb [*]	72
5.3	Flußdiagramm der Datenprozessierung	73
5.4	Wellenlängennormalisierungskurve	74
5.5	Luzatti-Graphik der met-Mb [*] -Daten	79
5.6	$2 F_{met-Mb^*} - F_c $ -Elektronendichtekarte der Hämeebene, Draufsicht . .	82
5.7	$2 F_{met-Mb^*} - F_c $ -Elektronendichtekarte der Hämumgebung, Seitenansicht	83
5.8	Differenzelektronendichtekarte $\Delta\rho = F_{met-Mb^*} - F_{met-Mb} $, seitliche Ansicht	84
5.9	Differenzelektronendichtekarte $\Delta\rho = F_{met-Mb^*} - F_{met-Mb} $, Draufsicht	86
6.1	Logarithmus der mittleren Reflexintensitäten aufgetragen gegen $\frac{1}{d^2}$. . .	90
A.1	Geometrische Bezeichnungen zur Herleitung des Öffnungsprofils	95

Tabellenverzeichnis

2.1	Pulsabstand t_{BX} und mittlerer Strom I unterschiedlicher Füllmodi verschiedener Speicherringe	6
3.1	Kenndaten verschiedener Chopper	28
3.2	5%-Breiten des Intensitätsprofils der Choppertransmission in Abhängigkeit von der Blendenöffnung	40
3.3	Betriebsfrequenzen und Zeitfenster des Choppersystems	44
3.4	Messungen zur Synchronisation	53
4.1	Kenndaten der verfügbaren Laser und Lichtwellenleiter	60
5.1	Häufigkeit der Energiemultipletts in Abhängigkeit von ihrer Harmonizität	75
5.2	Parameter zu Datennahme, Auswertung und Verfeinerung der Laue-Daten	76
5.3	Vollständigkeit der Datensätze von met-Mb und met-Mb*	78
5.4	Vergleich der erreichten Vollständigkeiten zu einem früheren ns-zeitaufgelösten Experiment	81

Symbolverzeichnis

t_{BX}	zeitlicher Abstand der Synchrotronpulse, allgemein
t_{nBX}	wie t_{BX} , wobei n die Anzahl der Pulse im Speicherring indiziert
λ	Wellenlänge
θ	Reflexionswinkel
d	Abstand der Netzebenen
I_{hkl}	Intensität des Reflexes (hkl)
F_{hkl}	Strukturfaktor des Reflexes (hkl)
α_{hkl}	Phase des Strukturfaktors
ρ_{xyz}	Elektronendichte
V	Volumen der Einheitszelle
t_I	Zeitpunkt der Anregung
t_Z	Zeitpunkt der Belichtung
Δt_Z	$t_Z - t_I$
Δt_I	Dauer der Anregung
Δt_{SR}	Dauer des Synchrotronpulses
δ	Realteil des Brechungsindex
θ_C	kritischer Winkel der Röntgenreflexion
N_e	Anzahl der freien Elektronen
$2l$	Länge des Spiegels
R	Abstand zwischen Spiegel und Blende
k_3	vertikale Apertur der Blende
φ_0	optimaler Anstellwinkel des Spiegels
$\delta\varphi_0$	Abweichung von der optimalen Reflexionsposition φ_0
ϕ_0	Ablenkwinkel des Strahls
$\Delta\varphi$	Akzeptanzwinkelbereich der Spiegel-Blenden-Anordnung
$\alpha_{-/+}$	Winkel eines Strahls unterhalb bzw. oberhalb der optischen Achse zu dieser
f_S	Rotationsfrequenz des Spiegels
Δt_S	Öffnungszeitfenster des Spiegels

σ_S	Kurzzeitstabilität der Spiegelrotation
f_V	Rotationsfrequenz des Vorchoppers
t_V	Umlaufperiode des Vorchoppers
r	Abstand der Blende zum Mittelpunkt der Scheibe
x_B	Schlitzbreite des Vorchoppers
x_{SR}	horizontale Ausdehnung des Synchrotronstrahls
f_{LSV}	Öffnungsfrequenz des langsamen Strahlverschlusses
Δt_{LSV}	Transmissionsfenster des langsamen Strahlverschlusses
Δt_{BX-CLK}	Dauer des Bunch-Uhr-Pulses
μ	Absorptionskoeffizient
x	photolysierte Kristalldicke
ρ_{E_0}	Energiedichte der Laserstrahlung
E_0	einfallende Laserenergie
E_{abs}	absorbierte Laserenergie
ρ_{Fe}	Dichte der Eisenatome in monoklinem Myoglobin
ΔT	Temperaturerhöhung
ρ_{H_2O}	Dichte des Wassers
c_{H_2O}	Wärmekapazität des Wassers
Q	Wärmemenge
R_{cryst}	kristallographischer R-Faktor
$S_{hkl}(\lambda)$	Skalierungsfaktor für die gemessenen F_{hkl}
C	Vollständigkeit
N	Anzahl der Atome in der Struktur
n_{Obs}	Anzahl der unabhängigen Observablen
n_{Par}	Anzahl der freien Parameter
$\sigma(x_i)$	Fehler auf eine Atomkoordinate
$\sigma(r)$	Positionsfehler der Atome
$\langle I \rangle$	mittlere Intensität der Beugungsreflexe
$\langle \sigma(I) \rangle$	mittleres Rauschen der Beugungsreflexe
$\Delta\rho$	Differenzelektronendichte
σ	Standardabweichung von der mittleren Elektronendichte in der Einheitszelle
I_{RU}	Meßwert der Reflexintensität
I_R	Untergrundsubtrahierte Reflexintensität
I_U	Untergrundintensität
SN	Signal/Rausch-Verhältnis

Kapitel 1

Einleitung

Die Proteinkristallographie liefert ein Raum- und Zeitmittel der dreidimensionalen Struktur von Proteinen. Die Kenntnis dieser mittleren Struktur reicht jedoch nicht immer aus, um die Funktionsweise eines Proteins aufzuklären. So wurde bereits kurz nach der Lösung der ersten Proteinstruktur, des Myoglobins (Kendrew et al. 1958), deutlich, daß die Diffusion eines O₂- oder CO-Liganden durch die Proteinmatrix zum aktiven Zentrum an der intern gebundenen Häm-Gruppe transiente Änderungen der Konformation erfordert, da die statische Struktur des Myoglobins keine hinreichend weiten Kanäle für die Diffusion aufweist. Inzwischen ist für eine große Anzahl von Proteinen bekannt, daß dynamische Änderungen lokaler oder globaler Konformation für wesentliche Aspekte der Struktur-Funktionsbeziehung verantwortlich sind. Beispiele hierfür sind nahezu alle Enzym-Substratwechselwirkungen, Transportvorgänge in Ionenkanälen und Transferreaktionen in Proteinsystemen. Das zeitliche Spektrum der im Protein ablaufenden Reaktionen erstreckt sich von Femtosekunden (z.B. Aufbrechen von Bindungen) bis zu mehreren Minuten (z.B. Proteinfaltungen, Austausch interner Wassermoleküle). Von besonderem Interesse für Konformationsänderungen ist der Nano- bis Mikrosekundenbereich, da er für korrelierte Bewegungen ausgedehnter Teile von Proteinstrukturen charakteristisch ist, denen hohe Bedeutung in bezug auf die Funktionalität des Proteins beigemessen wird.

Die Evidenz für das Auftreten dynamischer Konformationsänderungen in Proteinen wurde bisher in den meisten Fällen aus Röntgenbeugungsuntersuchungen statischer Strukturen, etwa von stabilen Anfangs- und Endzuständen, abgeleitet. Informationen über Strukturodynamik können aber auch mit Methoden der NMR oder diffuser Röntgenbeugung gewonnen werden. Hinreichend hohe Ortsauflösung in den zeitveränderlichen Koordinaten der Atome eines Makromoleküls erfordert jedoch Beugungsmessungen, für die im Falle extern anregbarer zyklischer Reaktionen zeitaufgelöste Röntgenbeugung eingesetzt werden kann (Bartunik 1983, Bilderback 1983).

Die Synchrotronstrahlung von Speicherringen der 2. und 3. Generation eignet sich aufgrund ihrer gepulsten Zeitstruktur mit Pulsbreiten von ≈ 100 ps besonders für diese Experimente. Die Meßmethode beruht hierbei auf der stroboskopischen Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten, bei der eine Probe wiederholt angeregt und anschließend mit einem Synchrotronpuls belichtet wird. Dieses Verfahren wurde erstmals in den achtziger Jahren unter Einsatz von monochromatischer Synchro-

tronstrahlung auf Festkörperkristalle angewandt, bei denen nach der Anregung die Änderung einzelner Beugungsreflexe im Nanosekundenbereich verfolgt wurde (Larson et al. 1982, Pruss et al. 1984, Bartunik 1984). Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf Proteinstrukturen wurde mehrfach vorgeschlagen und diskutiert (Bartunik 1983, Moffat 1989, Helliwell 1992b, Cruickshank et al. 1992, Hajdu & Andersson 1993, Wulff et al. 1997). Dabei müssen zur Strukturanalyse möglichst alle symmetrieunabhängigen Beugungsreflexe zeitaufgelöst gemessen werden, weswegen die Laue-Methode Anwendung findet, da sie den reziproken Raum mit höchster Effizienz abdeckt (Cruickshank et al. 1987, Clifton et al. 1991). Die Anzahl der nötigen Kristallorientierungen innerhalb des erforderlichen Rotationsbereichs hängt dabei nicht alleine von der Raumgruppe, sondern stark vom jeweiligen Verfahren der Laue-Datenauswertung ab (Ren & Moffat 1995a, Ren & Moffat 1995b, Campbell 1995, Bourenkov et al. 1996), und ist bei Anwendung von auf Bayes-Statistik beruhenden Verfahren minimal. Im Falle hoher, z.B. tetragonaler Kristallsymmetrie, reicht dann eine einzige Aufnahme aus, um einen hinreichend vollständigen Satz von Strukturfaktoren zu erhalten (Bourenkov et al. 1996).

Beim Einsatz des stroboskopischen Meßverfahrens zur Durchführung hochzeitaufgelöster Beugungsexperimente muß dafür Sorge getragen werden, daß nach jeder Anregung nur ein einziger Synchrotronpuls die Probe belichtet. Dies erfordert einen schnellen Strahlverschluß, i. f. *Chopper*, der imstande ist, die Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung so zu modulieren, daß eine Extraktion einzelner Pulse möglich wird, d. h. der Chopper muß ein Transmissionsfenster definieren, das kürzer ist als der maximale Abstand der Synchrotronpulse im Speicherring (ca. 1–4 μ s, abhängig vom Speicherring). Es sind bisher nur wenige solcher Chopper für polychromatische Röntgenstrahlung entwickelt worden, die größtenteils auf einer rotierenden Scheibe beruhen. Šrajer et al. (1996) zeigten, daß unter Verwendung eines solchen Choppers ns-zeitaufgelöste Anregungsexperimente an Kohlenmonoxy-Myoglobin (i. f. MbCO) realisierbar sind, und beobachteten strukturell die photolytische Abspaltung des COs von der Häm-Gruppe. Der Vergleich von atomar aufgelösten, statischen Strukturen von CO- und deoxy-Myoglobin (ligandenfrei) bestätigte, daß die Abspaltung des CO-Liganden tatsächlich mit korrelierten Konformationsänderungen einhergeht (Kachalova et al. 1999). Diese Bewegungen mit maximalen Amplituden $\leq 0,4$ Å erfordern zu ihrer Beobachtung sehr hohe Bragg-Auflösung, doch dieser Anforderung genügte die bisherige zeitaufgelöste Messung an MbCO bei weitem nicht. Die atomar aufgelösten Strukturen des Myoglobins zeigten außerdem, daß frühere statische Untersuchungen von MbCO vermutlich durch Kontamination mit anderen Ligandierungszuständen beeinflusst waren, die aufgrund zu niedriger Auflösung nicht erkannt wurde und zu Fehlinterpretationen führte. Für eine erfolgreiche Untersuchung der Konformationsänderungen kurz nach der Photolyse von MbCO ist daher neben hoher Bragg-Auflösung auch eine Optimierung der Präparationsbedingungen des Kristalls erforderlich sowie nach Möglichkeit eine Überprüfung der Ausgangsstruktur. Die Laseranregungsbedingungen zur Erzeugung eines hohen Photolysegrades sind ebenso zu optimieren.

Messungen an Speicherringen der 2. Generation sind damit zumindest zur Entwicklung adäquater experimenteller Bedingungen von erheblichem Nutzen. Da die Bragg-Auflösung der Experimente am ESRF von Šrajer et al. nicht durch die verfügbare Strahlintensität sondern durch Strahlenschädigung begrenzt war, kann darüber hinaus an DORIS mindestens vergleichbare Bragg-Auflösung erwartet werden.

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung einer experimentellen Apparatur zur Durchführung ns-zeitaufgelöster Beugungsexperimente am Proteinkristallographiestrahl BW6 HASYLAB/DORIS, die aus einem Synchrotronchoppersystem, einer Triggerlogik, einem Lasersystem und einem Aufbau zur Messung der Zeitauflösung besteht. Der vergleichsweise dreifach geringere Pulsabstand an DORIS gegenüber den neueren Synchrotronspeicherringen stellte hierbei für die Entwicklung des Choppers ein erhebliches Problem dar. Zu seiner Lösung wurde statt der gängigen Scheibenchopper ein neuartiger Chopper entwickelt, dessen zentrale Komponente ein rotierender Spiegel ist, mit dem die erforderlichen Öffnungszeitfenster bereits bei relativ niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten erreicht werden, so daß die technologischen Probleme, die bei Scheibenchoppem mit Geschwindigkeiten $\geq 50000 \frac{\text{U}}{\text{min}}$ auftreten, vermieden werden. Die Funktionsweise des Spiegelchoppersystems, die Überprüfung seiner Leistungsfähigkeit und die der Triggerlogik zur Synchronisation zwischen Chopper, Anregung und Synchrotronpuls werden beschrieben. Die Charakteristika des verwendeten Lasersystems zur Probenanregung werden erläutert, und die Anregungsbedingungen für Myoglobin abgeschätzt. Die Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems wird anhand eines ns-zeitaufgelösten Beugungsexperiments an met-Myoglobin demonstriert, und die erreichte Datenqualität anhand verschiedener Parameter und berechneter Dichtekarten analysiert. Abschließend werden Möglichkeiten zur weiteren Optimierung zeitaufgelöster Experimente mit dem Spiegelchoppersystem diskutiert.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Synchrotronstrahlung

2.1.1 Bedeutung und Erzeugung von Synchrotronstrahlung

Synchrotronstrahlung findet in zahlreichen Forschungsgebieten Anwendung, von der Grundlagenforschung in der Physik bis hin zur medizinischen Diagnostik. Da die Strahlung eine extrem hohe Brillianz* aufweist, ist sie sehr gut fokussierbar und daher besonders geeignet für die Proteinkristallographie, da Proteinkristalle schlechte Streuer und ihre Dimensionen oftmals gering sind ($< 50 \mu\text{m}$). Ursprünglich war Synchrotronstrahlung ein „Abfallprodukt“ aus Elektron- oder Positron-Speicherringen, die für Experimente in der Teilchenphysik entwickelt worden waren.

Der Entstehung von Synchrotronstrahlung liegt die Erzeugung elektromagnetischer Wellen bei Beschleunigung von sich relativistisch bewegenden, geladenen Teilchen zugrunde (Jackson 1975), in diesem Fall die Beschleunigung der Positronpakete des Speicherrings in den Ablenkmagneten. Aufgrund eines relativistischen Effekts erfolgt die Abstrahlung nicht in einem Dipolfeld, sondern in einem engen Kegel tangential zur Teilchenbahn in der Orbitebene.

Eine Intensivierung der Synchrotronstrahlung wird durch Wiggler und Undulatoren anstelle von Ablenkmagneten erreicht. In diesen Multipolmagneten besteht ein periodisch alternierendes Magnetfeld, welches die geladenen Teilchen aufgrund der Lorentz-Kraft auf eine slalomförmige Bahn zwingt. Die Überlagerung der entstehenden Lichtkegel intensiviert dabei die Strahlung. Synchrotronstrahlung zeichnet sich neben hoher Brillianz und polychromatischem Spektrum durch ihre gepulste Zeitstruktur aus, die für zeitaufgelöste Experimente von besonderem Nutzen ist.

2.1.2 Zeitstruktur

Die Zeitstruktur ist durch die diskrete Verteilung der Elektronen bzw. Positronen in Ladungspaketen im Speicherring bedingt, deren Pulslänge zwischen 50–120 ps

*Anzahl der Photonen, die in einer Bandbreite von 0,1 % pro Zeiteinheit (s) in einen Strahlungskegel (mrad^2) bei einer bestimmten Ausdehnung der Quelle (mm^2) emittiert werden.

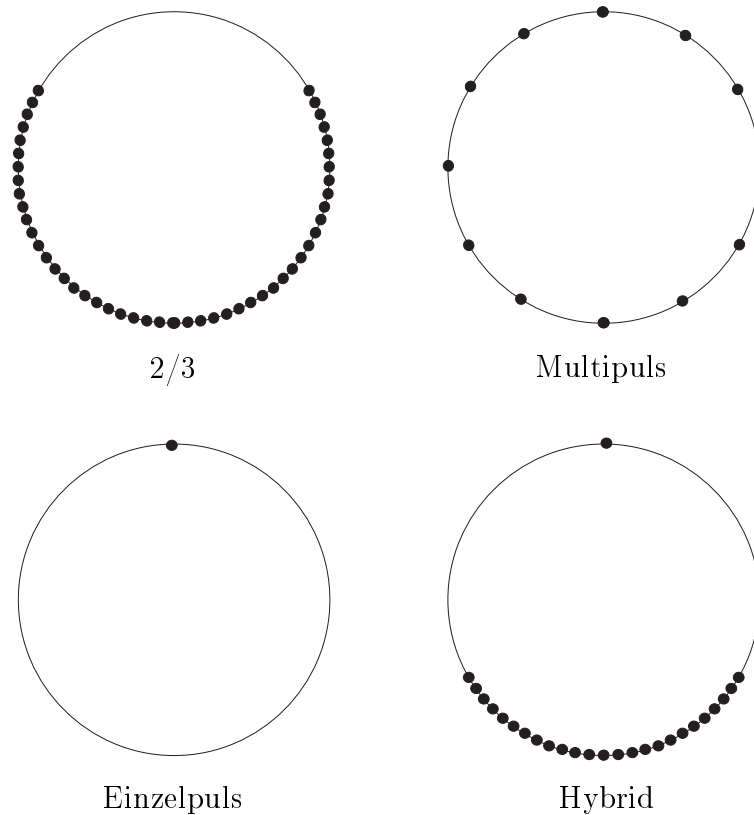


Abbildung 2.1: *Einige Beschleunigermodi an Synchrotronspeicherringen der 2. und 3. Generation. 2/3- und Multipuls-Modus sind die gängigsten Betriebsmodi, Einzelpuls und Hybrid-Modus werden für zeitaufgelöste Experimente gefüllt. Die Punkte symbolisieren schematisch die Ladungspakete im Speicherring.*

beträgt. Die zeitlichen Abstände t_{BX} variieren zwischen 2 ns und 4 μ s, je nach Orbitlänge und Füllschema des Rings (s. Tab. 2.1), wodurch die Anforderungen an die Verschlusszeit eines Synchrotronchoppers zur Extraktion eines einzelnen Pulses definiert werden. Verbreitete Füllmodi der Speicherringe 2. und 3. Generation sind der Multipuls-Modus und die 2/3-Füllung des Rings, die sich bei den Synchrotronen der 3. Generationen im Hinblick auf Höhe des Stromes und Lebensdauer gut bewährt hat, sowie gelegentlich der Einzelpuls- und der Hybrid-Modus (s. Abb. 2.1). Die notwendige Verschlusszeit eines Choppers ist offensichtlich am geringsten, wenn der Speicherring im Einzelpuls-Modus betrieben wird, denn dann beläuft sich der Pulsabstand auf 1–4 μ s. Dieser Modus ist jedoch aufgrund der geringen mittleren Intensität bei anderen Experimenten unerwünscht, weswegen diese den Multipuls- oder den 2/3-Modus bevorzugen. Ein Kompromiß zwischen möglichst hoher Intensität und möglichst langem Pulsabstand ist der Hybrid-Modus, bei dem antipodisch zu einem Einzelpuls ein *Superpuls* im Ring positioniert ist. Dieser besteht aus einer Vielzahl einzelner Ladungspakete mit einem Abstand von \approx 2–4 ns voneinander, wodurch ein hoher mittlerer Strom im Ring garantiert ist. Der Abstand zwischen Super- und Einzelpuls beträgt dann etwa ein Drittel der Gesamtumlaufzeit, im Falle des ESRF knapp 940 ns, so daß bei einem phasensynchron zur Ringfrequenz laufenden

Modus	DORIS		ESRF		APS	
	t_{BX} [μ s]	I[mA]	t_{BX} [μ s]	I[mA]	t_{BX} [μ s]	I[mA]
Einzel	0,96	43	2,82	15	3,68	5*
Doppel	0,48	80	1,41	n.r.	1,84	n.r.
Multi	0,19	140	0,18	90	0,15	100
Hybrid	0,32	n.r.	0,94	7+193	1,74	5+95*
$\frac{2}{3}$	0,32	n.r.	0,94	200	1,18	100

Tabelle 2.1: Umlaufzeit und mittlerer Strom unterschiedlicher Füllmodi von DORIS (HASYLAB 1999) und den Speicherringen der 3. Generation am ESRF (Goodhew 1999) und APS (Bizek 1996, Emery 1999). Der Eintrag „n.r.“ markiert, daß der Modus bisher nicht realisiert wurde, die sich theoretisch ergebenden Pulsabstände sind trotzdem eingetragen; mit „*“ gekennzeichnete Modi wurden von Mills (1989) vorgeschlagen.

Chopper ein Öffnungszeitfenster des Choppers von < 1880 ns zur Extraktion des Einzelpulses ausreicht. Der Nachteil des Hybrid-Modus im Vergleich zum gängigen 2/3-Füllmodus besteht lediglich in einer Reduktion der Strahllebensdauer von 45 h auf 35 h und einer etwa 10 Minuten längeren Injektionsphase, trotzdem wurden 1998 nur 11 Tage in diesem Modus bereitgestellt (Goodhew 1999).

An DORIS ist kein Hybrid-Modus verfügbar, sondern nur der 1-, 2- und 5-Puls-Modus, wobei der Speicherring größtenteils im 5-Puls-Modus betrieben wird. Zeitaufgelöste Beugungsexperimente können hier nur während des reduzierten Pulsbetriebes stattfinden, wobei aufgrund der 3–4-fach geringeren Umlaufperiode an DORIS gegenüber den anderen Speicherringen die Anforderungen an einen Synchrotronchopper entsprechend höher liegen. So sind zur Einzelpulsextraktion Öffnungszeitfenster von ≤ 964 bzw. 482 ns im Einzel- bzw. Zweipuls-Modus bei asynchronem Chopperbetrieb zwingend.

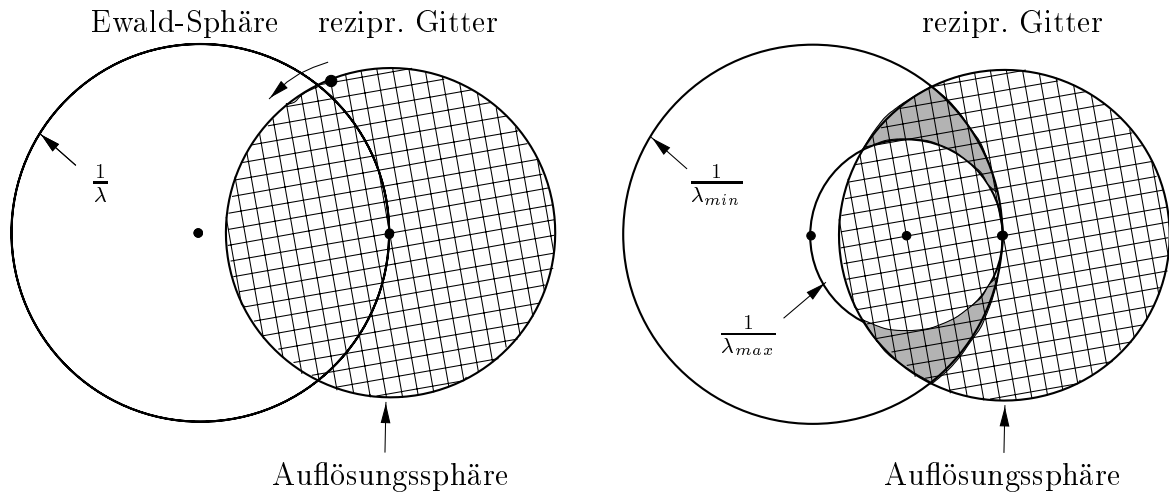


Abbildung 2.2: Auf die Ebene projizierte Ewald-Konstruktionen für monochromatische (links) und polychromatische Datennahme (rechts). Links ist ein reziproker Gitterpunkt hervorgehoben und die Drehrichtung gekennzeichnet, rechts markieren die schraffierten Flächen den beim Laue-Verfahren zugänglichen reziproken Raum. Die Radien der Ewald-Kugeln sind über die entsprechende reziproke Wellenlänge λ indiziert.

2.2 Kristallstrukturanalyse auf der Grundlage von Laue-Beugung

Dieser Abschnitt erläutert, wie Strukturinformationen über die Einheitszelle eines Proteinkristalls mittels kristallographischer Methoden erhalten werden können. Insbesondere wird hier das Laue-Verfahren diskutiert, da es für hochzeit aufgelöste Beugungsmessungen prinzipielle Vorteile bietet.

2.2.1 Kristallstrukturbestimmung

Die Kristallstrukturbestimmung basiert auf der Analyse von Bragg-Reflexen, die entstehen, wenn die auf den Kristall einfallende Strahlung die **Bragg-Bedingung**,

$$n\lambda = 2d \sin \theta, \quad n \in N, \quad (2.1)$$

erfüllt, wobei λ die Wellenlänge, d den Gitterebenenabstand und θ den Winkel zwischen Gitterebene und einfallender Strahlung bezeichnen. Die Intensität der Bragg-Reflexe, die von den Gitterebenen (hkl) ausgehen, ist proportional zum Quadrat der Strukturfaktoren $\mathbf{F}(h, k, l)$,

$$I(h, k, l) \propto |\mathbf{F}_{hkl}|^2. \quad (2.2)$$

Da der Strukturfaktor als Vektorsumme der Einzelstreuwellen der Atome in der Einheitszelle eine Funktion der Elektronendichte ρ ist, erlaubt es die Messung der Reflexintensitäten, Informationen über die Elektronendichte in der Einheitszelle zu gewinnen. Der Zusammenhang zwischen Strukturfaktor und Elektronendichte lautet

(Drenth 1995),

$$\mathbf{F}_{hkl} = \int_{\text{Einheitszelle}} \rho_{xyz} e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV, \quad (2.3)$$

und durch Fouriersynthese ergibt sich der Ausdruck für die Elektronendichte,

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_{hkl}}, \quad (2.4)$$

wobei der Strukturfaktor in der Notation $\mathbf{F} = F \exp^{i\alpha}$ geschrieben und die Integration über die Netzebenenindizes durch eine Summation ersetzt worden ist, da die Netzebenenindizes (hkl) nur diskrete Werte annehmen. Die Messung der integrierten Reflexintensitäten $I(hkl)$ erlaubt es, die Beträge der Strukturfaktoren F_{hkl} abzuleiten, die Phaseninformation α_{hkl} geht bei der Intensitätsmessung aber verloren. Bei zeitaufgelösten Messungen sind jedoch i. d. R. die statische Ausgangs- und Endstruktur des Proteins bekannt und damit auch deren Phasen. Da während einer Reaktion, die innerhalb von Nanosekunden abläuft, nur kleine Struktur- ($\leq 1 \text{ \AA}$) und damit Phasenänderungen erwartet werden, eignen sich die bekannten Phasen als Startphasen zur Berechnung von ρ_{xyz} .

2.2.2 Laue-Verfahren

Die Messung der Beugungsreflexe wird in der Proteinkristallographie für gewöhnlich mit monochromatischer Strahlung im **Drehkristallverfahren** durchgeführt. Hierbei ist jedoch die maximal erreichbare Zeitauflösung allein schon durch das Zeitintervall beschränkt, das benötigt wird, um einen Gitterpunkt im reziproken Raum durch die Ewald-Späre zu drehen (s. Abb. 2.2 links). Es hängt von der Ausdehnung des Gitterpunktes, also der Mosaizität des Kristalls, und der Drehgeschwindigkeit ab, die durch das angestrebte Signal/Rausch-Verhältnis bei gegebener Strahlintensität bestimmt wird. Die Belichtungsdauer liegt üblicherweise im Bereich von 5–15 s pro Bild, was monochromatische Methoden für hochzeitaufgelöste Messungen ausschließt. Eine wesentlich effektivere Methode zur Exploration des reziproken Raumes ist das **Laue-Verfahren**, durch dessen Anwendung Friedrich, Knipping und Laue im Jahre 1912 die allerersten Beugungsaufnahmen erhielten. Der Unterschied zum monochromatischen Verfahren besteht darin, daß der Kristall polychromatischer Strahlung ausgesetzt wird, die i. d. R. ein Wellenlängenband von ungefähr $\Delta\lambda = 0,5\text{--}2,0 \text{ \AA}$ umfaßt. In der Ewald-Konstruktion ist dann die Bragg-Bedingung für alle reziproken Gitterpunkte erfüllt, die in dem Raum liegen, der sich zwischen den beiden Ewald-Sphären mit Radius $\frac{1}{\lambda_{min}}$ und $\frac{1}{\lambda_{max}}$ befindet und von der Auflösungssphäre eingegrenzt wird (s. Abb. 2.2 rechts), die von der Kristallqualität abhängt. Der Vorteil des Laue-Verfahrens für zeitaufgelöste Beugungsmessungen liegt darin, daß die weisse Strahlung diese reziproken Gitterpunkte alle *gleichzeitig* anregt, was es bei hoher, z. B. tetragonaler Kristallsymmetrie erlaubt, bei einer einzigen Kristallorientierung einen hohen Prozentsatz symmetrieunabhängiger Reflexe ($> 80 \%$) zu messen (Cruickshank et al. 1987, Clifton et al. 1991). Bei geringer, z. B. monokliner Symmetrie, reichen

im Prinzip etwa fünf Laue-Aufnahmen bei unterschiedlichen Kristallorientierungen aus, um einen Datensatz mit hinreichender Vollständigkeit für die Auswertung zu erhalten.

Tatsächlich benötigen konventionelle Verfahren zur Auswertung von Laue-Daten eine Größenordnung mehr an Kristallorientierungen, um eine hohe Redundanz in der Messung von Strukturparametern zu erreichen, die zur rechnerischen Entfaltung der Energiemultipletts (energieüberlappende Reflexe, s.u.) benötigt wird (Ren & Moffat 1995a). Der Einsatz von statistischen Verfahren hingegen (Bayes-Statistik) benötigt diese Redundanz nicht, so daß die Anzahl der Kristallorientierungen minimiert wird (Bourenkov et al. 1996). Dies hat erhebliche Bedeutung für die erreichbare Strukturaufklärung, denn die Strahlenschädigung begrenzt die Strahlendosis, der ein Proteinkristall ausgesetzt werden kann. Bei Auswertung mit konventionellen Verfahren muß die Gesamtdosis aufgrund der geforderten Redundanz über viele Kristallorientierungen verteilt werden, bei Anwendung des Bayes-Verfahrens prinzipiell nur über die Anzahl, die zur Überdeckung des reziproken Raumes notwendig ist. Daraus resultiert ein höheres Signal/Rausch-Verhältnis und damit die Meßbarkeit von Reflexen bei höherer Bragg-Auflösung, die zum Nachweis geringer Konformationsänderungen unbedingt erforderlich ist.

2.2.3 Komplikationen bei der Auswertung von Laue-Daten

Die Anwendung des Laue-Verfahrens setzt außer speziellen Auswerteverfahren eine hohe kristalline Ordnung des Proteinkristalls voraus. Aufgrund der breiten Wellenlängenverteilung ist das Verfahren äußerst empfindlich auf Verbreiterungen in der Mosaikverteilung, die sich in den ausgedehnten, charakteristischen Reflexprofilen, den sogenannten *Streaks*, widerspiegelt (s. Abb. 2.3 links). Ist eine Mosaizität von weniger als $\approx 0,2^\circ$ nicht gegeben, kann dies zu so starker räumlicher Überlagerung der Reflexprofile führen, daß die Auswertung der Laue-Aufnahmen unmöglich wird. Folgende Effekte erschweren i. a. die Datenauswertung:

Low Resolution Hole. Wie in Abb. 2.2 (rechts) zu erkennen ist, nimmt die Anzahl der zugänglichen reziproken Gitterpunkte zum Koordinatenursprung hin aufgrund der Annäherung der beiden Ewald-Sphären stark ab. Dies resultiert bei einer Datennahme mit nur wenigen Kristallorientierungen in einer Unvollständigkeit des Datensatzes bei Reflexen geringer Auflösung, obwohl die Reflexe mittlerer und höherer Auflösung fast vollständig vorhanden sind (Clifton et al. 1991). Gemessene Reflexe geringer Bragg-Auflösung sind zusätzlich größtenteils Energiemultipletts, die entfaltet werden müssen, um überhaupt Reflexintensitäten bei geringer Auflösung bestimmen zu können.

Energiemultipletts entstehen, wenn der Satz von Wellenlängen und Netzebenenabständen $(\lambda, d), (\frac{\lambda}{2}, \frac{d}{2}), \dots, (\frac{\lambda}{n}, \frac{d}{n})$ die Bragg-Bedingung gleichzeitig erfüllt, denn dann beugt der Kristall diese Reflexe alle in dieselbe Richtung, und sie überlagern sich auf dem Detektor, so daß nur die Summe der Intensitäten als Meßwert vorliegt. Der Anteil dieser harmonischen Reflexe liegt bei weniger als 17 %

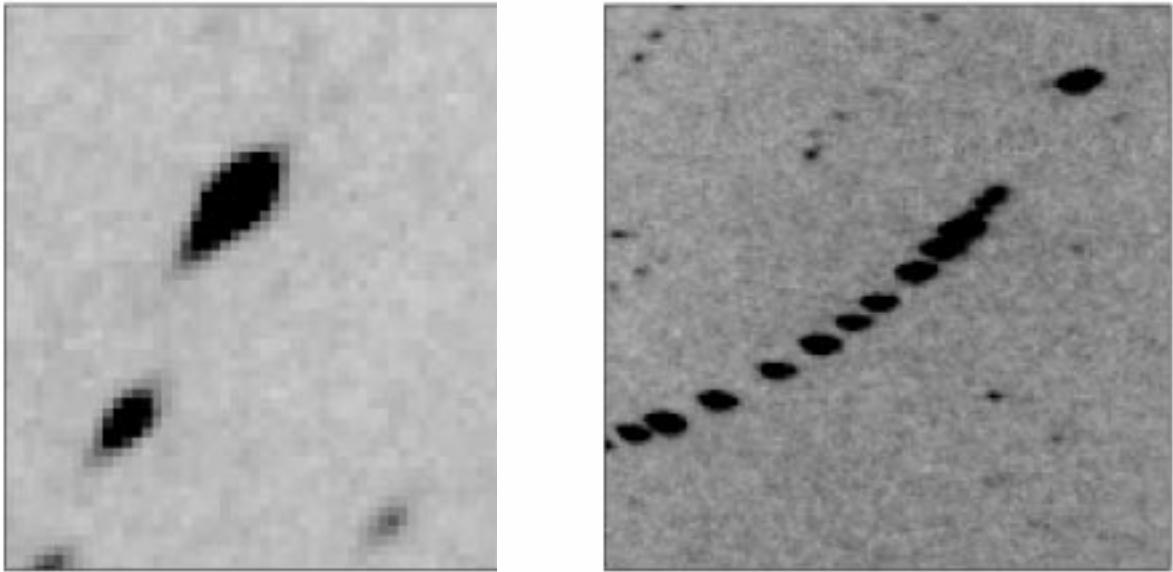


Abbildung 2.3: Links: *Charakteristischer, ellipsenförmiger, langgezogener Reflex eines Laue-Bildes, ein sogenannter Streak.* Rechts: *Räumlich überlappende, jedoch entfaltbare Reflexe innerhalb eines Lauekegels.*

(Cruickshank et al. 1987), doch betrifft er insbesondere Reflexe niedriger Auflösung, deren Quantität zwar gering ist, doch kann das Fehlen dieser Reflexintensitäten die Strukturanalyse stark beeinträchtigen (Szebenyi et al. 1992, Duke et al. 1994), weswegen spezielle Methoden zur Entfaltung dieser harmonischen Überlapps entwickelt worden sind (Ren & Moffat 1995a, Bourenkov et al. 1996), um die Strukturfaktoren der beteiligten Einzelreflexe trotzdem zu bestimmen. Fehlen diese nämlich bei der Fouriersynthese zur Berechnung der Elektronendichteverteilung, so kann es zu Abbruchfehlern kommen, die sich als „Wellen“ und Pseudomaxima in der Elektronendichtekarte manifestieren (Bartunik et al. 1992, Massa 1996).

Räumliche Überlappungen entstehen, wenn sich die Profile benachbarter Reflexe auf dem Detektor überlagern. Aufgrund der großen Zellabmessungen von Proteinkristallen ist die Reflexdichte sehr hoch (Anzahl der Reflexe $N_R \propto \frac{1}{\text{rezipr. Zellvol.}}$) und die relativ hohe Mosaizität verursacht insbesondere bei polychromatischer Bestrahlung eine starke Verbreiterung und Streckung der einzelnen Reflexprofile, so daß räumliche Überlappungen häufig auftreten. Ein Großteil kann mittels analytischer Profilanpassung entfaltet werden (Ren & Moffat 1995b) oder eine Vergrößerung des Detektorabstandes reduziert das Problem, jedoch auf Kosten der erreichbaren Auflösung.

Normalisierung der Wellenlänge. Zur korrekten Interpretation der gemessenen Reflexintensitäten müssen wellenlängenabhängige Effekte kompensiert werden. Hierzu gehören im wesentlichen die Spektralverteilung der Synchrotronquelle, Absorptionseffekte, verstärkte Abschneidung kurzer Wellenlängen bei Reflexion an optischen Elementen und das Ansprechverhalten des Detektors.

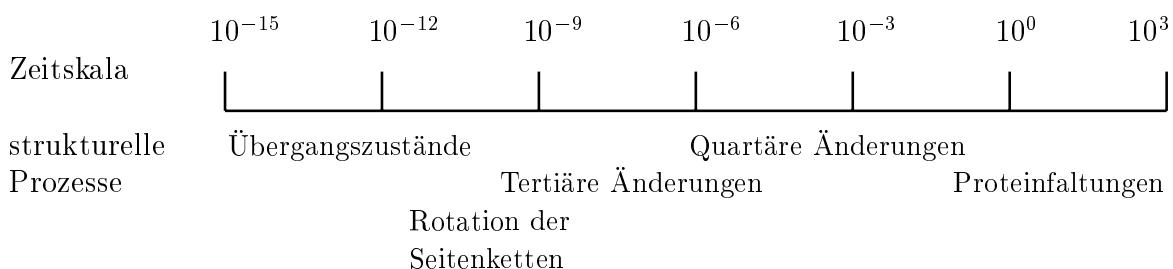


Abbildung 2.4: *Zeitskala struktureller Änderungen in Makromolekülen (Moffat 1989).*

Trotz der oben aufgeführten Komplikationen, die mit dem Laue-Verfahren verbunden sind, kann eine hohe Genauigkeit der mit dieser Methode bestimmten Strukturfaktoren erzielt werden. Dies wird in Kapitel 5.3 am Beispiel von zeitaufgelösten Beugungsmessungen an Myoglobin demonstriert.

2.3 Zeitaufgelöste Beugungsexperimente

Dieses Kapitel beschreibt die Durchführung zeitaufgelöster Beugungsexperimente wobei der nächste Abschnitt die Meßmethode unter Verwendung eines Synchrotronchoppers erläutert, es folgt eine Beschreibung der Anforderungen an eine erfolgreiche Reaktionsinitiation durch Photolyse und danach werden alternative Methoden zur Durchführung hochzeitaufgelöster Beugungsmessungen vorgestellt.

2.3.1 Zeitaufgelöste Beugungsmessungen unter Verwendung eines Synchrotronchoppers

Das Ziel hochzeitaufgelöster kristallographischer Beugungsexperimente an Proteinen ist es, mögliche Änderungen in der Tertiärstruktur[†] des Proteins im Verlauf einer biologisch relevanten Reaktion zu verfolgen. Die Zeitskala, auf der einige strukturelle Änderungen in Makromolekülen ablaufen, ist in Abb. 2.4 dargestellt. Die Prozesse vom Nano- bis zum Mikrosekundenbereich spielen hierbei eine besondere Rolle, da die Änderungen in der Tertiärstruktur eines Proteins in diesem Zeitbereich stattfinden, wie z. B. Bewegungen einzelner Seitenketten, kollektive Bewegungen einer Gruppe von Aminosäuren oder Ligandenabspaltung, denen große Bedeutung hinsichtlich der Proteinfunktion beigemessen wird.

Die zeitaufgelöste Messung einer biochemischen Reaktion mittels Röntgenbeugung erfordert, daß die Reaktion extern und i. a. zyklisch anregbar ist, damit durch Wiederholung des Experiments zum einen der reziproke Raum vollständig exploriert werden kann, zum anderen, damit durch Aufintegration mehrerer Belichtungen auf dem Detektor ein höheres Signal/Rausch-Verhältnis erreicht wird. Dabei dürfen die Änderungen in der molekularen Struktur als Folge der Anregung die Ordnung im Kristallgitter

[†]Unter der Tertiärstruktur werden Gruppen von α -Helices und β -Faltblättern verstanden, sogenannte *Domänen*. Mehrere dieser nahezu identischen Domänen bilden die Quartärstruktur eines Proteins.

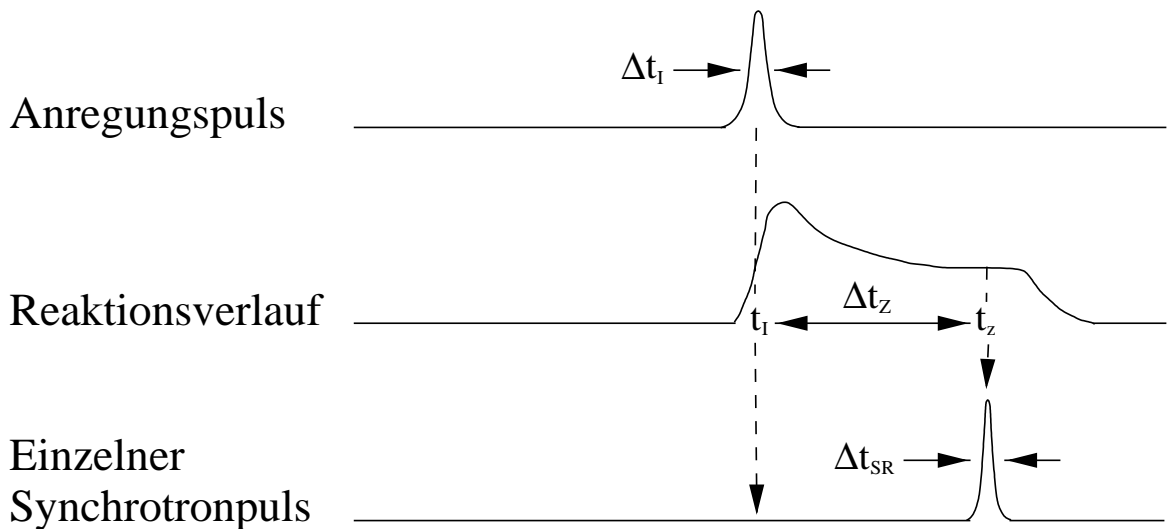


Abbildung 2.5: Schematischer Zeitverlauf eines Anregungsexperiments.

nicht beeinträchtigen, da dies die Auflösungsgrenze der Beugung erheblich verschlechtern kann.

Das verwendete Meßverfahren ist die stroboskopische Datenahme, bei der wiederholt zu einem Anfangszeitpunkt t_I eine Reaktionsinitiation stattfindet und zum Zeitpunkt t_Z die Beugungsmessung (s. Abb. 2.5). Durch Variation von $\Delta t_Z = t_Z - t_I$ läßt sich der strukturelle Relaxationsprozeß in Form von dreidimensionalen Momentaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten erfassen, wobei die Zeitauflösung δt_Z des untersuchten Phänomens durch die Faltung von Anregungsdauer Δt_I , Belichtungszeit Δt_{SR} und dem Zeitabstand Δt_Z bestimmt ist (Wulff et al. 1997):

$$\delta t_Z \approx \sqrt{\Delta t_I^2 + \Delta t_{SR}^2 + \Delta t_Z^2} . \quad (2.5)$$

Bei Verwendung eines Nd:YAG-Lasers zur photolytischen Anregung wird die Zeitauflösung durch den Anregungspuls dominiert, dessen Dauer ca. $\Delta t_I = 7$ ns beträgt, weil der belichtende Synchrotrorpuls wesentlich kürzer ist ($\Delta t_{SR} = 50\text{--}120$ ps). Da sich der zeitliche Abstand zum nächsten Synchrotrorpuls auf maximal $\approx 1\text{--}4$ μs beläuft, ist es notwendig, den belichtenden Synchrotrorpuls aus dem Pulszug zu extrahieren und die vorhergehenden und nachfolgenden Pulse abzublocken. Diese zerstören ansonsten die Zeitauflösung, weil sie den Kristall zusätzlich zur Belichtung bei t_Z zu einem Zeitpunkt belichten, zu dem die Proteine noch nicht angeregt worden sind bzw. diese sich bereits in einer fortgeschritteneren Reaktionsphase befinden. Die Beugungsbilder sind dann auf einem integrierenden Detektor, wie z. B. dem verwendeten Bildplattendetektor, i. f. *Image-Plate*, nicht mehr zu separieren. Die Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung kann durch eine Kombination von mehreren mechanischen Strahlverschlüssen, dem Synchrotronchoppersystem, so moduliert werden, daß wie gefordert nur ein einzelner Puls extrahiert wird (LeGrand et al. 1989, Wulff et al. 1997, Kosciesza & Bartunik 1999). Hierbei sind die Anforderungen an das erzeugbare Zeitfenster des Choppersystems umso höher, je geringer der Zeitabstand

der Synchrotronpulse. Damit die einzelnen Belichtungen unter den gleichen zeitlichen Bedingungen stattfinden, ist eine präzise Synchronisation zwischen Reaktionsstimulus und Beugungsmessung erforderlich, die an das Öffnen des Choppers gekoppelt ist. Die Belichtungszeit für eine Laue-Aufnahme hängt von der einfallenden Röntgenintensität, dem Kristallvolumen und der angestrebten Bragg-Auflösung ab. An einem DORIS-Wiggler liegt z. B. die effektive Belichtungszeit für ein bestrahltes Volumen von $\approx 400 \times 500 \times 80 \mu\text{m}^3$ unter Einsatz des Spiegelchoppers bei $\approx 385 \text{ ns}$, entsprechend 3500 einzelnen Synchrotronpulsen bei einer Pulslänge von 110 ps. Am ESRF sind schon Laue-Bilder von Myoglobinkristallen mit vergleichbarer Größe mit drei Synchrotronpulsen aufgenommen worden (360 ps), was der dortigen, etwa 1000-fach höheren Brillianz zu verdanken ist. Hochzeitaufgelöste Beugungsexperimente mittels Laue-Verfahren an Proteinkristallen gibt es inklusive dieser Arbeit bisher nur drei (Šrajer et al. 1996, Perman et al. 1998), und sie sind nur durch den Einsatz von Synchrotronquellen in Verbindung mit einem Synchrotronchopper realisiert worden.

2.3.2 Reaktionsinitiation durch Photolyse

Die Reaktionsinitiation zeitaufgelöster Beugungsexperimente läßt sich im Nanosekundenbereich nur photolytisch realisieren, da andere Methoden, wie z. B. Eindiffusion von Reagenzien, Temperatursprünge oder Druckänderungen, auf längeren Zeitskalen stattfinden (Gruner 1987, Moffat 1989). Laserpulse im Nanosekundenbereich sind heutzutage problemlos zu erzeugen und daher ein geeigneter Reaktionsinitiator, jedoch hat diese Methode der Anregung den Nachteil, nur auf photoaktive Proteine anwendbar zu sein bzw. auf solche, die photosensitiviert werden können. Das klassische Beispiel einer photoinduzierbaren Reaktion in einem Protein ist die bereits erwähnte Dissoziation von MbCO, andere photoaktive Proteine sind Bacteriorhodopsin[‡] (Subramaniam et al. 1999) und das Photoactive Yellow Protein (PYP) (Perman et al. 1998). Eine andere Methode der photoinduzierten Reaktionsinitiation besteht darin, Reaktionsstimuli wie z. B. ATP[§] in sogenannte Käfigverbindungen (*caged* ATP) einzusperren, die dann photolytisch aufgebrochen werden, um das ATP freizusetzen (Rapp et al. 1986, Schlichting et al. 1990).

Die Reaktionsinitiation bezweckt die Erzeugung eines strukturell metastabilen Zwischenzustandes hinreichend langer Besetzungsdauer, der dann kristallographisch erfaßt werden kann. Dabei ist die zyklische Wiederholbarkeit der Reaktion Voraussetzung, um das stroboskopische Meßverfahren anwenden zu können. Erstrebenswert ist eine über das Kristallvolumen **homogene Anregung mit hohem Anregungsgrad**, um eine hohe Population des Zwischenzustandes für ein meßbares Beugungssignal zu erzeugen. Die praktischen Aspekte dieser Anforderungen sind i. f. kurz erläutert.

[‡]Bacteriorhodopsin ist ein Photorezeptor, dessen Funktionsweise eng mit dem Sehmechanismus assoziiert wird, genau wie das PYP.

[§]Adenosintriphosphat, ein wichtiges Coenzym zur Speicherung leicht abrufbarer Energie in biologischen Systemen (Voet & Voet 1992).

Homogene Anregung

Zwecks einer homogenen Anregung ist darauf zu achten, daß bei der Anregungswellenlänge die Extinktion der Probe keinen zu hohen longitudinalen Gradienten in der Lichtintensität verursacht, denn dies resultiert sowohl in einem reduzierten Anregungsgrad als auch einem Temperaturgradienten, der Spannungskräfte im Kristall hervorrufen und ihn zerstören kann. Aus denselben Gründen sollte die Intensitätsverteilung der einfallenden Laserstrahlung in transversaler Richtung ebenfalls möglichst homogen sein.

Hoher Anregungsgrad

Für einen hohen Anregungsgrad ist neben homogener Anregung ausreichende Lichtintensität erforderlich. Diese hängt von der Anzahl der zu photolysierenden Reaktionszentren ab und muß sorgfältig bestimmt werden, da bei zu hoher Intensität Strahlenschäden bis hin zum Zersplittern des Kristalls aufgrund von Schockwellen auftreten. Eine hohe Quanteneffizienz für den relevanten Absorptionsprozeß ist hierbei vorteilhaft, um Erwärmungseffekte aufgrund von anderen Absorptionsprozessen zu vermeiden.

Auch wenn die Anforderungen an Homogenität der Strahlung und Anregungsgrad erfüllt sind, kann es neben dem Streusignal des interessierenden Zustandes zu störenden Streubeiträgen von anderen Zuständen kommen, denn es ist nicht selbstverständlich, daß bei der Präparation des Grundzustandes einheitliche Besetzung der Bindungsstellen erreicht wird. So kann z. B. statt eines CO-Moleküls ein O₂- oder H₂O-Molekül an das Häm-Eisen binden und später in der Elektronendichtekarte die Dichte verfälschen. Des weiteren kann nur darüber spekuliert werden, ob die auf die Photolyse folgenden Konformationsänderungen in jedem Molekül gleichartig erfolgen. Es ist außerdem davon auszugehen, daß höchstwahrscheinlich keine vollständige Photolyse erreicht werden kann (zumindest bei MbCO (Šrajer et al. 1996)), so daß ein gewisser Anteil der Moleküle im Grundzustand verbleibt. Die zeitaufgelöste Beugungsmessung kann daher lediglich die Mischung der über alle Einheitszellen gemittelten Zustände erfassen.

2.3.3 Alternative Methoden zeitaufgelöster Röntgenbeugung

Es existieren auch alternative Methoden zur Durchführung zeitaufgelöster Beugungsexperimente. Die möglichen experimentellen Apparaturen können anhand der Strahlungsquelle wie folgt charakterisiert werden:

1. Synchrotronspeicherring mit modulierter Zeitstruktur durch
 - Chopper oder
 - Kickermagnet
2. Synchrotronspeicherring in Verbindung mit hochzeitauflösenden Detektoren

3. Intensive Röntgenquellen mit Einzelschußbetrieb, wie

- FEL oder
- Plasmaquellen

Die hier aufgeführten Möglichkeiten sind i. f. beschrieben.

Synchrotronquellen mit modulierter Zeitstruktur durch Kickermagneten

Eine Modulation der Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung läßt sich außer durch einen Chopper auch durch eine kurzzeitige Veränderung des Orbits im Speicherring erzielen. Ein **Kickermagnet** ändert hierbei die Trajektorie des Ladungspakets vor Eintritt in den Wiggler und somit den Raumwinkel, in welchen die Synchrotronstrahlung emittiert wird, so daß nur im Falle dieser Ablenkung Strahlung durch die Komponenten der Strahlführung gelangt. Da die Ansteuerung eines Kickermagneten auf elektromagnetischem Wege innerhalb von Nanosekunden erfolgen kann, müßte es möglich sein, im Bedarfsfall nur die Trajektorie für ein einziges Elektronenpaket zu ändern, so daß das nachfolgende Paket keine Ablenkung erfährt. Nach dem Austritt des abgelenkten Ladungspakets aus dem Wiggler lenkt ein zweiter Kickermagnet dieses wieder zurück auf die ursprüngliche Bahn.

Aus Platzgründen kann es jedoch schwierig sein, derartige Kickermagneten in bestehende Speicherringe nachträglich zu integrieren. Es besteht bisher noch keine derartige Apparatur für zeitaufgelöste Beugungsexperimente, doch das Prinzip wird von Nikitenko et al. (1996) erfolgreich für zeitaufgelöste XANES-Messungen verwendet, indem ein Kickermagnet die Strahllage und somit den Einfallswinkel der Synchrotronstrahlung auf einen Monochromator ändert, was eine sehr schnelle Manipulation der Wellenlänge erlaubt.

Synchrotronquellen in Verbindung mit zeitauflösenden Detektoren

In der Proteinkristallographie haben sich integrierende Detektoren wie **Image-Plate** und **CCD-Kamera** für die Untersuchung statischer Strukturen etabliert, für zeitaufgelöste Messungen sind sie jedoch nur sehr bedingt einsetzbar, da die Auslesezeit die erreichbare Zeitauflösung auf ≈ 3 min (mar research 1998) bzw. $\approx 2-5$ s (Naday et al. 1994) limitiert, spezielle CCD-Entwicklungen erreichen allerdings mittlerweile schon Auslesezeiten von etwa 100 bis 20 ms pro Bild (Moon et al. 1994, Morse 1996, Amemiya et al. 1995). Auf diesen Zeitskalen lassen sich quartäre Strukturänderungen und Proteinfaltungen erfassen, doch der Nanosekundenbereich läßt sich mit diesen Detektoren nicht erschließen.

Eine bessere Perspektive bieten dagegen **photonenzählende Detektoren**. Interessant für die Proteinkristallographie sind aufgrund der hohen Reflexdichten[¶] jedoch nur 2-D-Detektoren, denn das einzelne Ausmessen der Reflexe mit hochzeitauflösenden

[¶]Für Myoglobin z. B. 6000 Reflexe bei polychromatischer Belichtung auf einem Image-Plate ($\varnothing = 36$ cm) in 20 cm Entfernung, entsprechend einem Raumwinkel von 4 % von $4\pi^2$.

0-D Detektoren, wie z.B. Streak-Kameras (Zeitauflösung $\Delta t_Z \approx 2$ ps (Murnane et al. 1990)) oder 1-D Detektoren, wie z.B. Zeilentransfer-CCDs ($\Delta t_Z = 20$ μ s (Clarke 1994)), ist allein schon wegen des Meßaufwands nicht zu realisieren. Zur Kategorie der photonenzählenden 2D-Detektoren gehören z.B. MWPCs (Multiwire Proportional Counter) und MicroGap-Detektoren (Lewis et al. 1997), MicroCATs (Micro Compteur A Trou) und Silizium-Pixeldetektoren. Bei diesen Detektoren definiert die Auslesegeschwindigkeit, d. h. die globale Zählrate die Zeitauflösung. Vielversprechend sind z. B. die gegenwärtigen Entwicklungen der beiden letzteren Detektortypen. Ein MicroCAT-Detektor ist im Prinzip ein hochsegmentierter Gasdetektor, der sich neuartiger Kathodenstrukturen zur Verstärkung der Primärladung bedient und in Verbindung mit moderner Ausleseelektronik einen leistungsfähigen Detektor für Anwendungen mit Synchrotronstrahlung darstellt (Menk & Sarvestani 1999). Er weist hohe Ortsauflösung (≈ 300 μ m), einen großen Dynamikbereich (10^7 – 10^8) und eine hohe Zählrate auf (lokal $\approx 3 \times 10^6 \frac{\gamma_s}{\text{s Pixel}}$) (Sarvestani et al. 1998). Bisher ist jedoch für den Prototyp nur eine aktive Fläche von 28×28 mm^2 realisiert worden, zu gering für Proteinkristallographie doch eine 10×10 cm^2 Version wird angestrebt.

Der andere Detektortyp ist der Silizium-Pixeldetektor, der im Prinzip aus einer Matrix von Photodioden besteht, wobei jede ihren eigenen Vorverstärker, Diskriminator und Zähler hat. In der Entwicklung befindet sich ein sogenannter DPAD (Digital Pixel Array Detector) mit einer aktiven Fläche von 15×15 cm^2 und 10^6 Pixeln mit einer Pixelgröße von 150 μ m für hohe räumliche Auflösung, die den Anforderungen der Proteinkristallographie gerecht wird. Die lokale Zählrate eines kleineren Testdetektors erreicht $10^6 \frac{\gamma_s}{\text{s Pixel}}$ und für die globale Rate des DPAD werden $10^{11} \frac{\gamma_s}{\text{s}}$ angesetzt (Cork et al. 1999). Der Detektor verfügt über einen Dynamikbereich von 10^9 und erlaubt eine Energieauflösung von besser als 10 % .

Mit Pixel- und MicroCAT-Detektoren hinreichender Fläche und Zählratenkapazität würden sich nach der Anregung Reaktionsabläufe mit Bildraten messen lassen, die der Frequenz der Synchrotronstrahlung entsprechen, hinreichende Intensität vorausgesetzt. Bei zu hohem Photonenfluß würde jedoch die globale Zählratenkapazität überschritten werden, bei zu niedriger das Signal/Rausch-Verhältnis leiden. Dieses könnte man jedoch durch erneutes Anregen und wiederholte Messung der Bildfolge verbessern. Ein langsamer Chopper wäre dann notwendig, um mittels eines Zeitfensters die Meßdauer auf den interessierenden Zeitbereich zu beschränken, damit unnötige Strahlenbelastung des Kristalls vermieden wird.

Röntgenquellen mit Einzelschußbetrieb

Röntgenquellen, die imstande sind intensive Röntgenpulse individuell zu erzeugen, sind der am DESY geplante Free Electron Laser (i. f. FEL) und Laserplasmaquellen. Die Verfügbarkeit einzelner Pulse setzt nur noch eine Synchronisation zum Anregungspuls voraus, um zeitaufgelöste Beugungsexperimente durchzuführen, was die Messungen stark vereinfacht, denn die Notwendigkeit, Chopper einzusetzen und diese mit dem Experiment zu synchronisieren entfällt. Im folgenden sind die Eigenschaften dieser Quellen im Hinblick auf zeitaufgelöste Experimente erörtert.

FEL. Eine wahrscheinlich ideale Strahlungsquelle für zeitaufgelöste Röntgenbeugung wird der FEL sein, hauptsächlich weil er imstande sein wird, hochbrillianten Röntgenpulse von nur etwa 100 fs Dauer zu erzeugen und diese den Experimentierstationen individuell zu Verfügung zu stellen (Schneider 1997). Ein FEL beruht auf dem SASE-Prinzip (**S**elf **A**mplified **S**pontaneous **E**mission), wobei ein in einem Undulator erzeugtes Photonenfeld in Wechselwirkung mit dem erzeugenden Elektronenpaket tritt, und so weitere Emission stimuliert, was zu einer enormen Brillianz dieser Quelle führt (Bonifacio et al. 1994). Die mittlere Brillianz des am DESY geplanten TESLA-FELs beträgt etwa $10^{25} \frac{\text{Photonen}}{\text{s} \cdot \text{mrad}^2 \cdot \text{mm}^2 \cdot 0,1\% \text{Bandbreite}}$ und ist somit um einen Faktor 10^6 höher als die eines ESRF-Undulators und um $\approx 10^9$ mal höher als an einem DORIS-Wiggler. Die Pulse des FEL werden mit einer Dauer von nur ≈ 100 fs in Pulszügen zu ≈ 11300 Einzelpulsen innerhalb 1 ms erzeugt, wobei der FEL diese Pulszüge mit einer Frequenz von 5 Hz generiert (Schneider 1997). Aufgrund der kurzen Pulsdauern scheinen zeitaufgelöste Beugungsexperimente bis in den 100 fs-Bereich von der apparativen Seite her möglich, jedoch müssen Untersuchungen zur Strahlenresistenz und Erwärmung von Proteinkristallen bei solch hohen Photonenflüssen erst noch durchgeführt werden. Erste Abschätzungen zeigen, daß bei derartigen Intensitäten die Elektronen von Makromolekülen in weniger als 1 fs in ein Plasma angeregt werden (Doniach et al. 1997). Eine Reduzierung der Intensität wird wahrscheinlich Voraussetzung dafür sein, überhaupt Beugungsaufnahmen an Proteinkristallen durchführen zu können, ohne diese zu zerstören. Die verfügbare Intensität wird das Signal/Rausch-Verhältnis wesentlich verbessern, und da der FEL die Photonen mit einem Strahldurchmesser von nur etwa $50 \mu\text{m}$ aussendet ergibt sich die Möglichkeit, mit sehr kleinen Kristallen zu arbeiten, die dementsprechend optisch dünn sind. Dies bringt erhebliche Vorteile in bezug auf eine gleichmässige, photolytische Anregung der Reaktion mit sich. Mit dem FEL wird die Chance auf eine wesentliche Verbesserung der Datenqualität für zeitaufgelöste Beugungsexperimente bestehen, und er wird den Subpikosekundenbereich für derartige Messungen ermöglichen.

Laserplasmaquellen. Eine weitere Röntgenquelle für die Emission einzelner Pulse ist die Laserplasmaquelle. Sie erzeugt Röntgenpulse, wenn Laserpulse mit Leistungen von 10^{14} – 10^{19} Watt auf ein Absorbermaterial treffen. Die Art des Erzeugungsprozesses, derer es verschiedene gibt, hängt von Laserenergie, -pulsdauer und Absorbermaterial ab und es kommt dabei vorwiegend zu Linienemission aber auch zu schmal- und breitbandiger Emission, wobei sich der Energiebereich von 0,05–500 keV erstreckt, abhängig von der Art der Erzeugung. Die Laserplasmastrahlung eines Goldtargets liefert z. B. ein kontinuierliches Bremsstrahlungsspektrum (10–500 keV) (Hauer & Kyralla 1997), das für Laue-Experimente von Interesse sein könnte. Die Röntgenpulsdauern bewegen sich dann im Bereich von 200 ps, was für ns-zeitaufgelöste Experimente vollkommen hinreichend wäre.

2.4 Myoglobin als Modellsystem

2.4.1 Physiologische Rolle

Myoglobin (Mb) gehört zur Gruppe der Häm-Proteine, und seine Aufgabe besteht in der Speicherung und dem Transport von Sauerstoff im Muskelgewebe. Bei Beanspruchung des Muskels sinkt der Sauerstoffgehalt im Gewebe, und Myoglobin führt Sauerstoff an den Muskel nach. Myoglobin ist eng verwandt mit den vier Untereinheiten des Hämoglobins, das für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich ist. In beiden Proteinen ist die gebundene Häm-Gruppe, die sich innerhalb des Proteins in der sogenannten Häm-Tasche befindet, für die Sauerstoffbindung verantwortlich.

Neben O₂ kommen für das Häm-Eisen Fe(II) die Moleküle CO, NO und H₂S als Liganden in Frage, die im freien Häm die Bindung mit wesentlich höherer Affinität eingehen als O₂ (im Fall von CO 30000-fach stärker (Springer et al. 1994)), was die Toxizität dieser Substanzen erklärt. Ist das Häm jedoch in Myoglobin eingebettet, so ist die Affinität zu den anderen Liganden stark reduziert, so daß das Verhältnis der Bindungsaffinitäten z. B. für CO zu O₂ nur noch einen Faktor 30 beträgt. Myoglobin ist also imstande, zwischen seinen Häm-Bindungspartnern zu differenzieren, was physiologische Relevanz hat, da CO im Organismus natürlich vorhanden ist; es entsteht z. B. beim Abbau des Häms im sogenannten Hämkatabolismus (Voet & Voet 1992). Als weitere Form des Myoglobins existiert das met-Myoglobin, bei dem das Häm-Eisen als Fe(III) vorliegt und koordinativ durch H₂O abgesättigt ist. Das in Kapitel 5 beschriebene Testexperiment ist mit dieser Form des Myoglobins durchgeführt worden.

2.4.2 Statische Struktur und Reaktionskinetik

Myoglobin wird im wesentlichen von acht α -Helices (A–H) aufgebaut, von denen zwei (E und F) den Großteil der hydrophoben Tasche formen, in der sich das Häm befindet (s. Abb. 2.6 und Abb. 2.7). Es besteht aus dem Porphyrinring, dieser wiederum aus vier Pyrrolringen, die das Eisen umgeben und je ein Stickstoffatom als Ligand für das Eisen beisteuern. Von der proximalen Seite her (unterhalb der Porphyrinebene), bindet das proximale Histidin (His93) als fünfter Ligand, von der distalen Seite her (oberhalb der Porphyrinebene) kann eines der oben genannten Moleküle, z. B. CO, als sechster Ligand binden oder die Bindungsstelle ist frei (deoxy-Mb), wie nach dem Abbinden des Liganden durch z. B. Photolyse,



Nach der Zerstörung der kovalenten CO-Bindung zum Eisen entsteht nach wenigen Pikosekunden ein intermediärer Zwischenzustand hoher Population und Lebensdauer ($\tau \geq 500$ ns), Mb*CO, bei dem sich das CO noch in der Häm-Tasche befindet, bevor es aus dem Protein herausdiffundiert und dieses in den reinen deoxy-Zustand (Mb* + CO) übergeht (Olson & Phillips 1996). Von wissenschaftlichem Interesse sind hierbei u. a. die Konformationsänderungen, die im Protein beim Übergang von

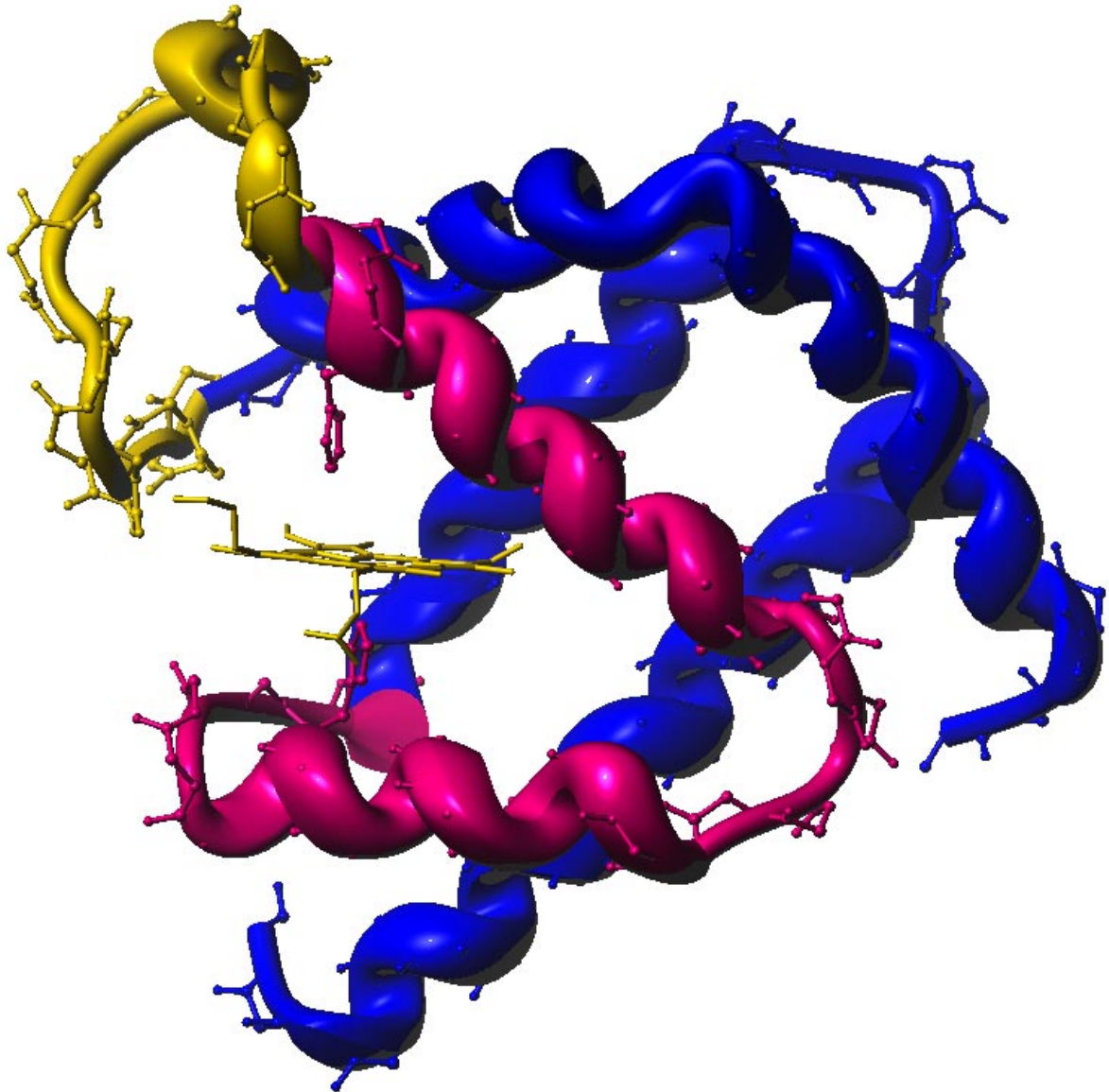


Abbildung 2.6: Strukturmodell des Myoglobins, die E- und F-Helix sind rot dargestellt, das Häm dazwischen sowie ein Teil der Hauptkette gelb. Oberhalb und unterhalb des Häms sind distales und proximales Histidin zu erkennen (zu Verfügung gestellt von G. Kachalova).

MbCO \rightarrow Mb*CO stattfinden und Aufschlüsse über den Bindungsmechanismus geben könnten. Der Prozeß Mb*CO \rightarrow Mb* + CO ist ebenfalls interessant, denn in den statischen Myoglobinstrukturen werden keine ausreichend großen Diffusionskanäle für das CO zum Verlassen des Proteins gefunden, weshalb vermutet wird, daß diese sich nur während des dynamischen Übergangs der Konformation zwischen Anfangs- und Endstruktur öffnen.

Ein Rückbinden des COs an das Eisen aus dem intermediären Zustand Mb*CO wird spektroskopisch zu einem Prozentsatz von nur 2 % beobachtet (Lim et al. 1995), der Rest diffundiert innerhalb von ≈ 1 ms aus der Häm-Tasche heraus. Eine Neubesetzung der Bindungsstelle erfolgt dann erst, nachdem ein neues CO auf bisher noch unbekanntem Wege aus der Lösung durch das Protein in die Häm-Tasche gelangt ist. Sauerstoff bindet hingegen in ungefähr 2 ps nach der Photolyse zu 80 % an das Eisen zurück (Olson & Phillips 1996), weswegen der intermediäre Zustand Mb*O₂ mit ns-zeitaufgelösten Beugungsmessungen nicht zugänglich ist. Dies ist einer der Gründe, weswegen sich die zeitaufgelösten Röntgenstrukturuntersuchungen auf MbCO statt auf das physiologisch relevantere MbO₂ konzentrieren.

2.4.3 Erwartete Strukturänderungen

Für die Strukturänderungen nach der Ligandenabspaltung werden im wesentlichen drei Aspekte in der Literatur diskutiert:

1. Wo ist das CO lokalisiert ?
2. Wie verändert sich das Häm und
3. welche Änderungen in der tertiären Struktur sind zu erwarten ?

Die photolytische Abspaltung des COs ist strukturell anhand von kristallographischen Tieftemperaturexperimenten statisch untersucht worden (Schlichting et al. 1994, Teng et al. 1994, Hartmann et al. 1996). Bei Temperaturen von 20–40 K kann das CO aufgrund der Rigidität des Proteins nicht aus der Häm-Tasche herausdiffundieren und die Rückbindung ist auf den Sekundenbereich verlangsamt, so daß durch kontinuierliche Beleuchtung des Kristalls eine hohe Besetzung des Abspaltungszustandes erreicht wird. Als wichtigstes Resultat dieser Messungen zeigte sich, daß das abgespaltene CO eine Position fast parallel zur Häm-Ebene in der distalen Tasche einnimmt (*docking-site*), die etwa 3 Å vom Eisenatom entfernt ist.

Das potentielle Verhalten des Häms und die Endzustände zu erwartender Konformationsänderungen der tertiären Struktur nach der Photolyse sind i. f. kurz anhand eines Vergleichs der von Kachalova et al. (1999) bei Zimmertemperatur gemessenen, hochaufgelösten (1,12 Å) statischen Strukturen des ligandenfreien deoxy-Myoglobins und des MbCOs aufgezeigt. Es wurden die folgenden wesentlichen strukturellen Unterschiede festgestellt, die ähnlich auch bei zeitaufgelösten Messungen zu erwarten wären (s. Abb. 2.7):

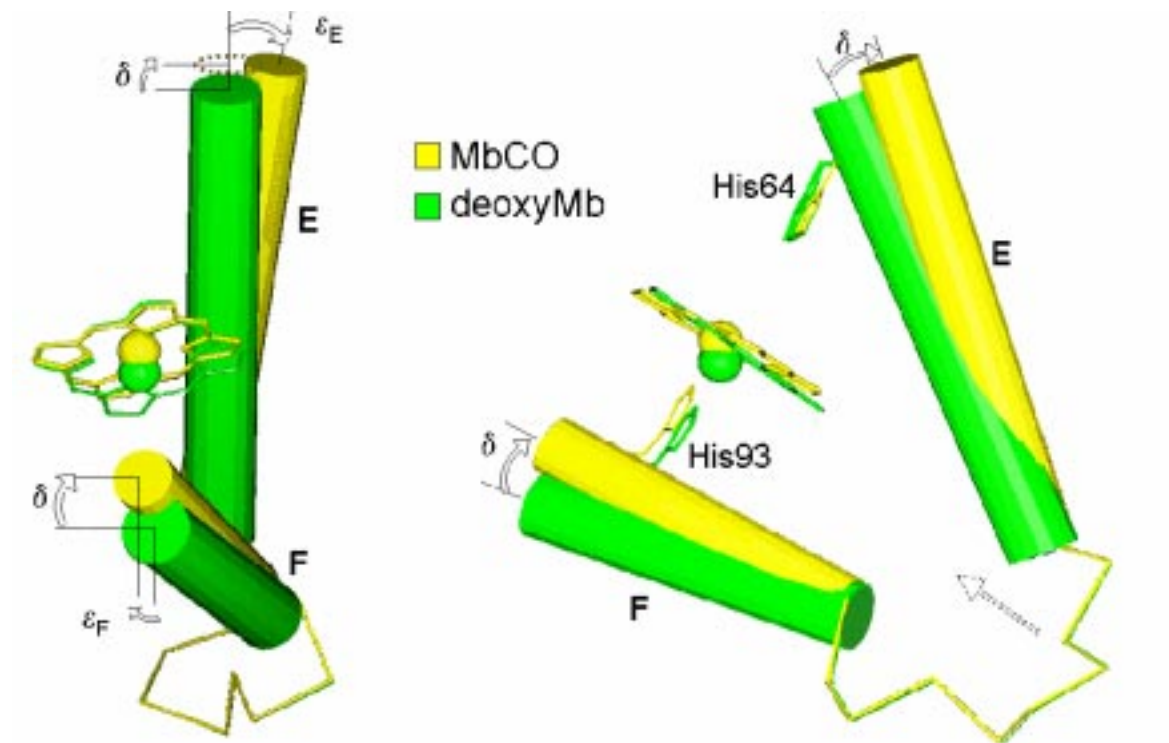


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der durch die E- und F-Helix gebildeten hydrophoben Tasche, in die das Häm eingebettet ist. Es sind die 4 Pyrrolringe des planaren Porphyrinrings zu erkennen, in deren Zentrum das Eisen sitzt. Die strukturellen Unterschiede zwischen MbCO und deoxy-Mb sind indiziert, das CO ist nicht dargestellt (Kachalova et al. 1999).

1. eine Inklination der Pyrrolringe des Porphyrins gegenüber der Häm-Ebene um 2° ,
2. eine Kontraktion des durch die vier Pyrrolringe aufgespannten Quadrates,
3. eine Bewegung des Eisens in die Häm-Ebene ($0,29 \text{ \AA}$) von der proximalen Seite her,
4. eine Bewegung von proximalem und distalem Histidin um $\approx 0,3 \text{ \AA}$ entlang des Verschiebungsvektors des Eisens, verursacht durch
5. eine gemeinsame starre Rotation ($\delta = 0,9^\circ$) und Translation ($0,12 \text{ \AA}$) der E- und F-Helices und
6. in einer anderen Projektion eine Art Scherenbewegung zwischen der E-Helix ($\epsilon_E = -0,9^\circ$) und der F-Helix zusammen mit dem Häm ($\epsilon_F = 0,9^\circ$) um einen Angelpunkt in der Ecke zwischen E- und F-Helix.

Wie zu erkennen ist, sind die beteiligten Amplituden gering, was die Notwendigkeit hoher Bragg-Auflösung zur Identifikation dieser Änderungen unterstreicht.

Bei dem bisher einzigen hochzeitaufgelösten Beugungsexperiment an MbCO wurden Beugungsbilder mit einem Zeitabstand von 4 ns zur Anregung bis hin zu Abständen im Millisekundenbereich aufgenommen (Šrajer et al. 1996). In der 4 ns-Differenzdichte zwischen MbCO und Mb*CO wird zum einen ein Verschwinden der Elektronendichte an der Bindungsposition des CO beobachtet, zum anderen eine positive Dichte in der Nähe der Andockstelle, die bei den Tieftemperaturexperimenten identifiziert wurde. Eine Bewegung des Eisens wird ebenso nachgewiesen. Es werden auch schwache Differenzdichten in der Nähe der E- und F-Helices gefunden, die sich aber sehr nahe am Rauschen bewegen und deren Signifikanz nur dadurch begründet wird, daß sie den Erwartungen entsprechen (Ursby 1998). Daher sind weitere Messungen mit besserem Signal/Rausch-Verhältnis für höhere Auflösung notwendig, um fundiertere Aussagen über die betreffenden Konformationsänderungen machen zu können.

2.4.4 Eignung des Myoglobins für hochzeitaufgelöste Beugungsmessungen

Neben der hohen Population des relativ langlebigen intermediären Zustandes Mb*CO ist die hohe Reversibilität des Bindungsprozesses in Myoglobin als Voraussetzung für stroboskopische Beugungsexperimente ein weiteres Argument für die Eignung von Myoglobin als Modellsystem. Die Verfügbarkeit von Kristallen geringer Mosaizität für das Laue-Verfahren ist ebenfalls eine Anforderung, der Myoglobin genügt. Es existieren atomar aufgelöste Strukturdaten der statischen Strukturen von MbCO und deoxy-Mb, deren Phasen zur Fouriersynthese der zeitaufgelösten Daten notwendig sind und deren Kenntnis für die Interpretation der erwarteten kleinen Strukturänderungen vorteilhaft ist. Die spektroskopischen Untersuchungen der Ligandenabspaltung (Olson & Phillips 1996, Lim et al. 1997) erleichtern die Wahl von Δt_Z , die Selektion der Anregungsbedingungen und helfen ebenfalls bei der Interpretation der Daten.

Kapitel 3

Entwicklung eines Spiegelchoppers für Synchrotronstrahlung

Die Anforderungen an einen Synchrotronchopper hängen vom jeweiligen Anwendungsfall und den entsprechenden Randbedingungen, wie z.B. Pulsabstand des Speicherrings, ab. Das folgende Unterkapitel vermittelt einen Überblick über einige Chopperkonstruktionen und deren Anwendungsgebiet, bevor in den Unterkapiteln 3.2 und 3.3 der experimentelle Aufbau und die technische Realisierung des in dieser Arbeit entwickelten Choppersystems beschrieben werden. Danach folgt die Erläuterung des Funktionsprinzips und die experimentelle Überprüfung der Leistungsfähigkeit. Das Unterkapitel 3.6 beschreibt die Synchronisation zwischen Chopper, Laser und Ringfrequenz sowie deren Überprüfung.

3.1 Überblick über Chopperkonstruktionen

Für den Einsatzes von mechanischen Choppern in Verbindung mit Synchrotronstrahlung existieren verschiedene Motivationen, z.B.:

1. Die Abschwächung der mittleren Leistung eines Synchrotronstrahls.
2. Die Modulation der Zeitstruktur von Synchrotronstrahlung,
 - (a) um den Zeitbereich von Lebensdauermessungen auszudehnen, oder
 - (b) um zeitaufgelöste Anregungsexperimente bis hin zum Nano- oder sogar Pikosekundenbereich zu realisieren.
3. Die schnelle Änderung zwischen links- und rechtspolarisierter Strahlung.
4. Die Reduzierung der Pulsbreite von Synchrotronpulsen.

Es wurden in der Literatur einige Entwicklungsideen vorgestellt, die sich am besten nach der Art des Rotors unterscheiden lassen:

1. Rotierende Scheibe(n) mit Rotationsachse
 - (a) parallel oder
 - (b) senkrecht zur Strahlachse (Fermi-Chopper).
2. Rotierende bzw. vibrierende optische Elemente, wie
 - (a) Kristall oder
 - (b) Spiegel.

In den folgenden Unterkapiteln sind einige Vertreter der genannten Choppertypen beschrieben und ihr Anwendungsfeld charakterisiert.

3.1.1 Scheibenchopper

Auf die Scheibenchopper soll in diesem Abschnitt etwas genauer eingegangen werden, da die bisherigen zeitaufgelösten Beugungsexperimente mit Scheibenchoppfern durchgeführt wurden, aber auch, weil der Vorchopper des in dieser Arbeit beschriebenen Choppersystems ein Scheibenchopper ist.

Die ersten mechanischen Chopper wurden von Dunning et al. (1935) zur Geschwindigkeitsselektion von Neutronenstrahlen eingesetzt. Fermi verbesserte die bis dahin gängigen Chopper mit Rotationsachse parallel zum eintreffenden Strahl, indem er die Achse senkrecht wählte und einen Kanal durch den Rotor bohrte (Fermi et al. 1947). Die Vorteile gegenüber Choppfern mit paralleler Rotationsachse liegen darin,

- daß sich bei Verschluß des Choppers bei gleichem Trägheitsmoment wesentlich mehr Material im Strahl befindet,
- daß das Öffnungsprofil symmetrisch um die Strahlachse ist und
- daß der Chopper bei gleicher Winkelgeschwindigkeit und Apertur doppelt so schnell schließt*.

Die meisten Folgeentwicklungen in der Neutronenphysik basierten aufgrund dieser Vorteile auf der Fermi-Konstruktion. Die Modifikationen reichen von Mehrfachanordnungen von Choppfern über Geräte mit speziell konstruierten Kanälen (Brugger 1965) bis hin zu Choppfern mit Magnetlagerung für hohe Laufruhe und phasengekoppelten Betrieb zum Beschleunigerring (Nutter et al. 1985, Donley 1985, Ostrowski et al. 1985). Von den Erfahrungen, die mit Magnetlagerungen für hohe Laufruhe gemacht wurden, konnten später auch Entwicklungen von Synchrotronchoppfern profitieren.

*Der gleiche Effekt ist mit zwei gegenläufigen, synchronisierten Scheibenchoppfern erreichbar, wenn der Schlitz der einen Scheibe sich von unten, der andere von oben der Strahlachse nähert (Mills 1989).

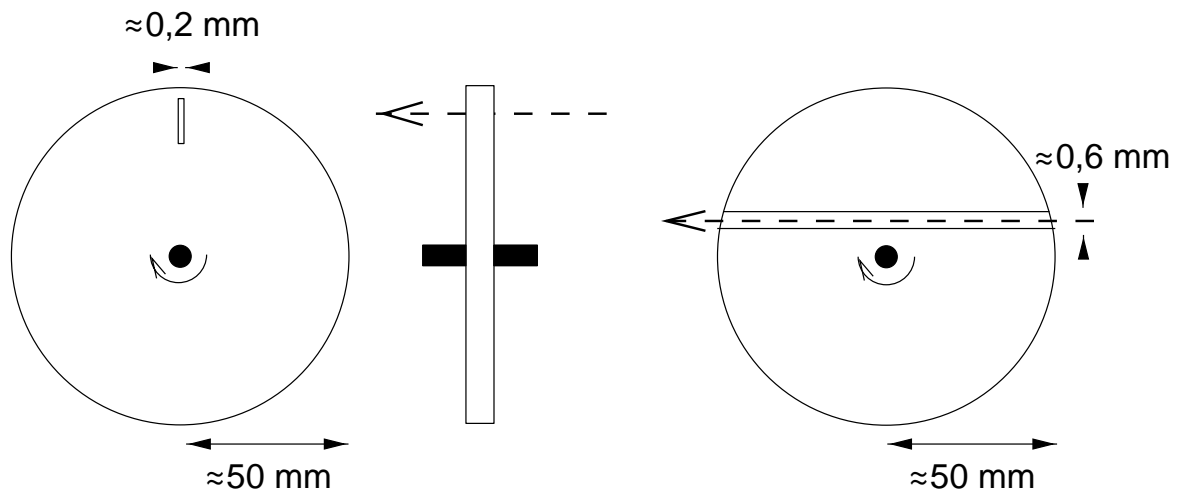


Abbildung 3.1: Scheibenchopper mit Rotationsachse parallel (links) und senkrecht (rechts) zur Strahlachse (Fermi-Konstruktion). x_B bezeichnet die Breite des Schlitzes bzw. die Höhe des Kanals, r den Radius der Scheiben.

SSRL-Chopper

Einer der ersten Synchrotronchopper mit Schlitzscheibe wurde 1984 von Tatchyn & Boyce (1984) vorgestellt und am SSRL in Betrieb genommen. Er diente hauptsächlich zur **Abschwächung der mittleren Leistung des Synchrotronstrahls**, um Strahlenschäden oder Überhitzung an empfindlichen Strahlkomponenten zu vermeiden, ohne dabei die Spektralverteilung zu beeinflussen, wie das bei Transmissionsfiltern der Fall gewesen wäre.

SUPERLUMI-Chopper

Der UHV-taugliche Chopper an der Apparatur SUPERLUMI (s. Tab. 3.1 (1)) am DORIS-Speicherring zielte darauf ab, die Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung zu modulieren, um den **Zeitbereich von Lebensdauermessungen auszudehnen** (Kampf 1989b), der durch den maximalen Pulsabstand des DORIS-Speicherrings auf knapp eine Mikrosekunde beschränkt ist. Dieser Chopper besteht aus einer Scheibe mit mehreren Schlitzern, die bis zu einer Umlauffrequenz von 1408 Hz beschleunigt werden kann. Wegen dieser hohen Geschwindigkeit, der notwendigen UHV-Tauglichkeit und geringer Reibungsmomente wurde eine magnetische Lagerung (Jones et al. 1985) eingesetzt, die den technischen Aufwand und die Kosten der Entwicklung erheblich steigerte. Es wurde eine sehr hohe Langzeitstabilität erreicht, doch keine Synchronisation zum Speicherring (Kampf 1989a). Aufgrund verschiedener Rotationsscheiben mit unterschiedlichen Schlitzanordnungen und -dimensionen ist der Chopper imstande, die Periode zwischen den Synchrotronpulsen auf Werte zwischen $11 - 625 \mu\text{s}$ auszudehnen. Hierbei kann das Öffnungszeitfenster bei einer Apertur von $230 \mu\text{m}$ eine Dauer von 500 ns erreichen, klein genug, um einzelne Pulse beim

Betrieb von DORIS im Einzelpuls-Modus zu extrahieren. Die Chopperscheibe ist jedoch dünn, da sie an SUPERLUMI nur für monochromatische Messungen im VUV benötigt wird, so daß der Chopper sich nicht für Röntgenmessungen eignet.

CHESS-Chopper

Der erste Synchrotronchopper, der mit der Absicht entwickelt wurde, einzelne Pulse aus dem Synchrotronstrahl zu extrahieren, um **zeitaufgelöste Anregungsexperimente an Proteinen unter Ausnutzung von Laue-Beugung** zu realisieren, wurde am CHESS nach der Fermi-Konstruktion gebaut (s. Tabelle 3.1 (2), LeGrand et al. (1989)). Am CHESS beträgt die Periode zwischen den Synchrotronpulsen $2,56 \mu\text{s}$, so daß bei einer Schlitzbreite von $0,3 \text{ mm}$ eine Rotationsfrequenz von 450 Hz zur Extraktion einzelner Pulse ausreichend ist. Die Synchronisation zwischen den zueinander asynchronen Frequenzen der Chopperrotation, der Synchrotronpulse und der Blitzlampenfrequenz des anregenden Nd:YAG-Lasers wird auf elektronischem Wege durch die Überwachung der relativen Phasen durch vier spezielle Elektronikmodule realisiert (Bourgeois et al. 1996). Dieser Chopper wurde am ESRF erfolgreich für das zeitaufgelöste kristallographische Experiment an CO-Myoglobin eingesetzt (Šrajer et al. 1996).

