

Institut für Biologie und Biochemie
Professur für physikalische Biochemie

**Zirkulardichroismus-Messungen mit Synchrotronstrahlung am BESSY:
Möglichkeiten und Grenzen bei der Untersuchung biologischer Proben**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Jan Lengefeld

Potsdam, Januar 2010

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0
Unported
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4426/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-44263](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-44263)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-44263>

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten und Grenzen für Zirkulardichroismus-Messungen mit Synchrotronstrahlung untersucht. Dazu wurde ein Messaufbau für Zirkulardichroismus-Messungen an zwei Strahlrohren am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung eingesetzt, die für Messungen im Bereich des ultravioletten Lichts geeignet sind. Eigenschaften der Strahlrohre und des Messaufbau wurden in einigen wichtigen Punkten mit kommerziellen Zirkulardichroismus-Spektrometern verglichen.

Der Schwerpunkt lag auf der Ausdehnung des zugänglichen Wellenlängenbereichs unterhalb von 180 nm zur Untersuchung des Zirkulardichroismus von Proteinen in diesem Bereich. In diesem Bereich ist es nicht nur die Lichtquelle sondern vor allem die Absorption des Lichts durch Wasser, die den Messbereich bei der Messung biologischer Proben in wässriger Lösung einschränkt.

Es wurden Bedingungen gefunden, unter denen der Messbereich auf etwa 160 nm, in einigen Fällen bis auf 130 nm ausgedehnt werden konnte. Dazu musste die Pfadlänge deutlich reduziert werden und verschiedenen Probenküvetten wurden getestet. Der Einfluss der dabei auftretenden Spannungsdoppelbrechung in den Probenküvetten auf das Messsignal konnte mit einem alternativen Messaufbau deutlich reduziert werden. Systematische Fehler im Messsignal und auftretende Strahlenschäden begrenzen jedoch die Zuverlässigkeit der gemessenen Spektren.

Bei Proteinfilmern schränkt die Absorption von Wasser den Messbereich kaum ein. Es wurden jedoch meist deutliche Unterschiede zwischen den Spektren von Proteinfilmern und den Spektren von Proteinen in wässriger Lösung festgestellt. Solange diese Unterschiede nicht minimiert werden können, stellen Proteinfilme keine praktikable Alternative zu Messungen in wässriger Lösung dar.

Summary

The possibilities and limitations for synchrotron radiation circular dichroism measurements were investigated in this thesis. Therefore an experimental setup to measure circular dichroism was used at two beamlines at the “Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung” (BESSY), which were suitable in the ultraviolet range of light. Properties of the beamlines and the experimental setup were compared to those of commercial circular dichroism spectrometer in some important points.

The focus was on the extension of the accessible wavelength range below 180 nm, with the aim to investigate the circular dichroism of proteins in that range. It is not only the light source that limits measurements with aqueous solutions in that range, but mainly the absorption of the light by water.

Conditions were found under which the wavelength range was extended to about 160 nm, in some cases even to 130 nm. To achieve this, a significant reduction of the pathlength was necessary. Several sample cells were tested for their usability. The effect of birefringence within the sample cells on the circular dichroism signal could be reduced strongly with an alternative experimental setup. However systematic errors in the circular dichroism signal and appearing radiation damage of the proteins limits the reliability of the measured spectra.

By using protein films, the light absorption by water is not a problem anymore. However, significant differences between the circular dichroism spectra of protein films and proteins in aqueous solution occurred in most of the cases. Unless these differences can be eliminated, measuring protein films is not an alternative to measurements in aqueous solution.

Abkürzungen, Formelzeichen und Konstanten

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACS	Ammoniumcampher-10-sulfonat
ASTRID	Aarhus Storage Ring in Denmark (Århus, Dänemark)
bzw.	beziehungsweise
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring - Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSRF	Beijing Synchrotron Radiation Facility (Beijing, China)
CB	zirkulare Doppelbrechung (<i>circular birefringence</i>)
CD	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
CPM	<i>channel photomultiplier</i>
CSA	Campher-10-sulfonsäure
CSP	Kälteschockprotein (<i>cold shock protein</i>)
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPM	duale Polarisationsmodulation (<i>dual polarization modulation</i>)
DSSP	<i>Definition of Secondary Structure of Proteins</i>
DTE	1,4-Dithioerythrit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GdmCl	Guanidiniumchlorid
Gl.	Gleichung
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HiSOR	Hiroshima Synchrotron Radiation Center (Hiroshima, Japan)
HZB	Helmholtz Zentrum Berlin für Materialien und Energie
LB	lineare Doppelbrechung (<i>linear birefringence</i>)
LD	Lineardichroismus (<i>linear dichroism</i>)
NIM	normal incidence Monochromator
NSLS	National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Lab, USA)
NSRL	National Synchrotron Radiation Laboratory (Hefei, China)
ORD	Optische Rotationsdispersion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principle component analysis</i>)
PEM	photoelastischer Modulator
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
RMSD	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPM	einfache Polarisationsmodulation (<i>single polarization modulation</i>)
SR	Synchrotron Strahlung (<i>synchrotron radiation</i>)
SRS	Synchrotron Radiation Source (Daresbury, Warrington, UK)
<i>T. m.</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett

Formelzeichen

Größe	Formelzeichen	Einheitenzeichen ¹
Absorption / Extinktion	A	--
Drehwinkel	ϕ, φ, β	°
Dissymmetrieverhältnis	g	--
Elliptizität	θ	°
Energie	E	J (eV)
Frequenz	ω	s ⁻¹
Konzentration	c	mol · l ⁻¹
molare Elliptizität	$[\theta]$	° · dmol ⁻¹ · cm ²
molarer Extinktionskoeffizient	ε	l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹
molarer Zirkulardichroismus	$\Delta\varepsilon$	l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹
Ordnung der Interferenz	m	--
Photonenfluss	Φ	Photonen · s ⁻¹
Pfadlänge	d	m
Phasenverschiebung	δ	--
Quantenausbeute	Q	Photon ⁻¹
Spannung	U	V
Gleichspannung	U_{DV}	
Hochspannung	U_{HV}	
Steuerspannung PEM	$U_{Vcontrol}$	
Wechselspannung	U_{AV}	
Strom	I	A
Ringstrom	I_{RC}	
Spiegelstrom (4. Spiegel)	I_{M4}	
Temperatur	T	K
	ϑ	°C
Verstärkung	σ	--
Volumen	V	l (m ³)
Wellenlänge	λ	m
Zeit	t	s (min, h, d)
Zirkulardichroismus	ΔA	--

Konstanten

Konstante	Formelzeichen	Betrag
Avogadrokonstante	N_A	6,022 137 · 10 ²³ mol ⁻¹
Elementarladung	e	1,602 177 · 10 ⁻¹⁹ C

¹ Bei den Einheitszeichen steht „--“ für dimensionslos. Bei Größen, bei denen mehr als eine Einheit verwendet wurde, steht das am häufigsten verwendete Einheitszeichen an erster Stelle und weitere in Klammern.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Summary	IV
Abkürzungen, Formelzeichen und Konstanten	V
Abkürzungen.....	V
Formelzeichen.....	VI
Konstanten	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 CD-Spektren von Proteinen	2
1.1.1 Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen anhand von CD-Spektren	3
1.2 CD-Spektren von Kohlenhydraten	5
1.3 CD-Spektren von Nukleinsäuren	5
1.4 Fragestellung	5
2 Grundlagen der Zirkulardichroismus-Spektroskopie	7
2.1 Extinktion und Absorption	7
2.2 Optische Aktivität und Zirkulardichroismus	7
2.3 Aufbau und Funktionsweise eines CD-Spektrometers	8
2.4 Berechnung der Extinktion über den Gleichspannungsanteil und die Photomultiplierhochspannung.....	11
3 Praktische Aspekte bei CD-Messungen.....	13
3.1 Fehlerquellen bei CD-Messungen	13
3.1.1 Statistische Fehler - Einfluss verschiedener Faktoren auf das Signal-Rausch-Verhältnis.....	13
3.1.1.1 Einfluss von Photonenfluss und spektraler Bandbreite.....	13
3.1.1.2 Einfluss der Quantenausbeute des Detektors	14
3.1.1.3 Einfluss der Messzeit	14
3.1.1.4 Einfluss der Absorption des Lösungsmittels	14
3.1.1.5 Einfluss der Absorption von Luft	14
3.1.1.6 Einfluss der optischen Bauelemente	14
3.1.1.7 Einfluss der Probenabsorption	15
3.1.1.8 Bedeutung des Dissymmetrieverhältnisses.....	16
3.1.2 Kalibrierung und Systematische Fehler im CD-Signal	16
3.1.2.1 Konventionelle Kalibrierung von CD-Spektrometern.....	16
3.1.2.2 Der Einfluss der polarisationsabhängigen Empfindlichkeit des Detektors auf das Messsignal.....	17
3.1.2.3 Reduzierung von Fehlern im CD-Signal durch „Polarization Scrambling“	18
3.2 Skalierung und Vergleich von Spektren.....	18
3.2.1 Skalierung bei einer Wellenlänge.....	18
3.2.2 Skalierung mit einem Vergleichsspektrum über den Wert von χ^2	19
3.2.3 Skalierung mit einem Vergleichsspektrum über die „Standardabweichung“.....	19
3.2.4 Auswahl der Skalierungsmethode.....	19
4 Beschreibung des SRCD-Messaufbaus	21
4.1 Synchrotronstrahlung als Lichtquelle	21
4.2 Messaufbau für Zirkulardichroismus-Messungen	23
4.3 Vorbereitungsarbeiten für Messungen am BESSY	24
4.4 Probenvorbereitung und -präparation	24
4.4.1 für Messungen mit Küvetten mit Pfadlängen von 1 cm bis 10 μm	24
4.4.2 für Messungen von Proteinfilmen	24
4.4.3 für Messungen zwischen zwei Fenstern ohne Abstandshalter	25
4.5 Messbedingungen für Messungen mit kommerziellen CD-Spektrometern.....	26
4.6 Auswählte Proteine	27
4.6.1 Myoglobin.....	27

4.6.2	Lysozym	27
4.6.3	Concanavalin A	27
4.6.4	Chymotrypsinogen	27
4.6.5	Peptid A2	27
4.6.6	FBP28-D15N WW-Domäne	28
4.6.7	Kälteschockprotein aus <i>Thermotoga maritima</i> (CSP <i>T. m.</i>)	28
4.6.8	Internalin A496	28
5	Charakterisierung des SRCD-Messaufbaus	29
5.1	Lichtquelle und Monochromator	29
5.1.1	Vergleich des Photonenflusses	29
5.1.1.1	Falschlicht	31
5.1.2	spektrale Bandbreite	32
5.1.2.1	spektrale Bandbreite am SRCD-Aufbau	32
5.1.2.2	spektrale Bandbreite bei kommerziellen CD-Spektrometern	33
5.1.3	Kalibrierung der Wellenlänge	34
5.1.3.1	Stabilität der Wellenlängeneinstellung	36
5.1.4	Bestimmung des Strahlquerschnitts am 3m-NIM-C	37
5.2	Kalibrierung des photoelastischen Modulators	40
5.3	Eigenschaften der Photomultiplier	40
5.3.1	Bestimmung der Z-Werte von Photomultipliern	40
5.3.1.1	Z-Werte der Photomultiplier am SRCD-Experiment	41
5.3.1.2	Vergleich mit kommerziellen CD-Spektrometern	41
5.3.2	Statistischer Fehler des CD-Signals	44
5.3.2.1	Stabilität der Basislinie	46
5.3.3	Abhängigkeit der CD-Basislinie vom Drehwinkel des Photomultipliers	48
5.4	Eigenschaften der verwendeten Messzellen	52
5.4.1	Quarz-Suprasil-Küvetten (Hellma)	52
5.4.2	Calciumfluorid-Küvetten	53
5.4.2.1	Drehwinkelabhängigkeit des Messsignals von Calciumfluoridfenstern	54
5.4.2.2	Neigungswinkelabhängigkeit des Messsignals von Calciumfluoridfenstern	55
5.4.2.3	Basislinien von mit Wasser präparierter Proben mit kleiner Pfadlänge	56
5.4.2.4	Basislinien mit DPM-Aufbau	57
5.5	Stopped-Flow-Messungen am SRCD-Messplatz	59
6	CD-spektroskopische Untersuchungen an Proteinen	61
6.1	Reinheit der Proteine	61
6.1.1	Met-Myoglobin	61
6.1.2	Lysozym	61
6.1.3	Concanavalin A	61
6.1.4	Chymotrypsinogen	61
6.1.5	Peptide	62
6.1.6	Kälteschockprotein CSP <i>T. m.</i>	62
6.1.7	InlA496	62
6.2	Absorption des Lösungsmittels	63
6.2.1	Wasserabsorption	63
6.2.2	Extinktion einiger Salzlösungen	64
6.3	Proteinfilme	65
6.4	Proteinpräparationen mit kleiner Pfadlänge	67
6.4.1	Myoglobin	67
6.4.2	Lysozym	68
6.4.3	Peptid A2	70
6.4.4	FBP28-D15N WW-Domäne	71
6.4.5	Kältschockprotein CSP <i>T. m.</i>	72
6.4.6	Internalin A496	73
6.5	Schäden durch Synchrotronstrahlung	74
7	Diskussion	81

8	Anhang.....	89
A1	Aufbau einer Datei des SRCD-Messprogramms (Version 1.5).....	89
A2	Abhängigkeit der Stickstoffabsorptionsbande von der Größe des Austrittsspalts.....	91
A3	Bestimmung des Strahlquerschnitts - Parameter der bestimmten Gaußfunktionen.....	92
A4	Stabilität der Basislinie am 3m-NIM-C.....	93
A5	Stabilität der Basislinie am U125-2_NIM.....	94
A6	Drehwinkelabhängigkeit des CD-Signals von CaF ₂ -Fenstern.....	95
A7	Wasserabsorption.....	97
A8	Spektren von Lysozymfilmen verschiedener Schichtdicke.....	98
A9	Campher-10-sulfonsäure.....	99
A10	Berechnung der raum-zeitlichen Temperaturverteilung, bei Bestrahlung.....	101
A11	Gleichungen zur Berechnung statistischer Größen.....	102
B1	Material.....	103
B1.1	Chemikalien.....	103
B1.2	Standards.....	103
B1.3	Proteine und Peptide.....	103
B1.4	Küvetten und Fenster.....	104
B1.5	Sonstige Materialien.....	104
B2	Geräte.....	105
B2.1	Komponenten des SRCD-Messaufbaus am BESSY.....	105
B3	weitere Methoden.....	105
B3.1	Absorptionsspektroskopie.....	105
B3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration und der Extinktionskoeffizienten.....	105
B3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	106
B3.4	Proteinfärbung.....	106
B3.4.1	Coomassie-Färbung.....	106
B3.4.2	Silberfärbung.....	106
C	Quellenverzeichnis.....	107

1 Einleitung

Alle biologischen Systeme vom Virus bis zum Blauwal sind aus chiralen Bausteinen aufgebaut. Nukleotide, die Aminosäuren außer Glycin sowie die meisten anderen organischen Moleküle mit mindestens einem asymmetrischen Kohlenstoffatom sind chiral, das bedeutet dass sie mit ihrem Spiegelbild durch Rotation nicht in Deckung gebracht werden können und keine Spiegelebene besitzen. Da die Elektronenverteilung dieser Moleküle im Grundzustand und im angeregten Zustand ebenfalls asymmetrisch ist, sind diese optisch aktiv. Le Bel und van't Hoff stellten 1874 einen Zusammenhang zwischen der unsymmetrischen Anordnung von Substituenten am gesättigten Kohlenstoff und der Rotation der Ebene linear polarisierten Lichts her. Durch die Definition der Chiralität war es möglich die Eigenschaften von Zuckern und vielen anderen organischen Molekülen zu erklären. Sie führte zur Entwicklung spektroskopischer Methoden, wie der Optischen Rotationsdispersion (ORD) und der Zirkulardichroismus-(CD-)Spektroskopie.

Die CD-Spektroskopie ist inzwischen eine etablierte Methode zur Untersuchung chiraler Moleküle und es gibt mehrere Hersteller von CD-Spektrometern für den alltäglichen Gebrauch im Labor, in denen Xenon-Lampen Licht vom Nah-Infrarot-Bereich bis in den ultravioletten (UV-)Bereich liefern. Mit diesen CD-Spektrometern sind unter geeigneten Messbedingungen (siehe Kapitel 3.1.1) Messungen im UV-Bereich bis 180 nm ohne weiteres möglich. Für Messungen im UV-Bereich bis etwa 130 nm werden Wasserstoff-Entladungslampen (Schnepp *et al.* 1970, Johnson 1971, Pysh 1976), intensive Deuteriumlampen (Brahms *et al.* 1977) und Synchrotronstrahlung (Snyder und Rowe 1980) verwendet.

Synchrotronstrahlung entsteht, wenn leichte geladene Teilchen wie zum Beispiel Elektronen, die sich mit nahezu Lichtgeschwindigkeit bewegen, durch magnetische Felder abgelenkt werden. Sie ist neben Lasern (Wen *et al.* 1996, Chen *et al.* 2005) eine alternative Lichtquelle zu den in Laborgeräten verwendeten Lampen. Die Synchrotronstrahlung ist schon linear polarisiert und daher für die CD-Spektroskopie ideal (Snyder und Rowe 1980). Derzeit stehen an der National Synchrotron Light Source (NSLS), am Aarhus Storage Ring in Denmark (ASTRID), am Hiroshima Synchrotron Radiation Center (HiSOR), am Berliner Elektronenspeicherring - Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) II, an der Beijing Synchrotron Radiation Facility (BSRF), am National Synchrotron Radiation Laboratory (NSRL) sowie an der Diamond Light Source (in Oxfordshire, UK) Messplätze für CD-Spektroskopie mit Synchrotronstrahlung (SRCD) zur Verfügung. Weitere sind in Planung oder befinden sich im Aufbau, unter anderem auch am BESSY (Seckler 2007-2010). Am BESSY II gibt es zwei Strahlrohre, die für Messungen im Energiebereich zwischen 4 und 10 eV geeignet sind: Ein Strahlrohr mit einem 3 m Normal-Incidence-Monochromator (NIM) an einem Dipol (Ablenkmagneten) (Reichardt *et al.* 2001b), das im folgenden Text als 3m-NIM-C bezeichnet wird und eins mit einem 10 m NIM am Undulator U125-2 (Reichardt *et al.* 2001a), das als U125-2_NIM bezeichnet wird. Seit 2003 wird ein Messaufbau für Zirkulardichroismus-Messungen im UV-Bereich eingesetzt und weiterentwickelt, der sowohl am 3m-NIM-C als auch am U125-2_NIM verwendet werden kann (Seckler 2001-2006).

Auf Möglichkeiten, die optische Aktivität von Biopolymeren für Untersuchungen zu nutzen, wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

1.1 CD-Spektren von Proteinen

Bei der CD-Spektroskopie werden die Spektren von Proteinen im Bereich der ultravioletten Strahlung meist in zwei Bereiche eingeteilt. Im Nah-UV-Bereich von 350-250 nm absorbieren Phenyl-, Tyrosyl- und Indolgruppen der Polypeptidkette sowie Disulfidbrücken. Diese führen zu einem von der Tertiärstruktur des jeweiligen Proteins abhängigen CD-Spektrum. Im chemisch oder thermisch entfalteten Zustand haben die CD-Banden deutlich kleinere Amplituden, da die Phenyl-, Tyrosyl- und Indolgruppen planar sind und im entfalteten Zustand viele verschiedene Orientierungen relativ zum Peptidrückgrad der Polypeptidkette möglich sind.

Im Fern-UV-Bereich unterhalb von 250 nm dominiert die Absorption der Peptidbindungen meist das CD-Spektrum von Proteinen. Durch Mutationsstudien, beispielsweise an Barnase (Vuilleumier *et al.* 1993) und dem Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (BPTI) (Sreerama *et al.* 1999a) wurde gezeigt, dass auch die aromatischen Aminosäurereste noch deutlich zum Fern-UV-Spektrum beitragen. Bei einigen reinen β -Faltblatt-Proteinen wie zum Beispiel beim Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* (CSP T. m.) (Welker *et al.* 1999) und Spherulin 3a aus *Physarum polycephalum* (Kretschmar *et al.* 1999) wird das CD-Spektrum deutlich von den aromatischen Aminosäureresten dominiert und die eigentlich typische negative CD-Bande um 215 nm ist nicht zu sehen.

Die auf die Peptidbindungen zurückzuführenden CD-Signale im Fern-UV-Bereich sind abhängig von der Orientierung und der lokalen Umgebung der Peptidbindungen. Es besteht daher ein Zusammenhang zwischen Sekundärstruktur und Fern-UV-CD-Spektrum (siehe Kapitel 1.1.1). Dies kann genutzt werden um Sekundärstrukturanteile von Proteinen in Lösung zu ermitteln oder Änderungen in der Sekundärstruktur zu verfolgen. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus der Kristall-beziehungsweise NMR-Struktur kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Die Zuordnung an Hand der Wasserstoffbrückenbindungen (DSSP) nach Kabsch und Sander (1983) ist die populärste, eine Zuordnung nach Amid-Amid Wechselwirkungen (xtlsstr) nach King und Johnson (1999) sollte für eine Interpretation der Fern-UV-CD-Spektren aber besser geeignet sein. Darüber hinaus ist eine Zuordnung zu Tertiärstrukturklassen möglich (Venyaminov und Vassilenko 1994, Sreerama *et al.* 2001, Lees *et al.* 2006).

Im Bereich von 780-350 nm absorbieren zum Beispiel prosthetische Gruppen wie Häm und Chlorophyll, die ungebunden auf Grund ihrer weitestgehend planaren Strukturen kein CD-Signal aufweisen, im gebundenen Zustand sich jedoch in chiraler Umgebung befinden und ein jeweils typisches CD-Signal zeigen, das auch spezifisch für den Redoxzustand dieser Gruppen ist. Da auch die Absorptionsspektren selbst häufig große Unterschiede abhängig von Bindung und Redoxzustand aufweisen und einfacher zu messen sind, wird die CD-Spektroskopie in diesem Bereich eher selten angewendet. Es gibt aber einige Beispiele, bei denen Zirkulardichroismus-Messungen zur Untersuchung bestimmter Fragestellungen verwendet werden, wie die Untersuchung von Prozessen, die der Photodissoziation von Kohlenmonoxid-Myoglobin Komplexen (Dartigalongue und Hache 2006) und Kohlenmonoxid-Cytochrom C Komplexen (Abel *et al.* 2007) folgen.

Auf Grund der Abhängigkeit der CD-Spektren von Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine eignet sich diese Methode besonders für die Untersuchung von *in vitro* Faltung, Entfaltung und Proteinstabilität. Im Nah-UV- und sichtbarem Bereich können auch Bindungsuntersuchungen durchgeführt werden, wenn sich das CD-Signal der an der Bindung beteiligten aromatischen Aminosäurereste ändert (Glazer und Simmons 1966, Martin und Bayley 1986) oder im Liganden ein CD-Signal induziert wird (Greenfield 1975, Cheruvallath *et al.* 1997, Zsila und Iwao 2007). Im Fern-UV-Bereich können größere Konformationsänderungen, wie zum Beispiel bei der Ca²⁺-Bindung durch Troponin C (Smith *et al.* 1994) oder der ATP-Bindung an GroEL (White *et al.* 1995), untersucht werden. Außerdem bieten sich Fern-UV-CD-Messungen zur Untersuchung von „intrinsically disordered“ Proteinen an, die allein in Lösung keine bestimmte Konformation aufweisen, sondern erst nach Bindung, wie beispielsweise α -Synuclein nach Bindung an Phospholipidvesikel (Davidson *et al.* 1998), Sekundärstruktur ausbilden oder in Folge von Dehydratisierung (Tolletter *et al.* 2007). Häufig ist der Fern-UV-Bereich für Bindungsuntersuchungen weniger geeignet, da sich die Sekundärstruktur bei der Bindung nur geringfügig ändert und andere Methoden genauere Werte bei der Bestimmung von Bindungsgeschwindigkeiten und Bindungsgleichgewichtskonstanten liefern. Mögliche Vorteile durch Zirkulardichroismus-Messungen mit Synchrotronstrahlung (SRCD), wie eine kürzere Messzeit und ein erweiterter Messbereich (Cowieson *et al.* 2008), sind für Bindungsuntersuchungen kaum relevant, da die dafür erforderlichen Pfadlängen und Konzentrationen die Möglichkeiten bei Titrationsexperimenten oder sequenziellen Verdünnungen deutlich einschränken.

1.1.1 Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen anhand von CD-Spektren

Mit der steigenden Zahl an Kristallstrukturen von Proteinen seit den 1960er Jahren und den aus diesen Strukturen bestimmten Sekundärstrukturanteilen (f_{ss}), wurde versucht, die Zusammenhänge zwischen Sekundärstrukturanteilen und ORD- bzw. Fern-UV-CD-Spektren zu bestimmen. So wurde durch (Holzwart und Doty 1965) anhand von CD-Spektren α -helikaler Polypeptide und von Myoglobin der Anteil der Peptidgruppen in helikaler Konformation in Myoglobin mit 65-80 % angegeben. Die CD-Spektren von Proteinen im Fern-UV-Bereich ($\Delta\epsilon(\lambda)$) wurden durch eine Linearkombination von Sekundärstruktur-spezifischen Basisspektren ($\Delta\epsilon_{ss}$) beschrieben (Gleichung 1.1 (Chen und Yang 1971)) um die Sekundärstrukturanteile f_{ss} zu berechnen. Dabei wurden erst Spektren synthetischen Polypeptide als Basisspektren (Greenfield und Fasman 1969) verwendet.

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \sum f_{ss} \cdot \Delta\epsilon_{ss} \quad (\text{Gleichung 1.1})$$

Später wurden die Basisspektren aus CD-Spektren von drei (Saxena und Wetlaufer 1971) und fünf (Chen und Yang 1971) Proteinen bekannter Struktur generiert um die Anteile von α -Helices und β -Faltblattstrukturen anhand von CD-Spektren zu berechnen. Durch Chang *et al.* (1978) wurden anhand von 15 CD-Spektren Basisspektren für α -Helices, β -Faltblatt, β -Schleifen und ungeordnete Strukturen erzeugt. Eine Auswertung von 16 CD-Spektren mit statistischen Methoden durch Siegel *et al.* (1980) lieferte im Bereich von 210-240 nm nur für den α -Helix-Anteil eine gute Korrelation nicht jedoch für β -Faltblatt und ungeordnete Strukturen. Eine Erweiterung des Spektralbereichs (Hennessey und

Johnson 1981, Toumadje *et al.* 1992), die Einbeziehung von Spektren denaturierter Proteine (Venyaminov *et al.* 1993, Sreerama *et al.* 2000) und die Verwendung von auf verschiedenen Auswertemethoden basierenden Programmen, wie CONTIN (Provencher und Glöckner 1981), SELCON (Sreerama und Woody 1993, Sreerama *et al.* 1999b, Sreerama *et al.* 2000) und CDsstr (Johnson 1999) konnten die Sekundärstrukturbestimmung anhand von CD-Spektren weiter verbessern. Alternativ werden auch neurale Netzwerke zur Sekundärstrukturbestimmung verwendet (Böhm *et al.* 1992, Andrade *et al.* 1993, Lees und Janes 2008, Matsuo *et al.* 2008, Perez-Iratxeta und Andrade-Navarro 2008)

Bis 2006 hat die Gruppe um Bonnie Ann Wallace an CD-Messplätzen mit Synchrotronstrahlung eine Spektrendatenbank aufgebaut, die 72 Spektren bis 175 nm und davon 39 bis 170 nm enthält (Lees *et al.* 2006). Die Gruppe um Kunihiko Gekko am HiSOR hat 31 Spektren bis 160 nm veröffentlicht (Matsuo *et al.* 2004, Matsuo *et al.* 2005). In beiden Fällen konnte eine Verbesserung bei der Bestimmung der Sekundärstrukturanteile mit der Vergrößerung des Spektralbereichs beobachtet werden. Eine Erweiterung des Spektralbereichs von 165 nm auf 160 nm führte jedoch beim Datensatz von 16 Proteinen zu einer größeren Abweichung zwischen den aus der Kristallstruktur (DSSP) berechneten und anhand der CD-Spektren ermittelten Sekundärstrukturanteilen.

Die Genauigkeit der Sekundärstrukturbestimmung hängt von fünf Faktoren ab. Sie ist abhängig von (1.) der Auflösung und Qualität der Strukturdaten (Hooft *et al.* 1996) und (2.) der Variation der aus den Strukturdaten bestimmten Sekundärstrukturanteile (King und Johnson 1999), der für die Basisspektren verwendeten Proteine. (3.) Für die Basisspektren müssen geeignete Proteine ausgewählt werden, so dass entweder großer Bereich von Proteinstrukturen abgedeckt ist (Oberg *et al.* 2003) oder ein spezifischer Datensatz vorliegt (Evans *et al.* 2007). Die letzten beiden Faktoren sind (4.) die Größe des verwendeten Spektralbereichs und (5.) die Qualität der CD-Spektren. Die Qualität der CD-Spektren hängt von der Reinheit und Integrität der verwendeten Proteine, von Fehlern bei der Bestimmung von Konzentration und Pfadlänge und von den Messfehlern der CD-Spektren ab. Eine Beurteilung dieser Qualität allein anhand der Spektren ist nicht möglich.

Bei der Interpretation aus CD-Spektren bestimmten Sekundärstrukturanteile muss bedacht werden, dass bei der Auswertung außer der Peptidbindung keine weiteren Chromophore berücksichtigt werden und so deutliche Änderungen im CD-Spektrum nicht immer mit entsprechenden Änderungen in der Sekundärstruktur einhergehen müssen, wie beispielsweise die Aktivierung von Chymotrypsinogen zu Chymotrypsin zeigt (Woody und Dunker 1996). Bei theoretischen Berechnungen von CD-Spektren anhand der Strukturdaten werden die Beiträge der aromatischen Aminosäuren zwar berücksichtigt, die Unterschiede zwischen experimentellen und theoretisch berechneten Spektren (z.B. Bulheller *et al.* 2008) sind jedoch noch sehr groß. Ich halte es daher für unwahrscheinlich, dass die derzeitigen Methoden der Sekundärstrukturberechnung aus CD-Spektren in den nächsten Jahren ersetzt werden können. Für Peptide konnte eine Korrektur der Beiträge einzelner absorbierender Seitenketten vorgenommen werden, indem der Wellenlängenbereich auf 195 bis 207 nm reduziert wurde (Krittanaï und Johnson 1997).

1.2 CD-Spektren von Kohlenhydraten

Die CD-Spektroskopie ist eine empfindliche Methode zur Untersuchung konformationeller Änderungen von Kohlenhydraten. Da unsubstituierte Kohlenhydrate erst unterhalb von 200 nm absorbieren, können diese nur unter Verwendung kleiner Pfadlängen (Nelson und Johnson 1972, Nelson und Johnson 1976a, Nelson und Johnson 1976b, Matsuo und Gekko 2004) oder als Filme (Arndt und Stevens 1993) untersucht werden. Mit Synchrotronstrahlung können die CD-Spektren möglicherweise bis auf den ersten σ - σ^* -Übergang (Arndt und Stevens 1993) zwischen 130 und 120 nm ausgedehnt werden. Während zu substituierten „Kohlenhydraten“, unsubstituierten Mono- und Disacchariden und Homopolysacchariden schon einige Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie vorliegen, sind unsubstituierte Heteropolysaccharide bisher kaum untersucht (Stevens 1996).

1.3 CD-Spektren von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind aus Nukleotiden aufgebaut, die ihrerseits aus einer aromatischen Base, einer Ribose beziehungsweise 2'-Desoxyribose und einer Phosphatgruppe bestehen. Die aromatischen Basen sind die Chromophore, die das UV-Absorptionsspektrum dominieren (Preiss und Setlow 1956), erst unterhalb von 200 nm absorbieren auch die Zucker das Licht (Voet *et al.* 1963), unterhalb von 150 nm dominiert die Absorption der Zucker und Phosphatgruppen (Kiseleva *et al.* 1975). Die aromatischen Basen selbst sind planar und weisen allein keinen Zirkulardichroismus auf. Nukleoside und Nukleotide sind auf Grund der Zucker chiral. Die Zucker induzieren einen geringen Zirkulardichroismus in den elektronischen Übergängen der Basen (Sprecher und Johnson 1977). Arbeiten mit *locked nucleic acids* (LNAs) zeigten am Beispiel von Adenosin und Thymin wie der Zirkulardichroismus von der Zuckerkonfiguration abhängt (Holm *et al.* 2007). Es wurden zahlreiche Untersuchungen von Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in Abhängigkeit von Temperatur, pH, Salz- und Lösungsmittelkonzentration durchgeführt, bei denen der Zirkulardichroismus ein empfindliches Signal für strukturelle Änderungen war (Johnson 1996). Änderungen des CD-Signals können auch für Bindungsuntersuchung mit Nukleinsäuren verwendet werden (Gray 1996).

1.4 Fragestellung

Auf Grund der Publikationen zu Zirkulardichroismus-Messungen mit Synchrotronstrahlung, die zwischen 2000 und 2003 erschienen sind, schien eine Erweiterung des Messbereichs im UV-Bereich um 20 nm und mehr gegenüber kommerziellen Geräten durch Verwendung von Synchrotronstrahlung ohne weiteres möglich zu sein. So sollten unter Bedingungen, unter denen mit gut eingestellten kommerziellen Geräten Messungen mit wässrigen Lösungen bis 178 nm möglich sind, mit Synchrotronstrahlung der Messbereich auf bis zu 160 nm ausgedehnt werden können (Wallace 2000a) und es wurden sogar Spektren von Ammoniumcampher-10-sulfonat (ACS) und Aminosäuren bis 140 nm gezeigt, die mit wässrigen Lösungen bei einer Pfadlänge von 20 μ m aufgenommen wurden (Ojima *et al.* 2001, Matsuo *et al.* 2002), sowie Spektren von Proteinen bis 160 nm (Matsuo *et al.* 2003). Diese Ergebnisse weckten die Hoffnung, dass mit Synchrotronstrahlung gemessene CD-Spektren zu einer Verbesserung der Strukturbestimmung führen. Unterhalb von 180 nm liegen CD-Banden, die anhand theoretischer Berechnungen durch

Ladungstransfer zwischen benachbarten Peptidbindungen erklärt werden können und von der Konformation der Peptidbindungen abhängen (Serrano-Andres und Fulscher 1998, Gilbert und Hirst 2004). Dieser Bereich könnte daher über eine verbesserte Bestimmung des β -Faltblattanteils hinaus auch eine Unterscheidung verschiedener β -Faltblattstrukturen zum Beispiel von paralleler und antiparalleler β -Faltblattstrukturen ermöglichen.

Schon erste Messungen am SRCD-Messplatz am BESSY zeigten, dass mit Wasser gefüllten Quarzküvetten einer Pfadlänge von etwa $10\ \mu\text{m}$ bei $170\ \mu\text{m}$ schon eine Extinktion von etwa zwei erreicht wird (siehe Abbildung 5.21b)). Anfangs vermutete Verunreinigungen im Wasser konnten ausgeschlossen werden. Die in der Literatur gefundenen Absorptionsangaben für Wasser (siehe Kapitel 6.2.1) unterscheiden sich, bezüglich Lage und Höhe des Maximums zum Teil deutlich. Jedoch geht aus ihnen hervor, dass das Absorptionsmaximum von flüssigem Wasser noch unterhalb von $150\ \text{nm}$ liegt und mit Pfadlängen von $1\ \mu\text{m}$ die Absorption im Maximum noch über zwei liegt. Damit ist es die Wasserabsorption, die die Ausdehnung des Messbereichs entscheidend einschränkt. Im Rahmen der Arbeit wurde daher geprüft, ob Proteinfilm eine Alternative zu Messungen in wässriger Lösung sind. Des Weiteren wurde Versuche unternommen die Pfadlänge zu reduzieren und so den zugänglichen Wellenlängenbereich auszudehnen. Außerdem wurde der Messaufbau charakterisiert um diesen mit konventionellen CD-Spektrometern und auch anderen SRCD-Messplätzen vergleichen zu können.

2 Grundlagen der Zirkulardichroismus-Spektroskopie

2.1 Extinktion und Absorption

Die Begriffe Extinktion und Absorption werden in dieser Arbeit wie folgt verwendet. Der negative dekadische Logarithmus des Verhältnisses von Photonenfluss nach Durchtritt durch die Probe Φ_p und dem Ausgangsphotonenfluss Φ_0 von Licht mit der Wellenlänge λ wird hier als Extinktion bezeichnet und kann experimentell bestimmt werden.

$$A_{\text{Extinktion}}(\lambda) = -\lg \frac{\Phi_p(\lambda)}{\Phi_0(\lambda)} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

Absorption bezeichnet den Teil der Extinktion, der auf die Anregung der Probe in Zustände höherer Energie durch Aufnahme der Photonen zurückzuführen ist. Im Idealfall können Lichtstreuung und Reflexion vernachlässigt werden und der Übergang vom angeregten in den Grundzustand würde ausschließlich strahlungslos erfolgen. In diesem Fall wären Extinktion und Absorption gleich.

Unter geeigneten Bedingungen besteht für gasförmige, flüssige und gelöste Proben ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion, Probenkonzentration c und Pfadlänge d , der als Lambert-Beer'sches Gesetz bekannt ist und über den bei bekannten Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ und Pfadlänge die Konzentration der Probe bestimmt werden kann.

$$A_{\text{Extinktion}}(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

2.2 Optische Aktivität und Zirkulardichroismus

Eine optisch aktive Probe absorbiert links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark. ΔA , die Differenz zwischen der Absorption von links zirkular polarisiertem Licht A_{LZPL} und der Absorption von rechts zirkular polarisiertem Licht A_{RZPL} wird als Zirkulardichroismus (CD) bezeichnet.

$$\Delta A(\lambda) = A_{LZPL}(\lambda) - A_{RZPL}(\lambda) \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Darüber hinaus unterscheidet sich der Brechungsindex der optisch aktiven Probe für diese unterschiedlich polarisierten Formen des Lichts, das heißt dass sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit für links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterscheidet und dies zu einer Drehung der Polarisationssebene von linear polarisiertem Licht führt. Diese Eigenschaft wird als zirkulare Doppelbrechung bezeichnet. Die Wellenlängenabhängigkeit der Drehung der Polarisationssebene linear polarisierten Lichts nennt man optische Rotationsdispersion (ORD). ORD und CD können über eine Kramers-Kronig Transformation ineinander umgewandelt werden (Moffitt und Moscovitz 1959). Absorbiert eine Probe links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark, entsteht aus linear polarisiertem Licht elliptisch polarisiertes Licht. Die Elliptizität θ wird teilweise anstelle von ΔA angegeben. Der Zusammenhang zwischen Elliptizität und Zirkulardichroismus kann folgender Gleichung entnommen werden (Woody 1996).

$$\theta(\lambda) = \frac{180^\circ}{\pi} \cdot \frac{\ln 10}{4} \cdot \Delta A(\lambda) = 32,982^\circ \Delta A(\lambda) \quad \text{(Gleichung 2.4)}$$

Analog zur Extinktion kann das Lambert-Beer'sche Gesetz auch auf Elliptizität und Zirkulardichroismus angewendet werden um bei bekannter Konzentration und Schichtdicke die molare Elliptizität $[\theta]$ beziehungsweise den molaren Zirkulardichroismus $\Delta\varepsilon$ zu berechnen.

$$\Delta A(\lambda) = \Delta\varepsilon(\lambda) c d \quad \text{(Gleichung 2.5)}$$

Die molare Elliptizität wird dabei üblicherweise in $^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ angegeben, der molare Zirkulardichroismus in $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Um Polymere unterschiedlicher Kettelänge, bei denen die Anzahl der Chromophore proportional zur Kettenlänge zunimmt, sinnvoll vergleichen zu können, ist es üblich, die molaren Werte noch durch die Anzahl ihrer Bausteine zu teilen, so dass man $[\theta]_{MR}$ beziehungsweise $\Delta\varepsilon_{MR}$ erhält. Dabei steht MR für *mean residue*.

Als eine von Konzentration und Schichtdicke unabhängige Größe kann das Dissymmetrieverhältnis g , der Quotient aus Zirkulardichroismus und Absorption definiert werden (Kuhn und Braun 1930).

$$g(\lambda) = \frac{2 \cdot (A_{LZPL}(\lambda) - A_{RZPL}(\lambda))}{A_{LZPL}(\lambda) + A_{RZPL}(\lambda)} = \frac{\Delta\varepsilon(\lambda)}{\varepsilon(\lambda)} \quad \text{(Gleichung 2.6)}$$

Es gibt zwei weitere Effekte die bei Wechselwirkung mit polarisiertem Licht auftreten können. Werden Moleküle orientiert, kann ein Absorptionsunterschied zwischen parallel und senkrecht zur Orientierungsachse linear polarisiertem Licht gemessen werden, der als Lineardichroismus (LD) bezeichnet wird. Variiert die Ausbreitungsgeschwindigkeit von linear polarisiertem Licht abhängig von der Polarisationssebene so spricht man von linearer Doppelbrechung (LB).

2.3 Aufbau und Funktionsweise eines CD-Spektrometers

Die Beschreibung des Aufbaus und der Funktionsweise erfolgt hier basierend auf den Publikationen von Velluz *et al.* (1965) und Drake (1986), um in der Arbeit verwendete Größen zu definieren und um Eigenschaften des Messaufbaus am BESSY erklären zu können (Schema Abbildung 2.1).

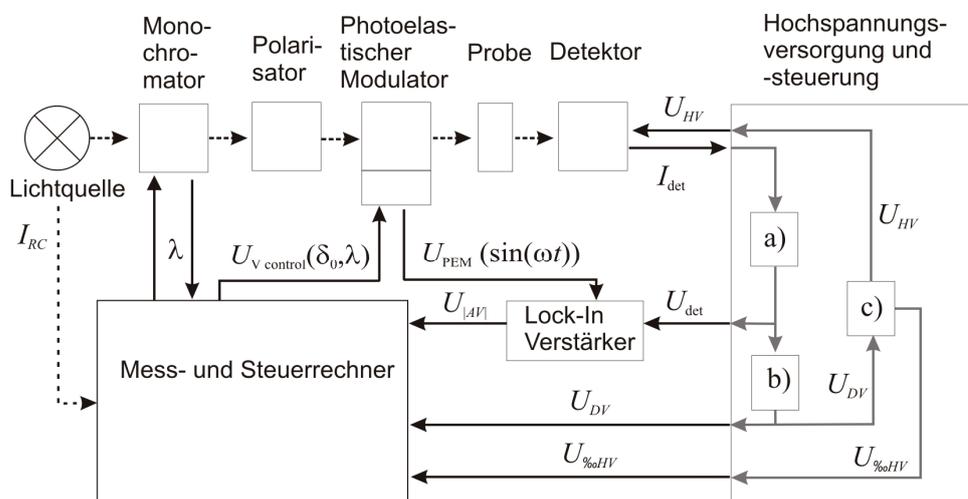


Abbildung 2.1 - schematische Darstellung des Aufbaus eines CD-Spektrometers
 a) Stromspannungswandler, b) Mittelwertbildner, c) elektronische Hochspannungsregelung

Durch den Polarisator wird linear polarisiertes Licht mit einem Photonenfluss Φ_0 erzeugt, das als Summe zweier senkrecht zueinander stehenden Wellen linear polarisierten Lichts Φ_0^{\parallel} und Φ_0^{\perp} mit gleicher Phase betrachtet werden kann. Der photoelastische Modulator (PEM) verschiebt die Phase der Welle die parallel zur Stressachse des PEMs linear polarisiert ist, wobei die Stärke der Phasenverschiebung (δ) von der Steuerspannung des PEM U_{control} abhängt (Kemp 1969). Bei einer Phasenverschiebung von $\delta = \pm\pi/2$ entsteht zirkular polarisiertes Licht. Ein optisches Element das eine feste Phasenverschiebung von $\delta = \pi/2$ aufweist wird als $\lambda/4$ -Plättchen bezeichnet (Velluz *et al.* 1965) und ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt, ein optisches Element mit verstellbarer Phasenverschiebung wird als Kompensator bezeichnet (Velluz *et al.* 1965). Für eine sinusförmige Modulation mit einer Frequenz (ω) ergibt sich für die Phasenverschiebung die folgende Gleichung, wobei δ_0 die maximale Verschiebung ist (Drake 1986).

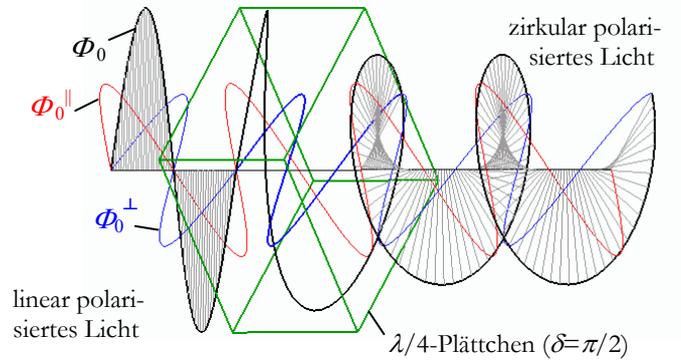


Abbildung 2.2 – Erzeugung von zirkular aus linear polarisiertem Licht mit einem $\lambda/4$ -Plättchen

Kompensator bezeichnet (Velluz *et al.* 1965). Für eine sinusförmige Modulation mit einer Frequenz (ω) ergibt sich für die Phasenverschiebung die folgende Gleichung, wobei δ_0 die maximale Verschiebung ist (Drake 1986).

$$\delta = \delta_0 \sin(\omega t) \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

Die Modulation erlaubt eine Messung kleiner Absorptionsdifferenzen und ist empfindlicher als Methoden bei denen A_{LZPL} und A_{RZPL} separat oder die Elliptizität gemessen wird (Velluz *et al.* 1965). Hinter der Probe ergibt sich folgender Photonenfluss Φ (Velluz *et al.* 1965, Drake 1986).

$$\Phi(t) = \frac{\Phi_0}{2} [(1 + \sin(\delta_0 \sin(\omega t))) \cdot 10^{-A_{LZPL}(\lambda)} + (1 - \sin(\delta_0 \sin(\omega t))) \cdot 10^{-A_{RZPL}(\lambda)}] \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

Als Detektoren werden nahezu ausschließlich Photomultiplier (PM) verwendet. Der Ausgangsstrom I_{det} des Photomultipliers ist proportional zur Quantenausbeute Q_{det} , zur Verstärkung σ des Detektors, zum Photonenfluss Φ und zur Elementarladung e (Drake 1986).

$$I_{\text{det}} = e \cdot \Phi \cdot \sigma \cdot Q_{\text{det}} \quad (\text{Gleichung 2.9})$$

Durch einsetzen von Gleichung 2.8 in Gleichung 2.9 ergibt sich folgende Gleichung.

$$I_{\text{det}}(t) = e \cdot \Phi_0 \cdot \sigma \cdot Q_{\text{det}} \cdot \frac{10^{-A_{LZPL}(\lambda)} + 10^{-A_{RZPL}(\lambda)}}{2} \left[1 + \sin(\delta_0 \sin(\omega t)) \cdot \frac{10^{-A_{LZPL}(\lambda)} - 10^{-A_{RZPL}(\lambda)}}{10^{-A_{LZPL}(\lambda)} + 10^{-A_{RZPL}(\lambda)}} \right] \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Am Ausgangswiderstand R_{det} des Detektors entsteht eine Spannung U_{det} .

$$U_{\text{det}} = I_{\text{det}} \cdot R_{\text{det}} \quad (\text{Gleichung 2.11})$$

Diese Spannung besteht aus einem Wechsel- U_{AV} und einem mittleren Gleichspannungsteil U_{DV} .

$$U_{AV}(t) = (10^{-A_{LZPL}(\lambda)} - 10^{-A_{RZPL}(\lambda)}) \cdot \sin(\delta_0 \sin(\omega t)) \cdot \frac{\Phi_0}{2} \cdot e \cdot \sigma \cdot Q_{det} \cdot R_{det} \quad (\text{Gleichung 2.12})$$

$$U_{DV} = (10^{-A_{LZPL}(\lambda)} + 10^{-A_{RZPL}(\lambda)}) \frac{\Phi_0}{2} \cdot e \cdot \sigma \cdot Q_{det} \cdot R_{det} \quad (\text{Gleichung 2.13})$$

Die Verstärkung σ des PMs kann durch die angelegte Hochspannung U_{HV} gesteuert werden. Die Photomultiplierhochspannung wird über einen Regelkreis so geregelt, dass der Gleichspannungsanteil U_{DV} konstant bleibt, um über einen großen dynamischen Bereich unter optimalen Bedingungen messen zu können (Arvinte *et al.* 2004). Aus U_{HV} und U_{DV} kann die Extinktion ermittelt werden. Die Details zur Extinktionsberechnung sind im Kapitel 2.4 beschrieben.

Der periodische Teil kann als Summe von Besselfunktionen ausgedrückt werden (Gleichung 2.14). Die Besselfunktionen J_0 , J_1 und J_2 sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

$$\sin(\delta_0 \sin(\omega t)) = 2 \sum_{n=1}^{\infty} J_n(\delta_0) \sin(n\omega t) \quad (\text{Gl. 2.14})$$

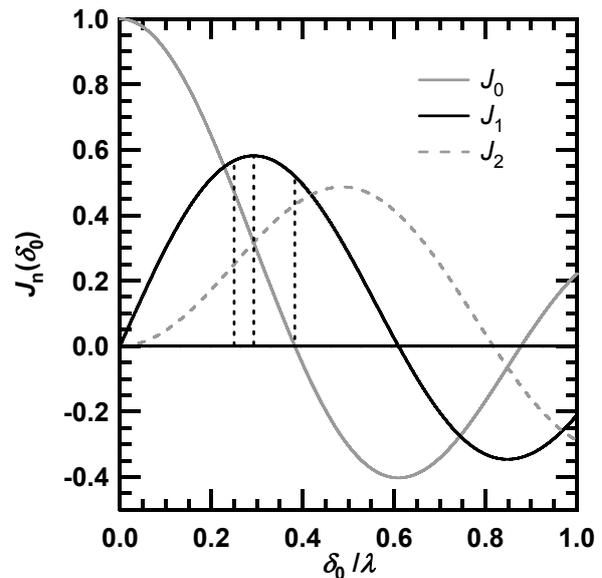


Abbildung 2.3 - Besselfunktionen

Die Positionen für $\delta_0=0,5\pi$, $0,586\pi$ und $0,765\pi$ sind durch senkrechte Geraden zwischen J_1 und Null kenntlich gemacht und markieren die am Messplatz im BESSY verwendete Einstellung, das Maximum von J_1 und die Nullstelle von J_0 . Durch einen Lock-In Verstärker, der einen Bandpass und einen phasenempfindlichen Gleichrichter enthält, werden die Terme mit $n>1$ aus dem Wechselspannungsanteil entfernt. Dabei wird die Phase der Schwingungen des PEMs als Referenz verwendet. Aus dem Wechselspannungsteil entsteht eine Gleichspannung $U_{|AV|}$, die am BESSY der um $\sqrt{2}$ reduzierten Amplitude des Wechselspannungsteils entspricht (PerkinElmer 2000).

$$U_{|AV|} = (10^{-A_{LZPL}} - 10^{-A_{RZPL}}) \cdot 2J_1(\delta_0) \cdot \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \frac{\Phi_0}{2} \cdot e \cdot \sigma \cdot Q_{det} \cdot R_{det} \quad (\text{Gleichung 2.15})$$

Für den Quotienten aus $U_{|AV|}$ und U_{DV} ergeben damit sich folgende Gleichungen.

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \frac{(10^{-A_{LZPL}} - 10^{-A_{RZPL}})}{(10^{-A_{LZPL}} + 10^{-A_{RZPL}})} \cdot J_1(\delta_0) \cdot \sqrt{2} \quad (\text{Gleichung 2.16})$$

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \tanh\left(\frac{\ln 10}{2} \cdot (A_{LZPL} - A_{RZPL})\right) \cdot J_1(\delta_0) \cdot \sqrt{2} \quad (\text{Gleichung 2.17})$$

Für kleine CD-Signale ($\Delta A < 0,01$) kann der Unterschied zwischen $\tanh(0,5 \Delta A \ln 10)$ und $(0,5 \Delta A \ln 10)$ vernachlässigt werden und man erhält die folgende Gleichung (Drake 1986).

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \left(\frac{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)}{\sqrt{2}} \right) \cdot \Delta A \quad (\text{Gleichung 2.18})$$

Diese Gleichung kann nach ΔA umgestellt werden. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen Zirkulardichroismus und dem Spannungsverhältnis.

$$\Delta A = \frac{\sqrt{2}}{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)} \cdot \frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} \quad (\text{Gleichung 2.19})$$

Für $\delta_0 = \pi/2$ muss das Spannungsverhältnis mit 1,083 multipliziert werden um ΔA zu erhalten. Neben Messungen mit $\delta_0 = \pi/2$ (Shindo und Nakagawa 1985) werden auch CD-Messungen beim Maximum der Besselfunktion J_1 mit $\delta_0 = 1,83$ (Shindo und Ohmi 1985), $\delta_0 = 1,841$ (Anson *et al.* 1977), mit $\delta_0 = 1,98$ (Velluz *et al.* 1965) und bei der Nullstelle der Besselfunktion J_0 mit $\delta_0 = 2,40$ (Cheng *et al.* 1975, Nafie 2000) durchgeführt.

2.4 Berechnung der Extinktion über den Gleichspannungsanteil und die Photomultiplierhochspannung

Bei der Messung von Spektren, von langsamen und continuous-flow Kinetiken wird die Hochspannung des Photomultipliers so geregelt, dass der Gleichstromanteil des Photomultipliers I_{DC} konstant bleibt. Bei stopped-flow Kinetiken und Extinktionsmessungen erfolgt die Messung bei konstanter Hochspannung. Werden Photomultiplierhochspannung U_{HV} und Gleichspannungsanteil U_{DV} aufgezeichnet, so ist es möglich Extinktionswerte zu berechnen. Dazu muss aus folgender Gleichung, mit der der Zusammenhang zwischen der Verstärkung des Photomultipliers σ und der Hochspannung näherungsweise beschrieben werden kann, von den beiden vom Photomultiplier abhängigen Konstanten K_{PM} und Z die Konstante Z bekannt sein (Arvinte *et al.* 2004).

$$\sigma = K_{PM} \cdot (U_{HV})^Z \quad (\text{Gleichung 2.20})$$

Durch einsetzen in Gleichung 2.13 erhält man folgende Gleichung.

$$U_{DV} = \frac{(10^{-A_{LZPL}(\lambda)} + 10^{-A_{RZPL}(\lambda)})}{2} \Phi_0 \cdot e \cdot Q \cdot R_{det} \cdot K_{PM} \cdot (U_{HV})^Z \quad (\text{Gleichung 2.21})$$

Durch umstellen erhält man die folgende Gleichung

$$\frac{U_{DV}}{\Phi_0 \cdot (e \cdot Q \cdot R_{det} \cdot K_{PM}) \cdot (U_{HV})^Z} = \frac{(10^{-A_{LZPL}(\lambda)} + 10^{-A_{RZPL}(\lambda)})}{2} \quad (\text{Gleichung 2.22})$$

Da der Absorptionsunterschied nur einige tausendstel der Absorption beträgt entspricht dies der Transmission (10^{-4}). Bei der Verwendung von Synchrotronstrahlung ändert sich der Photonenfluss mit

der Zeit. Der Photonenfluss ist proportional zur Zahl der Elektronen im Speicherring die durch den Ringstrom I_{RC} beschrieben wird. Für den Extinktionsunterschied zwischen Probe und Kontrolle (Index K) ergibt sich so folgende Gleichung.

$$A_{Extinktion} = Z \cdot \lg \frac{U_{HV}}{U_{HV,K}} - \lg \frac{U_{DV}}{U_{DV,K}} + \lg \frac{I_{RC}}{I_{RC,K}} \quad (\text{Gleichung 2.23})$$

Ersetzt man die Kontrollmesswerte durch konstante Werte erhält man für jede Messung Pseudoabsorptionswerte A_{PsA} .

$$A_{PsA} = Z \cdot \lg \frac{U_{HV}}{[1\text{kV}]} - \lg \frac{U_{DV}}{[0,3\text{V}]} + \lg \frac{I_{RC}}{[0,1\text{A}]} \quad (\text{Gleichung 2.24})$$

Die Differenz zweier Pseudoabsorptionswerte entspricht der Extinktion.

$$A_{Extinktion} = A_{PsA} - A_{PsA,K} \quad (\text{Gleichung 2.25})$$

3 Praktische Aspekte bei CD-Messungen

3.1 Fehlerquellen bei CD-Messungen

3.1.1 Statistische Fehler - Einfluss verschiedener Faktoren auf das Signal-Rausch-Verhältnis

Bei Messungen an kommerziellen CD-Spektrometern und SRCD-Messplätzen wird das Signal-Rausch-Verhältnis meist durch weißes Rauschen dominiert, da hier Lichtquellen mit einem hohen Lichtfluss und Photomultiplier mit einem niedrigem Dunkelstrom verwendet werden und die Fluktuationen in der Primärintensität der in kommerziellen CD-Spektrometern verwendeten Lampen deutlich langsamer als die Frequenz des PEMs von 50 kHz ist. Die 100 ns Lücke mit dem Einzelpuls in der Pulsfolge der Synchrotronstrahlung liegt im MHz-Bereich, die Abnahme der Gesamtintensität erfolgt über Stunden (siehe Kapitel 4), ein negativen Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis ist daher nicht zu erwarten. Wie beispielsweise durch Velluz *et al.* (1965), Anson und Bayley (1974) und Drake (1986) dargelegt, ergibt sich für das Signal-Rausch-Verhältnis in diesem Fall folgende Gleichung.

$$\frac{S}{N} = k_{\text{det}} \cdot \Delta A \cdot \sqrt{10^{-A} \cdot Q \cdot \Phi_0 \cdot t} \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

In die Konstante k_{det} gehen weitere von Messaufbau und Detektor abhängige Faktoren wie beispielsweise $J_1(\delta_0)$ ein, die in dieser Arbeit aber nicht diskutiert werden. Die Zeit t ist die Messzeit. Substituiert man ΔA in Gleichung 3.1 über Gleichung 2.6 erhält man folgende Gleichung anhand derer der Einfluss der einzelnen Faktoren diskutiert wird.

$$\frac{S}{N} = k_{\text{det}} \cdot \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon} \cdot A \cdot \sqrt{10^{-A} \cdot Q \cdot \Phi_0 \cdot t} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

3.1.1.1 Einfluss von Photonenfluss und spektraler Bandbreite

Der Photonenfluss sollte möglichst hoch sein, aber nicht zu Schäden an der Probe führen, wie sie beispielsweise von (Wien *et al.* 2005) beschrieben wurden. Er ist abhängig von der Helligkeit der Lichtquelle, der Effektivität mit der das Licht gesammelt und in Richtung Monochromator gelenkt wird und von der spektralen Bandbreite des Monochromators. Eine Verdopplung der spektralen Bandbreite führt, wenn der Eintrittsspalt S_1 vollständig und gleichmäßig ausgeleuchtet ist und Ein- und Austrittsspalt S_2 verdoppelt werden zu einer Vervierfachung des Photonenflusses (Velluz *et al.* 1965) (Gleichung 3.3) und einer Verdopplung des Signal-Rausch-Verhältnisses (siehe Gleichung 3.2).

$$\Phi = \frac{\Phi_{\text{max}}}{S_{1,\text{max}} \cdot S_{2,\text{max}}} \cdot S_1 \cdot S_2 \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

Bei Messungen von Proben in Lösung wird häufig eine Bandbreite zwischen 0,5 und 2 nm verwendet, da hier meist breitere Absorptions- und Zirkulardichroismusbanden vorliegen und Spektren mit einem Punktabstand von 0,5 oder 1 nm gemessen werden. Die Spalteinstellung des Monochromators wird so

gewählt, dass sich die spektrale Bandbreite während der Messung nicht ändert. Der Einfluss der Bandbreite auf das gemessene CD-Signal wurde von Velluz *et al.* (1965) beschrieben.

3.1.1.2 Einfluss der Quantenausbeute des Detektors

Die Quantenausbeute ist abhängig vom verwendeten Detektor. Die am SRCD-Messaufbau verwendeten Channelphotomultiplier C-921 und C-1321 von Perkin Elmer haben zwischen 125 und 295 nm eine Quantenausbeute von 10 bis 20 %. Bei Wellenlängen über 295 nm fällt die Quantenausbeute deutlich ab. Der Channelphotomultiplier C-1382 hat zwischen 170 und etwa 500 nm eine Quantenausbeute von 10 bis 20 %. Verwendet man andere Detektoren kann der messbare Wellenlängenbereich sich ändern.

3.1.1.3 Einfluss der Messzeit

Wie beim Photonenfluss führt eine Vervielfachung der Messzeit zu einer Verdopplung des Signal-Rausch-Verhältnisses (siehe Gleichung 3.2). Ist eine Erhöhung des Photonenflusses nicht möglich oder nicht sinnvoll und das Signal-Rausch-Verhältnis noch nicht zufrieden stellend, so muss daher die Messzeit erhöht werden. Am besten führt man dazu Wiederholungsmessungen durch, da man diese mitteln und die Fehler der Mittelwerte berechnen kann.

3.1.1.4 Einfluss der Absorption des Lösungsmittels

Im Idealfall würde das Lösungsmittel im Messbereich nicht absorbieren, da die Lösungsmittelabsorption praktisch den Photonenfluss am Detektor reduziert. Im Fern-UV-Bereich absorbieren allerdings nahezu alle Puffersubstanzen sowie Wasser selbst. Das Signal-Rausch-Verhältnis verringert sich mit zunehmender Absorption des Lösungsmittels. Bei einer Lösungsmittelabsorption von 0,2 hat man nur noch etwa 80 % des optimalen Signal-Rausch-Verhältnisses, bei 0,5 etwa 56 % und bei 1,0 etwa 32 % (siehe Gl. 3.2).

3.1.1.5 Einfluss der Absorption von Luft

Wie die Absorption des Lösungsmittels kann auch die Absorption von Bestandteilen der Luft den Photonenfluss am Detektor reduzieren. Die relevanten Informationen dazu wurden zum Beispiel von Boyce (1941) zusammengefasst und werden hier kurz wiedergegeben. Von den Bestandteilen der Luft absorbiert Sauerstoff im UV-Bereich am stärksten. Die Schumann-Runge Banden von Sauerstoff beginnen bei etwa 195 nm und konvergieren zu einer Grenze von 175,9 nm, unterhalb der eine starke kontinuierliche Absorptionsbande liegt. Messungen mit Luft wären auf Grund der Sauerstoffabsorption auf einen Messbereich bis etwa 185 nm begrenzt. Die kommerziellen CD-Spektrometer werden daher mit Stickstoff gespült. SRCD-Messplätze haben entweder einen mit Stickstoff gespülten Probenraum oder Vakuum um die Probenzelle. Stickstoff ist bis 145 nm transparent. Zwischen 145 nm und 99 nm liegt eine Serie scharfer schmaler Absorptionsbanden. Kohlendioxid und Wasserdampf absorbieren auch im UV-Bereich jedoch bei weitem nicht so stark wie Sauerstoff (Boyce 1941).

3.1.1.6 Einfluss der optischen Bauelemente

Die Transparenz gezüchteten Quarzkristallen endet bei etwa 145 nm. Bei Teilen aus synthetischem Quarzglas ist der verfügbare Messbereich durch Verunreinigungen deutlich stärker eingeschränkt (Hass und Hunter 1978). Für die verwendeten Quarz-Suprasil-Küvetten war er auf den Bereich über 160 nm

begrenzt (Abbildung 5.21b). Beim Messaufbau am BESSY, bei dem Fenster und PEM aus Calciumfluorid und der Polarisator aus Magnesiumfluorid bestehen, liegt die Grenze bei 124 nm (Abbildung 5.21b).

3.1.1.7 Einfluss der Probenabsorption

Die Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses von der Probenabsorption ist in Abbildung 3.1

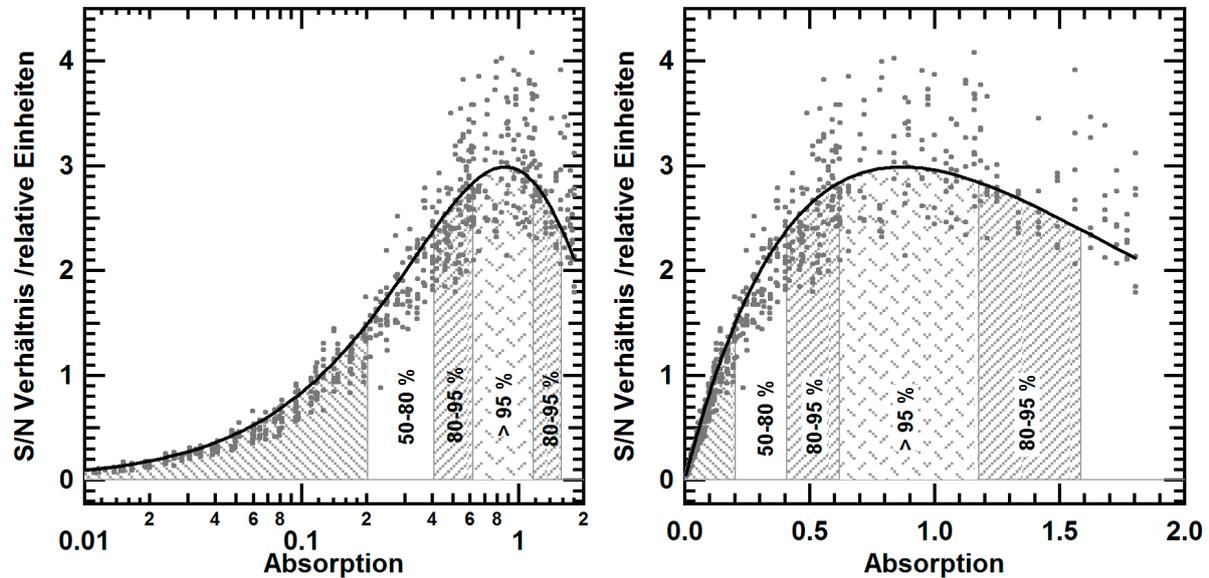


Abbildung 3.1 - Absorptionsabhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses

Das für Unterschiede in Dissymmetrieverhältnis und Photonenfluss korrigierte Signal-Rausch-Verhältnis einiger Messungen am 3m-NIM-C (dunkelgraue Punkte) zeigt die für weißes Rauschen erwartete Absorptionsabhängigkeit (schwarze Linie). Unter diese Linie sind Bereiche hellgrau gefüllt und relativ zum Optimum das jeweilige S/N Verhältnis angegeben.

dargestellt. Das Optimum liegt bei einer Absorption von 0,87, für eine Probenabsorption zwischen 0,62 und 1,17 hat man mehr als 95 % des maximalen Signal-Rausch-Verhältnisses und bei einer Probenabsorption zwischen 0,41 und 1,58 mehr als 80 %. Bei Proteinen unterscheidet sich die Absorption der aromatischen Seitenketten zwischen 300 und 250 nm von der der Peptidbindungen bei etwa 220 nm um ein bis zwei Größenordnungen, die Absorption bei etwa 190 nm ist noch um bis zu einer Größenordnung höher. Bei der Messung von CD-Spektren von Proteinen werden für Nah- und für den Fern-UV-Bereich unterschiedliche Proteinkonzentrationen beziehungsweise unterschiedliche Pfadlängen eingesetzt. Im Fern-UV-Bereich kann man auch verschiedene Konzentrationen beziehungsweise Pfadlängen für die Absorptionsbande bei etwa

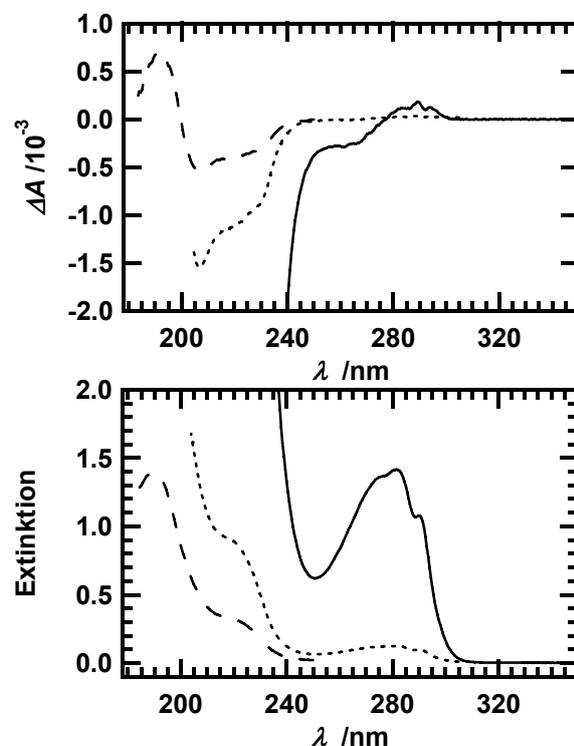


Abbildung 3.2 – Spektren von Lysozym

Die Abbildung zeigt CD-Spektren und Extinktion von drei Messungen mit Lysozym-Lösungen unterschiedlicher Konzentration und Pfadlänge.

220 nm und die bei etwa 190 nm verwenden. Dies ist für Lysozym in Abbildung 3.2 gezeigt. Bei Pfadlängen von 100-300 nm, wie sie für Messungen über die Wasserabsorptionsbande hinaus erforderlich sind, kann mit Proteinen in wässriger Lösung eine optimale Probenabsorption nicht mehr erreicht werden, so dass diese eher bei 0,2 und darunter liegt. Absorbieren Probe und Lösungsmittel das Licht sehr stark, kann es zu systematischen Abweichungen kommen, wenn die obere Grenze der Photomultiplierhochspannung erreicht wird und, wie beispielsweise am Jasco J-715 CD-Spektrometer (JASCO 1995), nur die Wechsellspannungsamplitude als Maß für das CD-Signal detektiert wird. Wenn Falschlicht in relevanter Größenordnung den Detektor erreicht, kann das CD-Signal verfälscht werden. (siehe Kapitel 5.1.1.1).

3.1.1.8 Bedeutung des Dissymmetrieverhältnisses

Da es sich beim Dissymmetrieverhältnis um von der Substanz und der Wellenlänge abhängige Konstanten handelt, ist das Dissymmetrieverhältnis bei der Messung von Spektren einer Substanz nicht von Bedeutung. Soll jedoch die Kinetik, z. B. einer Reaktion $A \rightarrow B$ untersucht werden, so hat bei der optimalen Wellenlänge der Quotient aus dem Betrag der Differenz des molaren Zirkulardichroismus von A und B und der Summe des Extinktionskoeffizienten von A und B ein Maximum. Dabei muss auch die Absorption der Probe berücksichtigt werden, da meist nur bestimmte Pfadlängen zur Verfügung stehen und bei einer Konzentrationsabhängigkeit auch bei verschiedenen Konzentrationen gemessen werden muss.

3.1.2 Kalibrierung und Systematische Fehler im CD-Signal

Bei Zirkular- und Lineardichroismus Messungen kommt es durch statische Spannungsdoppelbrechung im photoelastischen Modulator und durch lineare Doppelbrechung in Linsen oder Fenstern zu einer systematischen Verfälschung des Messsignals (O'Handley 1973, Cheng *et al.* 1975, Schönhofer *et al.* 1983). Da der Detektor eine polarisationsabhängige Empfindlichkeit hat, wird bei einem Aufbau wie er in Abbildung 2.1 skizziert ist, eine Abhängigkeit der Verfälschung vom Drehwinkel des Detektors um die Ausbreitungsrichtung des Lichts beobachtet (O'Handley 1973), wenn statische Spannungsdoppelbrechung oder lineare Doppelbrechung vorhanden ist (Shindo und Nakagawa 1985). Bei nicht vollständiger Polarisation des Lichts oder durch Falschlicht kann das gemessene CD-Signal verringert werden.

3.1.2.1 Konventionelle Kalibrierung von CD-Spektrometern

Der Drehwinkel des Photomultipliers ϕ wird meist so gewählt, dass die CD-Basislinie ohne Probe über einen großen Wellenlängenbereich nahe bei Null liegt und idealer Weise gerade ist. Dadurch kann im Messaufbau vorhandene Spannungsdoppelbrechung teilweise kompensiert werden, kommt durch die Probe zusätzliche lineare Doppelbrechung hinzu wird das Messsignal beeinflusst. Aus diesem Grund sollten nur polarimetrisch vermessene Küvetten, die kein artifizielles CD-Signal zeigen, für Zirkulardichroismus-Messungen verwendet werden.

Neben der Drehung des Photomultipliers werden Messungen mit 1-*S*-Campher-10-sulfonsäure (Cassim und Yang 1969, DeTar 1969, Chen und Yang 1977), Pantholacton oder Tris(ethylendiamin)-kobalt(III)-

iodid bzw. -chlorid (Schippers und Dekkers 1981, Miles *et al.* 2003) empfohlen, anhand der CD-Spektrometer „kalibriert“ werden können.

Durch die Kalibrierung z. B. mit 1-*S*-Campher-10-sulfonsäure kann zum einen der Einfluss einer unvollständigen Polarisation des Lichts und andere Effekte, die zu einer Reduzierung des gemessenen CD-Signals führen ausgeglichen werden, indem das CD-Signal über einen Skalierungsfaktor an den Erwartungswert angepasst wird. In einigen CD-Spektrometern, in denen der Gleichspannungsanteil konstant gehalten wird, erfolgt nur die Messung der Wechsellspannungsamplitude, so dass eine Kalibrierung notwendig ist (JASCO 1995). Da häufig 1-*S*-Campher-10-sulfonsäure oder deren Ammoniumsalz (ACS) für diese Kalibrierung verwendet wird, liegt bei etwa 290 nm meist eine gute Übereinstimmung zwischen an verschiedenen CD-Spektrometern gemessenen Werten vor. Aufgrund unterschiedlicher Spannungsdoppelbrechung können bei anderen Wellenlängen jedoch zum Teil deutliche Unterschiede beobachtet werden (Tuzimura *et al.* 1977, Konno *et al.* 1981, Miles *et al.* 2003). Ob ein Ausgleich der auf ein Vorhandensein von Spannungsdoppelbrechung, Zirkulardichroismus und zirkularer Doppelbrechung beruhenden Verfälschungen des CD-Signals durch Kalibrierung an vier Punkten, wie sie von Miles *et al.* (2003) vorgeschlagen wird, möglich ist und in wie weit die Literaturwerte, auf der diese Kalibrierung beruhen richtig sind ist zu hinterfragen. Eigenartig in der Publikation von Miles *et al.* (2003) ist, dass bei Kalibrierung bei einer Wellenlänge im gezeigten Datensatz bei dieser Wellenlänge zum Teil noch deutliche Abweichungen auftreten, bei dieser Wellenlänge bei der vorgeschlagenen Kalibrierung über vier Punkte solche Abweichungen aber nicht mehr zu sehen sind.

3.1.2.2 Der Einfluss der polarisationsabhängigen Empfindlichkeit des Detektors auf das Messsignal

Die Auswirkungen von linearer Doppelbrechung auf das CD-Signal ist davon abhängig, ob diese vor oder nach der Probe auftritt (Jensen *et al.* 1978). Der Einfluss linearer Doppelbrechung kann durch Subtraktion des Lösungsmittelspektrums nicht vollständig eliminiert werden (Shindo und Nakagawa 1985).

Wird die zirkulare Doppelbrechung der Probe nicht berücksichtigt und geht man davon aus, dass die lineare Spannungsdoppelbrechung nur klein ist, kann man diese in einem Term zusammenfassen (Nafie 2000), so dass sich anstelle der idealen Gleichung 2.18 folgende Gleichung ergibt.

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \left(\frac{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)}{\sqrt{2}} \right) \cdot \frac{\Delta A - \frac{2}{\ln 10} \cdot D_{Pol}(\phi) \cdot \delta_B(\lambda) \sin(2(\beta - \phi))}{1 + D_{Pol}(\phi) \cdot J_0(\delta_M^0) \cos(2\phi)} \quad (\text{Gleichung 3.4})$$

Hierbei ist $D_{Pol}(\phi)$ die Polarisationsempfindlichkeit des Photomultipliers, $J_n(x)$ sind Besselfunktionen, δ_M^0 ist Amplitude der Phasenverschiebung des PEMs, δ_B ist die Amplitude der kleinen linearen Doppelbrechung und β ist der Drehwinkel dieser Doppelbrechung. Die Gleichung zeigt, dass außer dem Zirkulardichroismus ΔA , die Polarisationsempfindlichkeit $D_{Pol}(\phi)$ und die Spannungsdoppelbrechung δ_B das Spannungsverhältnis beeinflussen.

3.1.2.3 Reduzierung von Fehlern im CD-Signal durch „Polarization Scrambling“

Beim „Polarization Scrambling“ wird die Polarisation der Lichts aktiv geändert, um eine Polarisationsabhängigkeit aufzuheben. Dabei wird die Polarisation verwürfelt, das heißt, dass die Polarisation zwar zu jedem Zeitpunkt bekannt, im zeitlichen Mittel aber zufällig ist. Bei Zirkulardichroismus-Messungen, bei denen ein Photoelastischer Modulator (PEM) zur Erzeugung zirkular polarisierten Lichts eingesetzt wird, kann dies durch einen zweiten PEM realisiert werden, der hinter der zu messenden Probe im Lichtstrahl platziert wird (Cheng *et al.* 1975). Dieser muss sich in seiner Eigenfrequenz geringfügig von der des ersten PEMs unterscheiden. Diese Methode wurde von (Nafie 2000) für CD-Messungen im IR-Bereich ausführlich als „Dualpolarisationsmodulation (DPM) ohne zweiten Polarisator“ beschrieben und am 3m-NIM-C erstmals für Zirkulardichroismus-Messungen im UV-Bereich angewendet, wobei auf die Messung der Wechsellspannungsamplitude mit der Frequenz und Phaseninformation des zweiten PEMs zur weiteren Reduktion der des Einflusses von Spannungsdoppelbrechung vorerst verzichtet wurde. Der Aufbau mit einfacher Polarisationsmodulation wird entsprechend als SPM bezeichnet. Für das Spannungsverhältnis ergibt sich bei der DPM folgende Gleichung wenn der Wechsellspannungsanteil nur mit der Phase des ersten PEMs bestimmt wird.

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \left(\frac{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)}{\sqrt{2}} \right) \cdot \frac{\Delta A - \frac{2 \cdot D_{Pol}(\phi) \cdot \delta_B(\lambda)}{\ln 10} (\cos 2\beta \sin 2\phi - \sin 2\beta \cos 2\phi \cdot J_0(\delta_{M2}^0))}{1 + D_{Pol}(\phi) \cdot J_0(\delta_{M1}^0) \cdot J_0(\delta_{M2}^0) \cos(2\phi)}$$

(Gleichung 3.5)

Wird die Amplitude des zweiten PEMs δ_{M2}^0 auf $0,765\pi$ gestellt so ist die Besselfunktion nullter Ordnung Null und die es ergibt sich folgende Gleichung.

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \left(\frac{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)}{\sqrt{2}} \right) \cdot \left(\Delta A - \frac{2 \cdot D_{Pol}(\phi) \cdot \delta_B(\lambda)}{\ln 10} (\cos 2\beta \sin 2\phi) \right) \quad \text{(Gleichung 3.6)}$$

Wird der Detektordrehwinkel ϕ auch auf Null gestellt, so vereinfacht sich die Gleichung derart, dass sie der Gleichung 2.18 entspricht.

3.2 Skalierung und Vergleich von Spektren

Um Spektren, die mit verschiedenen Konzentrationen und Pfadlängen aufgenommen wurden zu vergleichen, ist es sinnvoll, diese Spektren auf eine einheitliche Größe zu skalieren. Dafür wurde je nach Eignung eine von drei Möglichkeiten angewendet. Nach der Skalierung wurden die Spektren visuell verglichen.

3.2.1 Skalierung bei einer Wellenlänge

Ein Beispiel für Skalierung bei einer Wellenlänge ist die Berechnung molarer Werte anhand eines Extinktionskoeffizienten. Der Skalierungsfaktor a ist dabei der Quotient von Referenzwert $s_{ref,\lambda}$ geteilt durch den Messwert $s_{exp,\lambda}$.

$$a = \frac{s_{\text{ref},\lambda}}{s_{\text{exp},\lambda}} \quad (\text{Gleichung 3.7})$$

Das Produkt von Skalierungsfaktor a und gemessenem Spektrum $s_{\text{exp}}(\lambda)$ ist das skalierte Spektrum $s_{\text{skal}}(\lambda)$.

$$s_{\text{skal}}(\lambda) = a \cdot s_{\text{exp}}(\lambda) \quad (\text{Gleichung 3.8})$$

3.2.2 Skalierung mit einem Vergleichsspektrum über den Wert von χ^2

Steht ein Vergleichsspektrum $s_{\text{ref}}(\lambda)$ zur Verfügung, kann der Skalierungsfaktor a (Gleichung 3.9) durch Minimierung der mittleren quadratischen Abweichung (χ^2) (Gleichung 3.10) zwischen Vergleichsspektrum und skaliertem Spektrum, gewichtet mit der Standardabweichung der Punkte des zu skalierenden Spektrums $\sigma_{s_{\text{exp}}(\lambda)}$ bestimmt werden.

$$s_{\text{skal}}(\lambda) = a \cdot s_{\text{exp}}(\lambda) + n \quad (\text{Gleichung 3.9})$$

$$\chi^2 = \sum_{\lambda=\lambda_{\text{min}}}^{\lambda_{\text{max}}} \frac{(s_{\text{ref}}(\lambda) - s_{\text{skal}}(\lambda))^2}{\sigma_{s_{\text{exp}}(\lambda)}} \quad (\text{Gleichung 3.10})$$

Dazu wurde eine lineare Regression mit der Software IgorPro (WaveMetrics, USA) durchgeführt. Dabei muss die Zahl und der Abstand der Messpunkte von gemessenem Spektrum und Vergleichsspektrum gleich sein. Die Abweichung des Wertes n (Gleichung 3.9) von Null sollte deutlich unter der Standardabweichung der Messpunkte liegen.

3.2.3 Skalierung mit einem Vergleichsspektrum über die „Standardabweichung“

Wird für das Vergleichsspektrum und das gemessene Spektrum über einen identischen Wellenlängenbereich die Standardabweichung $\sigma_{s(\lambda)}$ formal berechnet (Gleichung 3.11), so können diese Werte zur Berechnung des Skalierungsfaktors verwendet werden.

$$\sigma_{s(\lambda)} = \sqrt{\sum_{\lambda=\lambda_{\text{min}}}^{\lambda_{\text{max}}} \frac{(s(\lambda) - \bar{s})^2}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 3.11})$$

Der Skalierungsfaktor a ist dabei der Quotient der Standardabweichung des Vergleichsspektrums geteilt durch die Standardabweichung des gemessenen Spektrums.

$$a = \frac{\sigma_{s_{\text{ref}}(\lambda)}}{\sigma_{s_{\text{exp}}(\lambda)}} \quad (\text{Gleichung 3.12})$$

3.2.4 Auswahl der Skalierungsmethode

Bei bekannten Konzentrationen und Schichtdicken wurden diese Werte zur Berechnung des Skalierungsfaktors verwendet (Kapitel 3.2.1). Bei zusammensetzbaren Küvetten können von Präparation zu Präparation Variationen der Pfadlänge auftreten. Bei Probenpräparationen zwischen zwei Fenstern ohne Abstandshalter werden sehr unterschiedliche Pfadlängen erreicht. In diesen Fällen erfolgt eine

Skalierung anhand von Spektren, die bei bekannter Konzentration und Pfadlänge aufgenommen wurden. Bei der Bestimmung des Skalierungsfaktors mit linearer Regression (Kapitel 3.2.2) und über die Standardabweichung (Kapitel 3.2.3) können systematische Abweichungen auftreten. Um diese anhand eines Beispiels aufzuzeigen, wurde zu einem CD-Spektrum statistisches Rauschen addiert (Abbildung 3.3a)), des Weiteren wurde der Einfluss einer Wellenlängenverschiebung untersucht. Mit zunehmendem statistischem Rauschen nimmt der Fehler des Skalierungsfaktors für die beiden Skalierungsmethoden zu, bei der Skalierung über die Standardabweichung fließt das Rauschen mit in den Skalierungsfaktor ein (Abbildung 3.3b)). Bei Spektren mit deutlichen Unterschieden im Signal-Rausch-Verhältnis ist die lineare Regression daher besser geeignet. Eine Verschiebung der Wellenlänge führt zu systematischen Abweichungen in der Berechnung des Skalierungsfaktors, die bei der linearen Regression deutlich größer sind als bei der Skalierung über die Standardabweichungen der Spektren (Abbildung 3.3c). Liegt eine Wellenlängenverschiebung vor oder unterscheiden sich die Spektren im Punktabstand ist eine Skalierung über die Standardabweichung besser geeignet.

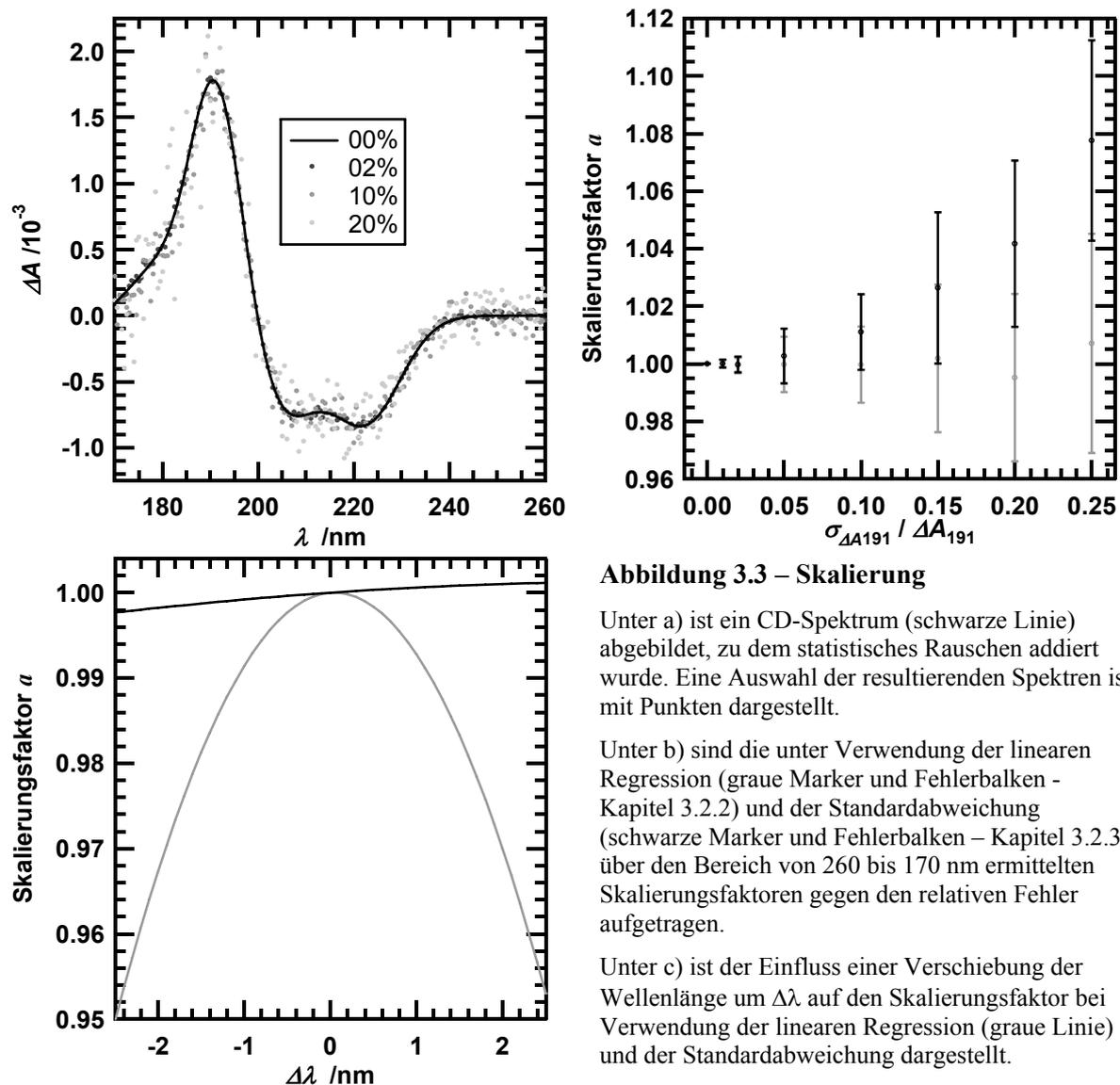


Abbildung 3.3 – Skalierung

Unter a) ist ein CD-Spektrum (schwarze Linie) abgebildet, zu dem statistisches Rauschen addiert wurde. Eine Auswahl der resultierenden Spektren ist mit Punkten dargestellt.

Unter b) sind die unter Verwendung der linearen Regression (graue Marker und Fehlerbalken - Kapitel 3.2.2) und der Standardabweichung (schwarze Marker und Fehlerbalken - Kapitel 3.2.3) über den Bereich von 260 bis 170 nm ermittelten Skalierungsfaktoren gegen den relativen Fehler aufgetragen.

Unter c) ist der Einfluss einer Verschiebung der Wellenlänge um $\Delta \lambda$ auf den Skalierungsfaktor bei Verwendung der linearen Regression (graue Linie) und der Standardabweichung dargestellt.

4 Beschreibung des SRC-D-Messaufbaus

4.1 Synchrotronstrahlung als Lichtquelle

Vom Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie (HZB) wird in Berlin-Adlershof eine Synchrotronstrahlungsquelle (BESSY II) betrieben. In dieser wird ein Elektronenstrahl in einem Mikrotron und einem Synchrotron bis zu einer Energie von 1,7 GeV beschleunigt und anschließend in einen Speicherring injiziert. Im Multi Bunch Hybrid Modus, der für Zirkulardichroismus-Messungen verwendet wird, werden bis zu 350 Elektronenpulse von ca. 30 ps Dauer mit bis zu 0,9 mA pro Puls und einem Abstand von 2 ns in den Speicherring injiziert. Die Umlaufzeit der Elektronen im Speicherring beträgt rund 800 ns. In die Mitte der verbleibenden Lücke wird ein Elektronenpuls von etwa 5 mA injiziert. So wird bei der Injektion ein Ringstrom I_{RC} von bis zu 320 mA erreicht. Der Ringstrom nimmt nach der Injektion kontinuierlich ab und fällt bis zur folgenden Injektion neuer Elektronen in den Speicherring auf etwa die Hälfte des Anfangswertes. Die Pulsfolge und der Verlauf des Ringstroms während eines Tages sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

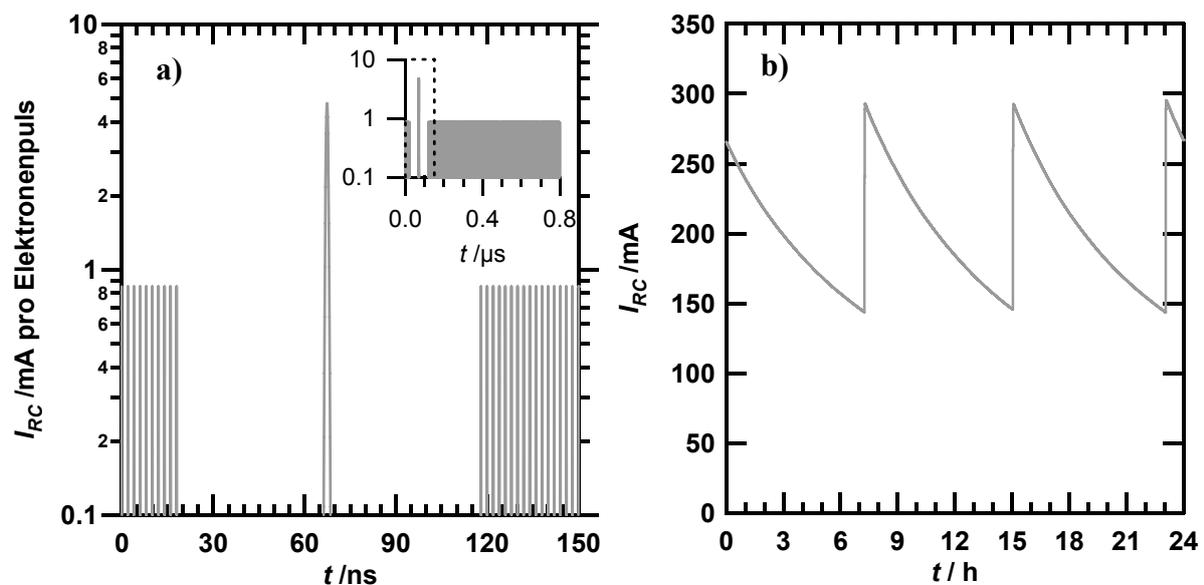


Abbildung 4.1 - Multi Bunch Hybrid Modus am BESSY

Unter a) ist die Pulsfolge um den einzelnen Elektronenpuls und im eingefügten Diagramm über die gesamte Umlaufzeit des Speicherrings dargestellt. Unter b) ist der Verlauf des Ringstroms eines Tages abgebildet.

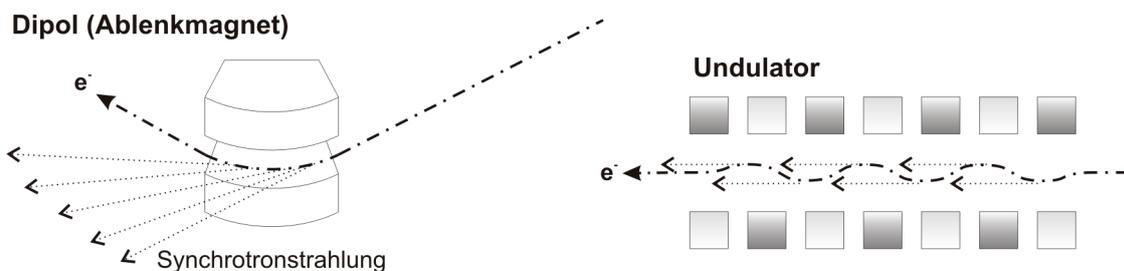


Abbildung 4.2 - Schematische Darstellung von Dipol und Undulator als Quellen von Synchrotronstrahlung

Der Elektronenstrahl ist als Strich-Punkt-Linie, die Synchrotronstrahlung als gepunktete Linie dargestellt.

Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1) erwähnt, entsteht die Synchrotronstrahlung wenn der Elektronenstrahl durch Magneten abgelenkt wird. Sie wird in Vorwärtsrichtung abgegeben. Je höher die Bewegungsenergie dieser Elektronen ist, desto stärker ist das entstehende Licht gebündelt und desto energiereicher ist das Licht. Am BESSY II stehen für den UV-Bereich ein Dipol mit einem 3m-NIM und ein Undulator mit einem 10m-NIM zur Verfügung. Dipol und Undulator sind in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Von der am Dipol fächerförmig entstehenden Synchrotronstrahlung wird am 3m-NIM nur ein Teil genutzt, da bei der Planung des Strahlrohres der Schwerpunkt auf ein hohes Auflösungsvermögen und eine kleine Größe des Lichtflecks im Fokus gelegt wurde und nicht auf den größtmöglichen Photonenfluss (Reichardt *et al.* 2001b). Der Messplatz C am 3m-NIM ist in der Beschreibung des Strahlrohres (Reichardt *et al.* 2001b) noch nicht enthalten. Am Messplatz C wird der Strahl hinter dem Monochromator (3m-NIM) vom Spiegel M3 nach oben reflektiert und der Austrittsspalt (AS) durch den Spiegel M4 im Messaufbau (MA) abgebildet (Abbildung 4.3).

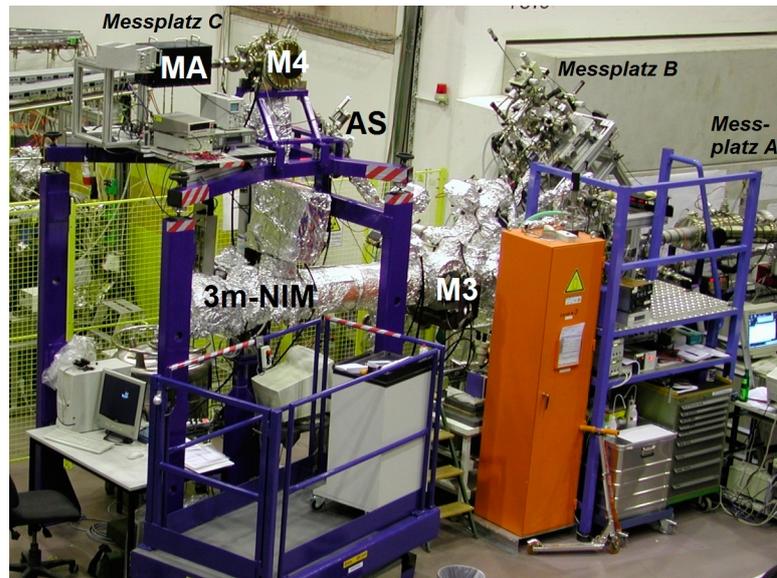


Abbildung 4.3 - Messplatz 3m-NIM-C

Der Monochromator 3m-NIM, der Spiegel M3, der Spiegel M4, der Austrittsspalt AS und der Messaufbau MA am Messplatz C sowie die Messplätze A und B sind gekennzeichnet.

Ein Undulator besteht aus vielen nah beieinander liegenden Magneten, die den Elektronenstrahl jeweils nur geringfügig ablenken. Da die Elektronen sich mit nahezu Lichtgeschwindigkeit bewegen, werden sie durch das periodisch ändernde Magnetfeld des Undulators und durch das elektrische Feld der schon entstandenen Photonen beeinflusst und als Folge entsteht ein Spektrum mit schmaler Bandbreite um die mittlere Wellenlänge λ , bei der das Magnetfeld des Undulators und elektrische Feld der entstandenen Photonen in Phase sind, sowie um die höheren harmonischen Schwingungen ($\lambda/2$, $\lambda/3$, ...) (Sutherland 1996). Durch die Verwendung des quasi-periodischen Undulator U125-2 sind die höheren harmonischen Schwingungen rot verschoben und ihr Anteil so deutlich reduziert (Reichardt *et al.* 2001a). Die Wellenlänge λ wird durch Änderung des Abstands der Magneten variiert, mit einem Monochromator die spektrale Bandbreite eingestellt und die höheren harmonischen Schwingungen abgetrennt.

Messungen mit dem Messaufbau wurden am U125-2_NIM in zwei bis drei Wochen pro Jahr durchgeführt, in denen 30 % Strahlzeit zur Verfügung standen und die verbleibenden 70 % von weiteren Nutzern am Undulator U125-2 genutzt wurden, die Strahlzeit stand in 8h Schichten über die Woche verteilt zur Verfügung. Der größte Teil der Messungen wurde am 3m-NIM-C durchgeführt, an dem meist 50 % der Messzeit, d. h. 12 von 24 Stunden genutzt werden konnte. Für einige Wochen konnte der

Messplatz am 3m-NIM auch für die komplette Messzeit genutzt werden. Ein Nutzerwechsel am 3m-NIM fand durch Austausch bzw. Entfernung des Spiegels M3 hinter dem Monochromator statt, am Undulator U125-2 liegt der Monochromator hinter dem für den Nutzerwechsel benutzten Spiegel. Die Planung und Konstruktion des Messaufbaus wurde durch ein BMBF-Projekt seit 2001 gefördert (Seckler 2001-2006).

4.2 Messaufbau für Zirkulardichroismus-Messungen

Der Aufbau und die Funktionsweise eines CD-Spektrometers wurde schon unter 2.3 erklärt. Der experimentelle Aufbau (Abbildung 4.4) befindet sich in einer mit Stickstoff gespülten Messkammer. Diese ist durch ein Lithiumfluorid-Fenster vom jeweiligen Strahlrohr, 3m-NIM (Reichardt *et al.* 2001b) oder U125-2_NIM (Reichardt *et al.* 2001a), getrennt, welches unter Hochvakuum steht. Aufgrund des Druckunterschieds kann im Lithiumfluorid-Fenster Spannungs-

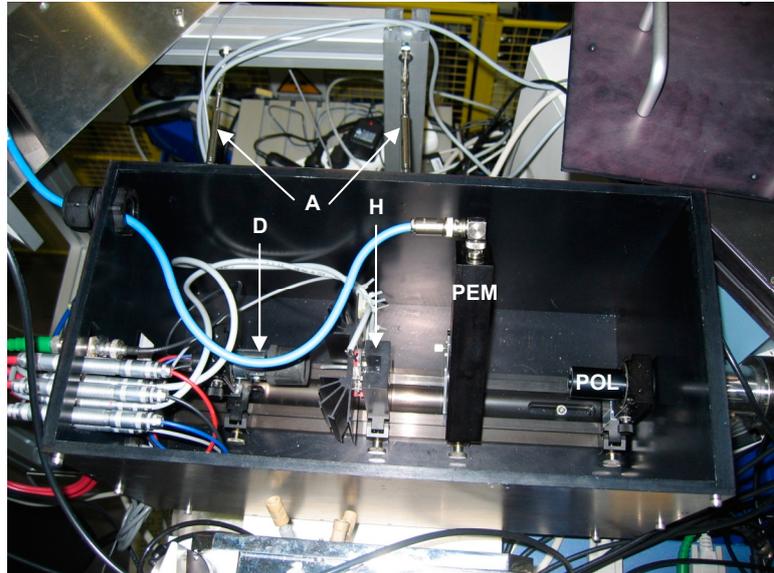


Abbildung 4.4 - Darstellung des Messaufbaus

Im Messaufbau sind Polarisator (POL), photoelastischer Modulator (PEM), Probenhalter (H) und Detektor (D) und der in der in der Abbildung zu sehende Teil der Aufhängung der Messkammer (A) gekennzeichnet.

reduziert. Der Grad linearer Polarisation des Lichts am 3m-NIM liegt auch nur etwas über 80 % (Reichardt *et al.* 2001b). Daher wurde hinter dem Lithiumfluorid-Fenster ein Rochon-Polarisator aus Magnesiumfluorid (POL) eingesetzt um eine vollständige Linearpolarisation des Lichts zu gewährleisten. Anschließend folgten ein photoelastischer Modulator (PEM) zur Erzeugung von zirkular polarisiertem Licht, ein Probenhalter (H) und einer der Channel-Photomultiplier (D). Über die Aufhängung der Messkammer (A) kann mit Hilfe von Lochblenden eine Ausrichtung des Messaufbaus erfolgen. Die Regelung der Hochspannung des Photomultipliers erfolgt durch eine vom BESSY, nach Plänen von Snyder (1984) gebaute Hochspannungsversorgung und -steuerung, deren Komponenten auf die verwendeten Photomultiplier abgestimmt sind. Das Messsignal wird durch einen Lock-In-Verstärker phasenabhängig detektiert. Die analogen Messwerte werden über eine Analog-Digital-Wandlerkarte digitalisiert. Sowohl die Steuerung des Monochromators und der Instrumente als auch die Speicherung der Daten (siehe Anhang A1) in einer Datenbank wurde in Labview (National Instruments, USA) programmiert (Baumgärtel 2003-2008). Die aktuelle Messung wird nach jedem Messpunkt in einer Datei lokal gespeichert, so dass infolge eines Programmabsturzes keine gemessenen Daten verloren gehen können. Nach der Messung wird diese Datei auf einen zweiten Computer zur Auswertung übertragen. Die Auswertung und vergleichende Betrachtung der Spektren erfolgte mit der Software IgorPro (WaveMetrics, USA). Das Einlesen der Messdaten, die Mittelung mehrerer Messungen, die Korrektur mit einer Basislinie

und die Abbildung einzelner oder mehrerer Spektren wurde mit Hilfe der softwareeigenen Skriptsprache automatisiert (Baumgärtel 2004-2008). Der Messplatz wurde im Rahmen des BMBF-Vorhabens (Seckler 2001-2006) von Peter Baumgärtel aufgebaut und von ihm betreut. Die Weiterentwicklung erfolgte auch auf Grundlage von mir durchgeführter Messungen. Die Verantwortung für die beiden Strahlrohre liegt beim BESSY. Der Strahlrohrbetreuer für 3m-NIM und U125-2_NIM ist Gerd Reichard.

4.3 Vorbereitungsarbeiten für Messungen am BESSY

Zu Beginn jeder Strahlzeit und nach Änderung des Messaufbaus wurde die Messkammer ausgerichtet. Dazu wurden zwei Lochblenden (Durchmesser 0,5 mm) in der Messkammer platziert und die Lage der Messkammer auf maximale Intensität optimiert. Konnte dadurch nicht der typische Photonenfluss erreicht werden und lag eine normale Strahl Lage im Speicherring vor, wurde die Strahl Lage im Strahlrohr durch den Strahlrohrbetreuer überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Nach Ausrichtung der Messkammer wurde bei Verwendung des Standardaufbaus (SPM) der Photomultiplier gedreht, bis die Gerätebasislinie ein CD-Signal möglichst nahe Null aufwies. Die Wellenlänge am 3m-NIM-C wurde über eine Messung der Nullten Ordnung des Monochromators oder durch Messung der Stickstoffabsorptionsbande bei 145 nm überprüft und gegebenen Falls korrigiert. Die Messkammer wurde meist mit 25-35 l Stickstoff pro Minute gespült.

4.4 Probenvorbereitung und -präparation

4.4.1 für Messungen mit Küvetten mit Pfadlängen von 1 cm bis 10 μm

Wenn nicht anders angegeben wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 5-15 mg ml⁻¹ gegen 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 dialysiert, mit einer ThermoVac-Pumpe entgast und für 30 min bei 100000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Kleine Proteine und Peptide (das Peptid „A2“, die FBP28-N15 WW-Domäne und das CSP *T. m.*) wurden ausgehend vom lyophilisiertem Zustand in entgasten Puffer oder Wasser gelöst und nicht dialysiert.

Küvetten mit Pfadlängen zwischen 1 und 10 mm wurden mit Protein- beziehungsweise Pufferlösungen blasenfrei befüllt. Beim Einsatz zusammensetzbarer rechteckiger Quarz-Suprasil-Küvetten wurden bei einer Pfadlänge von 100 μm 35 μl Protein- beziehungsweise Pufferlösungen, bei einer Pfadlänge von 10 μm 10 μl auf den Teil der Küvette mit Vertiefung pipettiert. Anschließend wurde der zweite Teil der Küvette so aufgelegt, dass keine Luftblasen mit eingeschlossen wurden. Der Außenrand beider Teile wurde mit Parafilm umwickelt, um die Haltbarkeit der Probe zu verlängern.

4.4.2 für Messungen von Proteinfilmern

Proteinlösungen in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 wurden gegen Wasser dialysiert und für Messungen mit Konzentrationen von 10-50 mg ml⁻¹ lyophilisiert. Das lyophilisierte Protein wurde wieder in Wasser gelöst. Die Proteinlösungen wurden filtriert (0,1 μm Filter). Das Filtrat wurde für die Probenpräparation verwendet.

Entweder wurden 5-20 μl Proteinlösung mit einer Konzentration von 10-50 mg ml^{-1} mit einer Pipettenspitze solange auf einem Fenster verteilt bis innerhalb weniger Sekunden ein fester Film entstand oder 150-300 μl Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,2-2 mg ml^{-1} auf ein Fenster aufgetragen und bis Ausbildung eines Films liegen gelassen. Exsikkatoren oder Vakuum wurden nicht verwendet, da diese den Wassergehalt der Filme so stark reduzieren können, dass die Proteine nicht mehr in nativer Form vorliegen.

4.4.3 für Messungen zwischen zwei Fenstern ohne Abstandshalter

Mit zwei Fenstern ohne Abstandshalter können kleine Pfadlängen von bis zu 100 nm erreicht werden, wenn zwischen den Fenstern eine wässrige Probe zusammengedrückt wird. Diese Methode wurde 1969 von Verrall und Senior mit Wasser beschrieben. Für CD-Messungen konnten so, abhängig von Probenvolumen, Pfadlängen von 1-10 μm erreicht werden (Johnson und Tinoco 1972).

Um hohe Proteinkonzentrationen einsetzen zu können, wurden die Proteine lyophilisiert. Lyophilisiertes Protein wurde in Wasser oder in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 gelöst und anschließend filtriert (0,1 μm Filter). Das Filtrat wurde für die Probenpräparation verwendet.

Es wurden 0,5-2 μl Lösung bzw. Wasser auf ein CaF_2 -Fenster pipettiert. Volumina unter 0,5 μl konnten praktisch nicht pipettiert werden, da mit einer Pipette bei hoher Proteinkonzentration beispielsweise 0,1 μl nicht aufgenommen werden konnten und Volumina von 0,1-0,3 μl meist an der Pipettenspitze hafteten anstatt auf dem Fenster zu verbleiben. Bei runden Küvetten mit einem Durchmesser von 20 mm würden rechnerisch 0,3 μl einer Pfadlänge von etwa 1 μm entsprechen. Um kleinere Volumina als 0,5 μl zu erreichen konnte ein Teil der Lösung wieder mit der Pipette aufgenommen werden. Für Pfadlängen von 0,1-0,3 μm liegt trotzdem ein Überschuss an Probe vor. Als nächstes wurde ein zweites CaF_2 -Fenster aufgelegt und leicht angedrückt, so dass die Lösung über einen Bereich von 3-10 mm^2 der Fensterfläche verteilt war. Bei runden Küvetten können die Fenster jetzt noch gegeneinander verdreht werden, um die richtige Ausrichtung der Fenster zu erreichen. Bei rechteckigen Küvetten wurden die Fenster entlang der langen Seite mehrmals um etwa ein Drittel der Länge verschoben werden, um eine Verteilung der Probe in dieser Richtung zu erreichen. Anschließend wurden die beiden Fenster fest zusammengedrückt, bis die Probe möglichst über den gesamten Bereich zwischen den beiden Fenstern verteilt war. Dazu wurden die Fenster auf fussfreie Reinigungstücher auf eine ebene Fläche gelegt und mit dem Daumen auf die Fenster gedrückt. Dabei wurden Nitrilhandschuhe verwendet, da mit puderefreien Latexhandschuhen Rückstände auf dem oberen Fenster verblieben.

Die Größe der erreichten Pfadlänge war abhängig vom aufgetragenen Probenvolumen, dem Druck und der Dauer der Druckausübung. Außerdem spielte die Viskosität der Probe eine Rolle. Bei Proteinen wurden Konzentrationen von etwa 0,05-0,3 g ml^{-1} eingesetzt, wobei mit mehr als 0,1 g ml^{-1} kaum Pfadlängen unterhalb von etwa 1 μm erreicht wurden. Bei Proteinkonzentrationen über 0,1 g ml^{-1} kam es vor, dass während der Präparation die Probe in den Randbereichen eintrocknet ist und die Pfadlänge nicht weiter reduziert werden konnte. Bei CSA wurden 20-50 %ige Lösungen in Wasser für die Probenpräparation verwendet. Der Außenrand beider Fenster wurde mit Parafilm umwickelt, um die

Verdunstung, von Wasser zu verringern. Eine Versiegelung der Proben beispielsweise mit Vakuumschmelz (Verrall und Senior 1969) wurde nicht vorgenommen.

Bei Probenpräparationen mit kleiner Pfadlänge haften die Fenster zum Teil sehr fest aneinander. Bei Präparationen mit Wasser lassen sich die Fenster voneinander lösen, wenn ein großer Teil der Probe verdunstet ist. Präparationen mit Wasser und Puffer können voneinander gelöst werden, nachdem sie bis zu einer Stunde in Wasser gelegt wurden. Bei Präparationen mit Proteinen kam es vor, dass sich die Fenster auch nach ein bis zwei Stunden unter Wasser nicht voneinander lösen ließen. Diese Präparationen verblieben dann bis zum folgenden Tag im Wasser (10-18 h).

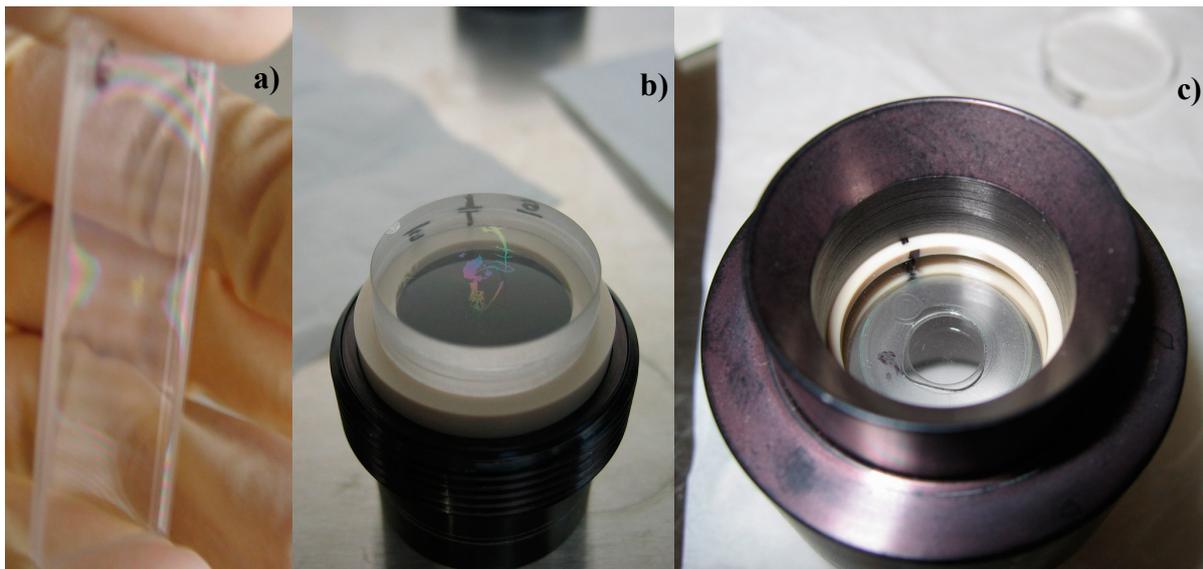


Abbildung 4.5 – Wasserpräparation mit verschiedenen CaF_2 -Küvetten

Unter a) ist eine Wasserpräparation mit rechteckigen CaF_2 -Fenstern von Hellma nach einer Messung zu sehen. Es ist zu erkennen, dass vor allem im oberen und unteren Teil und auch von den seitlichen Rändern das Wasser verschwunden ist. Anhand der farbigen Interferenzen kann man erkennen, dass die Schichtdicke für Messungen über die Wasserabsorptionsbande bei 145 nm (siehe Kapitel 6.2) deutlich zu groß ist. Der Abstand der Fenster ist in der Mitte der Präparation deutlich kleiner als am oberen und unteren Rand.

Unter b) ist eine Wasserpräparation mit runden CaF_2 -Fenstern von Korth zu sehen. Bei dieser Präparation hatte sich eine anfangs sehr klein erscheinende Luftblase durch die Verringerung der Pfadlänge über größere Bereiche ausgedehnt. Die Pfadlänge ist deutlich kleiner als die der unter a) abgebildeten Präparation. Am Rand der Fenster sind die Markierungen zu erkennen anhand derer die Fenster ausgerichtet wurden.

Unter c) ist eine Präparation mit einer runden CaF_2 -Küvette von Hellma Optics mit einer Pfadlänge von $4,2 \mu\text{m}$ zu sehen, die sich im Halter für runde Küvetten befindet. Die überschüssige Probenlösung kann hier in den vertieften Bereich abfließen und ein Eintrocknen der Probe im zentralen Messbereich verhindern.

4.5 Messbedingungen für Messungen mit kommerziellen CD-Spektrometern

Die kommerziellen CD-Spektrometer wurden für mindestens 15 Minuten vor dem Einschalten mit Stickstoff bei einem Fluss von $5-6 \text{ l min}^{-1}$ gespült. Dieser Stickstofffluss wurde während der Messungen beibehalten. Die erste Messung wurde etwa 30 Minuten nach dem Einschalten der Lampe gestartet. Bei Zirkulardichroismus-Messungen am Jasco J-715 wurden folgende Messeinstellungen verwendet.

- a) Bandbreite: 1 nm; Punktabstand: 0,5 nm; Zeitkonstante: 1 s; kontinuierlich 50 nm/min
- b) Bandbreite: 1 nm; Punktabstand: 0,5 nm; Integrationszeit: 1 s; schrittweise
- c) