

# 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  $110^\circ$  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  $4\sigma$  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.