ESRF-Chopper

Für das ESRF ist an der KFA Jülich zeitgleich mit der in dieser Arbeit beschriebenen Entwicklung ein weiterer Chopper für zeitaufgelöste Anregungsexperimente entwickelt worden (s. Tab. 3.1 (4)). Er ist wie der CHESS-Chopper vom Fermi-Typ, hat aber den Vorteil, magnetisch gelagert zu sein, wodurch eine so hohe Laufruhe erzielt wird, daß der Chopper phasensynchron zu einer Subharmonischen der Ringfrequenz bei $896,64 \text{ Hz}$ rotieren kann, und mit dieser Frequenz stroboskopische Messungen durchgeführt werden können. Hierbei hält der Chopper die Phasenschwankung auf $\pm 10,5 \text{ ns}$ konstant. Die Blitzlampenfrequenz des Lasers wird ebenfalls direkt von der Ringfrequenz abgeleitet, so daß das gesamte System phasensynchron läuft und eine Elektronik zur Feststellung der Phasenübereinstimmung entfällt. Der Rotor besteht zwecks Reduktion des Trägheitsmomentes aus einem Dreieck, dessen Apertur durch einen Schlitz entlang einer der Kanten gegeben ist. Der Chopper erreicht bei einer Apertur von $0,7 \text{ mm}$ ein Öffnungsfenster von $1,47 \mu\text{s}$ (Wulff et al. 1997) und ermöglicht somit am Strahl ID09 des ESRF zusammen mit einem Femtosekunden-Lasersystem prinzipiell zeitaufgelöste Experimente bis hin zum Pikosekundenbereich. Perman et al. (1998) führten mit dieser Apparatur erfolgreiche Experimente mit ns-Zeitauflösung am Photorezeptor Xanthopsin durch.

3.1.2 Chopperkonstruktionen mit optischen Elementen

Rotierender Siliziumkristall

An DORIS wurde 1992 ein rotierender Siliziumkristall zur Reduzierung der Synchrotronpulsrate eingesetzt (s. Tab. 3.1 (3)), um wie an der Apparatur SUPERLUMI den Zeitbereich für Lebensdauermessungen auszudehnen (Kizler et al. 1992). Ist die Bragg-Bedingung für die einfallende, monochromatische Strahlung für eine Kristallebene erfüllt, so kommt es unter dem korrespondierenden Bragg-Winkel zu einem Beugungsmaximum. Da die Apertur durch die extrem schmale „Rocking-Kurve“ ($\approx 6''$) des Si-Kristalls definiert ist, reicht eine Rotationsgeschwindigkeit von nur 4,8 Hz aus, um einen einzelnen Synchrotronpuls aus dem Pulszug zu extrahieren. Aufgrund der Schmalbandigkeit der transmittierten Strahlung ist dieser Chopper für Laue-Messungen jedoch nicht einsetzbar.

Vibrierender Siliziumkristall

Tucoulou et al. (1998) benutzten zur Extraktion eines ≈ 110 ns langen Pulszuges aus dem Superpuls des ESRF im 2/3-Modus einen LiNbO_3 -Kristall, in dem piezoelektrisch akustische Oberflächenwellen von 15 Å Amplitude erzeugt wurden. Die periodische Oberflächenmodulation wirkt wie ein dynamisches Gitter auf die eintreffende, monochromatische Synchrotronstrahlung und erzeugt um den Hauptreflex weitere Beugungsordnungen, die zeitlich mit der Amplitude der Oberflächenwellen korreliert sind. Dieser elektroakustische Chopper bietet den Vorteil, phasensynchron mit der Ringfrequenz des Speicherrings vom Hz – MHz-Bereich betrieben werden zu können, leidet jedoch unter hohem Untergrund und einer Signalhöhe der Nebenreflexe von nur 10 % des Hauptreflexes (s. Tab. 3.1 (5)).

Rotierende Spiegel

Weniger zur Modulation der Synchrotronfrequenz als zur Komprimierung der zeitlichen Ausdehnung eines Synchrotronpulses um ein bis zwei Größenordnungen schlug Csonka (1988) einen rotierenden Spiegel innerhalb einer statischen Spiegelanordnung vor. Eine ähnliche Anordnung sollte auch zur Verbesserung der transversalen Kohärenz von Synchrotronstrahlen dienen (Csonka 1990).

Es wurde auch der Einsatz eines Choppers bestehend aus vier Spiegeln zur Erzeugung und schnellen Alternierung zwischen links- und rechtspolarisierter Synchrotronstrahlung diskutiert (Chen 1992).

Letztlich existiert der Spiegelchopper zur Extraktion einzelner Synchrotronpulse, der in den Abschnitten 3.2 bis 3.6 beschrieben ist. Tabelle 3.1 faßt nochmal die Eigenschaften einiger der beschriebenen Chopper zusammen, wobei die Charakteristika des Spiegelchoppers vorweggenommen sind.

Chopper	1	2	3	4	5	6
Einsatzort	HASYLAB	CHESS	HASYLAB	ESRF	ESRF	HASYLAB
Hersteller	KFAJ 1985	CHESS 1988	HASYLAB 1992	KFAJ 1998	IMT 1998	MPG 1998
Inbetriebnahme	τ	ZB	τ	ZB	?	ZB
Anwendung	\parallel	\perp	\perp	\perp	-	\perp
Achse zum Strahl	1420	450	50	897	Hz-MHz	105
Betriebsfrequenz	[Hz]	305/450	6"	700	50	80
Apertur	925/231	1,73/2,57	0,093	1,47	0,11	0,44
min. Δt	2,0/0,5	?	?	?	-	10 ⁻⁶
Langzeitstabilität [$\frac{\Delta f}{f}$]	$\approx 10^{-7}$?	?	?	-	175
Schwankung in $\frac{1}{f}$	± 5900	?	?	10,5	-	175
Synchronisation	async.	async.	async.	sync.	sync.	async.
Strahlung	monochr.	polychr.	monochr.	polychr.	monochr.	polychr.
Kosten	≈ 110	?	?	≈ 500	?	≈ 60
Referenz	Kampf '89	LeGrand '89	Kizler '92	Wulff '97	Tucoulou '98	Koscienza '99

Tabelle 3.1: *Kenndaten verschiedener Chopper. τ steht für Lebensdauermessungen, ZB für zeitaufgelöste Beugungsexperimente, \parallel und \perp für Konstruktionen mit Rotationsachse parallel bzw. senkrecht zur Strahlachse und bei ',?' konnten keine Angaben gefunden werden.*

3.2 Experimenteller Aufbau des Spiegelchoppersystems am Strahl BW6

Das Spiegelchoppersystem wurde in den Proteinkristallographiestrahl BW6 der Max-Planck Gesellschaft am Hamburger Synchrotronlabor HASYLAB/DESY integriert, um dort die experimentellen Voraussetzungen zur Durchführung hochzeitaufgelöster Beugungsmessungen zu schaffen.

Der Wiggler (W) (s. Abb. 3.2) der BW6 generiert die Synchrotronstrahlung, die ein Planspiegel (PS) durch ein Blendensystem (K0) auf einen Toroidspiegel (TS) reflektiert. Dieser fokussiert die weiße Strahlung durch die Chopperanordnung, das Blendensystem K1, das zur Reduktion der harten Untergrundstrahlung dient, und durch den Kollimator mit den Blenden K2 und K3 auf den Probenort. Der einfallende Wellenlängenbereich erstreckt sich von 0,55–2,0 Å. Die beiden Hauptkomponenten des Spiegelchoppersystems sind der rotierende Spiegel (RS) und die Kollimatorblende (K3) im Abstand R zum Spiegel. Ein zur Spiegelrotation phasensynchronisierter Vorchopper (V) in Form eines Scheibenchoppers und ein langsamer elektromagnetisch getriebener Strahlverschluß (LSV) regulieren die Repetitionsrate der extrahierten Pulse. Hinter den Kollimatorblenden K2 und K3 befindet sich jeweils eine Ionisationskammer (I1 und I2), die zur Messung des Strahlstroms dienen. Ein Szintillationszähler (SZ) detektiert extrahierte Synchrotronpulse und eine Avalanche-Photodiode (APD) den Anregungspuls des Lasers. Die Beugungsreflexe der Probe werden durch ein Image-Plate nachgewiesen.

3.3 Die Komponenten des Spiegelchoppersystems

Dieser Abschnitt beschreibt die Komponenten, aus denen das Choppersystem aufgebaut worden ist, als da sind, der langsame Strahlverschluß, die Scheibe des Vorchoppers, der Spiegel, die Antriebskomponenten, die Regelkarte und das Image-Plate. Es werden die Detektoren und die Auswertelektronik beschrieben, die zur Analyse der Leistungsfähigkeit des Choppers und zur Überwachung der Zeitdifferenz zwischen Laser- und Synchrotronpuls eingesetzt werden. Das Lasersystem wird gesondert in Kapitel 4.1 beschrieben.

Langsamer Strahlverschluß

Der langsame Strahlverschluß (i. f. LSV) besteht aus einem elektromagnetisch getriebenen Hubmagneten, der einen 10 mm dicken Eisenkolben in den Strahlengang bzw. aus diesem heraus bewegt, der zwischen den beiden Blenden K2 und K3 sitzt. Der LSV wird über TTL-Pegel angesteuert und hat eine Reaktionszeit bis zur vollen Öffnung von ≈ 30 ms.

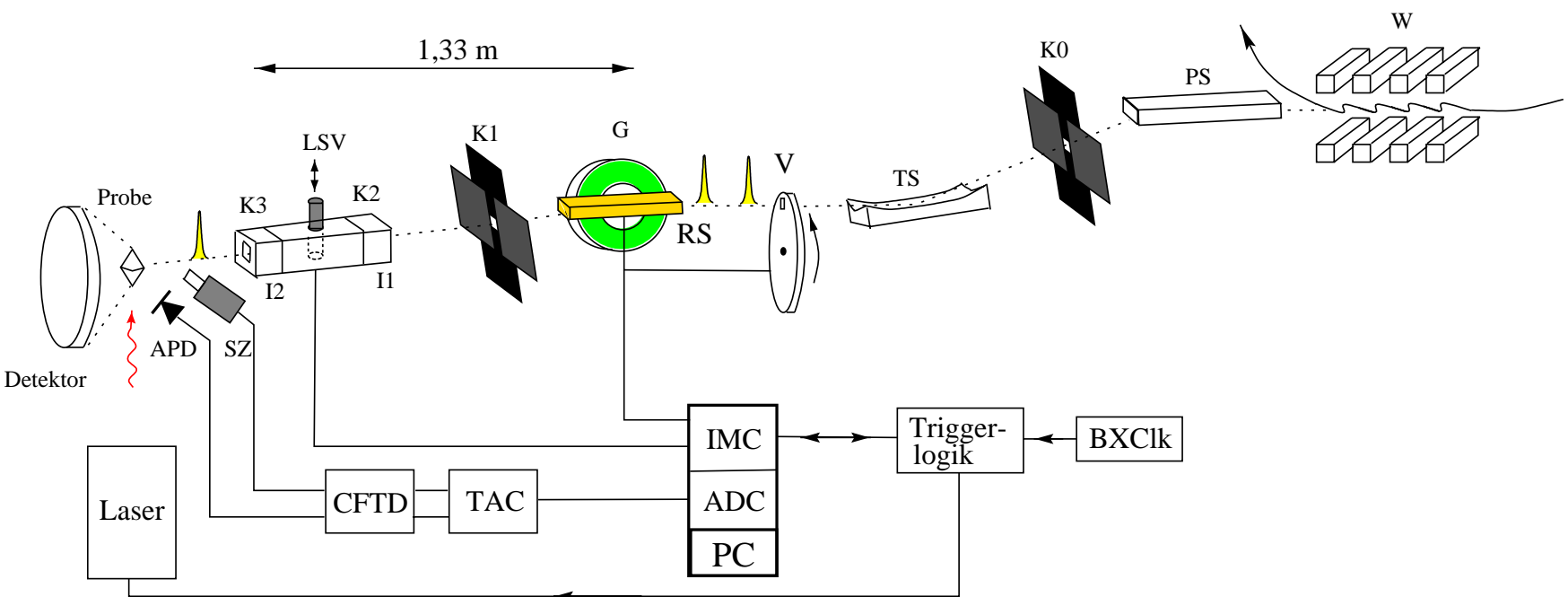


Abbildung 3.2: Experimenteller Aufbau an der BW6 (Beschreibung s. Text).

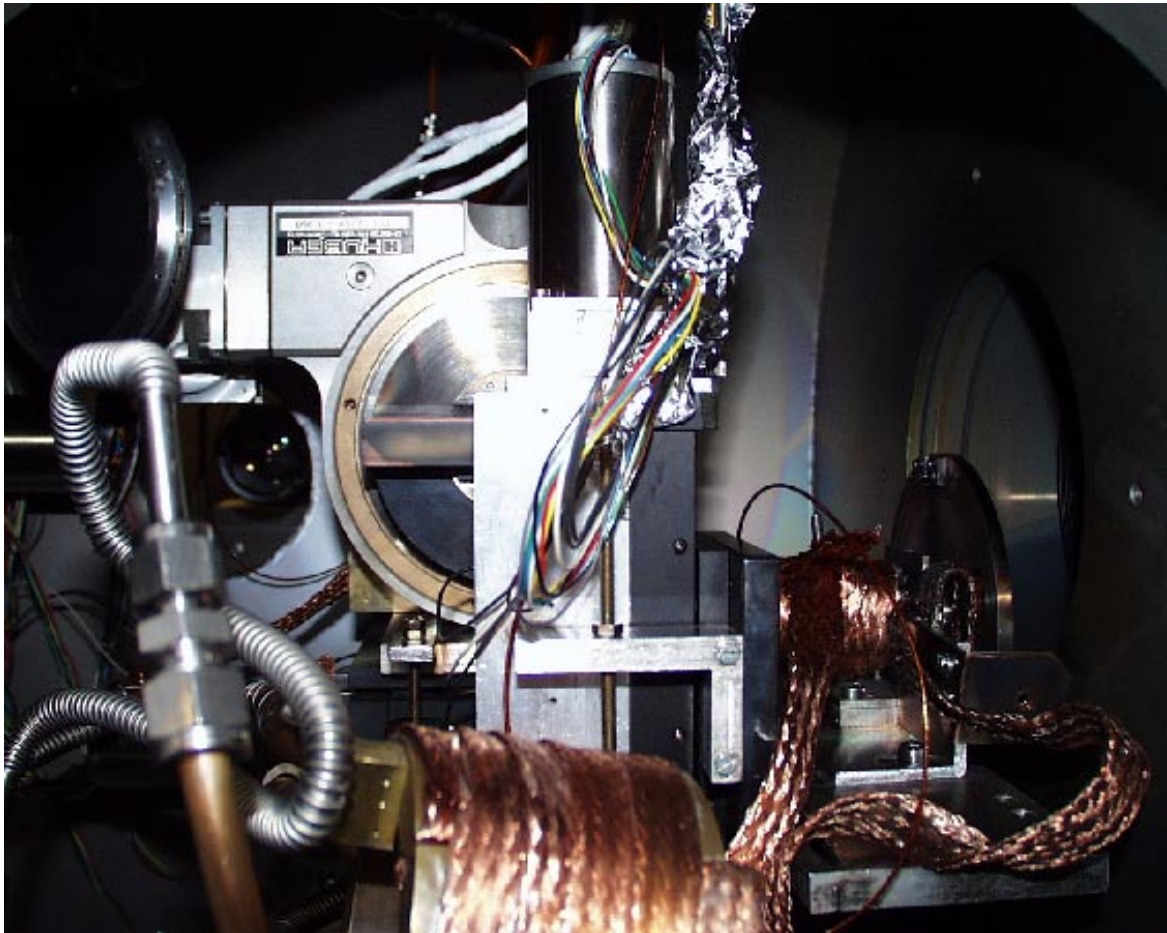


Abbildung 3.3: Seitliche Ansicht des Spiegelchoppers. Hinter der Stellmechanik für den Vorchopper befindet sich der Spiegel in Horizontalstellung. Sein Antriebsmotor ist in das hinter dem Spiegel zu sehende Goniometer eingebaut. Rechts im Bild ist die Scheibe des Vorchoppers zu erkennen.

Scheibe

Die Scheibe des Vorchoppers besteht aus einer 10 mm dicken Stahlscheibe mit einem Radius von 60 mm. Sie hat im Abstand von $r = 55$ mm zum Mittelpunkt eine Öffnung, deren Größe über Blenden horizontal und vertikal einstellbar ist. Um 180° versetzt und 45 mm vom Mittelpunkt entfernt befindet sich eine weitere Öffnung ($\varnothing=2$ mm), die mit einer 3 mm dicken Aluminiumblende verschlossen ist. Diese Öffnung wird bei der Justierung des Choppersystems unter Weißstrahlbedingungen benötigt, um den Strahl abzuschwächen, da ansonsten der Spiegel beschädigt und der zum Justieren verwendete Fluoreszenzschirm aufgrund der Hitzlast sofort zerstört wird. Die von der Scheibe aufgenommene Wärme wird über eine Schleifkühlung in Form einer breiten Kupferlitze an einen Kühlblock abgeführt. Zur genauen Justierung der Blende ist der Scheibenchopper über einen Schrittmotor vertikal verstellbar, wobei seine Position über einen Linearencoder auf $5 \mu\text{m}$ genau gemessen wird.

Spiegel

Der Spiegel wurde aus Zerodur als Quader gefertigt ($10 \times 2,5 \times 1,5 \text{ cm}^3$) und ist beidseitig mit einer Goldschicht bedampft (Firma Möller/Optische Werke). Die Oberflächenrauigkeit wurde mit $\leq 9 \text{ \AA}$ angegeben. Entlang des Quaders ist auf beiden Seiten eine Nut eingefräst, damit der Spiegel auf eine Schwungscheibe geklemmt werden kann, die direkt auf der Motorachse sitzt. Zerodur wurde aufgrund seiner Materialeigenschaften wie geringem Ausdehnungskoeffizienten, Härte und guter Bearbeitungsmöglichkeiten als Substrat benutzt. Für die Auswahl der Beschichtung war es entscheidend, daß diese das Wellenlängenband der weißen Strahlung ($0,55 \text{ \AA} < \lambda < 2,0 \text{ \AA}$) ohne große Verluste reflektiert und nicht zu viele Absorptionskanten in diesem Spektralbereich aufweist. Die Reflektivität geeigneter Materialien in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei einem Anstellwinkel von $1,5 \text{ mrad}$ zeigt Abb. 3.4 (links). Rhodium ist mit hoher Reflektivität und ohne Vorhandensein von Absorptionskanten in diesem Bereich ein sehr geeignetes Material, doch stellte es keine Standardbeschichtung dar, was den Preis des Spiegels gesteigert und die Lieferzeit verlängert hätte. Die Materialien Nickel und Platin zeigen zwar teilweise höhere Reflektivität als Gold, doch würde ihre Verwendung zusätzliche Absorptionskanten in die Spektralverteilung einfügen, die wegen der Goldbeschichtung von Toroid- und Planspiegel ohnehin schon die charakteristischen Absorptionskanten von Gold bei $0,86$, $0,9$ und $1,04 \text{ \AA}$ aufweist. Deswegen wurde unter geringer Einbuße an Reflektivität Gold als Beschichtung gewählt.

Im folgenden soll die Röntgenreflektivität des Goldspiegels in Abhängigkeit vom Anstellwinkel bestimmt werden. Sie ist i. a. durch Totalreflexion eines Materials auf einen Winkelbereich unterhalb des sogenannten kritischen Winkels θ_C beschränkt, der gegeben ist durch (Helliwell 1992a),

$$\theta_C = \left(\frac{e^2}{m_e c_o^2} \frac{N_e}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \lambda \approx \sqrt{2\delta} , \quad (3.1)$$

wobei N_e die Anzahl der freien Elektronen und δ der Realteil des Brechungsindex ist. Der kritische Winkel liegt für Materialien mit hoher Ordnungszahl bei wenigen Millirad. Er ist umso kleiner je kürzer die Wellenlänge, weswegen es zur Berechnung der minimalen Reflektivität von Gold ausreicht, die kleinste Wellenlänge im weißen Spektrum von $0,55 \text{ \AA}$ zu betrachten. Mit $\delta(0,55\text{\AA}) = 6,3 \times 10^{-6}$ (Henke et al. 1993) berechnet sich ein kritischer Winkel für Gold von $\theta_C = 3,6 \text{ mrad}$. In Abb. 3.4 (rechts) ist der Verlauf der Reflektivität in einem Winkelbereich von 0 – 9 mrad bei $\lambda = 0,55 \text{ \AA}$ aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß die Reflektivität für alle Winkel kleiner $1,5 \text{ mrad}$ größer als 94% ist, so daß der gewählte Anstellwinkel von $1,5 \text{ mrad}$ eine hohe Reflektivität garantiert. In Kapitel 3.4.1 wird gezeigt, daß das Öffnungsprofil des Choppers eine Breite von $0,214 \text{ mrad}$ hat, also der Spiegel bei Reflexion in seinem Anstellwinkel um $\pm 0,107 \text{ mrad}$ variieren kann. Dies hat lediglich eine Variation in der Reflektivität von $1,1 \%$ bei $\lambda = 0,55 \text{ \AA}$ zur Folge, für längere Wellenlängen nimmt dieser Wert weiter ab, so daß die Spektralverteilung der transmittierten Intensität nicht maßgeblich durch die zulässige Variation im Anstellwinkel beeinträchtigt wird.

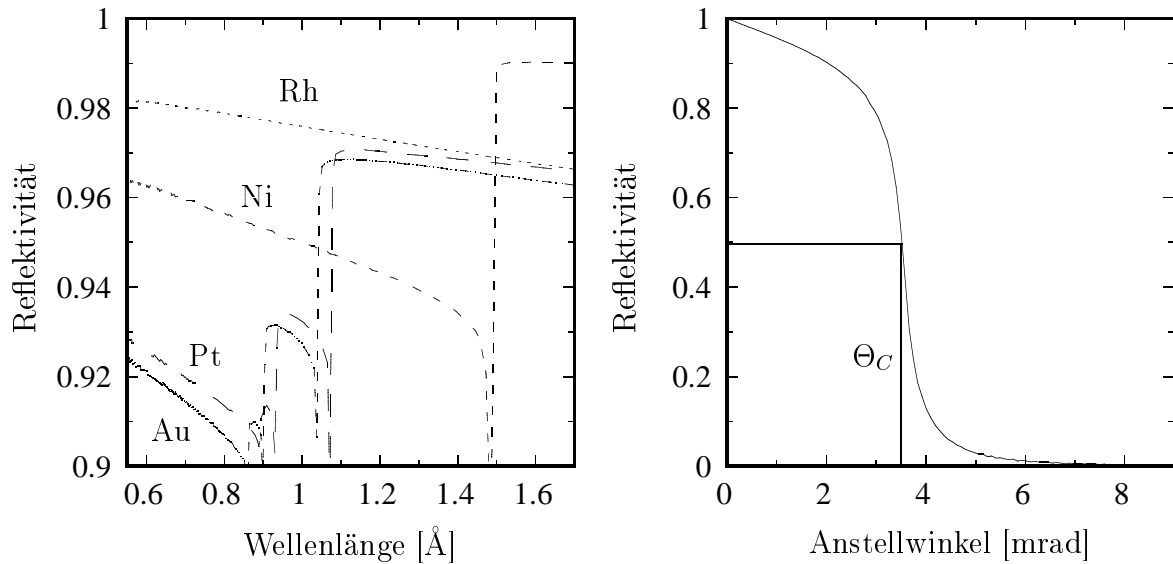


Abbildung 3.4: Links: *Berechnete Reflektivität für verschiedene Materialien in Abhängigkeit von der Energie bei einem Anstellwinkel von 1,5 mrad und (rechts) in Abhängigkeit vom Anstellwinkel bei einer Energie von 22,5 keV (0,55 Å). Bei der Berechnung mittels des Programms von Henke et al. (1993) wurde eine Oberflächenrauigkeit des Substrates (Zerodur) von 9 Å verwendet.*

Diese Verteilung muß bei der Auswertung der Laue-Beugungsbilder berücksichtigt werden und wird in Kapitel 5.2 bestimmt.

Der Spiegelchopper ist zum Schutz der Goldschicht in einem Vakuumtank untergebracht, weil die Synchrotronstrahlung in Luft vorhandene Moleküle ionisiert, die dann als Radikale die Beschichtung angreifen und zu einer Kohlenstoffbeschichtung führen. Außerdem verhindert das Vakuum störende Luftreibung bei der Rotation des Spiegels. Die vertikale Position des Spiegels läßt sich mittels eines Schrittmotors verfahren, und seine Position wird über einen Linearencoder auf 5 μm genau bestimmt.

Antrieb

Scheibe und Spiegel werden durch dieselbe Motor-Verstärker-Kombination angetrieben. Die Motoren sind vakuumtaugliche, dreiphasige, bürstenlose 54 W DC-Mikromotoren (Faulhaber 3556K179B), die sich durch eine hohe Linearität in der Drehzahl-Spannungskennlinie und eine kleine mechanische Zeitkonstante auszeichnen, woraus ein schnelles Ansprechverhalten auf die Regelung resultiert; ihre Maximaldrehzahl liegt bei $14000 \frac{\text{U}}{\text{min}}$. Ein Vierquadrantenverstärker (Faulhaber BLD5606CC4P) setzt die von der Regelkarte gelieferte Regelspannung in einen pulsweitenmodulierten Dreiphasenstrom um, der den Motor antreibt. Beide Motoren sind zur Positionsrückmeldung an die Karte mit einem Inkrementalgeber ausgestattet, der die Spiegelrotation in 81920 Inkremente einteilt (Litton G58W und Interpolationseinheit Heidenhain IBV200) bzw. die Scheibenrotation in 2048 Inkremente (Megatron SPTS512BZA). Beide Drehgeber generieren pro Umdrehung einen Referenzpuls, der

zur Phasensynchronisation der Motoren zueinander und für Triggerzwecke benötigt wird. Die Motoren sind zur Abfuhr der Wärme mit Vakuumleitpaste (Leybold) bestrichen und mit Kupferlitze umwickelt, die an einen Kühlblock führt. Die Temperatur beider Motoren wird mittels Pt100-Fühlern überwacht.

Anfänglich wurde versucht, den Spiegel mittels eines vakuumtauglichen Schrittmotors anzutreiben. Da die Geschwindigkeit eines Schrittmotors direkt über eine Frequenz regelbar ist, sollte versucht werden, ihn über eine Subharmonische der Ringfrequenz zu betreiben, und so eine Phasensynchronisation zum Ring herzustellen. Dies scheiterte zum einen daran, daß die Stabilität in der Umdrehung nicht hoch genug war, und zum anderen erreichte der Motor aufgrund von Resonanzen niemals die spezifizizierte Rotationsfrequenz von rund 90 Hz.

Regelkarte

Die Regelung der Motoren übernimmt die intelligente Motion-Controller-Karte (SB214PC4, ACS Electronics), i. f. IMC, die im Kontroll-PC des Experiments sitzt (s. Abb. 3.2). Sie steuert bis zu vier Achsen gleichzeitig, wobei alle Achsen entweder unabhängig voneinander oder phasensynchronisiert zu einer anderen Achse oder einer externen Frequenz betrieben werden können. Zwei der Achsen besitzen einen *Position Event Generator* (PEG), der es erlaubt, bei bestimmten Phasenwinkeln der Rotation, abhängig von der Auflösung des Drehgebers, Pulse zu erzeugen, deren Dauer in Inkrementen von 62,5 ns einstellbar ist. Es existieren außerdem weitere I/O-Möglichkeiten. Jede Achse hat ihren eigenen Servo-Prozessor, der die Positionsrückmeldung des Inkrementalgebers in einem digitalen Filter zweiter Ordnung, mit Beschleunigungs- und Geschwindigkeitsvorschub für verbesserten Folgebetrieb, verarbeitet. Die Einstellung des Filters erfolgt für jedes Motorsystem gesondert und wird über ein spezielles Programm vorgenommen, in welchem insgesamt neun Parameter anzupassen sind. Die Einstellprozedur kann abhängig von den Anforderungen an das Ergebnis, wie z. B. sehr hoher Stabilität des Motorsystems bei einer bestimmten Frequenz, durchaus mehrere Stunden dauern. Das Programm zum Betrieb des Spiegelchoppersystems und zum Start der Datennahme wurde in einer BASIC-orientierten Programmiersprache (ACSPL) des Herstellers der IMC geschrieben und läuft auf dem Hauptprozessor der Karte.

Avalanche Photodiode

Zum Nachweis der Laserstrahlung wurde ein APD-Modul (Hamamatsu 5658, Abb. 3.5 links) mit integrierter Hochspannung und Vorverstärker eingesetzt. Die Anstiegszeit beträgt 350 ps und ist somit hinreichend zum präzisen Nachweis der Nanosekunden-Laserpulse. Die hohe Empfindlichkeit des Moduls erlaubt es, die APD in großem Abstand vom Probenort zu positionieren (≈ 50 cm), der durch andere Geräte räumlich schon stark eingegrenzt ist, und trotzdem noch Streustrahlung des Laserlichtes nachzuweisen. Ein *Constant Fraction Timing Discriminator* (Phillips



Abbildung 3.5: Links: *Das APD-Modul zum Nachweis der Laserstrahlung.* Rechts: *Der Szintillationszähler, Ansicht auf die probenzugewandte Seite.*

Scientific CFTD 6915) diskriminiert den vom Vorverstärker kommenden Puls und generiert einen Logik-Puls für den Zeit-Amplituden-Konverter (TAC).

Plastikszintillationsdetektor

Der Plastikszintillationsdetektor weist die Synchrotronstrahlung nach, die vom Probenkristall gestreut wird. Er ist aus einem Szintillatorkristall (NE110, Harshaw) mit den Maßen $25 \times 35 \times 80 \text{ mm}^3$ und aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (Valvo XP2011/03), i. f. SEV, konstruiert worden (s. Abb. 3.5 rechts). Der Szintillationskristall ist bis auf eine Stirnfläche mit $5 \mu\text{m}$ dicker Aluminiumfolie umwickelt. Diese Fläche ist über ein Kontaktmittel mit dem Eintrittsfenster des SEV verbunden, der in einem Stahlrohr sitzt. Außerhalb des Rohrs sind die Seitenflächen des Kristalls mit $1,5 \text{ mm}$ dickem Blei vor strahlaufwärts entstehender, harter Röntgenstrahlung abgeschirmt, die andere Stirnfläche zeigt zur Probe. Die dünne Aluminiumfolie wird durch eine $50 \mu\text{m}$ dicke Captonfolie vor Beschädigung geschützt. Der SEV wird mit einer Hochspannung von 1250 V betrieben und erzeugt beim Nachweis der weissen Synchrotronstrahlung Pulse im Subvolt- bis Voltbereich, die aufgrund der großen Abmessungen des Szintillatorkristalls eine Anstiegszeit von $\approx 4 \text{ ns}$ haben. Ein CFTD diskriminiert auch hier das Signal und erzeugt ebenfalls einen Logik-Puls für den TAC.

TAC und ADC

Der TAC (Canberra TAC2145) besitzt 15 Meßbereiche, die es erlauben, Messungen von 5 ns – 1 ms durchzuführen. Für den bei diesem Experiment hauptsächlich verwendeten Bereich von 5–200 ns beträgt die Auflösung 25 ps. Der Wert des gemessenen Zeitintervalls ist proportional zur Amplitude eines 1,5 μ s langen Rechteckpulses (max. 10 V). Des weiteren stellt der TAC einen Logikpuls (CONV) zu Verfügung, der die Beendigung der Zeit-Amplituden-Konvertierung markiert. Zur Auswertung des Spannungspulses dient ein 333 kHz 12-Bit-ADC (ADlink PCI9118), der im selben PC sitzt wie die IMC (s. Abb. 3.2). Über den CONV-Puls ist die Spitzenwerterfassung durch den ADC mit dem Anliegen des Spannungspegels synchronisiert. Ein eigens entwickeltes Programm regelt die Auslese des ADCs und kommuniziert mit dem Programm zur Datennahme. Die Auflösung des ADCs entspricht ± 1 Bit, was einer Spannung von 2,4 mV oder bei obiger Einstellung des TACs einem Zeitintervall von ± 24 ps entspricht.

Image-Plate-Scanner

Zur Aufnahme der Beugungsreflexe wird der Image-Plate-Scanner (mar345, mar research (1998)) verwendet, der einen Durchmesser von 345 mm hat. Er beruht auf einer Phosphoreszenzplatte zur Messung der Reflexintensitäten, die nach der Aufnahme mittels eines Lasers ausgelesen wird. Der Detektor hat einen dynamischen Bereich von 16 bit und eine Ortsauflösung von 150 μ m, und ist daher für die Proteinkristallographie sehr geeignet.

3.4 Funktionsprinzip und Leistungsfähigkeit

Das Funktionsprinzip des Spiegelchoppers zur Erzeugung von Öffnungszeitfenstern im Submikrosekundenbereich bei relativ geringen Rotationsfrequenzen beruht auf der Ausnutzung des Lichthebelarmes zwischen dem rotierenden Spiegel und einer sich in einem Abstand von $R = 1,33$ m befindlichen Blende (K3). Unter einem Anstellwinkel von $\varphi_0 = 1,5$ mrad schneidet der Goldspiegel aus dem Synchrotronstrahl einen Teil von 150 μ m Höhe heraus und reflektiert diesen unter Totalreflexion zentral durch die Blende. Die Rotationsachse des Spiegels liegt horizontal und senkrecht zur optischen Achse des Strahls, um die lineare Polarisation der Synchrotronstrahlung in der Orbitebene zu berücksichtigen und die geringere Divergenz in vertikaler Richtung auszunutzen. Die vertikale Apertur k_3 der Blende hängt von der Eindringtiefe der Laserstrahlung im Kristall und dem zu erreichenden Zeitfenster des Choppers ab, die horizontale Apertur ist der Kristalldimension angepaßt. Die Länge des Öffnungszeitfenster Δt_S wird neben der Rotationsfrequenz f_S durch die Breite des Öffnungsprofils der Blenden-Spiegel-Kombination bei Rotation des Spiegels durch den entsprechenden Akzeptanzwinkel $\Delta\varphi$ bestimmt,

$$\Delta t_S = \frac{\Delta\varphi}{2\pi f_S}. \quad (3.2)$$

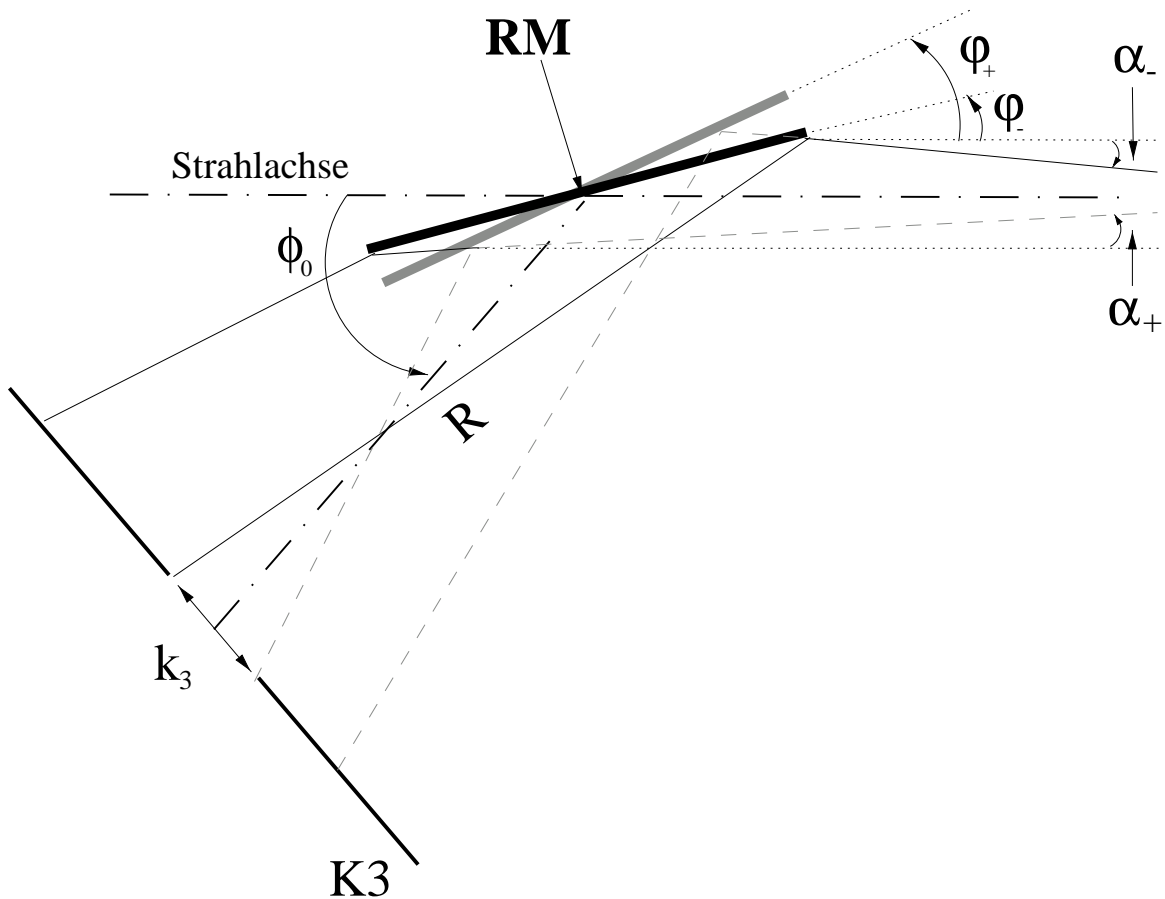


Abbildung 3.6: Strahlengang am Chopperspiegel. Die Rotation erfolgt entgegen des Uhrzeigersinns, φ_- und φ_+ bezeichnen die Grenzwinkel des Rotationsbereichs $\Delta\varphi$, für den Strahlen mit einem Winkel $\alpha \in [\alpha_-, \alpha_+]$ zur optischen Achse durch den Kollimator K3 treten. Die zu φ_- und φ_+ korrespondierenden Strahlengänge sind mit durchgezogener bzw. gestrichelter, grauer Linie gezeichnet.

3.4.1 Berechnung des Öffnungsprofils

Der Akzeptanzwinkel $\Delta\varphi$ der Spiegelrotation ist eine Funktion des Abstandes R zwischen Blende und Spiegel, der Blendenhöhe k_3 , der Spiegellänge $2l$, dem Ablenkwinkel ϕ_0 zwischen Strahlachse und Blendenmitte bzw. dem optimalen Anstellwinkel des Spiegels $\varphi_0 = \frac{\phi_0}{2}$ und der Breite der Winkelverteilung der Strahlung $\Delta\alpha$ (s. Abb. 3.6), die von der intrinsischen Strahldivergenz und der Fokussierung durch den Toroidspiegel abhängt. In Anhang A wird über die geometrischen Beziehungen dieser Größen folgende Beziehung für $\Delta\varphi$ hergeleitet,

$$\Delta\varphi \approx \frac{R-l}{2R-l} \alpha_+ - \frac{R+l}{2R+l} \alpha_- + \frac{2R(k_3 + l\phi_0)}{(2R+l)(2R-l)}. \quad (3.3)$$

Die Winkel α_- und α_+ berücksichtigen die Winkelverteilung der Strahlung und entsprechen den Winkeln bei 5 % der Verteilung unterhalb bzw. oberhalb der optischen

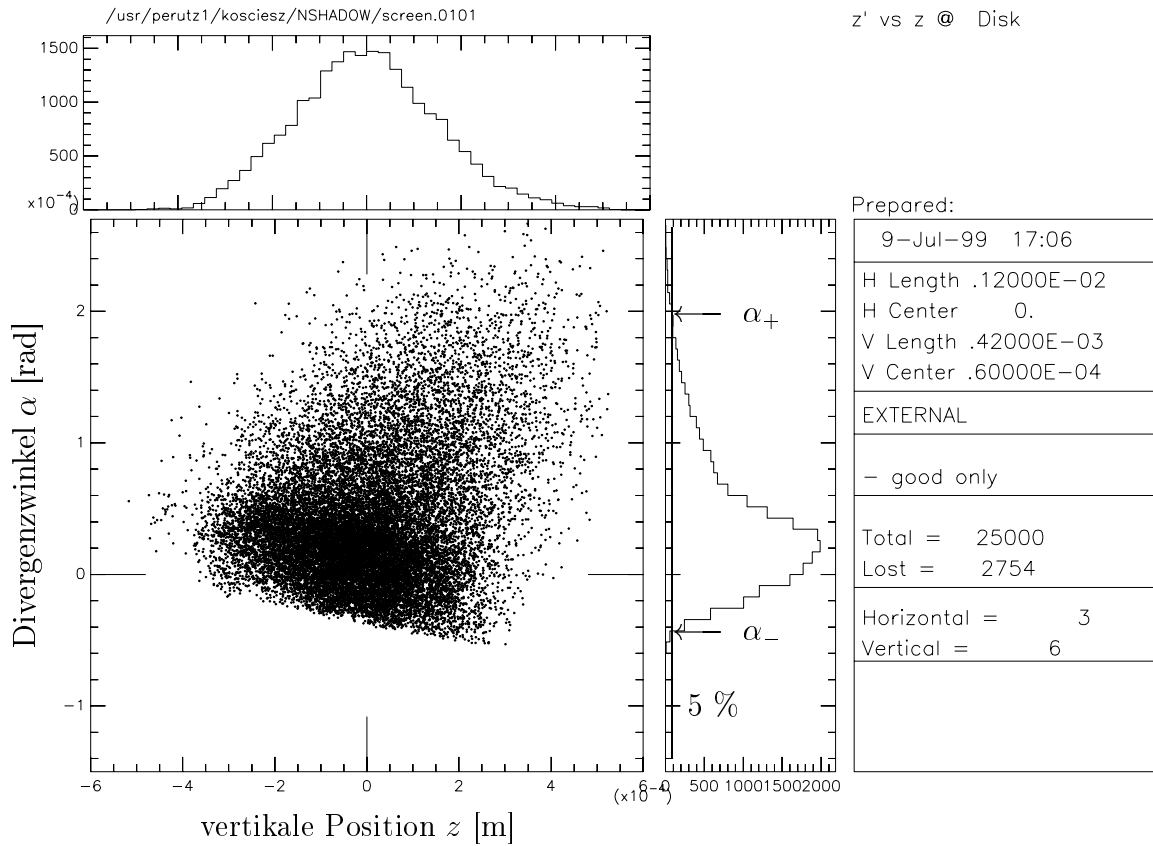


Abbildung 3.7: Vertikale Divergenz der Synchrotronstrahlung α im Abstand z von der optische Achse. Der Graphik liegen Simulationsrechnungen mit dem Programm SHADOW zugrunde. Die Divergenzwinkel bei 5% der Winkelverteilung sind gekennzeichnet.

Achse. Die Winkelverteilung kurz vor dem Spiegel ist mittels des Simulationsprogramms für Synchrotronstrahlung SHADOW (Welnak et al. 1994) berechnet worden. In Abb. 3.7 ist zu erkennen, daß die Verteilung asymmetrisch um die Strahlachse liegt, was aus den Abbildungseigenschaften des Toroidspiegels resultiert. Die Werte für die beiden Winkel sind $\alpha_+ = 0,197$ und $\alpha_- = -0,045$ mrad. Der Akzeptanzbereich $\Delta\varphi$ berechnet sich dann mit $2l = 10,0$ cm, $\phi_0 = 3,0$ mrad, $R = 1,33$ m und $k_3 = 80$ μm zu $\Delta\varphi = 0,206 \pm 0,005$ mrad. Aus Gl. 3.2 läßt sich dann die notwendige Rotationsfrequenz ermitteln, mit welcher der Spiegel rotieren muß, um ein Zeitfenster zu erzeugen, das kleiner ist als der Abstand der Synchrotronpulse im Einzelpulsbetrieb des Speicherrings, $\Delta t_S < t_{1BX} = 964$ ns bzw. im Doppelpulsbetrieb, $\Delta t_S < t_{2BX} = 482$ ns. Die entsprechenden theoretisch notwendigen Rotationsfrequenzen betragen lediglich 35 bzw. 70 Hz, und sind damit trotz des kleineren Orbits von DORIS um ca. eine Größenordnung geringer als die notwendige Geschwindigkeit von Scheibenchopperrn an anderen Synchrotron Speicherringen.

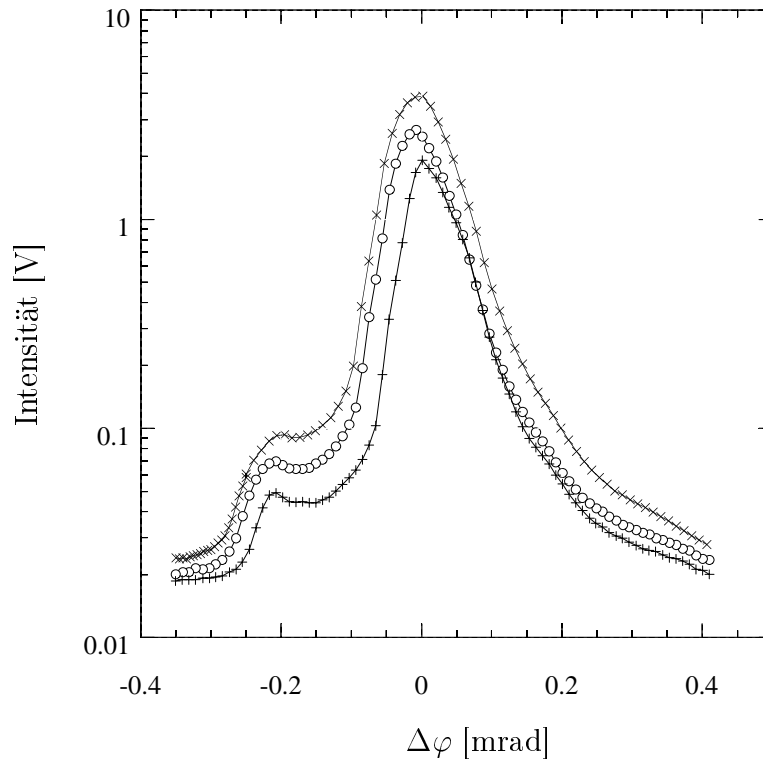


Abbildung 3.8: Öffnungsprofil des Spiegelchoppers bei Blendenöffnungen von 80 (+), 140 (o) und 200 μm (x). Die Unsicherheit in der Intensitätsmessung liegt unter 2 %, die im Anstellwinkel bei $\approx \pm 0,01$ mrad.

3.4.2 Experimentelle Bestimmung des Öffnungsprofils

Zur Überprüfung der Gültigkeit von Formel 3.3 wird der Spiegel mittels des Drehkreises um den Anstellwinkel φ_0 rotiert und das entstehende Intensitätsprofil hinter der Blende K3 mit Hilfe der Ionisationskammer I2 gemessen. Die Scheibe des Vorchoppers ist dabei so positioniert, daß die Oberkante ihrer Blende mit der Vorderkante des Spiegels abschließt, um das Spiegelsubstrat vor dem direkten weißen Strahl zu schützen. Außerdem wurde die sich strahlaufwärts befindliche Blende K0 von 0,9 mm auf 0,2 mm geschlossen, um die auf den Spiegel einfallende Intensität beim Abfahren des Profils zu reduzieren, da sich ansonsten der Strahl in den Spiegel einbrennt.

In Abb. 3.8 ist das gemessene Intensitätsprofil für Aperturen der Kollimatorblende K3 von 80, 140 und 200 μm in logarithmischer Darstellung aufgetragen. In Tabelle 3.2 sind die mittels Gl. 3.3 berechneten und die aus der Messung ermittelten 5%-Breiten aufgelistet, und eine Übereinstimmung im Rahmen der Fehlergrenzen ist zu erkennen. Die Fehler der experimentell bestimmten Werte ergeben sich durch das Ausmessen der 5%-Breite, die Fehler der theoretischen Werte aus den Unsicherheiten in k , R , l , α_- und α_+ . Wie anhand der Formel 3.3 für $\Delta\varphi$ erwartet, ist der Einfluß der Blendengröße gering, der Wert von $\Delta\varphi$ wird vielmehr durch α_- und α_+ , d. h. durch die Divergenz $\Delta\alpha$ dominiert. Er verändert sich bei einer Vergrößerung der Blende K3 um 150 % von 80 auf 200 μm lediglich um 15 %, so daß die Höhe der Blende sich nach dem photolytierten Kristallvolumen richten kann, ohne das Zeitfenster maßgeblich zu beeinflussen.

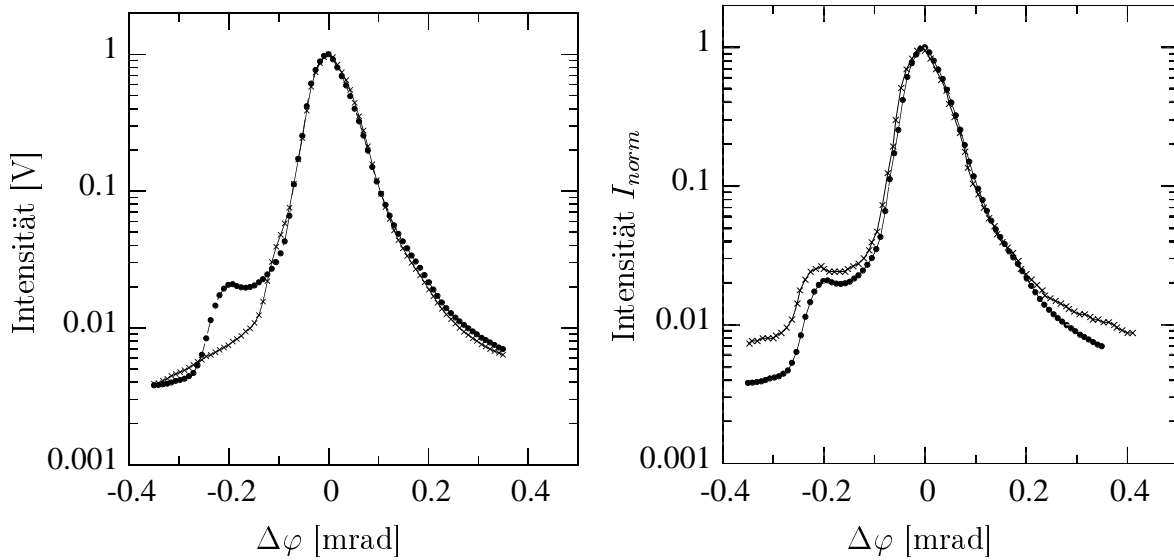


Abbildung 3.9: Links: Öffnungsprofil bei unterer (●) und oberer Scheibenposition (×). Rechts: Öffnungsprofil bei einer Apertur von 0,2 (×) und 0,4 mm (●) der Blende K0.

Unterhalb des Intensitätswertes von 0,1, etwa der 1 %-Breite entsprechend, ist deutlich eine Schulter im Öffnungsprofil erkennbar. Sie könnte durch die Abbildungseigenschaften des Toroids oder einen Reflex der Strahlung bei streifendem Einfall an der Oberfläche einer Blende entstehen. Die Schulter verschwindet, wenn die Scheibenblende so weit hochgefahren wird, daß ihre Unterkante mit der des Spiegels abschließt. Dies demonstriert Abb. 3.9 (links), die das gemessene Intensitätsprofil für die untere (●) und die obere (×) Scheibenpositionen zeigt. Bei zeitaufgelösten Messungen wird die Scheibe in die obere Position gefahren, da der Spiegel wegen des rotierenden Scheibenchoppers dann den weißen Strahl so gut wie überhaupt nicht mehr ausgesetzt ist. Während eines Beugungsexperiments wird sobald der Spiegel rotiert, die vertikale Blende K0 auf einen Wert von 0,9 mm geöffnet, um die Intensität um ca. einen Faktor 10 zu erhöhen; sie weiter zu öffnen resultiert in einer Reduzierung der Intensität, vermutlich weil dann die Hitzlast auf den Toroidspiegel zu Verformungen und veränderten Abbildungseigenschaften führt. Es ist untersucht worden, ob das Öffnen der Blende zu einer relevanten Verbreiterung des Intensitätsprofils aufgrund einer möglichen Veränderung in der Divergenz führt. Hierzu wurde das Intensitätsprofil bei einer Blende von 0,2 und 0,4 mm aufgenommen, eine Überprüfung bei 0,9 mm wurde wegen der hohen Intensität nicht riskiert. In Abb. 3.9 (rechts) sind die auf 1 normierten Meßkurven

Blende K3	[μm]	80	140	200	Fehler
$\Delta\varphi_{exp}$	[mrad]	0,214	0,223	0,247	$\pm 0,007$
$\Delta\varphi_{th}$	[mrad]	0,206	0,229	0,252	$\pm 0,005$

Tabelle 3.2: Experimentell und theoretisch bestimmte 5%-Breiten des Intensitätsprofils der Choppertransmission in Abhängigkeit von der Blendenöffnung.

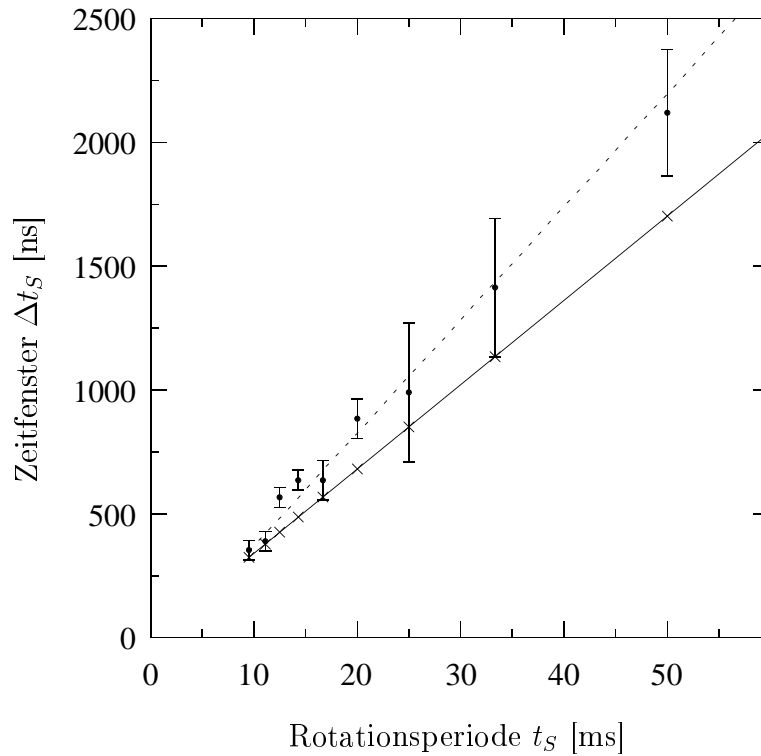


Abbildung 3.10: Zeitfenster Δt_S des Spiegelchoppers in Abhängigkeit von der Rotationsperiode t_S , direkt gemessene (●) und berechnete Werte (×).

dargestellt. Sie sind so gut wie identisch, lediglich auf der 2%-Höhe ist die Kurve mit einer Blende von 0,2 mm (×) etwas breiter als die mit Blende 0,4 mm (●). Daraus läßt sich schließen, daß das Öffnen der Blende K0 keinen relevanten Einfluß auf die Divergenz und somit das Zeitfenster nimmt.

3.4.3 Experimentelle Bestimmung des Öffnungszeitfensters

Mit Hilfe des gemessenen Öffnungsprofils $\Delta\varphi$ läßt sich nach Gl. 3.2 das zu erwartende Öffnungszeitfenster für unterschiedliche Frequenzen berechnen. Die Werte sind in Abb. 3.10 für Rotationsperioden von 9,5–50 ms, entsprechend 105–20 Hz, aufgetragen (—). Experimentell wurde die Dauer des Zeitfensters auf folgende Weise gemessen: Einen konstanten Zeitabstand vor der optimalen Reflexionsposition erzeugt der Inkrementalgeber der Spiegelachse einen Logikpuls, der ein Oszilloskop triggert. Der Szintillationszähler detektiert dann die nachfolgend durch die Blende tretenden Synchrotronpulse und sie werden über viele Rotationszyklen auf dem Oszilloskop aufintegriert. Abhängig von der momentanen Phasendifferenz zwischen Rotations- und Synchrotronfrequenz nach jeder Umdrehung variiert der Zeitabstand zwischen Trigger und Eintreffen des Synchrotronpulses, so daß eine Verteilung der transmittierten Intensitäten entsteht, die dem Öffnungszeitfenster des Spiegelchoppers entspricht. Diese Verteilung zeigt Abb. 3.13 (links) bei $f_S = 105$ Hz und für eine Aufintegration von ca. 4000 einzelnen Synchrotronpulsen. Analoge Verteilungen für andere Rotationsfrequenzen sind ebenfalls aufgenommen und die 5%-Breiten bestimmt worden. Die Ergebnisse sind neben den

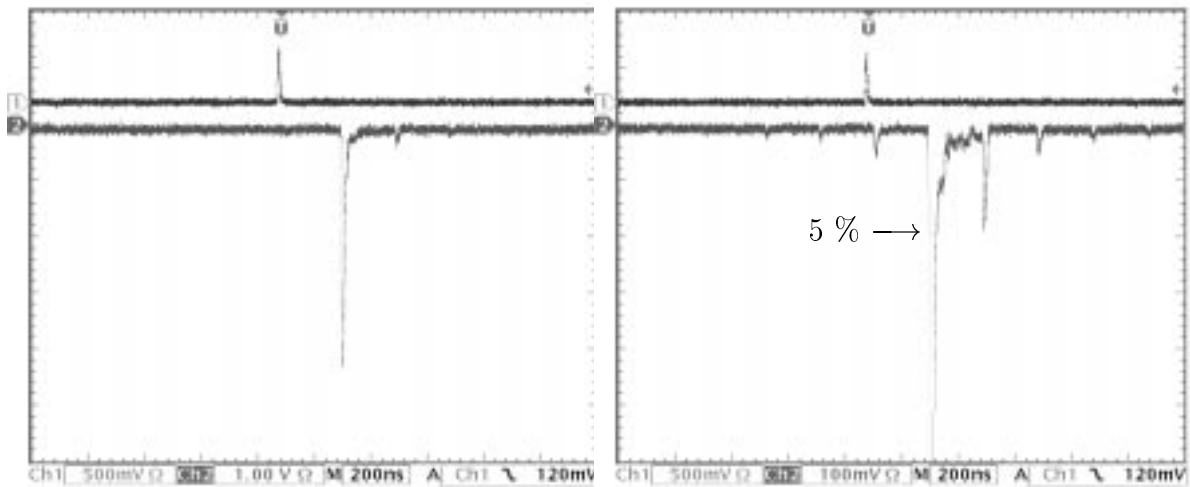


Abbildung 3.11: Einzelschußaufnahmen eines extrahierten Pulszuges mit DORIS im 5-Puls-Betrieb. Links: Der obere Kanal zeigt das APD-Signal des Laserschusses, auf das getriggert wird, der untere Kanal das Szintillatorsignal. Rechts: Ein weiteres Ereignis, jedoch ist der vertikale Darstellungsbereich des Oszilloskops zur Verdeutlichung der Nachbarpulse verzehnfacht.

berechneten Werten ebenfalls in Abb. 3.10 dargestellt. An beide Kurven ist eine Gerade $g(t_S) = mx + b$ angepaßt, deren Parameter i. f. aufgelistet sind.

Kurve	m	b	R
berechnet	34,1	0	1
gemessen	45,6	-83,2	0,998

Wie nach Formel 3.2 erwartet, geht die berechnete Kurve durch den Nullpunkt, die angepaßte Gerade der gemessenen Kurve schneidet hingegen die Y-Achse bei $-83,2$ ns. Des weiteren ist ihre Steigung um 32 % größer als die der berechneten Kurve. Die Abweichung kann nicht durch die direkten Meßfehler erklärt werden, die beim Ausmessen der Breiten am Oszilloskopbild entstehen. Es könnte jedoch sein, daß die Messung durch den Szintillationsdetektor die hohen Intensitäten nicht korrekt erfaßt hat, und so die Messung der 5%-Breite bei einem zu niedrigen Intensitätswert und daher größerer Profilbreite durchgeführt wird. Es wurde überprüft, ob der Szintillationszähler in die Sättigung geht, was die Unterdrückung hoher Meßwerte erklären könnte, doch dieser Verdacht bestätigte sich nicht. Eine Überprüfung des Ansprechverhaltens des Szintillationsdetektors in bezug auf seine Linearität erfolgte jedoch nicht. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde der Chopper bei einer höheren, empirisch ermittelten Frequenz von 105 Hz betrieben statt bei den berechneten 70 Hz.

In Abb. 3.11 stellen zwei Einzelschußaufnahmen Synchrotronpulse dar, die mit dem Spiegelchopper bei $f_S = 105$ Hz extrahiert wurden. Die Bilder wurden während des 5-Puls-Betriebs des Speicherrings aufgenommen, um zur besseren Erfassung des Öffnungsprofils mehrere Pulse zu messen. Der obere Kanal zeigt das Signal der APD auf den Laserpuls, der untere Kanal das Szintillatorsignal. Das linke Bild zeigt die volle Höhe des Signals, beim rechten ist die vertikale Skala des Oszilloskops zur Verdeutlichung der Nachbarpulse verzehnfacht und daher der Hauptpuls abgeschnitten.

Die 5 %-Schwelle in bezug auf den Puls im linken Bild ist gekennzeichnet. Das Bild könnte den Eindruck erwecken, als ob das Zeitfenster nur 193 ns lang ist, da sich nur 2 Pulse oberhalb bzw. bei der 5 %-Schwelle befinden. Tatsächlich muß jedoch beachtet werden, daß die Pulshöhen der Nachbarpulse in Abhängigkeit von der Spiegelposition beim Eintreffen des Hauptpulses variieren. Bei der Aufnahme in Abb. 3.11 (rechts) ist der Fall eingetreten, bei dem der dem Hauptpuls vorhergehende Puls intensitätsmäßig gegenüber dem nachfolgenden unterdrückt ist. In einer anderen Aufnahme könnte dies gerade umgekehrt sein. Deswegen müssen zum Messen des Zeitfensters, wie oben beschrieben, die reflektierten Pulse über verschiedene Anstellwinkel aufintegriert werden.

3.5 Vorchopper und langsamer Strahlverschluß

Die maximale Repetitionsrate für die vom Spiegel extrahierten Pulse beträgt $2f_S$, da der Spiegel doppelseitig beschichtet ist. Die Anregung des Kristalls ist jedoch auf eine wesentlich geringere Rate limitiert, etwa 3 Hz, damit keine Wärmeüberlastung auftritt. Zur Reduktion der Repetitionsrate pulst daher der Scheibenchopper den Strahl mit einer Frequenz von f_V vor. Sein Öffnungszeitfenster soll i. f. charakterisiert werden.

Alcalay & Knuth (1969) zeigten, daß das Öffnungszeitfenster Δt einer rotierenden Scheibe bei einer Kreisfrequenz von $\omega = 2\pi f_V$ gegeben ist durch,

$$\Delta t = \frac{\alpha + \psi}{\omega}, \quad (3.4)$$

wobei α der Öffnungswinkel der Blende und ψ der Winkel ist, durch den eine Blendenkante rotieren muß, um den Strahl abzufahren. Befindet sich die Blende der Breite x_B im Abstand r vom Scheibenzentrum und hat der Synchrotronstrahl eine Breite von x_{SR} , so kann Gl. 3.4 mit $\alpha \approx \frac{x_B}{r}$ und $\psi \approx \frac{x_{SR}}{r}$ für $x_B, x_{SR} \gg r$ in folgender Form ausgedrückt werden:

$$\Delta t_V \approx \frac{1}{2\pi f_V} \frac{x_B + x_{SR}}{r}. \quad (3.5)$$

Abhängig von den Werten für x_B und x_{SR} ergeben sich dann folgende mögliche Öffnungsprofile, wenn die Verteilung der einfallenden Synchrotronstrahlung vereinfachend als Kastenfunktion angenommen wird,

$$\begin{aligned} x_{SR} < x_B & : \text{ Trapezprofil mit } I_{max} = I_0 \\ x_{SR} > x_B & : \text{ Trapezprofil mit } I_{max} < I_0 \\ x_{SR} \approx x_B & : \text{ Dreiecksprofil mit } I_{max} = I_0. \\ x_{SR} \ll x_B & : \text{ Rechteckprofil mit } I_{max} = I_0 \end{aligned}$$

wobei I_0 die volle Intensität des Strahls ist. Die Intensitätsverteilung eines Synchrotronstrahls ist jedoch nicht kastenförmig, sondern eher gaußverteilt. In diesem Fall steigen die Flanken der Profile weniger steil an und die Ecken sind abgerundet.

An die Dauer des Öffnungszeitfensters des Vorchoppers ist die Bedingung geknüpft, daß es kleiner sein muß als die Halbperiode der Spiegelrotation, um doppelte Reflexion während Δt_V zu vermeiden. Die minimal notwendige Rotationsfrequenz f_V berechnet sich dann mittels Gl. 3.5 und den Werten von $x_{SR} = 3,6$ mm (volle Breite, der Wert wurde ebenfalls mit SHADOW ermittelt), $x_B = 4,0$ mm, $r = 55,0$ mm und $\Delta t_V < \frac{1}{2f_S} = 4,8$ ms zu $f_V > 4,6$ Hz. Damit der Spiegel immer den Phasenwinkel $\Delta\varphi$ um φ_0 durchläuft, wenn die Blende des Vorchoppers in der Öffnungsposition ist, müssen Spiegel- und Scheibenrotation phasensynchronisiert sein, also $\frac{f_S}{f_V} = n$, $n \in \mathbb{Z}$, und $\varphi_S = m 2\pi\varphi_V$, $m \in \mathbb{Z}$, wobei φ_S, φ_V die entsprechenden Phasen bezeichnen. Nach jeder n-ten Rotation des Spiegels werden dann Pulse durch die Scheibenblende transmittiert und so die Pulsrate von $2f_S$ auf f_V reduziert. Der Vorchopper rotiert mit der 20. Subharmonischen von f_S , also mit 5,25 Hz. Hieraus ergibt sich mit Gl. 3.5 theoretisch ein volles Öffnungszeitfenster von 4,2 ms, gemessen wurden 3,0 ms (s. Abb. 3.13 rechts), was vermuten läßt, daß x_{SB} tatsächlich kleiner ist, als mit SHADOW abgeschätzt. Das wegen $x_{SR} < x_B$ und der gaußischen Strahlverteilung erwartete abgerundete Trapezprofil wird durch die Messung bestätigt. Zur weiteren Reduktion der Pulsrate steht der langsame Strahlverschluß zu Verfügung, mit dem sich Transmissionsfenster von $\Delta t_{LSV} > 30$ ms erzeugen lassen, und der sich maximal mit $f_{LSV} \approx 5$ Hz öffnen läßt. Die Kombination von Spiegel-, Vorchopper und LSV ermöglicht dann, Pulsraten einzelner Synchrotronpulse im Bereich von $0 < f_{BX} \leq 2 f_S$ zu erzeugen. In Tabelle 3.3 sind noch einmal die typischen Betriebsparameter des Choppersystems für den Betrieb im Zweipuls-Modus des Speicherrings aufgelistet.

Strahlverschluß	Δt [μs]	f [Hz]
Spiegel	0,44	105
Scheibe	3000	5,25
LSV	> 30000	1–3

Tabelle 3.3: *Betriebsfrequenzen und Zeitfenster des Choppersystems für den Betrieb im Zweipuls-Modus des Speicherrings. Aufgelistet sind die Dauer der Zeitfenster Δt und die Betriebsfrequenz der Strahlverschlüsse.*

3.6 Synchronisation

Zur Durchführung eines zeitaufgelösten Anregungsexperiments ist es notwendig, eine Synchronisation zwischen Eintreffen des Synchrotronpulses und dem Öffnen des Choppers herzustellen bzw. voraussagen zu können, damit zum einen möglichst viel Intensität transmittiert wird und zum anderen, damit der Laser ein definierbares Zeitintervall vor dem Eintreffen des Synchrotronpulses gefeuert werden kann. Die Art der möglichen Synchronisation zwischen Chopper, Synchrotronpuls und Laser hängt stark von der Stabilität der Rotation ab und bestimmt, ob der Chopper phasensynchron zur Ringfrequenz laufen kann oder asynchron laufen muß. Im folgenden werden die Faktoren beschrieben, welche die Geschwindigkeitsstabilität beeinflussen sowie die Merkmale von phasensynchronem und asynchronem Chopperbetrieb.

Geschwindigkeitsstabilität. Die Geschwindigkeitsstabilität eines Choppers ist ein wichtiges Kriterium dafür, auf welche Weise die Synchronisation realisiert werden kann. Bei der Konstanz der Rotorgeschwindigkeit läßt sich in die Lang- und die Kurzzeitstabilität unterscheiden.

Die **Langzeitstabilität** wird vorwiegend durch Erwärmungseffekte im Motor, im stromliefernden Verstärker oder in der Lagerung gestört, wenn die Regelung diese nicht ausgleichen kann, bzw. verursacht die Regelung selbst Langzeitinstabilitäten, wenn die Regelparameter nicht korrekt eingestellt sind. Als Langzeitstabilität wird der Fehler auf den Mittelwert der Umlaufperiode verstanden, der über den Zeitraum gemessen wird, in dem sich Erwärmungsphänomene bemerkbar machen (Sekunden bis Minuten).

Nicht korrekt eingestellte Regelparameter der Regelschleife können auch kurzzeitige Instabilitäten verursachen, doch deren Hauptquelle sind Reibungseffekte in den Lagern und Unwuchten in der Rotation aufgrund von mechanischen Ungenauigkeiten. Diese wiederholen sich i. d. R. periodisch mit der Umdrehung, weswegen eine sinnvolle Meßgröße zur Charakterisierung der **Kurzzeitstabilität** die Standardabweichung σ auf die Umlaufperiode t ist. Zur Vermeidung von Luftreibung kann ein Chopper in Vakuum oder einer Heliumatmosphäre betrieben werden.

Phasensynchroner Betrieb. Rotiert ein Chopper phasensynchronisiert zu einer Subharmonischen $f_n = \frac{f_{BX}}{n}$, $n \in \mathbb{Z}$, der Ringfrequenz, dann tritt jedesmal wenn der Chopper öffnet ein Puls durch die Mitte des Öffnungszeitfensters. Da die Subharmonische das Eintreffen eines Synchrotronpulses markiert und über Frequenzteiler aus der Ringfrequenz abgeleitet werden kann, läßt sich von ihr durch Phasenverschiebung problemlos der Trigger für einen Laser ableiten. Die phasensynchrone Betriebsart ist die leistungsfähigste, doch verlangt sie eine sehr hohe Lang- und Kurzzeitstabilität des Choppers, die im Vakuum nur durch den Einsatz teurer Magnetlager (≈ 100 kDM) erreicht wird.

Asynchroner Betrieb. Weist ein Chopper keine hinreichende Lang- und Kurzzeitstabilität auf, so kann man ihn nicht phasensynchron betreiben. Die Phase zwischen Öffnungszeitpunkt und Eintreffen des Pulses schwankt dann, so daß im

ungünstigsten Fall gar kein Puls oder nur ein abgeschnittener durch den Chopper hindurchtritt, falls $\Delta t_{Chopper} < t_{BX}$, oder zwei teilweise abgeschnittene Pulse, falls $t_{BX} < \Delta t_{Chopper} < 2 t_{BX}$. Es existieren jedoch trotzdem Möglichkeiten, eine Synchronisation zwischen Synchrotronpuls und Öffnen des Choppers herzustellen. Eine besteht darin, die im Falle unzureichender Langzeitstabilität auftretende Phasenverschiebung zu überwachen und die Phasenübereinstimmung vorauszuberechnen, um dann eine Umdrehung vor der Übereinstimmung den Strahl für den Chopper mittels eines normalen Strahlverschlusses freizugeben, für den jedoch $t_{Verschluß}^{rise} \leq t_{Chopper}$ gefordert wird. Bei hinreichender Kurzzeitstabilität, d. h. einer Schwankung in der Umlaufperiode von $\sigma(t_{Chopper}) \ll \frac{\Delta t_{Chopper}}{2}$, wird dann die vorausberechnete Phasenübereinstimmung eine Umlaufperiode später hinreichend genau eintreten, so daß der Synchrotronpuls annähernd mittig durch die Chopperblende tritt. Bourgeois et al. (1996) entwickelten für den CHESS-Chopper (LeGrand et al. 1989) eine derartige Elektronik zur Phasenüberwachung und zur Synchronisation des Lasers, die am ESRF für die ersten zeitaufgelösten Beugungsexperimente eingesetzt wurde.

Eine weitere Methode der Synchronisation bei asynchronem Chopperbetrieb ist für den Spiegelchopper entwickelt worden und im nächsten Abschnitt beschrieben. Es schließt sich die Beschreibung der Testexperimente an, die zur Überprüfung der Synchronisation durchgeführt wurden.

3.6.1 Die Synchronisation des Spiegelchoppersystems

Die zur Synchronisation entwickelte Triggerlogik verarbeitet im wesentlichen vier Logikpulse, die mit den Öffnungszeitfenstern von Spiegel Δt_S , Vorchopper Δt_V und dem elektromagnetischen Strahlverschluß Δt_{LSV} sowie dem Eintreffen des Synchrotronpulses übereinstimmen. Ein Pulsdiagramm der Logikpulse ist in Abbildung 3.12 dargestellt, die logische Schaltung in Abbildung 3.15. Das Zustandekommen der wichtigsten Logikpulse und die Funktionsweise des Triggers werden i. f. beschrieben.

Logikpulse

BXClk Die Wiederholfrequenz der Synchrotronpulse ist über die sogenannte *Bunch-Uhr* verfügbar und in ihrer Phase durch eine Verzögerungseinheit verschiebbar. Der BXClk-Puls muß mit dem Eintreffen des Synchrotronpulses am Probenort übereinstimmen. Dazu wird dieser mit dem Plastiksintillationsdetektor gemessen und zusammen mit dem BXClk-Puls auf dem Oszilloskop dargestellt. Die Phasendifferenz zwischen beiden Pulsen wird dann über die Verzögerungseinheit minimiert.

Die Pulsdauer des BXClk-Pulses beträgt 20 ns. Da er später in einer Koinzidenzeinheit verwendet wird, ist es notwendig, ihn so weit wie möglich zu reduzieren, denn der wahre Synchrotronpuls ist nur 120 ps lang. Eine Reduktion wird dadurch erreicht, daß der Puls durch ein logisches ODER (**01**) (s. Abb.

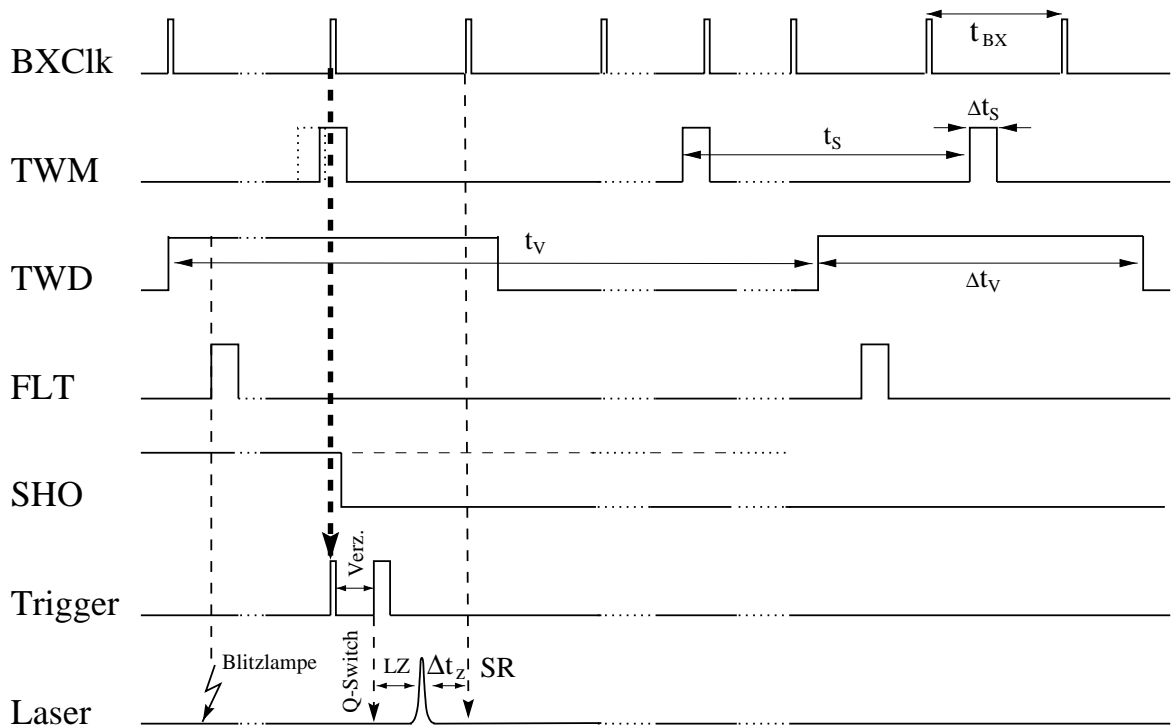


Abbildung 3.12: Pulsdiagramm des Triggers. Der $BXClk$ -Puls markiert das Eintreffen der Synchrotronpulse, TWM , TWD und SHO die Transmissionsfenster von Spiegel-, Vorchopper und langsamem Strahlverschluss. Durch Koinzidenz ergibt sich aus diesen Pulsen der Trigger, der nach einer gewissen Laufzeit (LZ) den Q -Switch des Lasers und damit den Laserpuls auslöst, auf den im Abstand Δt_Z der Synchrotronpuls folgt. Der FLT -Puls hat vorher durch Koinzidenz mit TWD die Blitzlampe des Lasers gefeuert.

3.15) geführt wird, dessen Ausgangspuls auf den möglichen Minimalwert von 4 ns eingestellt ist.

MIX und TWM Der Inkrementalgeber des Antriebsmotors des Spiegels erzeugt einmal pro Umdrehung einen Indexpuls, den MIX -Puls (Mirror IndeX). Der Motor ist innerhalb des Drehkreises montiert, so daß sich durch Rotation desselben der MIX -Puls relativ zum Reflexionszeitpunkt des Spiegelchoppers verstellen läßt. Die Einstellung ist bei einer minimalen Schrittweite des Drehkreises von $\Delta\varphi = 0,44 \mu\text{rad}$ und einer Rotationsfrequenz von $f_S = 105 \text{ Hz}$ auf 0,7 ns genau. Der TWM -Puls (Time Window Mirror) wird vom MIX -Puls abgeleitet, indem er durch einen *Gate-Generator* (**G1**) auf die Dauer des Öffnungszeitfensters Δt_S verlängert wird, das wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben bestimmt worden ist. Die Breite des TWM -Pulses wird auf die 2,5 %-Breite der gemessenen Verteilung eingestellt, entsprechend $\Delta t_S = 465 \text{ ns}$. TWM -Puls und Szintillatorsignal werden auf dem Oszilloskop beobachtet, und der TWM -Puls durch Rotieren des Drehkreises so in seiner Phase verschoben, daß er der Verteilung um $t_{1BX} = 964 \text{ ns}$ vorgelagert ist (s. Abb. 3.13 links), um genügend Zeit für Laufzeitkompensation und das Feuern des Lasers zu haben.

TWD Die IMC generiert mit Hilfe der PEG-Funktion (s. Kapitel 3.3) den TWD-Puls (Time Window Disk), der mit dem Phasenwinkel der Transmission des Vorchoppers übereinstimmt. Die Dauer des Pulses koinzidiert mit dem Bereich der maximalen Transmission (s. Abb. 3.13 rechts).

FLT Zur Erzeugung einer Besetzungsinversion in einem Nd:YAG-Laser muß eine Blitzlampe entladen werden, die beim verwendeten Laser mit einer Frequenz von 5 Hz ($\pm 10\%$) feuern muß, um konstante thermische Bedingungen im Resonator für einen optimalen Arbeitspunkt zu gewährleisten. Ungefähr 220 μs nach dem Blitzen der Lampe herrscht im Nd:YAG-Stab das Inversionsmaximum. Dies ist der optimale Zeitpunkt für die Laserentladung, die durch Güteschaltung des Resonators mittels einer Pockels-Zelle (auch *Q-Switch* genannt) innerhalb weniger Nanosekunden stimuliert wird (Spectra-Physics 1998).

Die Aufgabe des FLT-Pulses (FlashLamp-Trigger) ist es nun, die Blitzlampe im Zeitabstand von 220 μs vor einem potentiellen Laserschuß zu entladen. Hierzu wird der FLT-Puls 219 μs vor dem MIX-Puls mittels der PEG-Funktion der Spiegelachse generiert. Die Erzeugungsfrequenz des FLT-Pulses entspricht dann aber der Rotationsfrequenz des Spiegels und muß, wie eben erwähnt, auf ≈ 5 Hz heruntergeteilt werden. Dazu wird der FLT-Puls in Koinzidenz mit dem zur Spiegelrotation phasensynchronen TWD-Puls geschaltet (**K3**) und so die Frequenz des Blitzlampentriggers auf die des Vorchoppers von 5,25 Hz reduziert.

SHOC und SHO Der SHOC-Pegel (SHutter Open Command, s. Abb. 3.14 links, oberer Kanal), setzt den Ausgangspegel eines RS-Flip-Flops (**RS2**) und öffnet so den LSV. Dieser hat eine Reaktionszeit von $t_R \approx 30$ ms, so daß der SHOC-Pegel für den Trigger nicht verwendet werden kann, da die Synchrotronstrahlung tatsächlich erst später durch den Verschluß hindurchtritt. Deswegen wird um t_R verzögert der SHO-Pegel generiert (SHutter Open, s. Abb. 3.14 links, mittlerer Kanal), der mit der transmittierten Strahlung zeitlich übereinstimmt. Er setzt ein weiteres Flip-Flop (**RS1**), wodurch dessen invertierter Ausgangspegel gelöscht wird, und somit das Veto an der Koinzidenzeinheit **K2** verschwindet, das sicherstellt, daß kein Trigger erzeugt wird, solange der LSV geschlossen ist.

Funktionsweise des Triggers

Ein Trigger zum Feuern des Laserpulses bedarf der Koinzidenz zwischen BXClk, TWM, TWD und SHO-Pegel. Der Ablauf der Triggerbedingungen ist i. f. anhand der Pulse (s. Abb. 3.12) und den beteiligten Logikmodulen (s. Abb. 3.15) erläutert.

1. **Start der Datennahme.** Nach dem Start der Datennahme über das Kontrollprogramm öffnet dieses den Strahlverschluß und das Veto an K2 verschwindet.
2. **Koinzidenz an K1.** Die Koinzidenzeinheit **K1** überprüft bei jeder Spiegelumdrehung die Koinzidenz zwischen dem BXClk- und dem TWM-Puls, d. h. ob die Phase zwischen BXClk-Puls und der Mitte des TWM-Pulses kleiner ist als $\pm \frac{\Delta t_S}{2}$, womit die Bedingung für Reflexion durch K3 erfüllt ist. Der TWM-Puls

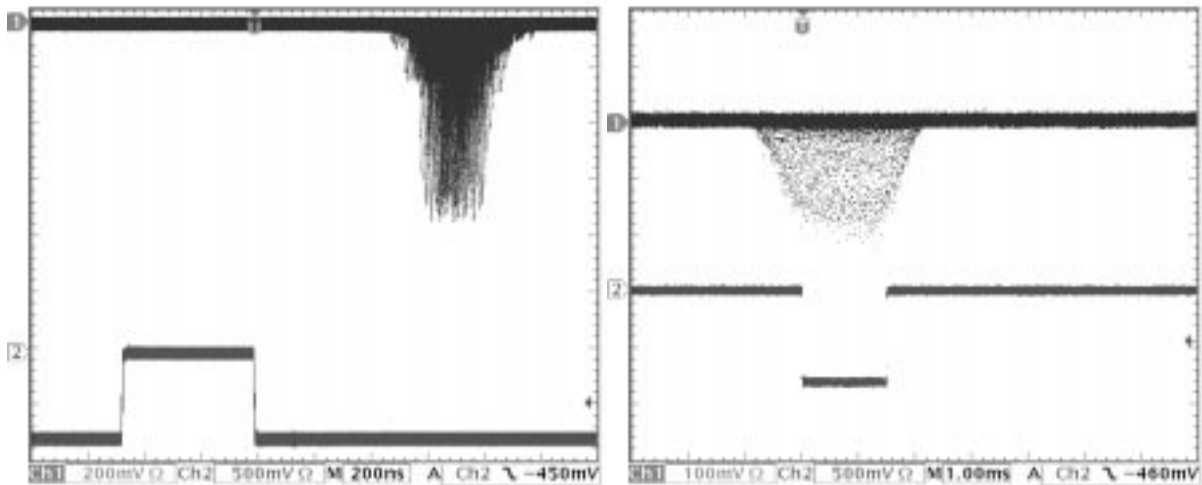


Abbildung 3.13: Links: Kanal 1 zeigt das Öffnungsprofil des Spiegelchoppers anhand der Aufintegration von ca. 4000 transmittierten, einzelnen Synchrotronpulsen am Oszilloskop bei einer Rotationsfrequenz von 105 Hz. Die Verteilung entsteht aufgrund der unterschiedlichen Reflexionspositionen des Spiegels bei Eintreffen des Pulses. Kanal 2 zeigt den um 964 ns vorgelagerten TWM-Puls, auf den getriggert wurde. Rechts: Kanal 1 zeigt das Öffnungsprofil des Scheibenchoppers (volle Breite 3 ms) anhand der transmittierten Synchrotronstrahlung bei einer Rotationsfrequenz von 5,25 Hz. Kanal 2 zeigt den korrespondierenden TWD-Puls.

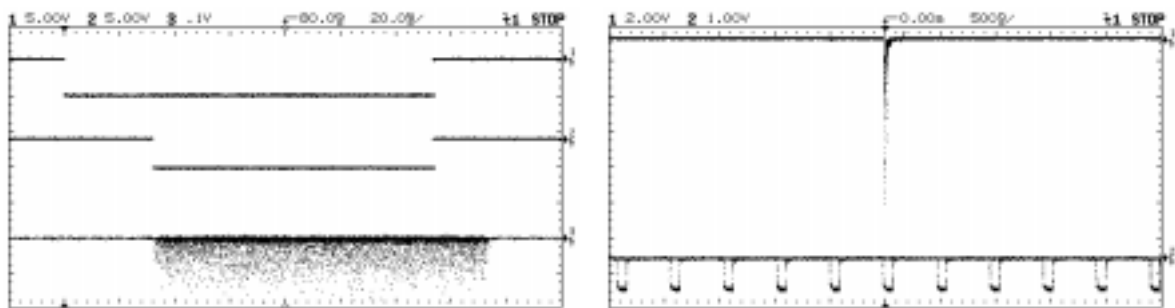


Abbildung 3.14: Links: Logikpulse und Transmission des LSV ohne Spiegel- und Vorchopper. Oben: Der SHOC-Pegel, der den Verschluss anspricht. Mitte: Der SHO-Pegel, der die wahre Öffnung des Strahlverschlusses markiert und so lange offen bleibt, bis der Trigger die Flip-Flops RS1 und RS2 zurücksetzt. Unten: Die tatsächliche Transmission, die aufgrund der Reaktionszeit des Strahlverschlusses auf den Verschlussbefehl (steigende Flanke von Kanal 2) noch rund 30 ms andauert. Rechts: Extraktion eines einzelnen Synchrotronpulses. Oben: Extrahierter Synchrotronpuls. Unten: Das Signal der Bunch-Uhr.

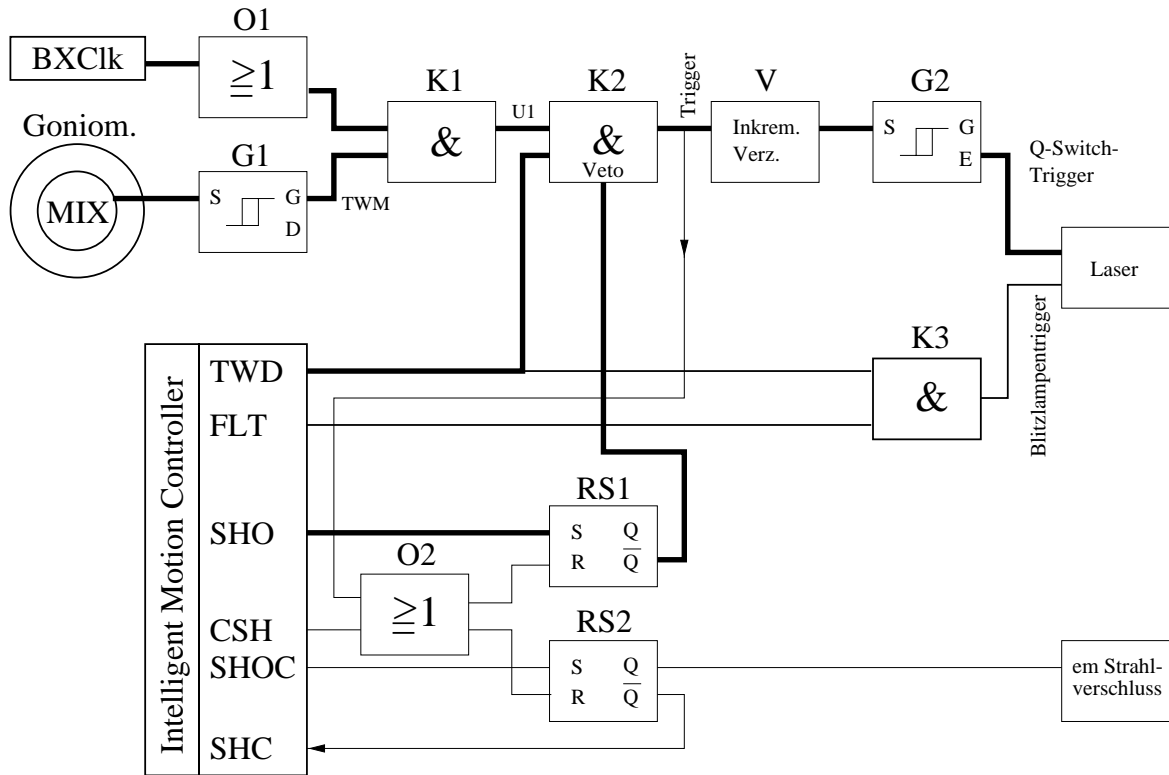


Abbildung 3.15: Schaltung der Triggerlogik, welche die Logikpulse der Bunch-Uhr (BX-Clk), des Spiegel- (TWM) und des Scheibenchoppers (TWD) und des LSV (SHO und SHOC) zur Synchronisation von Laseranregung und Synchrotronpuls verarbeitet.

liegt zwar um das Zeitintervall t_{1BX} vor der wahren Reflexionsposition, doch ändert sich das Phasenverhältnis innerhalb dieses Zeitintervalls nicht relevant[†], so daß die Triggerbedingung problemlos 964 ns vorher abgefragt werden kann. Bei Koinzidenz erzeugt **K1** dann das logische UND von BX-Clk und TWM, den Puls **U1**.

3. **Koinzidenz an K2.** Der Puls **U1** wird in der Einheit **K2** auf die Koinzidenz mit **TWD** hin überprüft und die Einheit erzeugt gegebenenfalls den **Trigger**. Dieser liegt nun knapp einen Pulsabstand vor dem belichtenden Synchrotronpuls, so daß genügend Zeit zu Verfügung steht, Laufzeiten von Kabeln, der nachfolgenden Elektronik und die Reaktionszeit des Lasers zu kompensieren.
4. **Zeitverzögerung.** Der **Trigger** läuft über eine Verzögerungseinheit (**V**) zum Gate-Generator **G2**, dessen Endmarkerpuls den Q-Switch-Trigger für den Laser generiert. Über die Länge des Gatters **G2** läßt sich der Endmarkerpuls zeitlich grob verschieben, über die Verzögerungsstufe in einem Bereich von 127,5 ns auf 0,5 ns genau. Das Zeitintervall zwischen Laser- und Synchrotronpuls wird wie in

[†]Die relative Schwankung in f_S pro Umlauf liegt bei 10^{-5} . Nimmt man diese Kurzzeitstabilität auch innerhalb von t_{1BX} an, so verursacht dies lediglich eine Fluktuation der Phase um 9,6 ps.

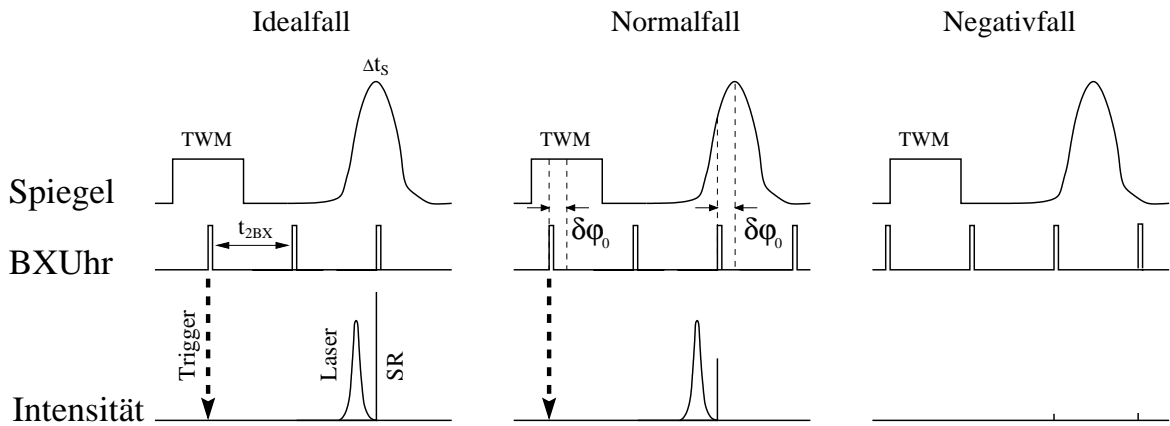


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung möglicher Triggersituationen, oben sind der Logikpuls und das reale Öffnungszeitfenster des Spiegelchoppers dargestellt, in der Mitte die Bunch-Uhr und darunter die auf den Kristall einfallenden Pulse.

Kapitel 3.6.2 beschrieben gemessen und kann über G2 und V auf die Anforderung des Experiments eingestellt werden.

- Weitere Triggerlogikfunktionen.** Der Trigger läuft nach seiner Erzeugung durch K2 nicht nur zur Verzögerungseinheit, sondern auch über ein logisches ODER **O2** zu den beiden Flip-Flops und setzt diese zurück, um den LSV zu schließen und das Veto an K2 wieder zu aktivieren. Obwohl dies ungefähr eine Pulsperiode vor der eigentlichen Belichtung geschieht, wird der Strahlengang im Kollimator dadurch nicht vorzeitig verschlossen, da die Reaktionszeit des LSV wesentlich länger ist. Durch das Zurücksetzen des Flip-Flops RS2 teilt der entstehende Ausgangspegel (SHC, SHutter Closed) der IMC und damit dem Kontrollprogramm mit, daß eine Belichtung stattgefunden hat. Das Kontrollprogramm wartet dann eine einstellbare Zeit, bis es den LSV wieder öffnet, und der Triggerzyklus beginnt von neuem. Der LSV läßt sich zum Abbruch der Datennahme manuell über den CSH-Puls (Close SHutter) schließen, der wie der Trigger über O2 ebenfalls die Flip-Flops löscht.

Vor- und Nachteile des Triggers

Der Hauptnachteil der Triggermethode liegt darin, daß die meisten Synchrotronpulse intensitätsgeschwächt sind, da der Spiegel im Augenblick des Eintreffens des Pulses nicht auf der optimalen Reflexionsposition φ_0 steht, sondern eine Abweichung $\pm\delta\varphi_0$ haben darf, die durch die gewählte Dauer des TWM-Pulses auf $|\delta\varphi_0| \leq 2\pi\Delta t_s f_s$ begrenzt ist (s. Abb. 3.16 Normalfall). Somit ist es zur Intergration einer bestimmten Strahlungsintensität auf dem Detektor notwendig, mehr Belichtungen durchzuführen als beispielsweise mit einem phasensynchronen Chopper (Idealfall).

Die mittlere transmittierte Intensität pro Puls läßt sich unter der Annahme, daß $\delta\varphi_0$ und die damit korrelierte transmittierte Intensität rein zufällig verteilt sind, anhand

von Abb. 3.13 (links) abschätzen. Hierzu wird das Integral unter der Einhüllenden der Verteilung gebildet und durch die Gesamtbreite geteilt, um die mittlere Pulshöhe zu berechnen. Es zeigt sich, daß sie rund 50 % des Maximalwertes der Verteilung beträgt, was bedeutet, daß aufgrund der Akzeptanz intensitätsgeschwächter Pulse eine doppelt so hohe Anzahl an Belichtungen in Kauf genommen werden muß als bei phasensynchronem Chopperbetrieb nötig wäre.

Ein weiterer Nachteil entsteht, wenn der Spiegelchopper während des Zweipulsbetriebs des Speicherrings eingesetzt wird, da das reale Zeitfenster unterhalb von $\approx 2,0$ % der Maximalintensität noch breiter ist als $t_{2BX} = 482$ ns. Tritt dann der Fall ein, daß der LSV offen ist und die Scheibe sich in Transmissionsposition befindet, aber der Puls U1 nicht generiert wird, weil der BXClk-Puls nicht mit dem TWM-Puls koinzidiert, so kann trotzdem Synchrotronstrahlung durch den Kollimator gelangen und den Kristall belichten, ohne daß dieser angeregt worden ist (s. Abb. 3.16 Negativfall). Diese Intensität beträgt aber entsprechend der Wahl der Länge von TWM immer weniger als 2,5 % der Maximalintensität, und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieses Falles liegt bei nur $\frac{\Delta t_S - t_{2BX}}{t_{2BX}} = 3,5\%$ ($\Delta t_S = 465$ ns, $t_{2BX} = 482$ ns), wobei wieder eine zufällige Verteilung von $\delta\varphi_0$ angenommen wird.

Der Hauptvorteil der Triggermethode besteht darin, daß keinerlei Anforderungen an die Stabilität des Spiegelchoppers gestellt werden müssen, was die Konstruktion des Antriebs derart vereinfacht und verbilligt hat, daß der mittlere Verlust der Intensität von 50% in Kauf genommen worden ist. Des weiteren konnte die Triggerlogik aus kommerziell erwerblichen NIM-Logikmodulen aufgebaut werden, so daß die Entwicklung einer aufwendigen Elektronik wie z.B. bei Bourgeois et al. entfiel.

3.6.2 Überprüfung der Synchronisation

In bezug auf die Synchronisation wurden folgende Eigenschaften des Choppers untersucht:

- Stabilität der Spiegelrotation
- Phasenfluktuation zwischen TWD und TWM
- Stabilität der Zeitdifferenz zwischen Laser und Synchrotronpuls

Als zentrale Komponente der Synchronisationsmessungen wurde der TAC eingesetzt, außer bei der Messung zur Stabilität der Spiegelrotation, da der maximale Meßbereich des TACs nur 1 ms, Δt_S jedoch 9,5 ms beträgt. Die anderen Messungen benutzten den TAC. Abhängig von der Art der Messung dienten Signale der Triggerlogik, der APD oder des Plastikszintillationsdetektors als Start- oder Stop-Signal für den TAC. Auf die Signale der Triggerlogik ist in Kapitel 3.6.1, auf die Detektoren in Kapitel 3.3 eingegangen worden. Im folgenden sind die oben aufgelisteten Messungen beschrieben, wobei Tabelle 3.4 einen Überblick über die Start- und Stop-Pulse der Zeitabstandsmessungen liefert.

	Messung	Start	Stop	Zeitmesser
1	Stabilität der Spiegelrotation	MIX-Puls	MIX-Puls	Zähler
2	Phasenschwankung der Zeitfenster von Scheibe und Spiegel	TWD-Puls	TWM-Puls	TAC
3	Messung der Laufzeiten	APD	PSD (Laser)	TAC
4	Zündzeitpunkt des Lasers	Trigger	APD	TAC
5	Zeitdifferenz Laser – SR	APD	PSD (SR)	TAC

Tabelle 3.4: Messungen zur Synchronisation und die entsprechenden Eingangspulse für den TAC bzw. Zähler.

Stabilität der Spiegelrotation

Die Kurzzeitstabilität der Spiegelrotation wird über die Messung der Schwankung σ_S in der Umlaufperiode t_S bestimmt. Hierzu setzt der MIX-Puls einen Pegel, der einen 8 MHz-Zähler startet. Nach einer Rotation löscht der MIX-Puls den Pegel und der Zähler stoppt. Auf diese Weise wird jede zweite Rotationsperiode auf ± 125 ns genau gemessen. Die Messungen sind für Rotationsfrequenzen von 10–90 Hz über eine Meßperiode von je 3 Minuten durchgeführt worden. Abbildung 3.17 zeigt σ_S in Abhängigkeit von der Rotationsfrequenz. An die Meßwerte ist die Potenzfunktion $g(f) = a \cdot f^b$ mit $a = 25796$ ns und $b = -1,09$ angepaßt. Der Exponent deutet darauf hin, daß σ_S genau wie die Umlaufperiode t_S mit $\frac{1}{f_S}$ abnimmt. Die Schwankung reicht bei hohen Rotationsfrequenzen nahe an die Auflösungsgrenze der Meßapparatur heran ($\sigma_S(f = 89\text{Hz}) = 175$ ns). Die mittlere Kurzzeitstabilität bzw. Langzeitstabilität berechnet sich über den Mittelwert der einzelnen $\frac{\sigma_S(f_S)}{t_S}$ bzw. $\frac{\delta t_S}{t_S}$ bei den verschiedenen Frequenzen, wobei δt_S der Fehler auf t_S ist,

$$\sum_{i=1}^{14} \frac{\sigma_S^i}{t_S^i} = 1,9 \pm 0,5 \cdot 10^{-5} \quad \text{bzw.} \quad \sum_{i=1}^{14} \frac{\delta t_S^i}{t_S^i} = 8,0 \pm 2,6 \cdot 10^{-7} . \quad (3.6)$$

Der geringe Fehler auf die gemittelten Stabilitäten bestätigt eine gute Regelung über den gesamten Meßbereich von 12–90 Hz.

Die hohe Langzeitstabilität des Spiegelchoppers hatte dazu motiviert, eine Phasensynchronisation seiner Rotation zur Ringfrequenz zu versuchen, was jedoch nicht gelang. Dies liegt vermutlich an der Schwankung in der Umlaufperiode von $\sigma_S = \pm 175$ ns oder daran, daß der Chopper nicht genau genug auf eine Subharmonische der Ringfrequenz ($\frac{1}{964\text{ns}} = 1037344,40$ Hz) eingeregelt werden konnte.

Das am Anfang von Kapitel 3.6 vorgestellte Synchronisationsverfahren von Bourgeois et al., bei dem die Phasenübereinstimmung auf σ_S genau vorausberechnet werden kann, hätte prinzipiell auch angewendet werden können, jedoch gilt nicht wie gefordert $\sigma_S \ll \frac{\Delta t_S}{2}$, nicht etwa weil σ_S des Spiegelchoppers im Vergleich zum CHESS-Chopper größer ist, sondern vielmehr, weil Δt_S dreimal geringer ist. Daraus würden bei Synchronisation nach diesem Verfahren ebenfalls abgeschnittene Pulse resultieren, so daß es zu dem hier neuentwickelten Verfahren keine Vorteile bietet. Außerdem wurde der Entwicklungsaufwand für die notwendige Auswertelektronik zur *a priori*

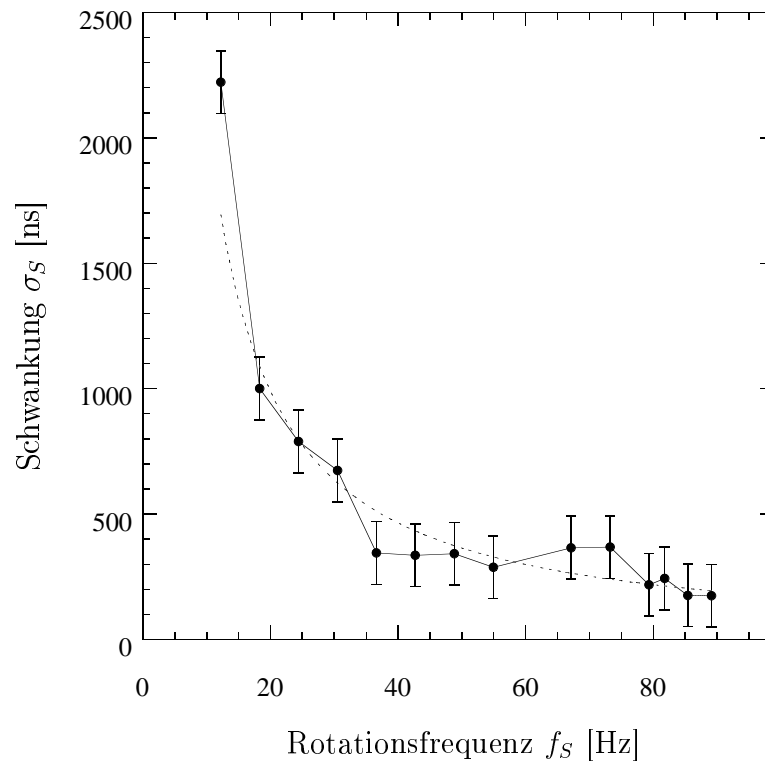


Abbildung 3.17: Standardabweichung σ_S der gemessenen Periode t_S aufgetragen gegen die Frequenz f_S . Der Fehler der Messung beträgt ± 125 ns.

Feststellung der Phasenübereinstimmung wesentlich höher eingeschätzt als das für den Spiegelchopper entwickelte Verfahren.

Phasenfluktuation zwischen TWD und TWM

Der Vorchopper rotiert im Mittel phasensynchron zum Spiegelchopper, doch ist es notwendig zu überprüfen, wie sehr die Phase zwischen Spiegel und Scheibe fluktuiert. Überschreitet dieser Wert nämlich $\frac{\Delta t_V}{2}$, so wird der Strahl durch die Scheibenblende teilweise oder gar ganz abgeschnitten bevor er den Spiegel in seiner Reflexionsposition erreicht. Zur Messung der Phasenfluktuation wird der Meßaufbau 2 verwendet, wobei der Spiegel mit $f_S = 105$ Hz und der Vorchopper mit $f_V = 5,25$ Hz rotiert; der TWD-Puls beträgt dann $800 \mu\text{s}$. Der TWM-Puls sollte dabei innerhalb des TWD-Pulses zentriert liegen (s. Abb. 3.18, links), doch die Phase dieser beiden Pulse läßt sich aufgrund der Auflösung des Drehgebers des Vorchoppers nur in Inkrementen von $0,176^\circ$ verstellen, entsprechend $97,7 \mu\text{s}$ bei $5,25$ Hz. Wie aus der gemessenen Verteilung der Zeitabstände zwischen TWD und TWM (s. Abb. 3.17, rechts) zu erkennen ist, konnte daher der TWD-Puls nicht genau zentriert werden, so daß der Mittelwert $368 \mu\text{s}$ statt $400 \mu\text{s}$ beträgt. Die Fluktuation errechnet sich als die Standardabweichung der Verteilung zu $48,7 \mu\text{s}$, und ist somit um einen Faktor sieben kleiner als $\frac{\Delta t_V}{2}$, womit eine hinreichende Phasensynchronisation der beiden Rotationsachsen zueinander gegeben und ein stets rechtzeitiges Öffnen des

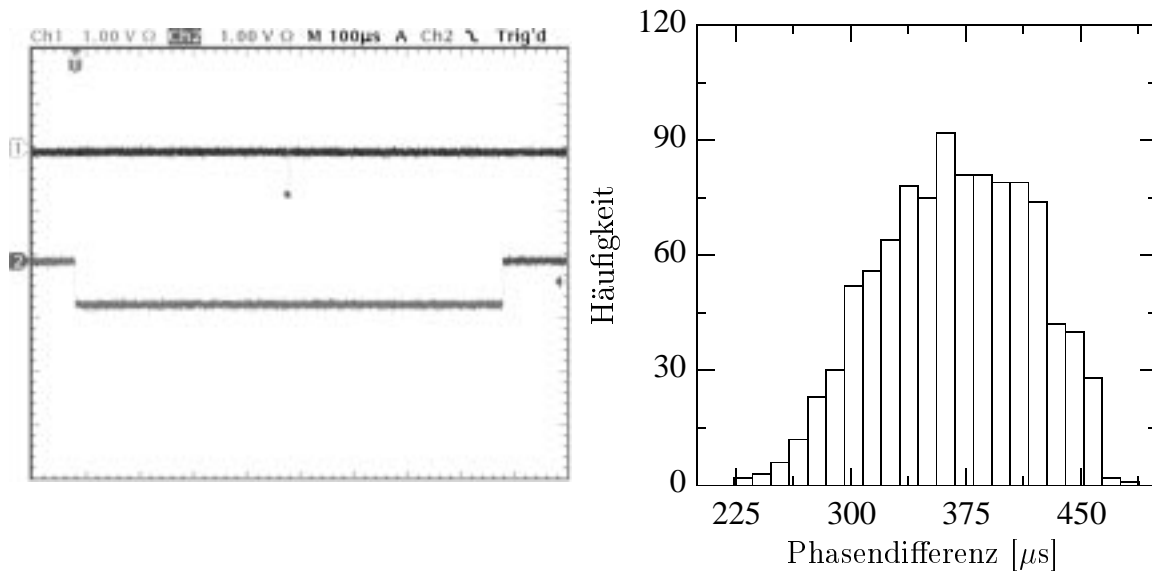


Abbildung 3.18: Links: *TWM-Puls innerhalb des TWD-Pulses zur Einstellung und Überprüfung der Phasensynchronisation zwischen Scheiben- und Spiegelchopper.* Rechts: *Phasenabstand zwischen TWD und TWM. Die Phase fluktuiert mit $48,7 \mu\text{s}$ um den Mittelwert von $367,7 \mu\text{s}$.*

Vorchoppers garantiert ist.

Stabilität der Zeitdifferenz zwischen Laser und Synchrotronpuls

Die Dauer von Laser- und Synchrotronpuls bestimmt die Unschärfe, mit welcher der relaxierte Anregungszustand des Proteinkristalls zum Zeitpunkt t_Z nach der Reaktionsinitiation gemessen werden kann. Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß das Zeitintervall Δt_Z konstant bleibt. Dieses Zeitintervall wird bei der Datennahme für jedes einzelne Ereignis entsprechend Meßaufbau 5 bestimmt, so daß nach dem Experiment die Standardabweichung $\sigma(\Delta t_Z)$ berechnet werden kann. Vorher muß jedoch auf Laufzeitdifferenzen zwischen APD und PSD korrigiert werden.

Zur Feststellung dieser Laufzeitdifferenz wird die Alufolie des Eintrittsfensters des PSDs angeritzt, um das Eintreten von Laserlicht zu ermöglichen. Der Nachweis eines Laserpulses durch beide Detektoren erlaubt es dann, die Laufzeitdifferenz zu bestimmen ($t_{LZ} = 27,1 \pm 0,6 \text{ ns}$) und den Meßwert von Δt_Z zu kalibrieren (Meßaufbau 3).

Die Faktoren, welche die Konstanz des Zeitintervalls Δt_Z während des Experiments stören können sind,

1. eine Veränderung des Zündzeitpunkts des Lasers,
2. Fehltrigger und
3. die Frequenz der Bunch-Uhr.

Die Untersuchung dieser Einflüsse ist im folgenden beschrieben:

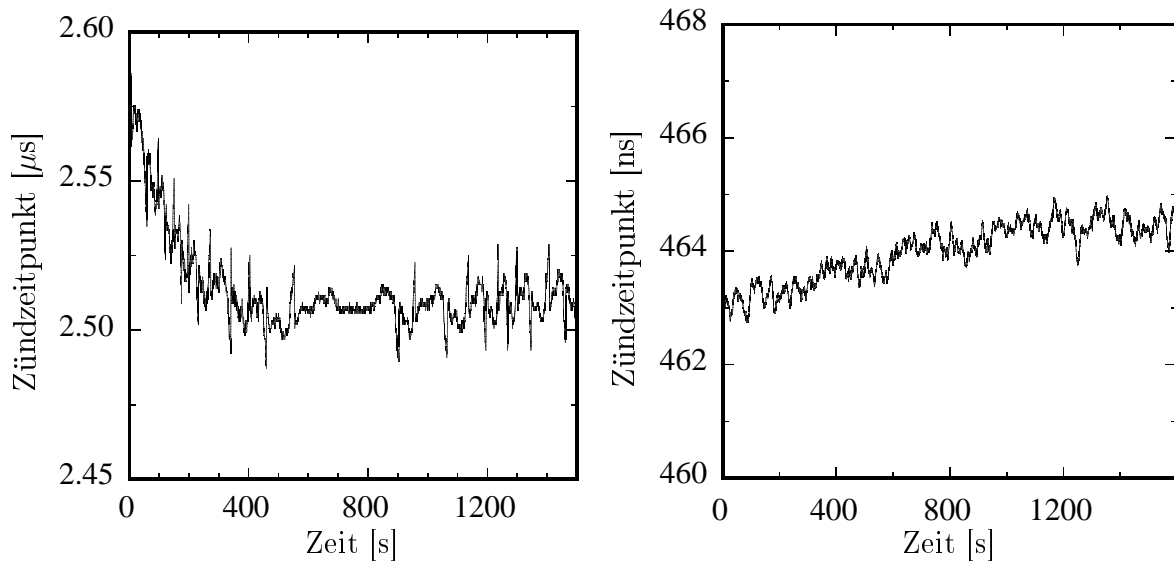


Abbildung 3.19: *Zeitliche Verschiebung der Zündzeitpunkte der Laser.* Links: *Exzimer-Laser.* Innerhalb der ersten 700 s verschiebt sich der Zündzeitpunkt des Lasers um ≈ 60 ns. Rechts: *Nd-YAG-Laser.* Der Zündzeitpunkt verschiebt sich innerhalb der ersten 900 s um ≈ 2 ns.

1. Veränderung des Zündzeitpunkts des Lasers

Die ersten Chopper-Testexperimente wurden mit einem Exzimer-Laser als Pumplaser durchgeführt, wobei zusätzlich zur normalen Schwankung im Zündzeitpunkt eine starke kontinuierliche Änderung festgestellt wurde. Um diese Verschiebung im Zündzeitpunkt zu quantifizieren, wurde das Zeitintervall zwischen Trigger und Laserpuls gemäß Meßaufbau 4 bestimmt. Es zeigte sich, daß sich der Zündzeitpunkt innerhalb der ersten 700 s um -60 ns verschiebt, bevor er im Rahmen der Spezifikation (± 5 ns) mit $\pm 6,3$ ns um einen stabilen Mittelwert schwankte (s. Abb. 3.19 links). Diese Verschiebung des Zündzeitpunkts findet ihre Ursache vermutlich in Erwärmungseffekten des Lasers, die den Zeitpunkt der Entladung der Hochspannung beeinflussen. Die hohe Instabilität im Zündzeitpunkt und die unpassende Form und Dauer der Pulse des Exzimer-Lasers für ns-zeitaufgelöste Experimente (s. Abb. 4.1) veranlaßten seinen Austausch gegen den Nd:YAG-Laser.

Doch auch hier besteht eine Verschiebung des Zündzeitpunkts, obgleich sie wesentlich geringer ist. In den ersten 900 s verschiebt er sich um ≈ 2 ns (s. Abb. 3.19 rechts), was jedoch in Anbetracht der Tatsache, daß der Laserpuls eine Halbwertsbreite von 7 ns hat und im Zweipulsbetrieb eine Schwankung in der Beugungsmessung von ± 2 ns auftritt (s. Punkt 3), noch tolerabel ist. Danach schwankt er im Rahmen der Spezifikation (0,5 ns) mit einer Standardabweichung von $\sigma_{Nd:YAG} = 0,63$ ns um einen konstanten Mittelwert, hier $464,36 \pm 0,01$ ns. Es besteht die Möglichkeit, die anfängliche Verschiebung des Zündzeitpunkts mittels der Verzögerungsstufe V (s. Abb. 3.15) zu kompensieren, da die Meßgröße Δt_Z während der Messung verfolgt wird.

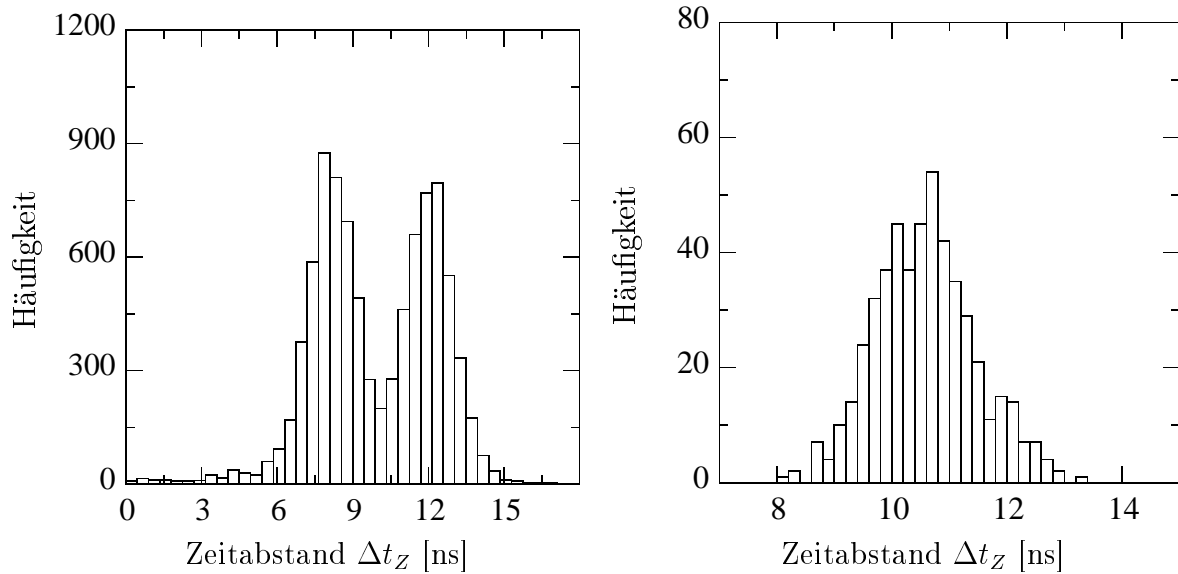


Abbildung 3.20: Zeitabstand zwischen Laser- und Synchrotronpuls. Links: DORIS im Zweipulsbetrieb. Der Abstand der Mittelwerte der beiden überlagerten Verteilungen, $\Delta t_Z^1 = 8,08 \pm 0,01$ ns und $\Delta t_Z^2 = 12,10 \pm 0,02$ ns entspricht mit $4,02 \pm 0,02$ ns dem Zeitabstand, der durch die Asymmetrie des Beschleunigerorbis hervorgerufen wird. Der Mittelwert beträgt $\Delta t_Z = 9,9 \pm 2,4$ ns. Rechts: DORIS im Einzelpulsbetrieb. Die Verteilung um den Mittelwert $\Delta t_Z = 10,58 \pm 0,05$ ns hat eine Standardabweichung von $\sigma(\Delta t_Z) = 0,87$ ns.

2. Fehltrigger

Die Aufgabe der Koinzidenzeinheit K1 ist es, die Information über die Ankunft des BXClk-Pulses dann weiterzugeben, wenn dessen steigende Flanke in das durch den TWM-Puls definierte Zeitfenster Δt_S fällt. Tritt jedoch der umgekehrte Fall ein, daß die steigende Flanke des TWM-Pulses in das durch den BXClk-Puls definierte Zeitfenster von 4 ns Dauer fällt, so entsteht ein Fehltrigger, weil der von K1 erzeugte Puls nicht mehr die Flanke des BXClk-Pulses markiert, sondern die steigende Flanke des TWM-Pulses. Da der BXClk-Puls eine Dauer von $\Delta t_{BX-Clk} = 4$ ns hat und der Zeitpunkt der Koinzidenz mit TWM innerhalb dieser Zeit zufällig ist, resultiert daraus im Mittel eine zusätzliche, ungewollte Phasenverschiebung des Triggers gegenüber dem Synchrotronpuls von $2,0 \pm 2,0$ ns.

Ein Fehltrigger tritt unter der Annahme, daß die Koinzidenz rein zufällig ist, mit einer Häufigkeit von $\frac{\Delta t_{BX-Clk}}{\Delta t_{BX-Clk} + \Delta t_S} = \frac{4 \text{ ns}}{469 \text{ ns}} = 0,9 \%$ auf. Für die Unschärfe in Δt_Z hat der Fehltrigger nur bei Experimenten im Einzelpuls-Modus des Beschleunigers geringe Bedeutung, im Zweipuls-Modus wird der induzierte Fehler durch die i. f. beschriebene Fehlerquelle dominiert.

3. Frequenz der Bunch-Uhr

Eine durch die Bunch-Uhr-Frequenz verursachte Unschärfe im Zeitintervall Δt_Z tritt auf, wenn der Chopper während des Zweipuls-Modus von DORIS betrieben wird. Die Ursache hierfür liegt darin, daß die Füllung des Speicherrings nicht

ganz symmetrisch ist. Nach dem Umbau von DORIS zum reinen Synchrotron-speicherring mußte ein *Bypass* installiert werden, der nur eine asymmetrische Füllung erlaubt. Im 2-Puls-Modus beträgt daher der Zeitabstand des ersten Elektronenpakets zum zweiten 480 ns, der vom zweiten zum ersten jedoch 484 ns. Die Bunch-Uhr-Frequenz berücksichtigt dies jedoch nicht, so daß die Phasenverschiebung des Synchrotronpulses zum Trigger bzw. Laserpuls entweder +2 oder -2 ns beträgt. Dies verdeutlicht Abb. 3.20 (links), bei der Δt_Z im Zweipuls-Modus des Speicherings gemessen wurde. Der Abstand der Mittelwerte der beiden Verteilungen entspricht mit $4,02 \pm 0,02$ ns dem Zeitabstand, der durch die Asymmetrie des Beschleunigerorbits hervorgerufen wird. Bei obiger Messung beträgt das mittlere $\Delta t_Z = 9,9$ ns mit einer Abweichung von 2,4 ns, während im Einzelpuls-Modus bei einem Mittelwert von $\Delta t_Z = 10,68$ ns die Standardabweichung nur 0,87 ns beträgt (s. Abb. 3.20 rechts). Eventuell ließe sich mit einer entsprechenden Elektronik die Bunch-Uhr-Frequenz so modifizieren, daß sie die Asymmetrie berücksichtigt und die zusätzliche Verbreiterung in der Zeitauflösung eliminiert wird.

Fazit

Die Messungen zur Überprüfung der Synchronisation belegen, daß das Choppersystem stabil läuft und die Phasensynchronisation zwischen Scheiben- und Spiegelchopper so gut ist, daß die Transmission des Synchrotronstrahls in keinsten Weise beeinträchtigt wird. Die erreichbare Zeitauflösung wird durch die selten auftretenden Fehltrigger und die Instabilität im Zündzeitpunkt des Lasers im Rahmen von 2 ns gestört, doch hat dies nur für Messungen im Einzelpuls-Modus Relevanz, da im Zweipuls-Modus der eben unter Punkt 3 beschriebene Effekt dominiert. Die Beeinträchtigung liegt aber mit ± 2 ns noch um knapp einen Faktor 2 unter der Halbwertsbreite des Laserpulses von 7 ns, der somit die erreichbare Zeitauflösung maßgeblich bestimmt.

Kapitel 4

Das Lasersystem zur photolytischen Anregung

4.1 Experimenteller Aufbau des Lasersystems

Das Lasersystem zur Erzeugung der Anregungspulse besteht aus einem Farbstofflaser (FL2002, Lambda-Physik) und einem dazugehörigen Pumpplaser. Anfänglich diente ein Exzimer-Laser (EMG101, Lambda-Physik) als Pumpquelle, doch aufgrund der Halbwertsbreite des Hauptpulses von 15 ns (s. Abb. 4.1) und des nachfolgenden Höckers mit einer Halbwertsbreite von 20 ns sowie der kontinuierlichen Verschiebung und der Schwankung im Zündzeitpunkt (s. Kapitel 3.6.2) wurde er durch einen Nd:YAG-Laser (INDI50, Spectra Physics) ersetzt. Der wesentliche Vorteil dieses Lasers für zeitaufgelöste Messungen liegt in der kürzeren Pulsbreite von 7 ns und der Stabilität im Zündzeitpunkt von 0,63 ns. Außerdem ist die Pulsenergie regulierbar und das Gerät bedienfreundlicher als der Exzimer-Laser. So entfällt z. B. das relativ häufige Befüllen mit gefährlichen Gasen. Mit der gegenwärtigen Farbstoff-Pumplaserkombination lassen sich Wellenlängen von 355–920 nm erzeugen. Bei den Testexperimenten wurde DCM als Farbstoff verwendet (0,71 g/l in Dimethylsulfoxid), das seine intensivste Emission bei 658 nm hat.

Die Strahlung des Farbstofflasers wird über eine spezielle Optik in eine 6,5 m lange *Multimode-Faser* (MMF1) mit einem Kerndurchmesser von 580 μm eingekoppelt. Die Faser leitet die Laserstrahlung zur Probenumgebung, wo eine eigens konstruierte Auskoppeloptik ($f = 20$ mm) den Ausgang der Faser im Verhältnis 1:1 abbildet. Die Optik ist entlang der drei Raumrichtungen über Linearschlitten justierbar (auf ≈ 5 μm genau). Der Fokus wird so eingestellt, daß er hinter dem Probenkristall liegt (s. Abb. 4.4, rechts), damit die Intensitätsverteilung an der Kristalloberfläche transversal homogener wird. Die Transmission der Faser im Wellenlängenbereich von 400–700 nm liegt bei ≈ 98 %, unterhalb von 400 nm nimmt die Transmission stark ab, weswegen für mögliche Anregungen im UV-Bereich eine Spiegelstrecke aufgebaut wurde, bei der nur auf den letzten zwei Metern eine Faser (MMF2, Transmission ≈ 85 % bei 308 nm) die Strahlung zur Auskoppeloptik leitet. Die Aktivierung von *caged* ATP bedarf z. B. eines Laserpulses im UV (Rapp et al. 1986).

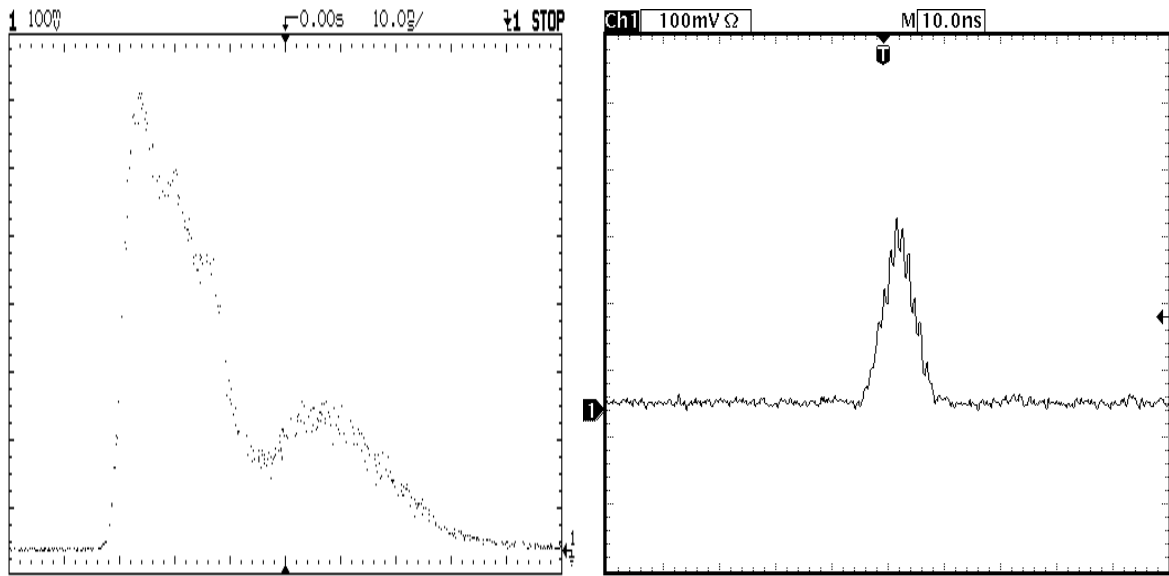


Abbildung 4.1: *Pulsform der Laserpulse.* Links: *Exzimer-Laser, Halbwertsbreite des Hauptpulses 15 ns.* Rechts: *Nd-YAG-Laser, Halbwertsbreite 7 ns, die Überspitzen entsprechen den Longitudinalmoden des Resonators.* Beide Pulse wurden mit der APD ($t_{\text{rise}} = 350 \text{ ps}$) gemessen.

Lasertyp	Hersteller	Energie [$\frac{\text{mJ}}{\text{Puls}}$]	λ [nm]	Pulsdauer [ns]			
Farbstoff	FL2002	Lambda-Phy.	10 – 30 % der Pumpenergie	355–920 wie Pumpquelle			
Nd-YAG	INDI50	Spectra-Phy.	110 275 570	355 532 1064 7			
Exzimer	EMG101	Lambda-Phy.	120	308 15			
Fasertyp	Hersteller	\varnothing [μm]	NA	T [%]	P_{max} [MW]	Länge [m]	
MMF1	FG600UAT	Thorlabs	580	0,16	98	9,0	6,5
MMF2	FT1.5UMT	Thorlabs	1500	0,39	85	56,0	2

Tabelle 4.1: *Kenndaten der verfügbaren Laser und Lichtwellenleiter.* \varnothing bezeichnet den Kerndurchmesser, NA die numerische Apertur, T die Transmission auf gesamter Länge bei 658 bzw. 355 nm, P_{max} die maximal tolerierbare gepulste Leistung für Pulse der Dauer 10 ns bei 1064 nm und $5 \frac{\text{GW}}{\text{cm}^2}$ Energiedichte.

4.2 Anregungsbedingungen

Im folgenden wird zuerst eine geeignete Wellenlänge zum Erreichen einer möglichst homogenen longitudinalen Verteilung der Energiedichte in einem MbCO-Kristall ermittelt, und danach die bei dieser Wellenlänge notwendige Energiedichte für einen möglichst hohen Photolysegrad abgeschätzt. Es folgt eine Beschreibung der Messung des transversalen Energiedichteprofiles und eine experimentelle Überprüfung der Zerstörschwelle des Kristalls. Es schließt sich eine Abschätzung der durch die Laserstrahlung induzierten Temperaturerhöhung an.

4.2.1 Abschätzung einer geeigneten Anregungswellenlänge

Die Abschätzung der Anregungswellenlänge erfolgt unter dem Aspekt, daß der Kristall bei der betreffenden Wellenlänge optisch dünn sein soll, um longitudinal eine möglichst homogene Energiedichteverteilung innerhalb des Kristalls zu gewährleisten. Die optische Dichte $OD = \mu(\lambda)x$ ist bei gegebener Kristalldicke x durch den wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten $\mu(\lambda)$ bzw. die Absorptionslänge $\mu(\lambda)^{-1}$ bestimmt, die in Abb. 4.2 für MbO₂* aufgetragen ist. Die Absorptionslänge wurde ausgehend von einem Absorptionsspektrum für eine 1mM MbO₂-Lösung ermittelt, indem dieses auf die Konzentration des Myoglobins im Kristall von 43,9 mM hochskaliert wurde (Wulff et al. 1997). Die bei dieser hohen Konzentration auftretenden Streueffekte und die kristalline Anisotropie sind daher nicht berücksichtigt. Der Effekt der Anisotropie kann annähernd vernachlässigt werden, denn Sage & Jee (1997) stellten z. B. keine nennenswerte richtungsabhängige Kristallabsorption im Infraroten fest, und anhand eines polarisationsabhängigen Spektrums für einen orthorhombischen Kristall (Chen et al. 1994) ist zu erkennen, daß die Polarisationsabhängigkeit der Absorption oberhalb von 650 nm nahezu verschwindet. Die Abb. 4.3 (rechts) verdeutlicht, daß MbO₂ vom UV bis in den optischen Bereich hinein stark absorbiert, erst ab ≈ 600 nm wird die Absorption gering und die Absorptionslänge nimmt Werte an, die bei 100–1000 μm liegen (s. Abb. 4.2). Zum Erreichen hoher Bragg-Auflösung sind aufgrund der dazu notwendigen Streuintensität Kristalldicken von $\geq 80 \mu\text{m}$ erwünscht, so daß für eine homogene Anregung oberhalb von 600 nm der Wellenlängenbereich für eine sinnvolle Anregungswellenlänge liegt.

Verlangt man, daß innerhalb der Strecke x die Variation im longitudinalen Energiedichteprofil 10 % sein soll, so läßt sich der erforderliche Absorptionskoeffizient mit Hilfe des Lambert–Beerschen Gesetzes für die Energiedichte ρ_E unter Vernachlässigung von Streueffekten berechnen, und auf ihm basierend eine geeignete Wellenlänge wählen. Für die Dicke x des zu photolysierenden Kristallvolumens werden 80 μm angesetzt, was der verwendeten Schlitzhöhe des Kollimators K3 entspricht, und es folgt,

$$\frac{\rho_E(x)}{\rho_{E_0}} = e^{-\mu x} \implies \mu = \frac{\ln 0,9}{-80 \mu\text{m}} = 1,3 \times 10^{-3} \mu\text{m}^{-1}, \quad (4.1)$$

*Die Absorption von MbO₂ und MbCO unterscheidet sich nur geringfügig, oberhalb von 600 nm so gut wie überhaupt nicht, so daß ohne Bedenken die Absorption von MbO₂ betrachtet werden kann (Antonini & Brunori 1971).

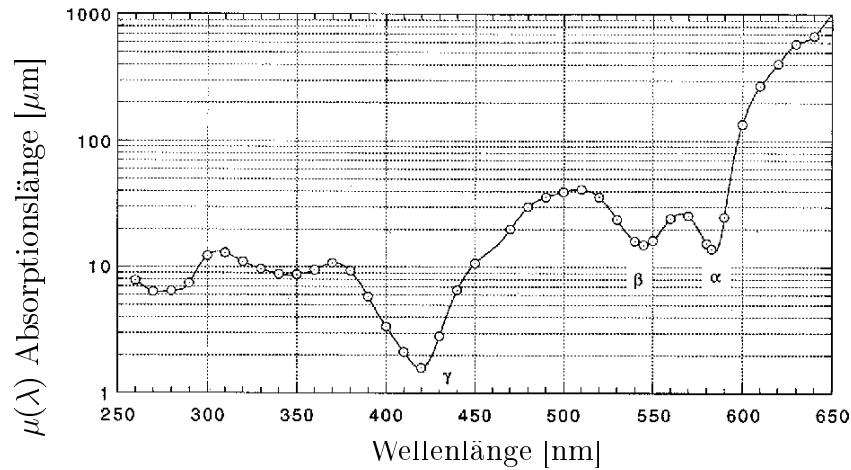


Abbildung 4.2: Absorptionslänge μ^{-1} für monoklines MbO_2 (Wulff et al. 1997).

bzw. die Absorptionslänge μ^{-1} beträgt $760 \mu\text{m}$. In der Darstellung der Absorptionslänge in Abb. 4.2 ist zu erkennen, daß bei einer Wellenlänge von $\approx 640 \text{ nm}$ die Absorptionslänge $760 \mu\text{m}$ beträgt. Da die intensivste Wellenlänge des verwendeten Laserfarbstoffs bei 658 nm liegt, wurde diese Wellenlänge benutzt, bei der die Absorptionslänge $\approx 1000 \mu\text{m}$ beträgt. Damit fällt die Absorption innerhalb der $80 \mu\text{m}$ von 10% auf $6,7 \%$, was zwar die Homogenität verbessert, aber für einen vergleichbaren Photolysegrad auch eine höhere Energiedichte erfordert.

4.2.2 Abschätzung der Energiedichte

Antonini & Brunori (1971) berichteten, daß die Quanteneffizienz für die Abspaltung des CO vom Häm-Eisen vom UV bis in den optischen Bereich hinein 100% ist. Die hierfür notwendige Energie beträgt $18,4 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ (Causgrove & Dyer 1996), was pro Bindung einer Energie von $\epsilon_B = 1,3 \times 10^{-19} \text{ J}$ entspricht, die bereits ein Photon der Wellenlänge 1550 nm aufbringt.

Die vom Kristall zu absorbierende Laserenergie E_{abs} zur vollständigen Photolyse eines Kristallvolumens $V = A x$ berechnet sich dann aus der Anzahl der Eisenatome in V , der Photonenenergie E_γ und dem Absorptionsgesetz in folgender Weise,

$$E_{abs} = E_0 (1 - e^{-\mu x}) = \rho_{Fe} V E_\gamma = \rho_{Fe} A x \frac{hc_0}{\lambda}, \quad (4.2)$$

wobei E_0 die auf A einfallende Energie und $\rho_{Fe} = 2,97 \times 10^{16} \text{ mm}^{-3}$ die Dichte der Eisenatome im Myoglobinkristall ist (Wulff et al. 1997). Mit $\lambda = 658 \text{ nm}$, $x = 80 \mu\text{m}$ und einer Kristalloberfläche von $400 \times 500 \mu\text{m}^2$ berechnet sich die zu absorbierende Energie zu $E_{abs} = 0,14 \text{ mJ}$. Durch Umformen obiger Gleichung erhält man einen praktischen Ausdruck zur Berechnung der erforderlichen Energiedichte der Laserstrahlung an der Oberfläche,

$$\rho_{E_0} = \frac{E_0}{A} = \frac{hc_0}{\lambda} \cdot \frac{\rho_{Fe} \cdot x}{1 - e^{-\mu x}} \quad (4.3)$$

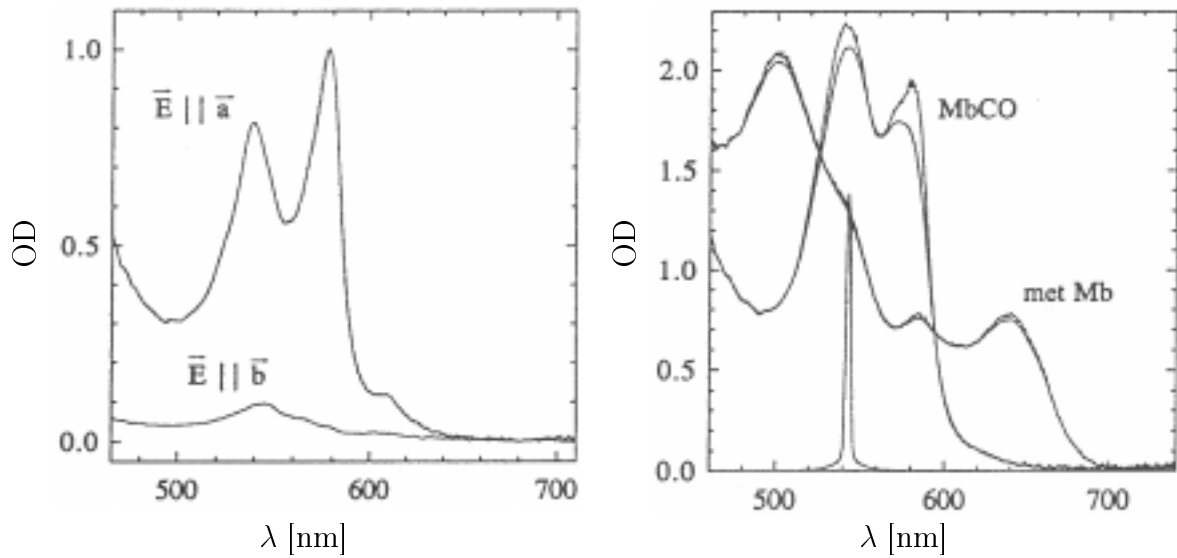


Abbildung 4.3: Links: *Polarisationsabhängige Absorptionsspektren eines orthorhombischen MbCO-Kristalls mit \vec{E} -Feldvektor parallel zur Kristallachse \vec{a} bzw. \vec{b} . Rechts: Absorptionsspektren von MbCO und metMb. Die obere Kurve stellt jeweils die Meßkurve dar, die untere ist auf die spektrale Antwortfunktion des Spektrophotometers (ebenfalls dargestellt) korrigiert (Chen et al. 1994).*

$$= \frac{5,91}{1 - e^{-\mu x}} \cdot \frac{x [\mu\text{m}]}{\lambda [\text{nm}]} \cdot \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}, \quad (4.4)$$

und mit den gegebenen Werten berechnet sich die Energiedichte für einen MbCO-Kristall zu $\rho_{E_0} = 9,3 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$.

4.2.3 Messung des Energiedichteprofiles

Neben einem möglichst kleinen longitudinalen Gradienten in der Energiedichte muß auch der transversale Gradient möglichst gering sein. Er ist durch das Strahlprofil der Faser, die Auskoppeloptik und die Lage der Fokalebene relativ zur Probe bestimmt. Die Energiedichteverteilung am Ort der Probe wird auf folgende Weise ausgemessen: Zunächst muß der Laserbrennfleck in der horizontalen Ebene auf den Probenort eingestellt werden. Ein Teleskop bildet hierzu den Probenort auf eine CCD-Kamera ab, die an einen Monitor angeschlossen ist. Die Fokalebene der Kamera ist so eingestellt, daß sie im Fokalebereich der Synchrotronstrahlung liegt. Durch Beschuß eines in der Fokalebene der Kamera befindlichen Thermolumineszenzpapiers mit Laserpulsen kann der Ort des Brennflecks bestimmt und mittels der Justiermöglichkeiten der Auskoppeloptik so korrigiert werden, daß er mit dem Probenort übereinstimmt (Fadenkreuz, s. Abb. 4.4 links). Dabei ist darauf zu achten, daß die Fokalebene der Auskoppeloptik hinter der Probe liegt, um ein homogeneres Strahlprofil zu erreichen (s. Abb. 4.4, rechts).

Zum Ausmessen des Strahlprofils werden 11 Lochblenden mit Durchmessern von

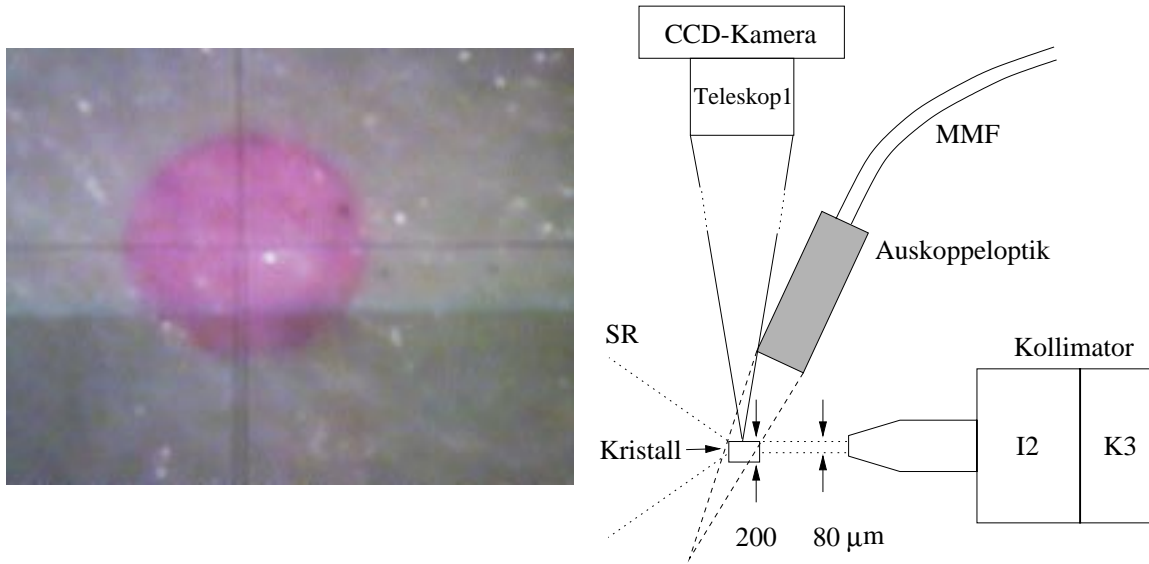


Abbildung 4.4: Links: *Photographie des Monitorbildes mit dem Brennfleck des Lasers auf dem Thermolumineszenzpapier.* Rechts: *Schematische Darstellung der Strahlengänge von CCD-Kamera, Laser- und Synchrotronstrahlung.*

0,05–1,2 mm benutzt, die nacheinander in einen Blendenhalter gelegt werden, der in einem Goniometerkopf sitzt. Die Lochblenden werden über die Translationsmöglichkeiten des Goniometerkopfes unter Beobachtung des Bildes auf dem Monitor so justiert, daß sie im Zentrum des Laserstrahls liegen (Fadenkreuz). Hinter der jeweiligen Blende mißt ein pyroelektrisches Joulemeter (ED100, Gentec) dann die Energie der Laserstrahlung. Die gemessene Gesamtenergie des Laserpulses betrug $4,6 \pm 0,3$ mJ. Zur Abschätzung des Energiedichteprofiles wird die mittlere Energiedichte in einem Kreisring zwischen den Radien r_i und r_{i-1} zweier benachbarter Blenden berechnet, indem die Differenz der zu der jeweiligen Apertur korrespondierenden Energie gebildet und durch die Differenz ihrer Flächen geteilt wird,

$$\overline{\rho_{E_{0i}}} = \frac{(E_i - E_{i-1})}{\pi(r_i^2 - r_{i-1}^2)}. \quad (4.5)$$

Das Ergebnis dieser Berechnungen zeigt Abb. 4.5, in der $\overline{\rho_{E_{0i}}}$ über r_i aufgetragen ist. Der Fehler auf den Blendendurchmesser beträgt $\pm 7 \mu\text{m}$, der Fehler in der gemessenen Energie etwa 7 %. Die relativ großen Fehler für $\overline{\rho_{E_{0i}}}$ resultieren aus der Quadratur der r_i und der Differenzbildung zur Bestimmung der Ringfläche. Die Energiedichte reicht nur für $r < 75 \mu\text{m}$ an den abgeschätzten Wert von $9,3 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ heran, bis zu einem Radius von $250 \mu\text{m}$, dessen korrespondierende Fläche in etwa die typische Oberfläche der verwendeten Kristalle einschließt, nimmt $\overline{\rho_{E_{0i}}}$ um 30 % auf $\approx 6,5 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ in der entsprechenden Ringfläche ab, so daß hier mit einem geringeren Photolysegrad zu rechnen ist. Eine Verbesserung der Homogenität des Strahlprofils läßt sich durch eine Faser größeren Kerndurchmessers realisieren, wobei dann jedoch auch mehr Energie in die Faser eingekoppelt werden muß. Diese Verbesserung ist bereits in Angriff genommen

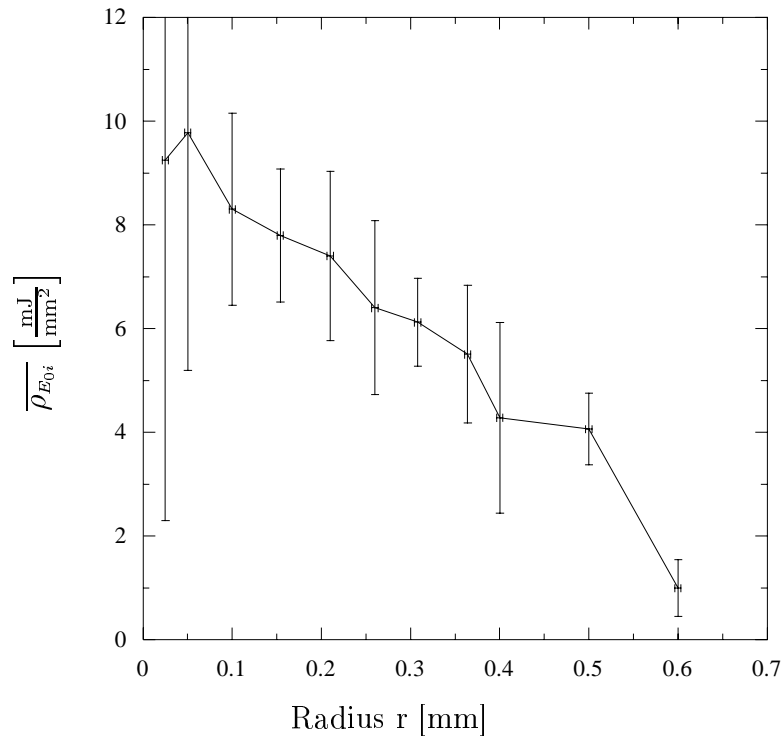


Abbildung 4.5: *Energiedichteprofil der Laserstrahlung. Aufgetragen ist die mittlere Energiedichte $\overline{\rho_{E_0}}$ innerhalb eines Ringes der Fläche $\pi(r_i^2 - r_{i-1}^2)$ gegen den äußeren Radius der Ringfläche r_i .*

worden.

4.2.4 Zerstörschwelle des Kristalls

Die Absorption der Laserenergie verursacht im Kristall eine Erwärmung und kann ebenso Schockwellen hervorrufen, die das Kristallgitter zerstören können. Deshalb wurde getestet, welchen Laserenergiedichten Myoglobin-Kristalle standhalten.

Zunächst wurde ein met-Myoglobinkristall bei dem oben ausgemessenen Strahlprofil mit Laserpulsen beschossen, da das zeitaufgelöste Testexperiment mit dieser Ligandierungsform des Myoglobins durchgeführt werden sollte. Schon nach dem zweiten Schuß platzten kleine Teile des Kristalls ab, was seine Ursache höchstwahrscheinlich in der stärkeren Absorption von met-Mb gegenüber MbCO bei 658 nm findet. So läßt sich anhand der von Chen et al. (1994) aufgenommenen Spektren von MbCO und met-Mb in Lösung erkennen (s. Abb. 4.3, rechts), daß met-Mb bei 658 nm eine grob 16-fach höhere Absorption aufweist als MbCO, folglich treten die oben erwähnten Nebeneffekte der Absorption stärker in Erscheinung und zerstören das Kristallgitter. Deswegen wurde die Laserenergie zunächst stark reduziert und dann sukzessive erhöht, bis bei einer Energiedichte von $3,5 \frac{mJ}{mm^2}$ der Kristall nach den ersten 3 Laserschüssen nicht mehr zerstört wurde. Dann wurde zur Sicherheit diese Energiedichte um rund 30 % reduziert ($\rho_{E_0} = 2,5 \frac{mJ}{mm^2}$), so daß nach ca. 10000

Laserpulsen optisch keinerlei Schäden mehr beobachtbar waren. Dies wurde ebenso anhand eines Beugungsbildes verifiziert.

Zur Abschätzung der notwendigen Energiedichte für met-Mb wird dessen Absorptionslänge aus der von MbCO ($\mu^{-1}_{MbCO}(658 \text{ nm}) \approx 1000 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$) und der etwa 16-fach stärkeren Absorption von met-Mb zu $\mu^{-1}_{met-Mb}(658 \text{ nm}) \approx 62,5 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ abgeschätzt. Daraus berechnet sich mit Gl. 4.3 eine notwendige Energiedichte von $1 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ zur vollständigen Photolyse. Der tatsächlich verwendete Wert von $2,5 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ stellte somit sicher, daß unter Berücksichtigung der transversalen Inhomogenität im Mittel 1,8–2,5 Photonen je Häm-Gruppe zur Absorption zu Verfügung standen.

Als Vorbereitung auf zeitaufgelöste Beugungsexperimente an MbCO-Kristallen, wurde ebenfalls deren Widerstandsfähigkeit getestet. Hierzu wurde ein Kristall mit ca. 50000 Laserpulsen beschossen, wobei die mittlere Laserenergiedichte innerhalb einer Kreisfläche mit $400 \text{ } \mu\text{m}$ Durchmesser etwa $10 \pm 0,8 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ betrug, also in etwa dem abgeschätzten Wert von $9,3 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ entsprach. Anhand von Beugungsbildern, die vor und nach dem Laserbeschuß aufgenommen worden waren, konnte verifiziert werden, daß der MbCO-Kristall den Laserbeschuß bei dieser Energiedichte unbeschadet übersteht. Hieraus lassen sich jedoch noch keine konkreten Rückschlüsse auf den tatsächlichen Photolysegrad ziehen. Dazu wären parallel zur Photolyse zeitaufgelöste spektroskopische Messungen mit einem Einkristallspektrometer nötig, doch ein solches ist für das Experiment noch nicht verfügbar. Damit ließe sich der Photolysegrad direkt verfolgen und der Anregungsgrad optimieren.

4.2.5 Abschätzung der Temperaturerhöhung

Bei einer konventionellen Montage eines Proteinkristalls innerhalb eines Kapillarröhrchens würde der Kristall aufgrund der mehrfachen Anregung bei der stroboskopischen Messung die aus den Laserpulsen absorbierte Energie akkumulieren, was in einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung resultieren und den Kristall schnell zerstören würde, falls keine hinreichende Kühlung zur Aufrechterhaltung eines thermischen Gleichgewichtes vorhanden ist. Im folgenden wird die mittlere Temperaturänderung abgeschätzt, die ein Laserpuls in einem Myoglobinkristall verursacht, um die Notwendigkeit einer Kristallkühlung zu verdeutlichen. Dazu wird von einer adiabatischen Temperaturänderung ausgegangen, da die Luftkonvektion innerhalb eines Kapillarröhrchens gering ist. Für diese Änderung gilt,

$$\Delta T = \frac{Q}{c_{H_2O} V \rho_{H_2O}} . \quad (4.6)$$

Für die in den Kristall dissipierende Wärmemenge Q wird die durch die Häm-Gruppen des Kristalls absorbierte Laserenergie E_{abs} angenommen, für Dichte und Wärmekapazität des Kristalls die des Wassers ($\rho_{H_2O} = 1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$, $c_{H_2O} = 4,19 \frac{\text{J}}{\text{g K}}$), was aufgrund der Tatsache, daß Proteinkristalle zu 50 % aus Wasser bestehen, zu vertreten ist. Mit Gl. 4.2 und Gl. 4.3 läßt sich die Temperaturerhöhung in Abhängigkeit von der

einfallenden Energiedichte wie folgt ausdrücken,

$$\Delta T = \frac{E_{abs}}{c_{H_2O} \rho_{H_2O} V} \quad (4.7)$$

$$= \frac{E_0 (1 - e^{-\mu x})}{c_{H_2O} \rho_{H_2O} V} \quad (4.8)$$

$$= \frac{\rho_{E_0} (1 - e^{-\mu x})}{c_{H_2O} \rho_{H_2O} x} . \quad (4.9)$$

Für x muß hier die gesamte Kristalldicke angesetzt werden, die für den met-Mb-Kristall rund $200 \mu\text{m}$ beträgt. Mit $\rho_{E_0}^{met-Mb} = 2,5 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ bzw. $\rho_{E_0}^{MbCO} = 10,0 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ und $\mu_{met-Mb} = 0,016 \mu\text{m}^{-1}$ bzw. $\mu_{MbCO} = 0,001 \mu\text{m}^{-1}$ errechnen sich Temperaturerhöhungen von 2,9 bzw. 2,2 K pro Laserschuß. Bei einer gewöhnliche Montage des Kristalls in einem Kapillarröhrchen könnte der Kristall bei einer Pulsfrequenz von $\approx 2 \text{ Hz}$ die entsprechende Wärme mittels Lufkonvektion nicht schnell genug abführen, so daß er schnell überhitzen würde. Deswegen ist es dringend erforderlich den Kristall, wie im folgenden Kapitel beschrieben, zu kühlen.

Kapitel 5

Nanosekunden-zeitaufgelöstes Laue-Experiment an met-Myoglobin

In den vorhergehenden Kapiteln ist gezeigt worden, daß Chopper- und Lasersystem die experimentellen Voraussetzungen für ns-zeitaufgelöste Laue-Experimente erfüllen. Es gilt nun, ein solches Experiment mit einem Proteinkristall durchzuführen, um zu untersuchen, ob ein auswertbarer Datensatz mit dem Spiegelchopper an DORIS gesammelt und welche Bragg-Auflösung erzielt werden kann. Hierzu beschreibt dieses Kapitel die Messung an met-Myoglobin, das photochemisch inaktiv ist, weswegen keine Konformationsänderungen erwartet werden, was jedoch zu verifizieren ist, da der thermische Einfluß der Laserabsorption auf die Proteinstruktur noch nicht untersucht wurde. Es ist daher festzustellen, ob der Laserbeschuß allein schon die Struktur verändert, was die Identifizierung von photochemisch induzierten Konformationsänderungen in MbCO erschweren würde.

5.1 Experimentelle Durchführung

Zeitaufgelöste Beugungsexperimente sind i. a. vorbereitungsintensiv, da zuerst die gesamte Strahlführung auf Weißstrahlbedingungen umgestellt und dann der Chopper justiert werden muß. Sie verlangen auch nach diesen Vorbereitungen noch einen hohen Zeitaufwand vor der Messung, da z. B. die Präparation des MbCO aus met-Mb kurz vor der Messung erfolgen sollte. Hierbei wird in einem vierstündigen Prozeß das Fe^{3+} des met-Mb mit Dithionat zu Fe^{2+} reduziert und dann CO in den Kristall eindiffundiert (Antonini & Brunori 1971). Ein geeigneter Kristall muß dann montiert und auf Synchrotron- und Laserstrahl ausgerichtet werden, bevor die eigentliche Messung beginnen kann. Im folgenden sind stichpunktartig die Schritte zur Justierung des Choppers aufgelistet, es schließt sich die Beschreibung der Probenmontage und -justierung an, bevor die Datennahme erläutert wird.

5.1.1 Justierung des Choppers

Der Chopper muß möglichst so justiert werden, daß der Spiegel den intensivsten Teil des Synchrotronstrahls ausschneidet und durch die Blende K3 reflektiert. Hierzu

sind folgende Einstellungen notwendig:

1. Einstellen der Kollimatorschlitze (K2: $400 \times 1700 \mu\text{m}$, K3: $80 \times 500 \mu\text{m}$).
2. Positionierung der Blende des Scheibenchoppers auf maximale Transmission.
3. Horizontalstellung des Spiegels über Rotation des Goniometers.
4. Absenken des Spiegels bis zur Strahlmitte (halbe Intensität).
5. Inklination des Spiegels um 1,5 mrad.
6. Inklination und Absenken des Kollimators um 3 mrad bzw. 4 mm durch Verfahren des Experimentiertisches mitsamt der Aufbauten wie Kollimator, Image-Plate, Diffraktometer und Justieroptiken.
7. Aufsuchen des Reflexes durch Feinjustierung des Spiegels mittels Rotation des Goniometers.
8. Optimierung von Toroidspiegel und Kollimator auf maximal reflektierte Intensität mittels eines automatischen Justierprogrammes.
9. Verschließen der Blende K1 zur Reduktion des Strahlungsuntergrundes.
10. Hochfahren der Scheibenblende, bis diese mit der Unterkante des Spiegels abschließt.

Nachdem die optische Justierung des Choppers beendet ist, erfolgt die Einstellung der Synchronisation des Choppersystems, die in Kapitel 3.6 beschrieben worden ist.

5.1.2 Probenmontage

Kristallkühlung

In Kapitel 4.2 ist gezeigt worden, daß die Temperaturerhöhung pro Laserpuls etwa $2,9^\circ \text{C}$ für met-Mb beträgt, so daß der Kristall sich während des Laserbeschusses schnell aufheizen würde. Zur Aufrechterhaltung konstanter thermischer Bedingungen muß er daher gekühlt werden, da er ansonsten schnell austrocknet und zerstört wird. Der präparierte Kristall wird daher in ein konisches Kapillarröhrchen gegeben, durch welches während des Experiments eine Ammoniumsulfatlösung (4,8 M in 0,1 M Phosphatpuffer, pH=6) fließt (Fließgeschwindigkeit = 14,5 ml/hr). Der Fluß treibt den Kristall in der Kapillare so weit voran, bis er aufgrund der Konizität des Röhrchens stecken bleibt. Für Experimente mit MbCO-Kristallen muß die Lösung mit Kohlenmonoxid versetzt werden, da ansonsten die photolysierten CO-Moleküle allmählich aus dem Proteinkristall in die Lösung diffundieren, so daß mit der Zeit die CO-Konzentration und somit die Besetzung der Bindungsstellen im Kristall stark abnimmt.

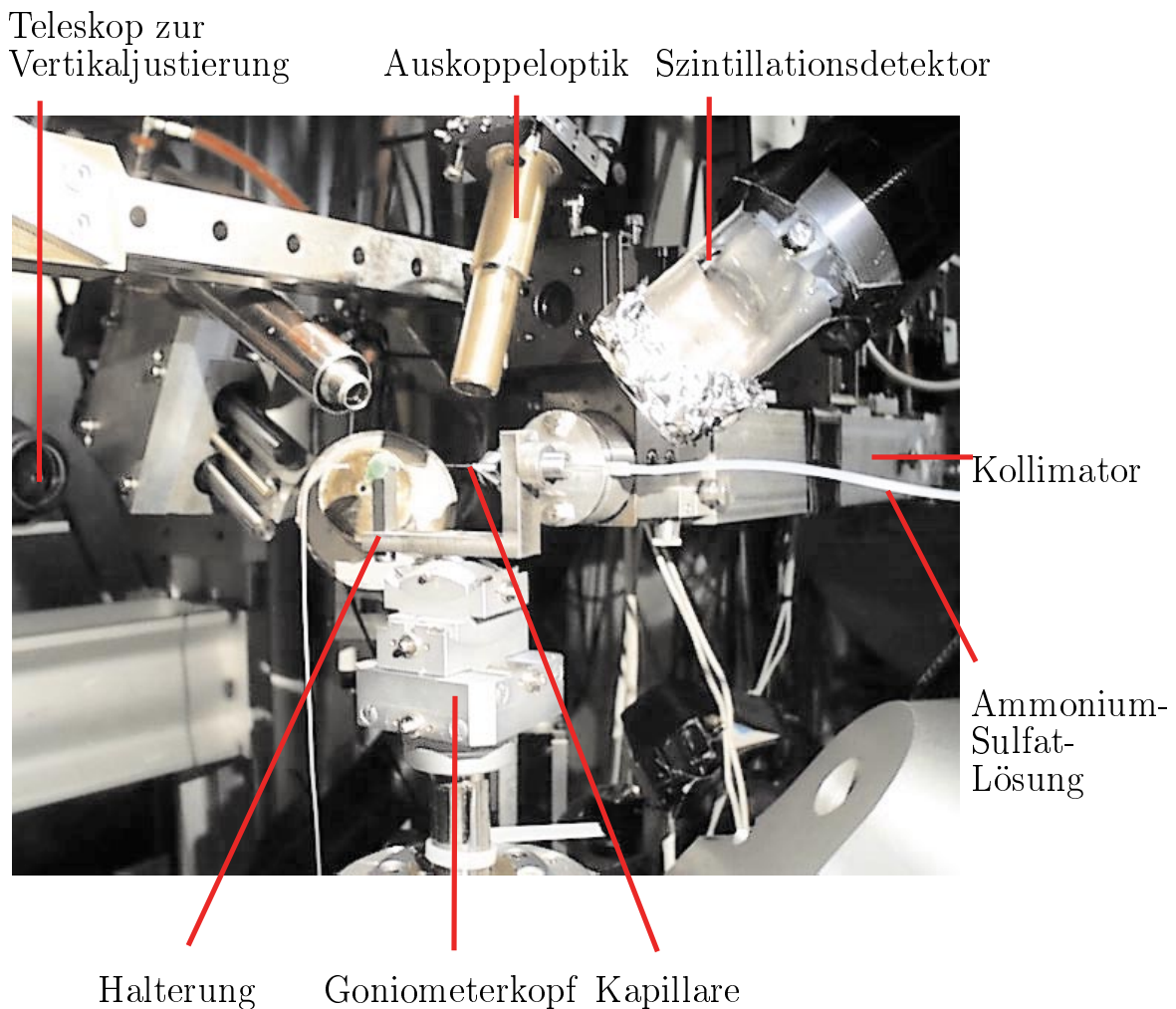


Abbildung 5.1: *Experimenteller Aufbau am Probenort. In der Mitte sind der Goniometerkopf, die Halterung, das Kapillarröhrchen und die Schläuche zu erkennen, in denen die Ammoniumsulfatlösung fließt. Von oben zielt das Auskoppelobjektiv der Faser auf die Kapillare, rechts davon befindet sich der Plastiksintillationsdetektor, im Hintergrund der Kollimator. Am linken mittleren Bildrand ist schwach das Teleskop zur Einstellung der vertikalen Kristallposition zu erkennen.*

Montage des Kapillarröhrchens

Das Kapillarröhrchen ist auf einem Bügel montiert, der für weitere Justierungen auf einem Goniometerkopf sitzt (s. Abb. 5.1). Außerdem kann die Kapillare vor der endgültigen Fixierung in der Halterung zur Orientierung des Kristalls entlang ihrer Längsachse rotiert werden. Die Orientierung erfolgt so, daß die größte Fläche des Kristalls horizontal liegt und nach oben zeigt, so daß die Laserstrahlung fast senkrecht eintrifft. Eine stabile Halterung sowie eine gute Befestigung des Röhrchens sind äußerst wichtig, um z. B. kleine Vibrationen zu verhindern, denn durch die Verwendung polychromatischer Strahlung sind die Beugungsreflexe empfindlich auf Bewegungen der Probe.

Justierung zum Synchrotronstrahl

Nach der optischen Ausrichtung des Kristalls erfolgt die Montage des Goniometerkopfes mit der Halterung auf dem Diffraktometer (s. Abb. 5.1). Auf dem Diffraktometerkopf muß der Kristall so ausgerichtet werden, daß das mit Synchrotronstrahlung belichtete Volumen mit dem photolysierten zusammenfällt (s. Abb. 4.4 rechts). In der Horizontalebene wird er hierzu über die Verstellmöglichkeiten des Goniometerkopfes auf das Fadenkreuz des Monitors eingestellt, welches das Zentrum von Laserbrennfleck und Synchrotronstrahlung markiert. Die Höhe des Kristalls wird mittels der Vertikalverstellung des Goniometerkopfes unter Beobachtung mit Hilfe eines in der Horizontalebene liegenden Teleskops (s. Abb. 5.1) so einjustiert, daß die Oberkante des Kristalls mit der des Synchrotronstrahls abschließt. Die Strahlposition wurde vorher mittels eines Thermolumineszenzpapiers festgestellt und über das Fadenkreuz des Teleskops markiert.

Da die Kollimatorschlitze aufgrund des Choppers vertikal klein sein müssen, horizontal aber breit sein dürfen, ist eine vertikale Drehachse des Diffraktometers vorteilhaft. Der Kristall darf dann nämlich relativ groß sein und die Breite des Synchrotronstrahls ausnutzen, ohne daß bei den verschiedenen Kristallorientierungen unterschiedliche Kristallvolumina bestrahlt werden, wie das bei einer horizontalen Drehachse der Fall wäre, die normalerweise für monochromatische Messungen Vorteile bietet. Auch bleiben der Einfallswinkel des Laserlichts auf die Kristalloberfläche und somit das photolysierte Volumen bei jeder Kristallorientierung konstant.

5.1.3 Datennahme

Die zeitaufgelösten Beugungsmessungen wurden am Proteinkristallographiestrahl BW6/DORIS in einem Wellenlängenband von 0,55–2,0 Å durchgeführt, wobei der Speicherring im Zweipulsbetrieb lief. Bei Zimmertemperatur wurden Beugungsaufnahmen bei sechs unterschiedlichen Kristallorientierungen innerhalb eines Winkelbereichs von 110° gemacht, der aufgrund der Halterungskonstruktion auf diesen Wert eingeschränkt war. Bei jeder Orientierung wurde zunächst ein Beugungsbild des met-Myoglobins* bei ruhender Scheibe und ohne Laserbeschuß, aber mit rotierendem Spiegel, aufgenommen. Hierbei blieb der Strahlverschluß für 15,0 s geöffnet, so daß ca. 3150 einzelne Pulse auf dem Image-Plate integriert wurden. Danach erfolgte die stroboskopische Datennahme bei einer Pulsrate von 1,7 Hz, wobei mit 3500 einzelnen Synchrotronpulsen pro Laue-Bild belichtet wurde (s. Abb. 5.2). Das Zeitintervall Δt_Z wurde mittels APD und Szintillationszähler während des gesamten Experiments verfolgt, und eine geringe Änderung in Δt_Z aufgrund der Instabilität im Laserzündzeitpunkt (s. Kapitel 3.6.2) festgestellt. Diese Änderung konnte jedoch durch Verschieben des Triggerzeitpunkts mittels der manuell bedienbaren Verzögerungsstufe (Kapitel 3.6) kompensiert werden. Die Standardabweichung auf $\Delta t_Z = 9,9$ ns wurde zu $\sigma(\Delta t_Z) = 2,4$ ns ermittelt (s. Abb. 3.20 links), was bestätigt, daß der Effekt der Asymmetrie des Beschleunigerorbits (s. Kapitel 3.6.2) die Zeitauflösung gegenüber der manuellen Kompensation der Instabilität im Zündzeitpunkt dominiert.

*monoklines *sperm whale myoglobin*

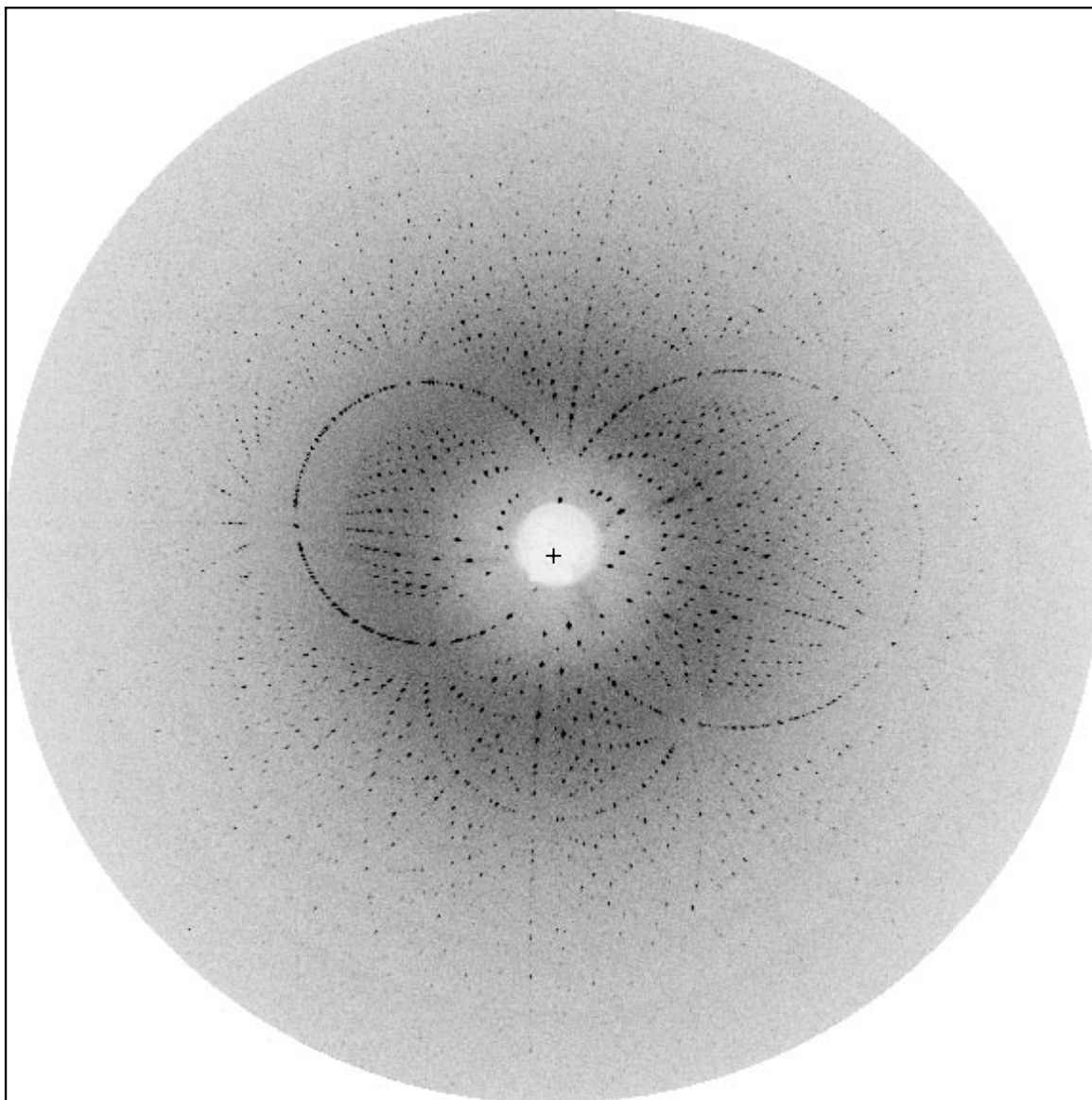


Abbildung 5.2: *Laue-Bild des angeregten met-Mb*-Kristalls, das mit 3500 extrahierten Synchrotrimpulsen aufgenommen wurde. Das Bild enthält 5442 Reflexe.*

5.2 Prozessierung der Laue-Daten

Die Bestimmung der Strukturfaktoren aus den gemessenen Reflexen erfolgt über die drei Programme **LAUEGEN** (Campbell 1995, Campbell et al. 1998), **SCALE** und **MUL_SORT** (Bourenkov et al. 1996). **LAUEGEN** extrahiert die gemessenen Reflexintensitäten aus den Laue-Bildern (s. Abb. 5.2), **SCALE** erstellt eine Wellenlängennormalisierungskurve (WNK) und **MULSORT** entfaltet die Energiemultipletts und erstellt die skalierten Reflexintensitäten. **SHELLXL97** und **SHELLXLPRO** (Sheldrick 1997) verfeinern und prozessieren die Daten zur Darstellung der Elektronendichteverteilung mittels des Programms **O** (Jones 1991). Im folgenden sind die einzelnen Schritte der

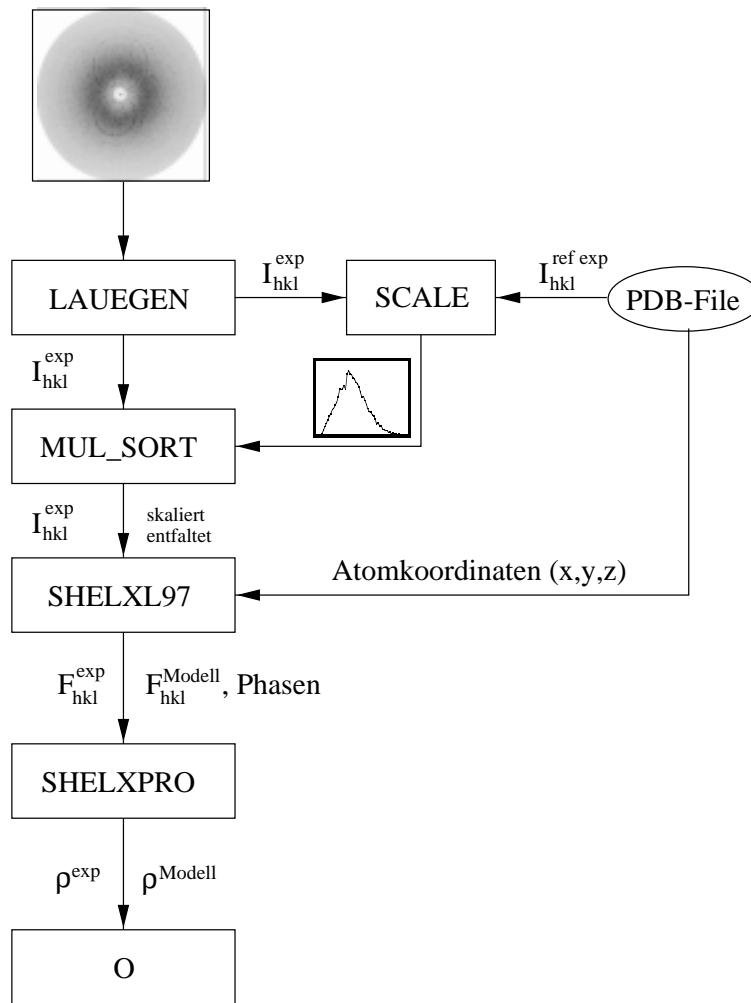


Abbildung 5.3: *Flußdiagramm der Prozessierung der Laue-Daten.*

Datenauswertung beschrieben (s. Abb. 5.3):

1. **LAUEGEN**, Extraktion der gemessenen Reflexintensitäten aus den Laue-Bildern.
 - (a) **Kristallorientierung.** Die Bestimmung der Kristallorientierung erfolgt im ersten Schritt über eine manuelle Auswahl einiger Reflexe des Laue-Bildes auf einer graphischen Bedienoberfläche. Das Programm errechnet dann in der Auto-Indizierung die in Frage kommenden Orientierungen und die korrespondierenden hkl -Indizes der Reflexe. Der Anwender wählt dann anhand eines RMS-Wertes einen Vorschlag aus, der sich aus der Abweichung der selektierten Reflexpositionen zu den berechneten ergibt.
 - (b) **Parameteranpassung.** Bei der Parameteranpassung werden für eine ausgesuchte Anzahl von Reflexen Parameter wie Orientierungswinkel der Einheitszelle zum Strahl, Zellabmessungen, monokliner Winkel und detektor-spezifische Parameter (z. B. Abstand, Neigung, Rotation) variiert, um die

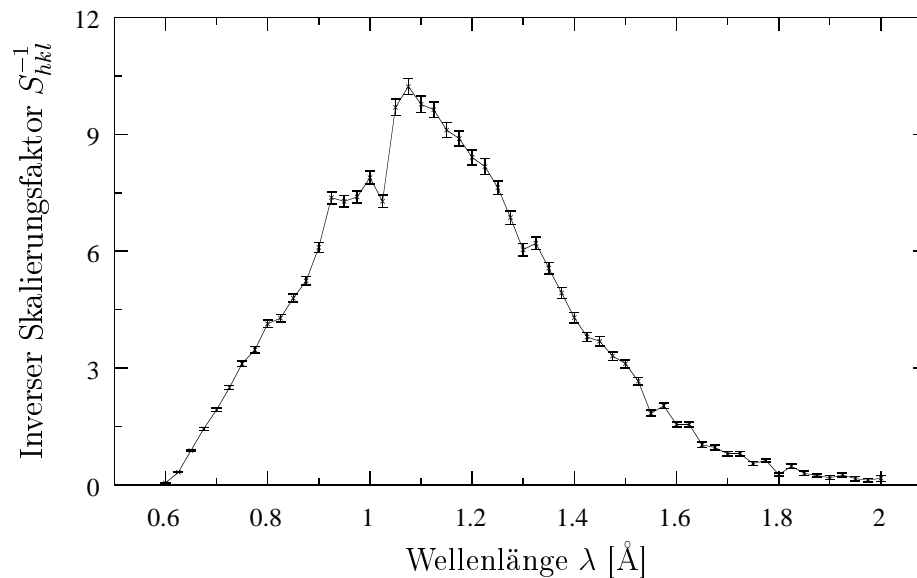


Abbildung 5.4: *Wellenlängennormalisierungskurve. Aufgetragen ist der inverse Skalierungsfaktor S_{hkl}^{-1} über die Wellenlänge λ in Wellenlängenbereichen zu $0,025 \text{ \AA}$.*

theoretischen Reflexpositionen den gemessenen noch besser anzupassen, da eine gute Anpassung die Voraussetzung für eine korrekte Reflexintegration ist.

- (c) **Reflexdimensionen.** Es wird die räumliche Ausdehnung der Beugungsreflexe erfasst.
- (d) **Soft-Parameter.** Bestimmung der Braggauflösung d_{min} und der kleinsten vorkommenden Wellenlänge λ_{min} in den Laue-Daten.
- (e) **Integration der Reflexintensitäten.** Integration der Reflexintensitäten unter Beachtung der Reflexdimensionen und der Schnitte auf d_{min} und λ_{min} .

2. SCALE, Erstellung der Wellenlängennormalisierungskurve.

- (a) Aufgrund der in Kapitel 2.2 genannten Effekte ist die einfallende Intensität der Synchrotronstrahlung wellenlängenabhängig, worauf die gemessenen Reflexintensitäten korrigiert werden müssen. Hierzu wird ein Skalierungsfaktor $S_{hkl}(\lambda)$ berechnet, der über die Referenzintensitäten I_{hkl}^{mono} der PDB-Datei aus der *Protein Data Bank* bestimmt wird. Für Reflexe $I_{hkl}^{exp}(\lambda)$ mit $\lambda < 2 \lambda_{min}$ berechnet er sich zu $S_{hkl}(\lambda) = \frac{I_{hkl}^{mono}}{I_{hkl}^{exp}(\lambda)}$. Für die Reflexe mit $\lambda \geq 2 \lambda_{min}$ sind alle $I_{hkl}^{exp}(\lambda)$ Energiemultipletts, weswegen die $S_{hkl}(\lambda)$ über ein Gleichungssystem bestimmt werden müssen (Bourenkov et al. 1996).
- (b) Der resultierende Skalierungsfaktor ist als $S_{hkl}^{-1}(\lambda)$ über die Wellenlänge in Abb. 5.4 dargestellt. Die WNK reflektiert die Spektralverteilung der gebeugten Strahlung, wie sie vom Image-Plate gemessen wurde.

Kristall	harmonische Multiplizität m											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
met-Mb	26784	4547	546	186	54	36	16	9	4	1	2	5
met-Mb*	26437	4561	516	178	63	32	14	9	4	3	2	4

Tabelle 5.1: *Häufigkeit der Multipletts in Abhängigkeit von ihrer Harmonizität.*

3. Mul_Sort

- (a) Das Programm Mul_Sort skaliert die einfachen Reflexe gemäß der WNK und entfaltet die Reflexintensitäten der Energiemultipletts in die beitragenden Intensitäten der Einzelreflexe, die erst dann skaliert werden. Das Entfaltungsverfahren beruht auf der Annahme von Bayes-Statistik für die Beiträge der Einzelintensitäten zur Gesamtintensität eines Energiemultipletts. Tabelle 5.1 zeigt die Häufigkeit der Energiemultipletts in Abhängigkeit von der Anzahl der beitragenden Einzelreflexe m , wobei alle Reflexe, deren Schwerpunkte näher als 0,5 mm beieinander liegen, als Multiplett aufgefaßt werden. Die Entfaltung wird nur auf Multipletts mit Harmonizität $m < 9$ angewendet, da die Rechenzeit für die Entfaltung eines Multipletts der Ordnung m exponentiell mit m anwächst. Die nicht entfaltenen Multipletts mit $m > 8$ machen nur einen Anteil von 5 Promille an der Gesamtzahl der Reflexe aus, so daß ihre Vernachlässigung vertretbar ist.
- (b) Nach der Entfaltung stellt das Programm die skalierten Reflexintensitäten I_{hkl}^{exp} bzw. die Beträge der Strukturformfaktoren F_{hkl}^{exp} für die weitere Prozessierung zu Verfügung.

4. SHELXL97, SHELXPRO und O

- (a) Das Programm SHELXL97 berechnet zunächst die theoretischen Strukturformfaktoren F_{hkl}^{Modell} und Phasen von met-Mb aus den Atomkoordinaten der Modellstruktur und führt mit den F_{hkl}^{exp} eine Verfeinerung an das Modell durch. Die kristallographischen R-Faktoren R_{cryst} beider Strukturen liegen knapp unter 19 %, die für die Strukturformfaktoren mit $\frac{F_{exp}}{\sigma(F_{exp})} > 4$ bei 16 %.
- (b) Das Programm SHELXPRO führt die Fouriersynthese der Strukturformfaktoren zur Berechnung der Elektronendichteverteilung durch. Die berechnete Elektronendichtekarte kann mittels des Programms O visualisiert und mit der Karte des Modells verglichen werden.

Parameter	Einheit	met-Mb	met-Mb*
Datennahme			
Detektorabstand zur Probe	mm	200	200
Anzahl der Laue-Bilder		6	6
Abstand voneinander	°	12,22,22,22,22	
ges. Rotationsbereich	°	110	110
Belichtungszeit/Bild	s	≈ 15	2000
Anzahl SR-Pulse		≈ 3150	3500
Ereignisrate	Hz	210	1,7
Zeitfenster des Choppers (2,5 %-Breite)	ns	465	465
Zeitabstand zwischen Laser- u. SR-Puls [#]	ns	—	9,9 ± 2,4
Auswertung			
Raumgruppe		P2 ₁	
Einheitszelle			
a	Å	34,83	34,83
b	Å	31,02 ± 0,02	31,02 ± 0,02
c	Å	64,68 ± 0,11	64,67 ± 0,12
β	°	105,84 ± 0,16	105,86 ± 0,14
mittlere Reflexdimension			
Länge	mm	1,25 ± 0,09	1,24 ± 0,11
Breite	mm	0,81 ± 0,06	0,78 ± 0,06
d_{min}	Å	1,65	1,65
λ_{min}	Å	0,6	0,6
Gemessene Reflexe		32190	31823
” entfaltet		39058	38632
symm. unabh. Reflexe		11653	11647
$\frac{\langle I \rangle}{\langle \sigma(I) \rangle}$		6,98	7,13
Vollständigkeit	%	70,9	71,5
Verfeinerung			
R_{cryst} für alle F_0	%	18,8	18,7
R_{cryst} für $\frac{F_0}{\sigma(F_0)} > 4$	%	16,0	15,9
Koordinatenfehler $\overline{\sigma(x_i)}$	Å	0,21	0,21

[#]Zeitabstand Spitze–Spitze

Tabelle 5.2: Parameter zu Datennahme, Auswertung und Verfeinerung der Laue-Daten.

5.3 Datenanalyse

5.3.1 Analyse der Beugungsdaten

Die Parameter der Datennahme sowie die Ergebnisse der Auswertung und der Verfeinerung sind in Tabelle 5.2 zusammengefaßt. Die Qualität der gemessenen Strukturfaktordaten läßt sich anhand der folgenden Eigenschaften charakterisieren: Vollständigkeit des Datensatzes, Signal/Rausch-Verhältnis, Bragg-Auflösung und R-Faktoren. Letztere sind $< 20\%$ und stellen daher einen guten Wert dar (Drenth 1995). Die anderen Charakteristika sind i. f. diskutiert.

Vollständigkeit

Die Vollständigkeit des Satzes der Strukturfaktoren ist neben der erreichten Bragg-Auflösung wichtiges Kriterium für die Qualität der Elektronendichteverteilung. Sie hängt vom überdeckten reziproken Raum und vom Signal/Rausch-Verhältnis der Messung ab. Bei den durchgeführten Messungen konnte der reziproke Raum nicht vollständig exploriert werden, da der Rotationsbereich auf 110° eingeschränkt war, so daß der Kristall nicht um die vollen 180° gedreht werden konnte, wie das bei monoklinen Systemen zur Aufnahme eines kompletten Datensatzes notwendig ist. Die Einschränkung resultiert daraus, daß die Halterung des Kapillarröhrchens ab einem Winkel von $\pm 35^\circ$ zwischen Strahlachse und Röhrchen anfängt, den Streubereich zwischen Image-Plate und Kristall abzuschatten.

In Tabelle 5.3 ist die erreichte (exp.) neben der bei gegebener Geometrie erreichbaren **Vollständigkeit** (theo.) für verschiedene Auflösungsbereiche angegeben, wobei die Einteilung gleichen Volumina im reziproken Raum und somit gleicher Reflexanzahl entspricht, außer für den Bereich von $16,8\text{--}5,64\text{ \AA}$, bei dem die Anzahl der Reflexe nur ein Achtel beträgt. Die Vollständigkeit liegt für beide Datensätze bei 71% , die theoretisch mögliche bei 75% . Die eigentliche Qualität der Messung und des Auswerteverfahrens verdeutlicht der Vergleich zwischen theoretischer und erzielter Vollständigkeit ($\frac{exp.}{theo.}$). Hiernach konnten im Mittel 95% aller meßbaren Reflexe bei beiden Datensätzen nachgewiesen werden, was beweist, daß mit dem Laue-Verfahren und dem Spiegelchopper ähnliche Vollständigkeiten erreicht werden können wie mit monochromatischen Methoden.

Für die **Vollständigkeit bei geringer Auflösung** ($16,8\text{--}5,64\text{ \AA}$) wird ein geringerer Prozentsatz festgestellt, was am Problem des *Low Resolution Holes* (s. Kapitel 2.2) liegt. Die Anwendung der Bayes-Methode zur Entfaltung der Energiemultipletts entschärft dieses Problem jedoch, so daß immerhin $\approx 86\%$ aller theoretisch meßbaren Reflexe mit einer Auflösung von $> 5,64\text{ \AA}$ nachgewiesen werden. Die Häufigkeit der Energiemultipletts läßt sich anhand von Tabelle 5.1 berechnen und beträgt für den Datensatz des met-Myoglobins $16,8\%$ und für met-Mb* $16,9\%$, was den von Clifton et al. (1991) abgeschätzten Wert von 17% für die Anzahl der Multipletts in einem Laue-Datensatz bestätigt.

Die **Vollständigkeit im Bereich der höchsten Bragg-Auflösung** ($1,75\text{--}1,65\text{ \AA}$)

met-Mb					met-Mb*				
$\Delta\lambda$ [Å]	$\frac{\langle I \rangle}{\langle \sigma(I) \rangle}$	Vollständigkeit			$\Delta\lambda$ [Å]	$\frac{\langle I \rangle}{\langle \sigma(I) \rangle}$	Vollständigkeit		
		exp. [%]	theo. [%]	$\frac{exp.}{theo.}$ [%]			exp. [%]	theo. [%]	$\frac{exp.}{theo.}$ [%]
16,8 – 5,64	5,91	45,7	51,4	88,9	16,8 – 5,64	5,35	44,8	52,1	86,0
5,64 – 2,71	9,63	71,6	74,0	96,8	5,64 – 2,71	9,14	72,6	75,7	95,9
2,71 – 2,19	8,24	75,8	76,8	98,6	2,71 – 2,19	8,26	76,6	77,9	98,3
2,19 – 1,93	5,57	75,1	76,3	98,4	2,19 – 1,93	5,77	75,6	77,1	98,2
1,93 – 1,76	3,28	73,4	75,1	97,8	1,93 – 1,76	3,34	74,3	76,0	97,8
1,76 – 1,65	2,38	60,9	72,5	84,0	1,76 – 1,65	2,50	60,7	71,6	84,8
16,8 – 1,65	6,98	70,9	74,4	95,3	16,8 – 1,65	7,13	71,5	75,1	95,2

Tabelle 5.3: *Vollständigkeit der Datensätze von met-Mb und met-Mb*. Die Wellenlängenbereiche korrespondieren zu gleichen Volumina im reziproken Raum, außer bei dem Bereich von 16,8–5,64 Å, wo das Volumen nur 12,5 % der anderen Volumina beträgt.*

beträgt für beide Datensätze rund 60 % bzw. werden 84 % aller theoretisch meßbaren Reflexe erfasst. Die etwas geringere Vollständigkeit bei hoher Auflösung liegt am geringeren Signal/Rausch-Verhältnis für diese Reflexe, das zum einen aus der Abnahme der atomaren Streufaktoren sowie dem Einfluß der Temperaturfaktoren mit zunehmendem Streuwinkel resultiert, zum anderen ist der Einfluß der Mosaizität des Kristalls auf das Streuvermögen hierfür verantwortlich.

Signal/Rausch-Verhältnis

Die Abnahme des Streuvermögens mit zunehmender Auflösung ist deutlich anhand von $\frac{\langle I \rangle}{\langle \sigma(I) \rangle}$ in Tabelle 5.3 zu erkennen, lediglich der Bereich von 16,8–5,64 Å fällt aus dem Schema. Dies liegt vermutlich daran, daß keinerlei Redundanz für diese Reflexe vorhanden und die Messung somit unsicherer ist, und eventuell auch am Einfluß der Energieentfaltung, da alle Reflexe in diesem Bereich aus Energiemultipletts stammen. Das Signal/Rausch-Verhältnis der einzelnen Auflösungsbereiche beider Datensätze liegt zwischen 2,4 und 9,5. Das mittlere Signal/Rausch-Verhältnis hat einen Wert von 7, was mit monochromatischen Messungen dieser Auflösung vergleichbar ist und die Anwendbarkeit der Laue-Methode unterstreicht.

Bragg-Auflösung und Koordinatenfehler

Die Bragg-Auflösung der Laue-Daten erreicht 1,65 Å mit einer Vollständigkeit in der letzten Auflösungsschale von fast 61 %, und das, obwohl der reziproke Raum nicht vollständig exploriert wurde. Eine hohe Auflösung ist maßgeblich für die Reduzierung des Fehlers auf die Ortskoordinaten der Atome $\sigma(x_i)$, ($i=1-3$). Der Fehler wird i. f. mittels der Näherungsformel von Cruickshank (1999) berechnet, die einen mittleren

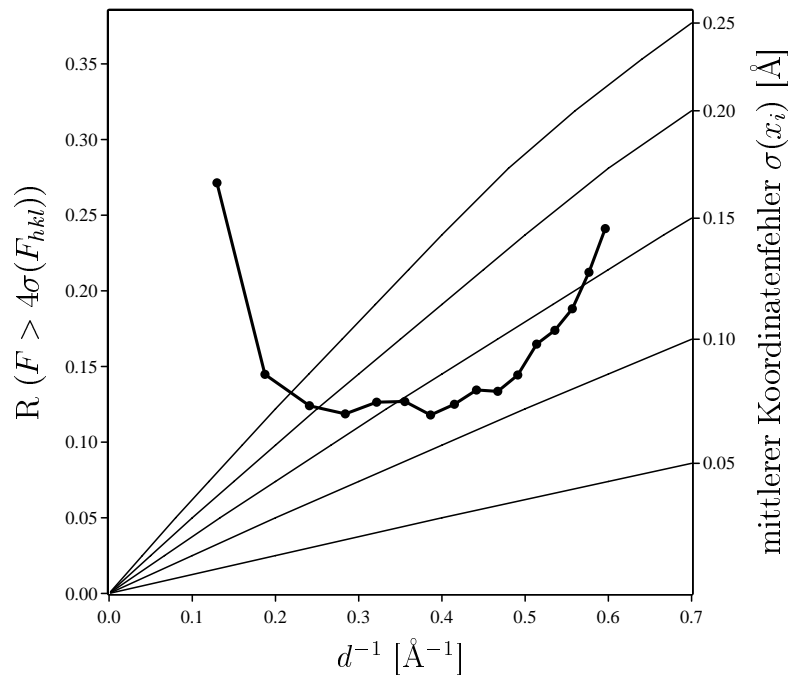


Abbildung 5.5: Luzatti-Graphik der met-Mb*-Daten. Dargestellt ist der R-Faktor in Abhängigkeit von der reziproken Bragg-Auflösung d^{-1} (\bullet). Die Geradenschar markiert mittlere Koordinatenfehler in Abhängigkeit von d^{-1} .

isotropen Temperaturfaktor B annimmt:

$$\sigma(x_i) \approx \sqrt{\frac{N}{n_{Obs} - n_{Par}}} C^{-\frac{1}{3}} R_{cryst} d_{min} , \quad (5.1)$$

wobei $N = 1704$ die Anzahl der Atome in der Struktur ist, $n_{Obs} = 11647$ die Anzahl der unabhängigen Observablen, $n_{Par} = 4 N = 6816$ die Anzahl der freien Parameter (x_1, x_2, x_3, B), $R_{cryst} = 0,187$ der R-Faktor der Verfeinerung gegenüber der Modellstruktur und $d_{min} = 1,65 \text{ \AA}$ die erreichte Bragg-Auflösung. Hieraus ergibt sich ein Fehler auf eine Ortskoordinate von $\sigma(x_i) = 0,21 \text{ \AA}$ bzw. ein Positionsfehler von $\sigma(r) = \sqrt{3} \sigma(x_i) = 0,36 \text{ \AA}$.

Ein oberer mittlerer Koordinatenfehler[†] in Abhängigkeit von der Auflösung kann mittels einer Luzatti-Graphik abgeschätzt werden (Cruickshank 1999), die in Abb. 5.5 für die errechneten Atomkoordinaten des met-Mb*-Datensatzes dargestellt ist. Hier ist der R-Faktor in Abhängigkeit von d^{-1} aufgetragen (\bullet) und eine Geradenschar gezeichnet, von der jede einzelne Gerade einen oberen mittleren Koordinatenfehler in Abhängigkeit von d^{-1} markiert. Im Bereich von $d^{-1} = 0,4-0,5 \text{ \AA}^{-1}$ ($d = 2,5-2,0 \text{ \AA}$) verläuft die Kurve etwa linear zu der Geraden, die zu einem Fehler von $\approx 0,12 \text{ \AA}$ korrespondiert. Dies ist der beste Teil der Struktur. Mit zunehmender Auflösung verschlechtert sich der Fehler aufgrund des zunehmenden Einflusses der Temperaturfaktoren und der experimentellen Fehler, so daß die obere Fehlergrenze bei $d^{-1} = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$ ($1,65 \text{ \AA}$) bis auf

[†]Eigentlich ist dies kein Koordinatenfehler, sondern der Betrag, um den die Koordinate x_i in einer idealisierten Verfeinerung verschoben werden muß, um genaue Übereinstimmung mit dem Modell zu erreichen.

0,17 Å ansteigt. Unterhalb einer Auflösung von 2,5 Å nimmt die Fehlergrenze ebenfalls zu, bei $d^{-1} = 0,2 \text{ \AA}^{-1}$ ($d = 5 \text{ \AA}$) beträgt sie $\approx 0,25 \text{ \AA}$. Oberhalb von 5 Å nimmt sie aufgrund der geringen Anzahl der Reflexe in diesem Auflösungsbereich (305) drastisch zu. Die obere Grenze für den Fehler liegt im Bereich von 5,0–1,65 Å zwischen 0,12 und 0,25 Å, was mit dem für die gesamte Struktur mittels der Näherungsformel 5.1 bestimmten Wert von 0,21 Å verträglich ist.

5.3.2 Vergleich der Datenqualität zu einem früheren ns-zeit-aufgelösten Beugungsexperiment an Myoglobin

Bisher wurde nur ein einziges hochzeitaufgelöste Beugungsexperimente an MbCO durchgeführt (Šrajer et al. 1996), für das die Meßverfahren, die Vollständigkeit und der Fehler auf die Atomkoordinaten i. f. mit den Daten dieser Arbeit verglichen werden.

Der **Unterschied der Meßverfahren** liegt darin, daß bei den met-Mb*-Daten dieser Messung 6 Laue-Bilder in Abständen von 22° (Rotationsbereich = 110°) bei einer entsprechenden Exploration des reziproken Raumes von 75 % aufgenommen wurden, während bei den MbCO-Daten das Auswerteverfahren zur Entfaltung der Energiemultipletts eine hohe Redundanz in den Messungen forderte, und deswegen 50 Laue-Aufnahmen in einem Bereich von 180° gefordert waren.

Die erreichten **Vollständigkeiten** beider Messungen sind zum Vergleich in Tabelle 5.4 nach den Auflösungsbereichen, wie sie in der Veröffentlichung von Šrajer et al. (1996) gewählt wurden, dargestellt. Es fällt auf, daß bei der MbCO-Messung trotz eines Rotationsbereiches von über 180° nur 65,7 % Vollständigkeit bis zu einer Auflösung von 1,8 Å erreicht wurden, wobei die äußerste Auflösungsschale lediglich eine Vollständigkeit von 27 % aufweist. Das zeitaufgelöste Experiment dieser Arbeit erreichte im selben Auflösungsbereich mit 73,8 % eine höhere Vollständigkeit, trotz eines geringeren Rotationsbereiches. Der Auflösungsbereich erstreckt sich sogar noch bis zu 1,65 Å, und das bei einer Vollständigkeit von 63,8 % in der Auflösungsschale von 1,8–1,65 Å. Damit beträgt die gesamte Vollständigkeit 71,5 %. Im Bereich niedriger Auflösung (10,8–5,64 Å) zeigt das Experiment von Šrajer et al. (1996) eine höhere Vollständigkeit als diese Messung, was durch die unvollständige Überdeckung des reziproken Raumes bei dieser Messung erklärt wird (180° vs. 110°).

Der **Fehler auf die Atomkoordinaten** der MbCO-Messung wird i. f. gemäß Gl. 5.1 abgeschätzt, weil in der Veröffentlichung diesbezüglich keine Informationen gegeben wurden. Der in der Formel auftauchende R-Faktor aus der Anpassung an die Modellstruktur ist ebenfalls nicht angegeben, so daß optimistisch derselbe Wert wie in dieser Messung angenommen wird, $R_{cryst} = 0,187$. Die Parameter $n_{Obs} = 8032$, $C = 65,7\%$ und $d_{min} = 1,8 \text{ \AA}$, ebenfalls optimistisch, da hier die Vollständigkeit nur 27 % beträgt, sind der Veröffentlichung entnommen. Mit $N = 1704$ und $n_{Par} = 6816$, berechnet sich der mittlere Fehler auf eine Ortskoordinate zu $\sigma(x_i) = 0,46 \text{ \AA}$ bzw. der Positionsfehler zu $\sigma(r) = 0,80 \text{ \AA}$. Diese Fehler sollten als untere Grenze angesehen werden, da bei d_{min} und R_{cryst} Zugeständnisse gemacht worden sind. Anhand des Koordinatenfehlers läßt sich schließen, daß bei der MbCO-Messung keine Konformationsänderungen aufgedeckt werden konnten, da deren erwartete Amplituden geringer sind ($\leq 0,4 \text{ \AA}$,

$\Delta\lambda$ [Å]	Vollständigkeit	
	met-Mb* [%]	Mb*CO [%]
$\infty - 10.8$	20.5	26.1
10.80 – 5.40	51.8	86.6
5.40 – 3.60	66.9	93.7
3.60 – 2.41	76.3	91.4
2.41 – 2.02	76.3	68.9
2.02 – 1.80	74.7	27.0
1.80 – 1.65	63.8	–
$\infty - 1.80$	73.8	65.7

Tabelle 5.4: Vergleich der Vollständigkeiten zwischen den met-Mb*- und den Mb*CO-Daten von Šrajer et al. (1996).

s. Kapitel 2.4) als der abgeschätzte mittlere Positionsfehler, während der Fehler dieser Messung weniger als halb so groß ist und schon im Bereich der Konformationsänderungen liegt.

5.3.3 Analyse der Strukturdaten

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen zur Veranschaulichung der Datenqualität zwei Ausschnitte der Häm-Umgebung in der $2|F_{met-Mb^*}| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte, die aus den met-Mb*-Daten und dem Modell berechnet worden sind. In zwei weiteren Abbildungen wird die Differenzfourierdichte zwischen Anregungs- und statischer Messung dargestellt.

Ansicht auf die Porphyrinebene

Die Abbildung 5.6 zeigt die Elektronendichteverteilung des Porphyrinrings des Häms von der distalen Seite her betrachtet, wobei das Eisenatom im Zentrum sowie die vier Pyrrolringe bei einem Kontourniveau von $1,6 \sigma^\ddagger$ (blau) deutlich zu erkennen sind. Auf einem Niveau von $3,0 \sigma$ (grün) zeichnen sich noch Dichten bei den vier Stickstoffatomen der Pyrrolringe ab, die dem Eisen als Liganden dienen sowie das Eisen selbst. Außerdem existieren links oben und rechts unten noch weitere Elektronendichten auf diesem Niveau, die von einzelnen Kohlenstoffatomen des Porphyrinrings stammen; bei $12,0 \sigma$ (rot) zeigt nur noch das Eisenatom eine Dichte.

Seitliche Ansicht des Häms

In der zweiten Elektronendichtekarte (s. Abb. 5.7) ist ein vertikaler Schnitt durch die Häm-Ebene dargestellt. Im Zentrum sitzt das Eisenatom, umrandet vom Porphyrinring, der aufgrund der begrenzten Tiefe des Bildausschnitts nur teilweise zu

[‡]Standardabweichung von der mittleren Elektronendichte in der Einheitszelle.

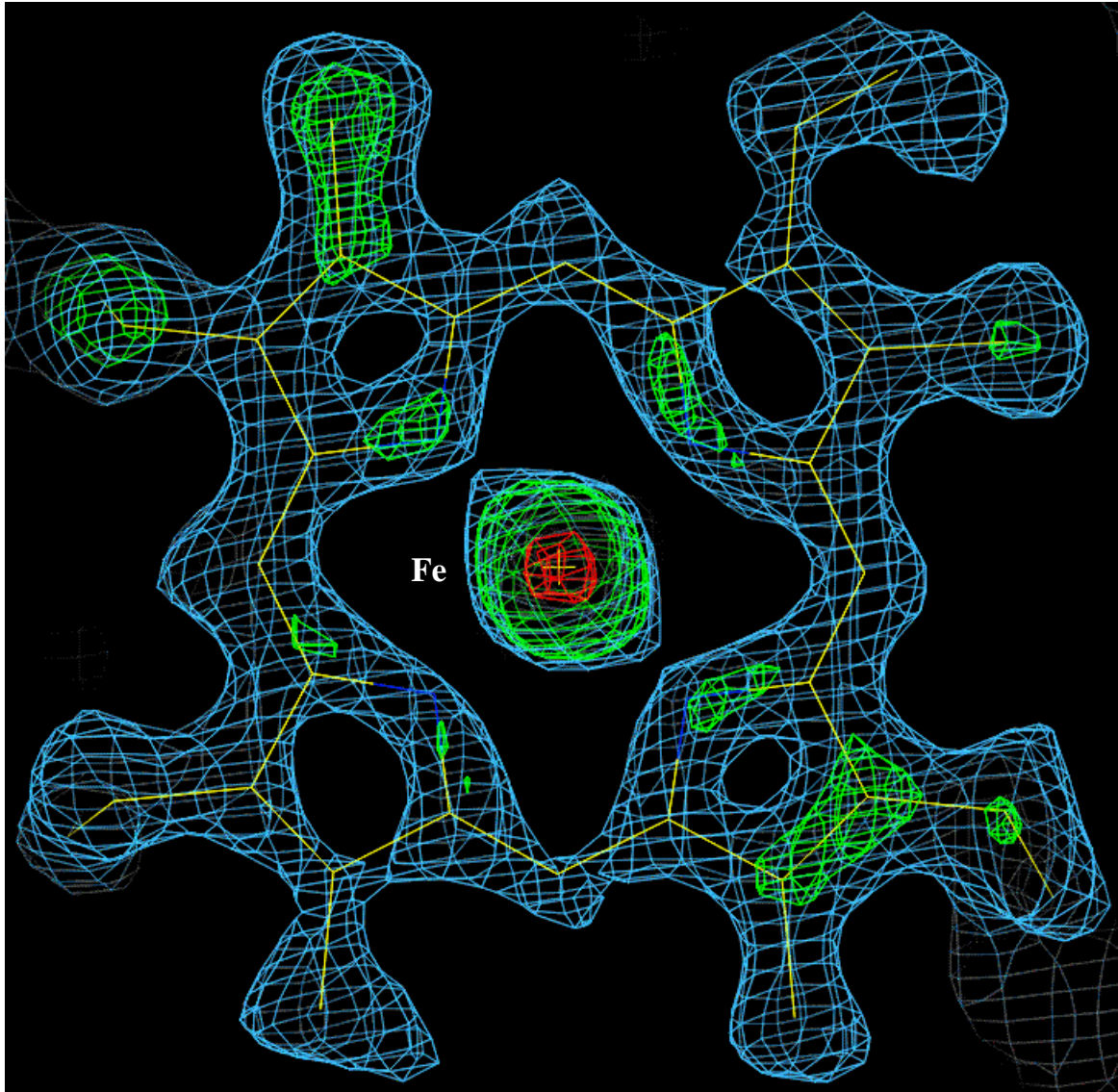


Abbildung 5.6: $2|F_{met-Mb^*}| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte der Hämebene, von der distalen Seite her betrachtet. Die Kontourniveaus betragen $1,6 \sigma$ (blau), $3,0 \sigma$ (grün) und $12,0 \sigma$ (rot).

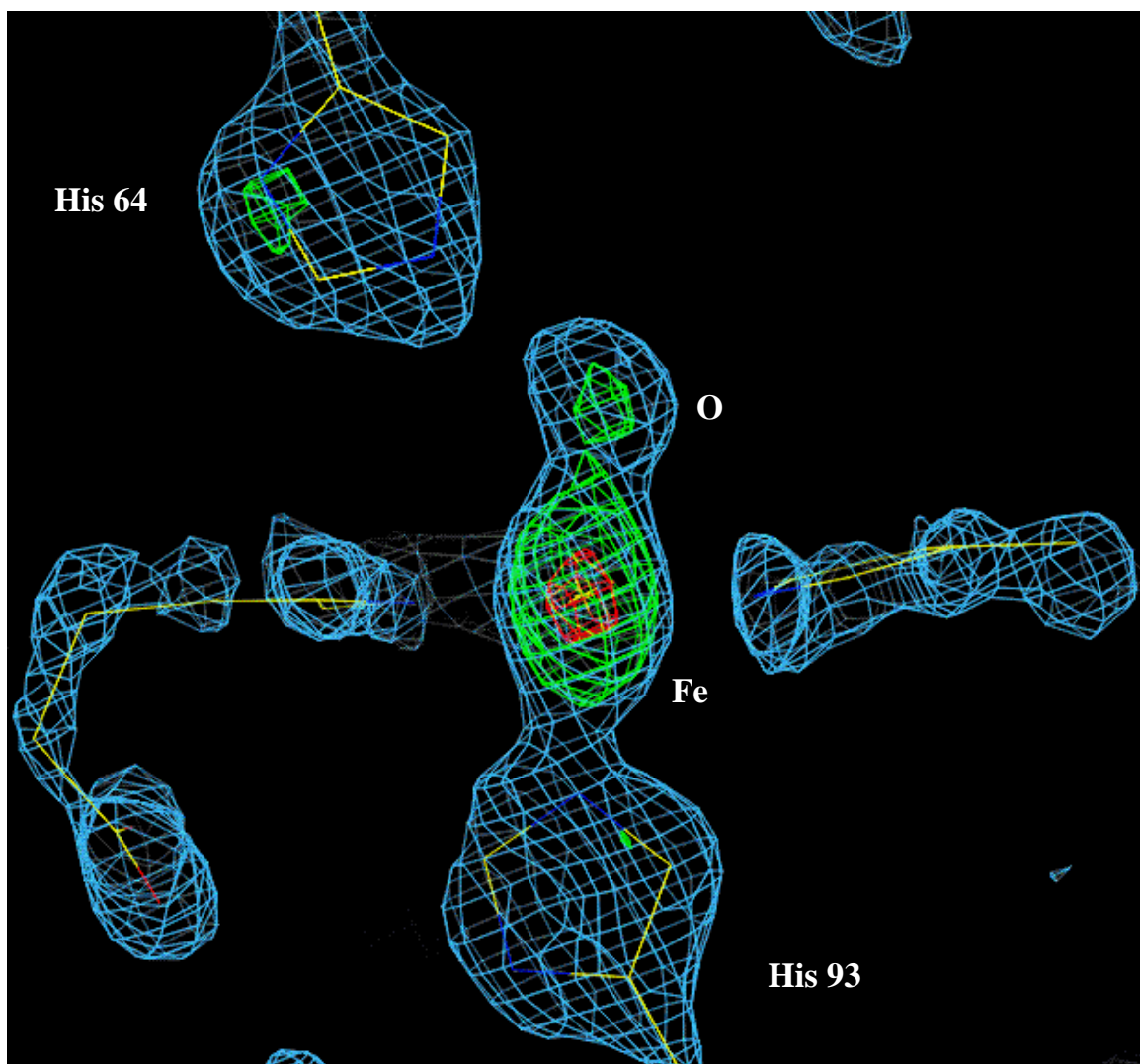


Abbildung 5.7: $2|F_{met-Mb^*}| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte eines vertikalen Schnittes durch die Hämebene. Die Kontourniveaus betragen $2,2 \sigma$ (blau), $4,5 \sigma$ (grün) und $12,0 \sigma$ (rot).

sehen ist. Bei einem Konturniveau von $2,2 \sigma$ (blau) ist oberhalb der Häm-Ebene der Imidiazolring des distalen Histidins (His64) zu erkennen sowie der Sauerstoff des koordinativ gebundenen Wassermoleküls direkt oberhalb des Eisens, unterhalb der Häm-Ebene ist das proximale Histidin (His93) sichtbar. Die Dichten von Sauerstoff, Eisen und proximalem Histidin sind auf diesem Kontourniveau noch verschwommen, auf einem Kontourniveau von $4,5 \sigma$ (grün) sind hingegen die Dichten von Sauerstoff und Eisen deutlich separiert und es existiert noch eine Dichte am Stickstoffatom von His64. Oberhalb von 12σ (rot) zeichnet sich wieder nur das Eisen ab.

Beide Elektronendichtekarten sind von guter Qualität, da sich bei relativ hohen Kontourniveaus von $1,6$ bzw. $2,2 \sigma$ immer noch (fast) vollständig zusammenhängende

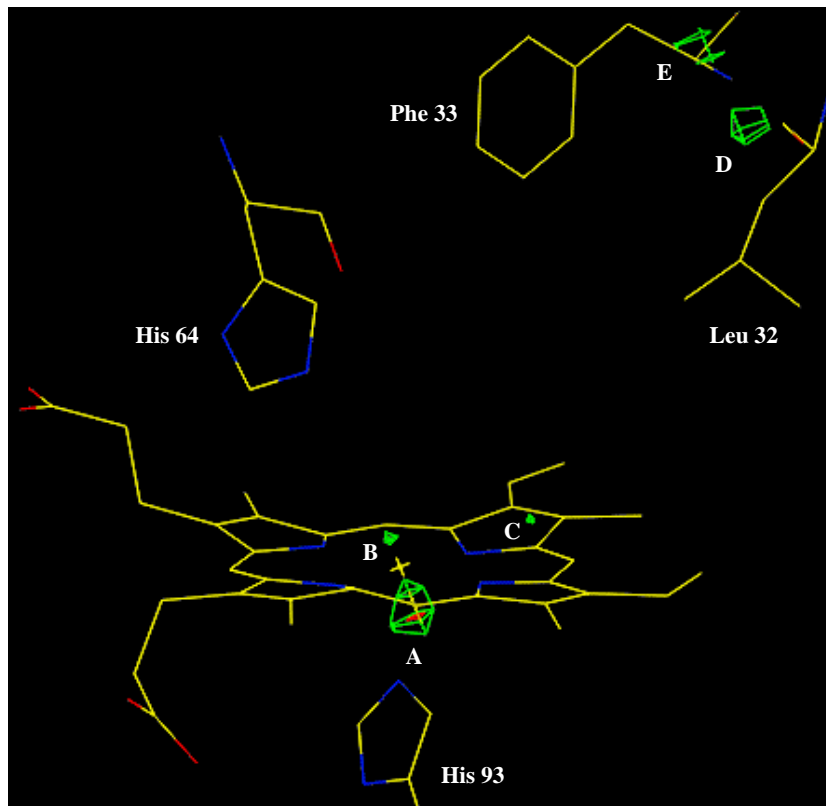


Abbildung 5.8: *Seitliche Ansicht der Differenzelektronendichtekarte $\Delta\rho = |F_{met-Mb^*}| - |F_{met-Mb}|$ bei einem Kontourniveau von $+4\sigma$ (grün) und $+5\sigma$ (rot). Das Stockmodell zeigt das Häm sowie ausgewählte Seitenketten, wobei die Kohlenstoffatome gelb, Sauerstoff rot und Stickstoff blau markiert sind.*

Elektronendichten abzeichnen, und bei höheren Niveaus ($3,0$ bzw. $4,5 \sigma$) Dichten einzelner Atome deutlich getrennt identifiziert werden können.

Differenzelektronendichte

Die Differenzelektronendichte $\Delta\rho_{xyz}$ ist über die Differenzfouriersynthese der Strukturformfaktoren zwischen der statischen met-Mb-Struktur und der nach Laseranregung berechnet worden (Drenth 1995),

$$\Delta\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (|F_{hkl}^{met-Mb^*}| - |F_{hkl}^{met-Mb}|) e^{-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}}, \quad (5.2)$$

wobei die Phasen der bekannten Modellstruktur übernommen wurden. Es existieren zahlreiche Differenzdichten im Bereich von $-4\sigma < \overline{\Delta\rho} < 4\sigma$, die sich homogen über das Protein verteilt finden. Erfahrungsgemäß kann einzelnen Differenzmaxima im Bereich zwischen $\pm 3-4\sigma$ ohne andere komplementäre Informationen keine Signifikanz beigemessen werden (Bartunik et al. 1999). Dies liegt daran, daß nur eine begrenzte Anzahl von Strukturformfaktoren bestimmt werden kann, so daß es bei der Fouriersyn-

these zu Abbruchfehlern kommt, die sich in der Elektronendichtekarte neben dem statistischen Rauschen in Form von Pseudomaxima manifestieren. Daher sind in Abb. 5.8 und 5.9 nur Differenzelektronendichten mit einer Abweichung von $\geq +4\sigma$ vom Mittelwert $\overline{\Delta\rho}$ dargestellt, unterhalb von -4σ existieren keine Differenzdichten.

Auf einem Kontourniveau von $+4\sigma$ (grün) werden noch insgesamt 5 Differenzdichten lokalisiert, eine sehr kleine am Pyrrolring C (C) und eine kleine in der Nähe des Eisens (B) sowie eine große Differenzdichte unterhalb der Hämebene (A), die erst bei $+5,7\sigma$ verschwindet. Sie liegt der Differenzdichte B in etwa derselben Entfernung zum Eisen gegenüber (s. Abb. 5.9). Met-Myoglobin ist im Gegensatz zu MbCO photochemisch nicht aktiv, was durch die unterschiedlichen Oxidationsstufen des Eisens (Fe^{2+} bzw. Fe^{3+}) in den entsprechenden Formen des Myoglobins erklärt wird. Daher kann die Differenzdichte A nicht auf das sogenannte *doming* zurückgeführt werden, der Bewegung des Eisens in Richtung des proximalen Histidins, die nur bei Eisen(II)-Komplexen spektroskopisch nach der Ligandenabspaltung beobachtet wird (Franzen et al. 1995). Auch als eine Bewegung thermischen Ursprungs aufgrund von Häm-Vibrationen können weder die Dichten A und B noch die Dichte C über dem Pyrrolring interpretiert werden, da sowohl die thermischen als auch die Vibrationsrelaxationszeiten durch Zeitkonstanten von ≤ 25 ps charakterisiert sind (Mizutani & Kitagawa 1997). Bei einer Bewegung des Eisens müßte außerdem eine große negative Differenzdichte an der ursprünglichen Position des Eisens zu finden sein, die jedoch selbst auf niedrigem Kontourniveau ($2,0 \sigma$) fehlt. Eine plausible Begründung für die Dichten A und B liegt darin, daß Eisen eine hohe Streukraft besitzt, und sich deswegen die Abbruchfehler bei der Fouriersynthese in der Umgebung des Eisens besonders stark auswirken (sogenannte *ripples*), so daß es sich bei diesen Maxima wahrscheinlicher um Pseudomaxima handelt.

Zwei weitere Differenzdichten oberhalb von $+4\sigma$ sind in der Nähe der Aminosäuren Leucine 32 (D) und Phenylalanine 33 (E) lokalisiert. Sollten diese auf Bewegungen dieser Seitenketten hindeuten, so müßten entsprechende negative Dichten bei den Atompositionen der nichtangeregten Struktur zu finden sein, was jedoch nicht der Fall ist. Eine Interpretation dieser zwei Dichten als Bewegung dieser Seitenketten aufgrund eines thermischen Effekts wäre daher äußerst spekulativ.

Anhand der gezeigten Differenzelektronendichten ist zu folgern, daß auf die Absorption folgende thermische Effekte die Konformation des Proteins nicht relevant beeinflussen, zumindest nicht bei einer Auflösung von $1,65 \text{ \AA}$ und nicht innerhalb der ersten $9,9 \pm 2,4$ ns nach dem Anregungsmaximum. An einem photolytischen Experiment an MbCO können ähnliche thermische Bedingungen wie bei met-Mb erwartet werden, so daß dann auftretende signifikante Differenzdichten mit Ligandenabspaltung, *doming* oder Konformationsänderungen in der tertiären Struktur assoziiert werden können, und nicht darüber spekuliert werden muß, ob diese thermischen Ursprungs sind.

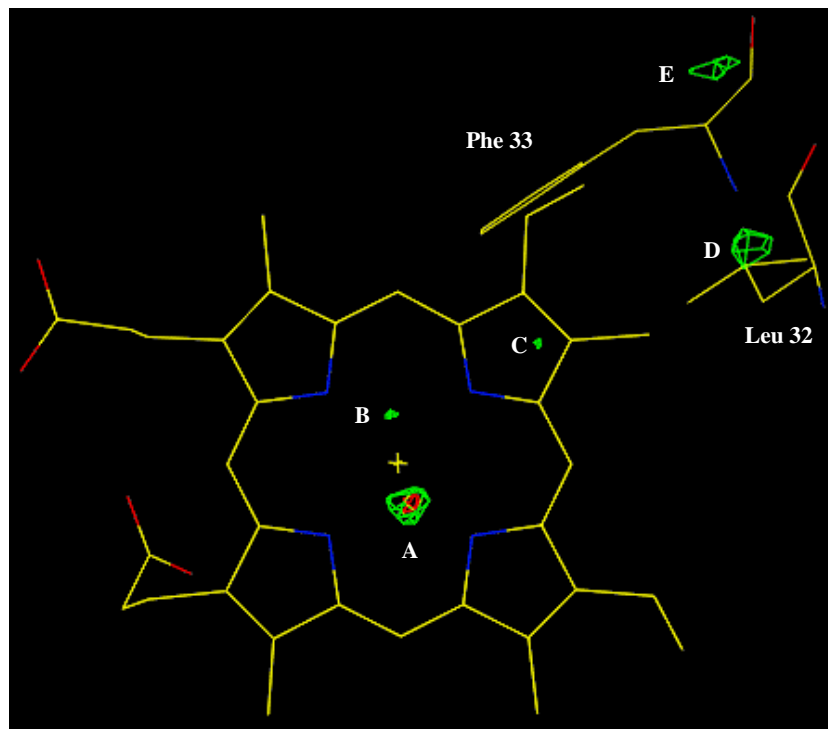


Abbildung 5.9: Ansicht der Differenzelektronendichtekarte $\Delta\rho = |F_{met-Mb^*}| - |F_{met-Mb}|$ von der distalen Seite her bei einem Kontourniveau von $+4\sigma$ (grün) und $+5\sigma$ (rot).

Kapitel 6

Diskussion und Ausblick

Diskussion der Leistungsfähigkeit des Spiegelchoppers

Eine Hürde für die Weiterentwicklung und Durchführung hochzeitaufgelöster Beugungsexperimente stellt die nur geringfügig vorhandene Strahlzeit der Speicherringe im Einzelpuls-Modus dar, denn zeitaufgelöste Experimente sind allein schon wegen der Justierung von Chopper und Kristall zeitintensiv. Die Strahlintensität eines DORIS-Wigglers ist zusätzlich etwa einen Faktor 1000 geringerer als z. B. an Speicherringen der 3. Generation, so daß eine wesentlich höhere Anzahl an stroboskopischen Wiederholungen zur Aufnahme eines Datensatzes erforderlich ist. Eine Nacht Meßzeit im Einzelpuls-Modus, wie sie an DORIS normalerweise zu Verfügung steht, reicht für einen Datensatz gerade so aus, wenn keine unvorhergesehenen Komplikationen auftreten. Eine Messung bis zu höherer Auflösung oder die Aufnahme mehrerer Datensätze zu unterschiedlichen Zeitpunkten des strukturellen Relaxationsprozesses ist jedoch in einer so kurzen Zeit nicht realisierbar. Daher ist es von entscheidender Bedeutung für den Erfolg zeitaufgelöster Beugungsexperimente an BW6, daß es der neuentwickelte Chopper erlaubt, aufgrund seines Funktionsprinzips so kurze Zeitfenster zu erzeugen, daß die Experimente im Zweipuls-Modus von DORIS durchgeführt werden können. Dadurch steigert sich die nutzbare Strahlzeit um einen Faktor 15, denn in 1998 belief sich beispielsweise die Strahlzeit im Einzelpulsbetrieb lediglich auf sechs Nächte (insgesamt 70 h), während im Zweipuls-Modus 6 Wochen zu Verfügung standen.

Aufgrund seiner geringen Betriebsfrequenz von nur 105 Hz ist für den Spiegelchopper noch Potential vorhanden, das Zeitfenster durch höhere Rotationsfrequenzen weiter zu verkürzen. Die Maximalfrequenz ist gegenwärtig nur aufgrund der Grenzfrequenz des Inkrementalgebers auf 140 Hz beschränkt, mit dem gegenwärtigen Motor läßt sich die Geschwindigkeit noch auf 230 Hz steigern. Die Installation eines Inkrementalgebers mit höherer Grenzfrequenz ist daher angestrebt. Für einen Betrieb bei 230 Hz berechnet sich das erreichbare Zeitfenster zu 200 ns, das durch eine zusätzliche Blende kurz vor dem Spiegel zur Verringerung der Divergenz weiter reduziert werden könnte. Dann erscheint sogar ein Betrieb im Fünfpuls-Modus ($t_{5BX} = 192,8$ ns) des Speicherrings prinzipiell realisierbar, woraus sich noch bessere Bedingungen für zeitaufgelöste Experimente an DORIS ergeben würden.

Die beiden Fermichopper, die ebenfalls zur Durchführung zeitaufgelöster Laue-Experi-

mente entwickelt wurden (s. Tabelle 3.1 2 und 4), erreichen Zeitfenster von 1,73 bzw. 1,5 μs Dauer, die grob einen Faktor 3 länger sind als das des Spiegelchoppers, obwohl diese Chopper mit 5–9-fach höherer Geschwindigkeit rotieren. Die erzeugten Zeitfenster sind damit zu lang, um an DORIS einzelne Synchrotrimpulse extrahieren zu können. Eine weitere Reduzierung der Zeitfenster dieser Chopper durch noch höhere Rotationsfrequenzen ist nicht mehr realisierbar, da entweder die zulässige Maximalfrequenz aufgrund der mechanischen Konstruktion schon erreicht ist (CHESS-Chopper, LeGrand et al. (1989)) oder weil Rotationsfrequenzen von ≈ 900 Hz bereits in der Nähe der Reißgrenze des Rotormaterials liegen (ESRF-Chopper, Wulff et al. (1997)).

Verbesserung zeitaufgelöster Experimente mit dem Spiegelchoppersystem

Das Testexperiment an met-Mb hat gezeigt, daß mit dem Spiegelchopper Datensätze von guter Qualität aufgenommen werden können. Es wurde eine Bragg-Auflösung der Beugungsdaten von 1,65 Å erreicht, die sogar um 0,35 Å höher liegt als die des am ESRF an Mb*CO durchgeführten Experiments. Der mittlere Positionsfehler der Atome bewegt sich mit $\approx 0,36$ Å in der Nähe der Amplituden der erwarteten Konformationsänderungen, doch ist ein noch geringerer Fehler auf die Atompositionen zur genaueren Analyse etwaiger Strukturänderungen wünschenswert. Eine Verkleinerung dieses Fehlers und eine Verbesserung der Datenqualität lassen sich durch höhere Vollständigkeit, höhere Bragg-Auflösung und durch Optimierung der Anregung realisieren. Diese Aspekte sind i. f. diskutiert:

Vollständigkeit. Zum Erreichen höherer Vollständigkeit sollte versucht werden, einen größeren Rotationsbereich abzudecken, der gegenwärtig durch die Haltekonstruktion auf 110° beschränkt ist. Diese muß derart verbessert werden, daß sie einen geringeren Raumwinkelbereich der Streuung bei den Randwinkeln des Meßbereichs abschattet als bisher.

Bragg-Auflösung. Höhere Auflösung kann durch eine höhere Anzahl an stroboskopischen Wiederholungen erzielt werden, falls der Kristall hinreichend gut streut. Die erforderliche Anzahl an Belichtungen zu einer Verbesserung der bisher erreichten Auflösung von 1,65 Å auf 1,5 Å bzw. 1,3 Å soll i. f. abgeschätzt werden. Hierzu wird für eine Messung bis zu einer höheren Auflösung d_2 in der äußersten Auflösungsschale dasselbe Signal/Rausch-Verhältnis SN gefordert wie in einer Messung bis zu geringerer Auflösung d_1 , $SN(d_1) = SN(d_2)$, um etwa dieselbe Datenqualität bei d_2 zu erhalten. Das Signal/Rausch-Verhältnis berechnet sich aus der Intensität I_R und dem Rauschen $\sigma_R = \sqrt{I_R}$ eines gemessenen Reflexes, unter der Annahme der Gültigkeit von Zählstatistik für I_R und den Strahlungsuntergrund I_U , wie folgt, wobei I_{RU} dem eigentlichen Meßwert ohne Untergrundsubtraktion entspricht,

$$I_R = I_{RU} - I_U \quad (6.1)$$

$$\sigma_R^2 = \sigma_{RU}^2 + \sigma_U^2 = I_R + 2 I_U \quad (6.2)$$

$$SN = \frac{I_R}{\sigma_R} = \frac{I_R}{\sqrt{I_R + 2 I_U}} \quad (6.3)$$

Sowohl der Untergrund als auch das Streusignal des Reflexes sind proportional zur Belichtungszeit t , die von der Anzahl der belichtenden Synchrotronpulse n_{BX} abhängt. Es gilt daher $I_R = i_R n_{BX}$ und $I_U = i_U n_{BX}$, wobei i_R bzw. i_U für den Reflex- bzw. Untergrundbeitrag stehen, den ein Synchrotronpuls im Mittel zur Messung beiträgt. Mit Gl. 6.3 folgt dann für SN,

$$SN = \frac{i_R}{\sqrt{i_R + 2 i_U}} \sqrt{n_{BX}}, \quad (6.4)$$

und mit der Forderung $SN(d_1, n_{BX}) = SN(d_2, n'_{BX})$ ergibt sich,

$$\frac{i_R^{d_1} \sqrt{n_{BX}}}{\sqrt{i_R^{d_1} + 2 i_U^{d_1}}} = \frac{i_R^{d_2} \sqrt{n'_{BX}}}{\sqrt{i_R^{d_2} + 2 i_U^{d_2}}}, \quad (6.5)$$

wobei i_R^d bzw. i_U^d den Intensitätsbeitrag bei der entsprechenden Auflösung bezeichnen. Mit der gerechtfertigten Annahme, daß bei hoher Auflösung $i_R \ll i_U$ und der Näherung, daß der Untergrund bei d_2 denselben Wert hat wie bei d_1 , folgt aus Gl. 6.5 für die erforderliche Anzahl der Synchrotronpulse,

$$n'_{BX} = \frac{i_U^{d_2}}{i_U^{d_1}} \left(\frac{i_R^{d_1}}{i_R^{d_2}} \right)^2 n_{BX} \approx \left(\frac{i_R^{d_1}}{i_R^{d_2}} \right)^2 n_{BX}. \quad (6.6)$$

Zur Abschätzung des Verhältnisses der Konstanten $i_R^{d_1}$ und $i_R^{d_2}$ können die Intensitäten der hochaufgelösten, monochromatischen Messung an met-Myoglobin von Kachalova et al. (1999) herangezogen werden, da die Abhängigkeit des Streuvermögens von der Auflösung bei gegebenen Temperaturfaktoren eine typische Eigenschaft der Atome des Myoglobins in der Einheitszelle und somit weitestgehend auf die Laue-Messung übertragbar ist. In Abb. 6.1 ist analog einer Wilson-Graphik der natürliche Logarithmus der über einen $\frac{1}{d^2}$ -Bereich von $0,0071 \text{ \AA}^{-2}$ gemittelten Reflexintensität $\overline{I_{met-Mb}(d)}$ über $\frac{1}{d^2}$ aufgetragen (\bullet), darunter dieselbe Kurve für die Intensitäten der Laue-Messung. Die Steigungen beider Kurven sind ungefähr identisch, was die obige Feststellung bezüglich des Streuvermögens bestätigt. Aus den Daten können die Werte der Intensitäten in willkürlichen Einheiten ermittelt werden, $I_R^{1,65\text{\AA}} = 2924$, $I_R^{1,5\text{\AA}} = 1701$ und $I_R^{1,3\text{\AA}} = 616$. Die Verhältnisse ergeben sich dann mit Gl. 6.6 zu

$$\left(\frac{I_R^{1,65\text{\AA}}}{I_R^{1,5\text{\AA}}} \right)^2 = \left(\frac{i_R^{1,65\text{\AA}}}{i_R^{1,5\text{\AA}}} \right)^2 = 3,0 \quad \text{und} \quad \left(\frac{i_R^{1,65\text{\AA}}}{i_R^{1,3\text{\AA}}} \right)^2 = 22,5. \quad (6.7)$$

Die notwendige Anzahl an Wiederholungen zum Erreichen höherer Auflösung beim Chopperexperiment berechnet sich dann mit Gl. 6.6 und der Anzahl der Synchrotronpulse des Testexperiments $n_{BX}^{1,65\text{\AA}} = 3500$ zu $n_{BX}^{1,5\text{\AA}} = 10500$ bzw. $n_{BX}^{1,3\text{\AA}} = 79000$ pro Orientierung.

Bei Auflösungen von 1,5 bzw. 1,3 Å bewegt sich der Positionsfehler dann grob bei 0,14 bzw. 0,11 Å*. Ein Fehler von 0,14 Å wäre schon hinreichend, um mittels

*Diese Werte entsprechen den Positionsfehlern einiger Proteinstrukturen bei Auflösungen von 1,5 bzw. 1,3 Å (Cruickshank 1999).

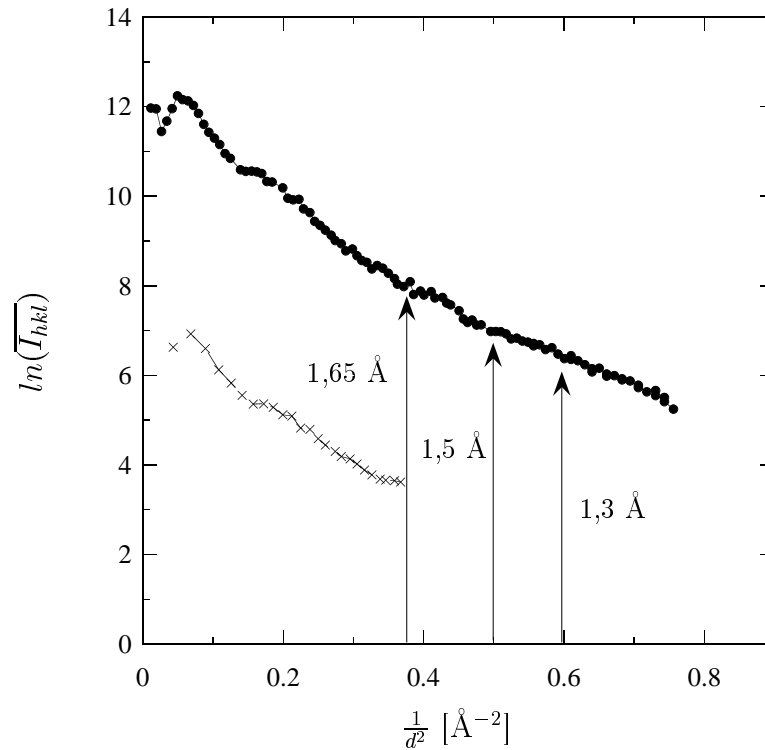


Abbildung 6.1: *Logarithmus der mittleren Reflexintensitäten (nicht skaliert) innerhalb eines $\frac{1}{d^2}$ -Bereichs von $0,0071 \text{ \AA}^{-2}$ aufgetragen gegen $\frac{1}{d^2}$. Die obere Kurve zeigt die Intensitäten der hochaufgelösten, monochromatischen Daten (\bullet), die untere die der Laue-Messung (\times).*

der Informationen aus den hochaufgelösten, statischen Messungen an MbCO und deoxy-Mb die Konformationsänderungen nach der photolytischen Abspaltung zu identifizieren. Der Erhöhung der stroboskopischen Belichtungen der Probe um einen Faktor 3 spricht von der apparativen Seite her nichts entgegen, jedoch müßte der Einfluß der höheren Röntgen- bzw. Laserstrahlendosis auf den Kristall erst noch untersucht werden. Eine Erhöhung der Strahlendosis um einen Faktor 3 liegt jedoch durchaus im Bereich des Möglichen, da der Kristall des Testexperiments während statischer und zeitaufgelöster Messung bereits rund 6500 Pulse pro Orientierung ohne erkennbare Schäden überstanden hat. Die Aufnahme eines Laue-Bildes mit 10500 Pulsen würde bei einer stroboskopischen Rate von wie bisher 1,7 Hz knapp 2 Stunden pro Laue-Bild dauern, also ca. 12 h pro Datensatz. Zum Erreichen noch höherer Auflösung (1,3 Å) beliefe sich die Meßzeit auf 90 h, wobei hier Strahlenschädigung wahrscheinlich nicht mehr vernachlässigt werden kann. In Anbetracht der langen Meßdauer bietet es sich dann eher an, die Möglichkeiten intensiverer Quellen zu nutzen. Der Einsatz des Bayes-Auswerteverfahrens ist dann umso zwingender, damit die Anzahl der notwendigen Kristallorientierungen und somit die Strahlendosis minimiert werden kann.

Optimierung der Anregungsbedingungen. Ein nächster Schritt zur Verbesserung des Experiments besteht darin, die Anregungsbedingungen für ein zeitaufgelöstes MbCO-Experiment zu optimieren, um eine hohe Besetzung des Anregungszustandes für ein starkes Streusignal zu erzielen. Dies ist zur Identifikation der intermediären Zustände ebensowichtig wie hohe Auflösung und geringer Positionsfehler. Die Anregungsbedingungen sind zwar abgeschätzt worden, doch beim gegenwärtigen Aufbau fehlt noch ein zeitauflösendes Einkristallspektrometer, um den tatsächlichen Photolysegrad des Kristalls zu überprüfen und den Zeitverlauf der Rekombination parallel zur Beugungsmessung spektroskopisch erfassen zu können. Die so gewonnenen Informationen sind außer zur Optimierung der Anregungsbedingungen insbesondere auch zur späteren Interpretation der Strukturdaten von hoher Bedeutung, weswegen eine entsprechende Apparatur eine wichtige Ergänzung zum vorhandenen Laser- und Choppersystem darstellen würde.

Neben zeitaufgelösten Experimenten mit ns-Zeitauflösung lassen sich mit dem Spiegelchopper auch Experimente mit geringerer Zeitauflösung durchführen, z. B. im Mikrosekunden- bis Sekundenbereich, wobei der Füllmodus des Rings dabei keine Rolle mehr spielt. Der Chopper erlaubt es hierbei, die Belichtungszeiten flexibel zu wählen, indem der Spiegel bei langsamerer Geschwindigkeit, oder für Zeitauflösungen im Submillisekunden- bis Sekundenbereich, der Scheibenchopper bzw. der Strahlverschluß alleine betrieben wird. Die maximale stroboskopische Wiederholrate des Experiments wird hierbei durch die Blitzlampenfrequenz des Nd:YAG-Lasers auf 5,5 Hz beschränkt, und die Laserwellenlänge kann im Bereich vom UV bis ins IR variiert werden. Das Spiegelchoppersystem zeichnet sich somit durch einen breiten Bereich in der möglichen Zeitauflösung und den Anregungsbedingungen aus, so daß es eine hohe Flexibilität für potentielle Anwendungen nicht nur biologischer Proben bietet.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein experimenteller Aufbau am Proteinkristallographiestrahl BW6/DORIS entwickelt und konstruiert, der stroboskopische Laue-Beugungsexperimente mit Zeitaufösungen bis hin zum Nanosekundenbereich ermöglicht. Hierzu wurde ein neuartiges Choppersystem entwickelt, das auf einem langsamen Strahlverschluss, einem Scheibenchopper und einem rotierenden Spiegel basiert, der den Lichthebelarm zu einer Blende ausnutzt, um extrem kurze Öffnungszeitfenster zu erzeugen, wie sie mit anderen Choppnern für weiße Röntgenstrahlung bisher nicht erreicht wurden. Die Zeitfenster von 440 ns Dauer (5%-Breite) erlauben, sowohl im Einzel- als auch im Zweipuls-Modus von DORIS einzelne, polychromatische Röntgenpulse für stroboskopische Anregungsexperimente aus dem Synchrotronpulszug zu extrahieren. Zur Anregung photolytisch induzierbarer Reaktionen wurde ein Farbstofflasersystem aufgebaut, dessen Pulse über einen Lichtwellenleiter zur Probe gelangen. Die Synchronisation zwischen Choppersystem, Laser- und Synchrotronpuls regelt eine Triggerlogik, die es erlaubt, den Zeitabstand zwischen den Pulsen auf $\pm 0,8$ ns im Einzel- und $\pm 2,4$ ns im Zweipuls-Modus konstant zu halten. In jedem Fall dominiert jedoch die Breite des Laserpulses von 7 ns die Zeitauflösung. Der Zeitabstand zwischen Laser- und Synchrotronpuls wird mit einer eigens entwickelten Meßanordnung überwacht und ist innerhalb eines ausgedehnten Zeitbereichs (ns–s) einstellbar. Als Vorbereitung auf ein zeitaufgelöstes Experiment an dem photoaktiven CO-Myoglobin wurden die Anregungsbedingungen für eine möglichst vollständige Photolyse abgeschätzt, und eine notwendige Energiedichte von $9,3 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ bei 658 nm ermittelt. Ein Zerstörtest verifiziert, daß der MbCO-Kristall innerhalb einer Fließzelle über 50000 Laserpulsen dieser Energiedichte standhält, ohne Schäden davonzutragen, genauso wie ein met-Mb-Kristall, bei dem aufgrund seines höheren Absorptionsvermögens eine Energiedichte von $2,5 \frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ benutzt wurde. Die Funktionalität des Gesamtsystems wurde anhand eines zeitaufgelösten Experiments an monoklinem met-Myoglobin überprüft, das weltweit das dritte Laue-Beugungsexperiment an einer Proteinstruktur mit ns-Zeitauflösung darstellt. Die Messungen von statischer und angeregter Struktur erzielten mit je 3500 einzelnen Synchrotronpulsen pro Laue-Bild und unter Anwendung eines speziellen Auswerteverfahrens eine Vollständigkeit von 71 %, obwohl der zugängliche reziproke Raum auf nur 110° beschränkt war. Beide Datensätze erreichten eine Bragg-Auflösung von $1,65 \text{ \AA}$ bei einem mittleren Fehler auf die Atompositionen von $\approx 0,36 \text{ \AA}$. Es wurden Elektronendichtekarten von guter Qualität berechnet, in denen

Strukturdetails erkennbar sind. Die Differenzfourierdichte zwischen beiden Strukturen enthält oberhalb eines Kontourniveaus von 4σ noch fünf Differenzdichten in der Häm-Umgebung, wobei die Bedeutung dieser Dichten nicht eindeutig geklärt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, daß mittels des Spiegelchoppersystems Laue-Daten sowohl hoher Zeit- als auch Bragg-Auflösung mit hinreichender Vollständigkeit an DORIS aufgenommen werden können, und deswegen für ein Anregungsexperiment an CO-Myoglobin gute Chancen bestehen, die Trajektorie des COs nach der photolytischen Abspaltung und damit einhergehende Konformationsänderungen zu identifizieren, insbesondere, da anhand des Experiments an met-Myoglobin verifiziert wurde, daß thermische Effekte der Photonenabsorption die Proteinstruktur nicht relevant beeinflussen.

Anhang A

Berechnung des Akzeptanzwinkels

Zur Berechnung des Öffnungszeitfensters nach Gl. 3.2,

$$\Delta t_S = \frac{\Delta\varphi}{2\pi f},$$

muß der Akzeptanzwinkelbereich $\Delta\varphi$ ermittelt werden. Hierzu werden i. f. die beiden Grenzanstellwinkel des Spiegels, φ_- und φ_+ , berechnet, bei denen gerade noch Strahlung durch den Kollimator hindurchtreten kann. Sie sind von der Divergenz der Strahlung abhängig und somit von dem minimalen und maximalen Winkel der Strahlen gegenüber der optischen Achse, α_- und α_+ , die in der Winkelverteilung des einfallenden Strahlenbündels auftreten (s. Abb. A.1). Rotiert der Spiegel im Gegenuhrzeigersinn, so ist der minimale Anstellwinkel φ_- erreicht, wenn der Strahl mit Winkel $\alpha_- < 0$ zur optischen Achse von der vorderen Kante des Spiegels zur Oberkante des Kollimators reflektiert wird, der maximale φ_+ , wenn der Strahl mit $\alpha_+ > 0$ von der hinteren Kante des Spiegels auf die Unterkante des Kollimators trifft (nicht dargestellt). Der minimale und der maximale Anstellwinkel für Reflexion durch die Blende ist gegeben durch,

$$\varphi_- = \alpha_- + \varepsilon_-(\varphi) \quad (\text{A.1})$$

$$\varphi_+ = \alpha_+ + \varepsilon_+(\varphi), \quad (\text{A.2})$$

wobei $\varepsilon_-(\varphi)$ und $\varepsilon_+(\varphi)$ die korrespondierenden Einfallswinkel auf den Spiegel in Abhängigkeit des momentanen Anstellwinkels φ sind (s. Abb. A.1 und Abb. 3.6). Zur Berechnung von $\Delta\varphi = \alpha_+ - \alpha_-$ muß ein Ausdruck für ε_- bzw. ε_+ in Abhängigkeit von φ gefunden werden. Ein Ausdruck für ε_- wird mit Hilfe der folgenden geometrischen Beziehungen aus Abb. A.1 abgeleitet, wobei l die halbe Länge des Spiegels, k die halbe Breite der Blende K3 und R der Abstand zwischen Spiegel und K3 ist:

$$a^2 = \sqrt{R^2 + k^2} \quad (\text{A.3})$$

$$\tan \vartheta = \frac{k}{R} \approx \vartheta \quad (\text{A.4})$$

$$\zeta = \varphi_0 - \vartheta - \varphi_- \quad (\text{A.5})$$

$$c^2 = e^2 + 4l^2 - 4el \cos \varepsilon_- \quad (\text{A.6})$$

$$a^2 = e^2 + l^2 - 2el \cos \varepsilon_- \quad (\text{A.7})$$

$$c^2 = a^2 + l^2 - 2la \cos \zeta. \quad (\text{A.8})$$

wobei e mittels Gl. A.10 eliminiert wurde. Der Term c^2 wird dann wieder durch Gl. A.8 ersetzt,

$$\cos \varepsilon_- = \frac{a \cos \zeta + l}{\sqrt{a^2 + l^2 + 2la \cos \zeta}}. \quad (\text{A.14})$$

Der Kosinus läßt sich für kleine Winkel nach der Potenzreihenentwicklung wie folgt annähern (Bronstein & Semendjajew 1987),

$$\cos \zeta = 1 - \frac{\zeta^2}{2} + O(4), \quad (\text{A.15})$$

daraus resultiert für Gl. A.14

$$1 - \frac{\varepsilon_-^2}{2} \approx \frac{a(1 - \frac{\zeta^2}{2}) + l}{\sqrt{a^2 + l^2 + 2la(1 - \frac{\zeta^2}{2})}} \quad (\text{A.16})$$

$$\approx \frac{a + l - \frac{a}{2}\zeta^2}{\sqrt{(a+l)^2 - a\zeta^2}}. \quad (\text{A.17})$$

Der Nenner läßt sich wie folgt entwickeln (Bronstein & Semendjajew 1987),

$$\frac{1}{\sqrt{A + Cx^2}} \approx \frac{1}{\sqrt{A}} \left(1 - \frac{1}{2} \frac{C}{A} x^2 + O(4) \right) \quad (\text{A.18})$$

$$A = (a+l)^2 \quad (\text{A.19})$$

$$C = -al \quad (\text{A.20})$$

$$\frac{1}{\sqrt{(a+l)^2 - \frac{\zeta^2}{2}}} = \frac{1}{a+l} \left(1 + \frac{al}{2(a+l)^2} \zeta^2 \right) \quad (\text{A.21})$$

woraus sich für Gl. A.16 ergibt:

$$1 - \frac{\varepsilon_-^2}{2} \approx \left(a + l - \frac{a}{2} \zeta^2 \right) \frac{1}{a+l} \left(1 + \frac{al}{2(a+l)^2} \zeta^2 \right) \quad (\text{A.22})$$

$$\approx 1 - \frac{a^2 \zeta^2}{2(a+l)^2} \zeta^2 + O(4) \quad (\text{A.23})$$

$$\implies \varepsilon_- \approx \frac{a}{a+l} \zeta. \quad (\text{A.24})$$

Durch Einsetzen von ζ (Gl. A.5) und durch analoge Berechnung für ε_+ erhält man,

$$\varepsilon_- \approx \frac{a}{a+l} (\varphi_0 - \vartheta - \varphi_-) \quad (\text{A.25})$$

$$\varepsilon_+ \approx \frac{a}{a-l} (\varphi_0 + \vartheta - \varphi_+), \quad (\text{A.26})$$

was durch Einsetzen in Gl. A.1 bzw. Gl. A.2 und durch Auflösen nach φ_- bzw. φ_+ auf die gesuchten Ausdrücke für die beiden geometrischen Grenzwinkel der Reflexion führt,

$$\varphi_- \approx \frac{1}{2a+l} ((a+l)\alpha_- + a(\phi_0 - \vartheta)) \quad (\text{A.27})$$

$$\varphi_+ \approx \frac{1}{2a-l} ((a-l)\alpha_+ + a(\phi_0 + \vartheta)). \quad (\text{A.28})$$

Hieraus ergibt sich dann der gesuchte Winkelbereich $\Delta\varphi = \varphi_+ - \varphi_-$ in Abhängigkeit der Divergenzwinkel α_- und α_+ ,

$$\Delta\varphi \approx \frac{a-l}{2a-l} \alpha_+ - \frac{a+l}{2a+l} \alpha_- + \frac{2a(2a\vartheta + l\phi_0)}{(2a+l)(2a-l)}. \quad (\text{A.29})$$

Die Variable a läßt sich wegen $k \ll R$ durch R ersetzen (Gl. A.3), und nach Gl. A.4 ist $R\vartheta \approx k$ und $2k$ die Gesamtbreite der Blende k_3 , so daß sich der Ausdruck wie folgt schreiben läßt:

$$\Delta\varphi \approx \frac{R-l}{2R-l} \alpha_+ - \frac{R+l}{2R+l} \alpha_- + \frac{2R(k_3 + l\phi_0)}{(2R+l)(2R-l)}. \quad (\text{A.30})$$

Literaturverzeichnis

- Alcalay, J. A. & Knuth, E. L. (1969). Molecular-beam time-of-flight spectroscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **40**: 438.
- Amemiya, J., Ito, K., Yagi, N., Asano, Y., Wakabayashi, K. & Ueki, Y. (1995). Large aperture TV detector with a beryllium-windowed image intensifier for x-ray diffraction, *Rev. Sci. Instrum.* **66**(2): 2290.
- Antonini, E. & Brunori, M. (1971). *Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands*, North-Holland, Amsterdam–London.
- Bartunik, H. D. (1983). Low-temperature and time-resolved protein crystallography using synchrotron radiation, *Nucl. Instr. Meth.* **208**(1–3): 523.
- Bartunik, H. D. (1984). Crystallographic investigation of transient states by time-resolved techniques using synchrotron radiation, *Rev. Phys. Appl.* **19**(9): 671.
- Bartunik, H. D., Bartsch, H. H. & Huang, Q. (1992). Accuracy in Laue x-ray diffraction analysis of protein structures, *Acta Cryst.* **A48**: 180.
- Bartunik, H. D., Bourenkov, G. & Kachalova, G. (1999). persönliche Mitteilung.
- Bilderback, D. H. (1983). Real-time x-ray-diffraction using synchrotron radiation - system characterization and applications, *Nucl. Instr. Methods* **1–3**: 495.
- Bizek, H. M. (1996). The Advanced Photon Source list of parameters.
URL: <http://www.aps.anl.gov/techpub/techbulletins/TB26/TB26.html>
- Bonifacio, R., DeSalvo, L., Pierini, P., Piovello, N. & Pellegrini, C. (1994). Spectrum, temporal structure, and fluctuations in a high-gain free-electron laser starting from noise, *Phys. Rev. Lett.* **73**(1): 70.
- Bourenkov, G. P., Popov, A. N. & Bartunik, H. D. (1996). A Bayesian approach to Laue diffraction analysis and its potential for time-resolved protein crystallography, *Acta Cryst.* **A52**: 797.
- Bourgeois, D., Ursby, T., Wulff, M., Pradervand, C., LeGrand, A., Schildkamp, W., Labouré, S., Šrajer, V., Teng, T. Y., Roth, M. & Moffat, K. (1996). Feasibility and realization of single-pulse Laue diffraction on macromolecular crystals at ESRF, *J. Sync. Rad.* **3**: 65.

- Bronstein, I. N. & Semendjajew, K. A. (1987). *Taschenbuch der Mathematik*, Verlag Harri Deutsch, pp. 375, 32.
- Brugger, R. M. (1965). Mechanical and time-of-flight techniques, in P. Egelstaff (ed.), *Thermal Neutron Scattering*, Academic Press, p. 53.
- Campbell, J. W. (1995). LAUEGEN, an X-windows-based program for the processing of Laue x-ray diffraction data, *J. Appl. Cryst.* **28**: 228.
- Campbell, J. W., Hao, Q., Harding, M. M., Nguti, N. D. & Wilkinson, C. (1998). LAUEGEN version 6.0 and INTLDM, *J. Appl. Cryst.* **31**: 496.
- Causgrove, T. P. & Dyer, R. B. (1996). Picosecond structural dynamics of myoglobin following photolysis of carbon monoxide, *J. Phys. Chem.* **100**: 3273.
- Chen, C. T. (1992). Raytracing, chopper and guideline for double-headed dragon monochromators, *Rev. Sci. Instrum.* **63**: 1229.
- Chen, Y., Šrajer, V., Ng, K., LeGrand & Moffat, K. (1994). Optical monitoring of protein crystals in time-resolved x-ray experiments: Microspectrophotometer design and performance, *Rev. Sci. Instrum.* **65**(5): 1506.
- Clarke, R. (1994). CCD x-ray detectors: opportunities and challenges, *Nucl. Instr. Methods* **347**: 529.
- Clifton, I. J., Elder, M. & Hajdu, J. (1991). Experimental strategies in Laue crystallography, *J. Appl. Cryst.* **24**: 267.
- Cork, C., Datte, P., Druillolle, F., Earnest, T., Millaud, J. & Xuong, N. H. (1999). Solid-state photon-counting detector for protein crystallography, *Sync. Rad. News* **12**(4): 7.
- Cruickshank, D. W. J. (1999). Remarks about protein structure precision, *Acta Cryst.* **D**(55): 583.
- Cruickshank, D. W. J., Helliwell, J. R. & Johnson, L. N. (1992). *Time-resolved macromolecular crystallography*, The Royal Society and Oxford Press.
- Cruickshank, D. W. J., Helliwell, J. R. & Moffat, K. (1987). Multiplicity distribution of reflections in Laue diffraction, *Acta Cryst.* **A43**(5): 656.
- Csonka, P. L. (1988). Equitemproal x-ray optics (time compression of x-ray pulses), *J. Appl. Phys* **64**(3): 967.
- Csonka, P. L. (1990). Transverse coherence saturation: A method to enhance the coherence of x-ray beams, *Phys. Rev. A* **41**(11): 6155.
- Doniach, S., Hodgson, K., Lindau, I., Pianetta, P. & Winick, H. (1997). Early work with synchrotron radiation at Stanford, *J. Sync. Rad.* **4**(6): 380.

- Donley, L. I. (1985). Phase locking the IPNS neutron choppers to the 60 Hz power line, in G. C. Stirling (ed.), *Neutron-scattering Techniques*, Vol. 3 of *Proceedings of the Eighth Meeting of the International Collaboration on Advanced Neutron Sources*, Rutherford Appleton Laboratory, p. 689.
- Drenth, J. (1995). *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer-Verlag, pp. 96., 246., 150.
- Duke, E. M. H., Wakatsuki, S., Hadfield, A. & Johnson, L. N. (1994). Laue and monochromatic diffraction studies on catalysis in phosphorylase b crystals, *Protein Science* **3**: 1178.
- Dunning, J. R., Pegram, G. A., Fink, G. A., Mitchell, D. P. & Segre, E. (1935). *Phys. Rev.* **48**: 704.
- Emery, L. (1999). persönliche Mitteilung, e-mail: emery@aps.anl.gov.
- Fermi, E., Marshall, J. & Marshall, L. (1947). *Phys. Rev.* **72**: 193.
- Franzen, S., Bohn, B., Poyart, C., DePillis, G., Boxer, S. G. & Martin, J. L. (1995). Functional aspects of ultra-rapid heme-doming in hemoglobin, myoglobin and the myoglobin mutant h93g, *J Biol Chem* **270**(4): 1718.
- Goodhew (1999). Characteristics of beam modes at the ESRF (2-transmitter mode).
URL: <http://www.esrf.fr/machine/myweb/MODES.html>
- Gruner, S. M. (1987). Time-resolved x-ray diffraction of biological materials, *Science* **238**: 305.
- Hajdu, J. & Andersson, I. (1993). Fast crystallography and time-resolved structures, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**: 467.
- Hartmann, H., Zinser, S., Komninos, P., Schneider, R. T., Nienhaus, G. U. & Parak, F. (1996). X-ray structure of a metastable state of carbonmonoxy myoglobin after photodissociation, *Biophysics*, Vol. 93 of *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p. 7013.
- HASYLAB (1999). Parameters of DORIS III.
URL: <http://www-hasylab.desy.de/facility/doris/parameters.htm>
- Hauer, A. A. & Kyrala, G. A. (1997). Laser-plasma x-ray emission: its creation, diagnosis and applications in transient diffraction, in J. R. Helliwell & P. M. Rentzepis (eds), *Time-Resolved Diffraction*, Clarendon Press: Oxford, p. 71.
- Helliwell, J. R. (1992a). *Macromolecular crystallography with synchrotron radiation*, 1 edn, Camb. Univ. Press.
- Helliwell, J. R. (1992b). Synchrotron x-ray crystallography techniques: Time-resolved aspects of data collection, *Philos. Trans. R. Soc.* **A340**: 221.

- Henke, B. L., Gullikson, E. M. & Davis, J. C. (1993). X-ray interactions: photoabsorption, scattering, transmission and reflection at 50–30000 eV, $Z = 1-92$, **54**: 181.
URL: also http://www-cxro.lbl.gov/optical_constants
- Jackson, J. D. (1975). *Classical Electrodynamics*, 2nd edn, John Wiley & Sons.
- Jones, T. A. (1991). A modeling environment for map interpretation, *Abstr Pap Am Chem S* **202**(1): 29.
URL: <http://xray.bmc.uu.se/~alwyn/>
- Jones, T. J. L., Parker, J. H. & Davidson, I. (1985). Experience with the KFA/IGV (Jülich) magnetic bearing system on an SNS neutron chopper, in G. C. Stirling (ed.), *Neutron-Scattering Techniques*, Vol. 3 of *Proceedings of the Eighth Meeting of the International Collaboration on Advanced Neutron Sources*, Rutherford Appleton Laboratory, p. 707.
- Kachalova, G. S., Popov, A. N. & Bartunik, H. D. (1999). A steric mechanism for inhibition of CO binding to heme proteins, *Science* **284**: 473.
- Kampf, S. (1989a). Bedienungsanleitung für den schnellen mechanischen Chopper, *Technical Report F41 89-01*, HASYLAB/DESY.
- Kampf, S. (1989b). *Bildung und Zerfall der heteronuklearen Edelgasexzimer KrAr, KrNe, XeKr, XeAr*, PhD thesis, Universität Hamburg.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H., Parrish, R. G., Wyckoff, H. & Phillips, D. C. (1958). *Nature* **181**: 662.
- Kizler, P., Schneider, J. R. & Bayer, E. G. (1992). Rotating crystal pulse selector for the separation of single synchrotron radiation flashes in the x-ray regime, *Nucl. Instr. Methods* **A313**: 546.
- Kosciesza, D. & Bartunik, H. D. (1999). Extraction of single bunches of synchrotron radiation from storage rings with an x-ray chopper based on a rotating mirror, *J. Sync. Rad.* **6**(5): 947.
- Larson, B. C., White, C., Noggle, T. & Mills, D. M. (1982). Synchrotron x-ray diffraction study of silicon during pulsed-laser annealing, *Phys. Rev. Lett.* **48** (5): 337.
- LeGrand, A. D., Schildkamp, W. & Blank, B. (1989). An ultrafast mechanical shutter for x-rays, *Nucl. Instr. Methods* **A275**: 442.
- Lewis, R., Helsby, W., Jones, A., Hall, C., Parker, B., Sheldon, J., Clifford, P., Hillen, M., Sumner, I., Fore, N., Jones, R. & Roberts, K. (1997). The "RAPID" high rate large area x-ray detector system, *Nucl. Instr. Methods* **392A**(1–3): 32.
- Lim, M., Jackson, T. A. & Anfinrud, P. A. (1995). Binding of CO to myoglobin from a heme pocket docking site to form linear Fe-CO, *Science* **269**: 962.

- Lim, M., Jackson, T. A. & Anfinrud, P. A. (1997). Ultrafast rotation and trapping of carbon monoxide dissociated from myoglobin, *Nat. Struct. Bio.* **4**(3): 209.
- mar research (1998). *The mar345 Image Plate Detector*.
URL: <http://www.marresearch.com/marip.htm>
- Massa, W. (1996). *Kristallstrukturbestimmung*, Teubner.
- Menk, R. H. & Sarvestani, A. (1999). Novel gaseous imaging detectors for advanced biological diffraction studies, *Sync. Rad. News* **12**(4): 14.
- Mills, D. M. (1989). Feasibility study into the use of mechanical choppers to alter the time structure of the APS, *Rev. Sci. Instrum.* **60**(7): 2338.
- Mizutani, Y. & Kitagawa, T. (1997). Direct observation of cooling of heme upon photodissociation of carbonmonoxy myoglobin, *Science* **278**: 443.
- Moffat, K. (1989). Time-resolved macromolecular crystallography, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**: 309.
- Moon, K., Allinson, M. N. & Helliwell, J. R. (1994). High-speed acquisition system for Laue diffraction patterns, *Nucl. Instr. Methods A* **348**: 631.
- Morse, J. (1996). Fast CCD camera and data acquisition, *ESRF Annual Report 1995-96* p. 72.
URL: <http://www.esrf.fr/info/science/annrep/95-96/report/exp/detector/detector.htm>
- Murnane, M. M., Kapteyn, H. C. & Falcone, R. W. (1990). X-ray streak camera with 2 ps resolution, *Appl. Phys. Lett.* **56**: 1948.
- Naday, I., Westbrook, E. M., Westbrook, M. L., Travis, D. J., Stanton, M., Phillips, W. C., Omara, D. & Xie, J. H. (1994). Characterization and data-collection on a direct-coupled CCD x-ray-detector, *Nucl. Instr. Methods A* **348**(2-3): 635.
- Nikitenko, S. G., Tolochko, B. P., Aleshaev, A. N., Kulipanov, G. N. & Mishnev, S. I. (1996). XANES registration by electron beam position scanning for time-resolved experiments, *Proc. XAFS IX Conference, Grenoble, France*.
- Nutter, M., Lewis, L., Tepper, S., Silver, R. N. & Heffner, R. H. (1985). Neutron chopper development at LANSCE, in G. C. Stirling (ed.), *Neutron-Scattering Techniques*, Vol. 3 of *Proceedings of the Eighth Meeting of the International Collaboration on Advanced Neutron Sources*, Rutherford Appleton Laboratory, p. 697.
- Olson, J. S. & Phillips, G. N. (1996). Kinetic pathway and barriers for ligand binding to myoglobin, *J. Bio. Chem.* **271**(30): 17593.

- Ostrowski, G. E., Donley, L. I., Rauchas, A. V., Volk, G. J., Jung, E. A., Haumann, J. R. & Pelizzari, C. A. (1985). The IPNS chopper control and accelerator interface systems, in G. C. Stirling (ed.), *Neutron-Scattering Techniques*, Vol. 3 of *Proceedings of the Eighth Meeting of the International Collaboration on Advanced Neutron Sources*, Rutherford Appleton Laboratory, p. 676.
- Perman, B., Šrajer, V., Ren, Z., Teng, T., Pradervand, C., Ursby, T., Bourgeois, D., Schotte, F., Wulff, M., Kort, R., Hellingwerf, K. & Moffat, K. (1998). Energy transduction on the nanosecond time scale: Early structural events in a xanthopsin photocycle, *Science* **279**: 1946.
- Pruss, D., Huber, G., Danielmeyer, H. G. & Bartunik, H. D. (1984). Nanosecond time-resolved diffraction study of laser-excited $5d_1$ state in CeP_5O_{14} , *Acta Cryst.* **A40**: 401.
- Rapp, G., Poole, K. J., Maeda, Y., Guth, K., Hendrix, J. & Goody, R. S. (1986). Time-resolved structural studies on insect flight-muscle after photolysis of caged-ATP, *Biophys. J.* **50**(5): 993.
- Ren, Z. & Moffat, K. (1995a). Deconvolution of energy overlaps in Laue diffraction, *J. Appl. Cryst.* **28**: 482.
- Ren, Z. & Moffat, K. (1995b). Quantitative analysis of synchrotron Laue diffraction patterns in macromolecular crystallography, *J. Appl. Cryst.* **28**: 461.
- Sage, J. T. & Jee, W. (1997). Structural characterization of the myoglobin active site using infrared crystallography, *J. Mol. Biol.* **274**: 21.
- Sarvestani, A., Besch, H. J., Menk, R. H., Pavel, N., Sauer, N., Strietzel, C. & Walenta, A. H. (1998). Study of the high rate performance of the MicroCAT detector, *Proceedings of the 6th International Conference of Advanced Technology in Particle Physics*, Villa Olmo, Como, Italy.
URL: http://www.physik.uni-siegen.de/walenta/wtcr_pub.html
- Schlichting, I., Almo, S. C., Rapp, G., Wilson, K., Petreatos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E. F., Petsko, G. A. & Goody, R. S. (1990). Time-resolved x-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras P2₁ protein on GTP hydrolysis, *Nature* **345**: 309.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Phillips, G. N. & Sweet, R. M. (1994). Crystal structure of photolyzed carbonmonoxy-myoglobin, *Nature* **371**: 808.
- Schneider, J. R. (1997). Properties and scientific perspectives of a single pass x-ray free-electron laser, *Nucl. Inst. Methods* **A398**: 41.
- Sheldrick, G. M. (1997). *SHELXL-97*, Göttingen, Germany.
URL: <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/>
- Spectra-Physics (1998). *Quanta-Ray INDI, Pulsed Nd:YAG-Laser*.

- Springer, B. A., Sligar, S. G., Olson, J. S. & Phillips, G. N. (1994). Mechanism of ligand recognition in myoglobin, *Chem. Rev.* **94**: 699.
- Šrajer, V., Teng, T., Ursby, T., Pradervand, C., Ren, Z., Adachi, S., Schildkamp, W., Bourgeois, D., Wulff, M. & Moffat, K. (1996). Photolysis of the carbon monoxide complex of myoglobin: Nanosecond time-resolved crystallography, *Science* **274**: 1726.
- Subramaniam, S., Lindahl, M., Bullough, P., Faruqi, A. R., Tittor, J., Oesterhelt, D., Brown, L., Lanyi, J. & Henderson, R. (1999). Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle, *J. Molec. Bio.* **287**(1): 145.
- Szebenyi, D. M. E., Bilderback, D. H., LeGrand, A., Moffat, K., Schildkamp, W., Temple, B. S. & Teng, T. (1992). Quantitative analysis of Laue diffraction patterns recorded with a 120 ps exposure from an x-ray undulator, *J. Appl. Cryst* **25**: 414.
- Tatchyn, R. & Boyce, R. (1984). A UHV chopper design for SSRL, *Nucl. Inst. Methods* **222**: 345.
- Teng, T. Y., Šrajer, V. & Moffat, K. (1994). Photolysis-induced structural changes in single crystals of carbonmonoxy myoglobin at 40 K, *Struct. Bio.* **1**(10): 701.
- Tucoulou, R., Roshchupkin, D. V., Mathon, O., Schelokov, I. A., Brunel, M., Ziegler, E. & Morawe, C. (1998). High-frequency x-ray beam chopper based on diffraction by surface acoustic waves, *J. Sync. Rad.* **5**: 1357.
URL: <http://www.esrf.fr/info/science/highlights/97-98/TECHNIQU.htm>
- Ursby, T. (1998). *From time-averaged to time-resolved crystallography: Studies on superoxide dismutase and myoglobin*, PhD thesis, Lund University, Sweden.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1992). *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft.
- Welnak, C., Chen, G. J. & Cerrina, F. (1994). SHADOW - A synchrotron-radiation and x-ray optics simulation tool, *Nucl. Inst. Methods* **A246**: 337.
- Wulff, M., Schotte, F., Naylor, G., Bourgeois, D., Moffat, K. & Mourou, G. (1997). Time-resolved structures of macromolecules at the ESRF: Single-pulse Laue diffraction, stroboscopic data collection and femtosecond flash photolysis, *Nucl. Instr. Methods* **A398**: 69.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Der *Max-Planck Gesellschaft* für die finanzielle Unterstützung sowie den *Max-Planck Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie* für die guten Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. R. L. Johnson für die offizielle Betreuung und das kritische Lesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. E. Gerdau für die Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. H. D. Bartunik für die interessante Themenstellung, die konstruktive Kritik und die Betreuung dieser Arbeit.

Insbesondere *Gleb Bourenkov*, für die ausführliche und immer aufschlußreiche Beantwortung meiner vielen Fragen, besonders in bezug auf die Laue-Datenauswertung, und *Dr. Galina Kachalova* für die Präparation der Kristalle. Außerdem zeigten beide ständige Bereitschaft zur Diskussion und unterstützten mich während der Meßnächte.

Dr. Peter Boesecke und *Dr. Alexander Popov* für ihre Hilfe bei den Experimenten.

Den Ingenieuren *Axel Bonsen*, *Andre Hagestedt*, *Dirk Hamann*, *Klaus Knaack*, *Arne Rick* und *Roland Stange* für die Beratung und Hilfe bei der Lösung technischer Probleme.

Wolfgang Cleophas für die flinke Anfertigung der von mir benötigten Chopperteile.

Birgitta Fried für die Präparation von Kristallen und die Hilfe im Labor.

Susanne Meier und *Christiana Radzwill*, die immer eine Antwort auf die Problemchen eines Institutsalltags wußten und stets hilfsbereit waren.

Den Systemadministratoren *Hannes Blume*, *Frank Müller* und *Carsten Thieswal* für die Lösung mancher Computerprobleme.

Der *EMBL-* und der *HASYLAB-Werkstatt* sowie der *HASYLAB-Vakuumgruppe* für die technische Unterstützung und das Ausleihen verschiedener Geräte.

Den *Angestellten der Verwaltung* der Max-Planck Arbeitsgruppen für zahlreiche Dienste.

Jan Hauschild, *Dr. Ingo Kölln*, *Andrej Lebedev* sowie Gästen unserer Arbeitsgruppe und allen anderen, die ich vergessen habe, für diverse Tips, Kollegialität, moralische Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer bestens unterstützt haben, sowie meiner Freundin *Lene Christoffersen*, der ich nicht immer so viel Aufmerksamkeit schenken konnte, wie sie es eigentlich verdient gehabt hätte.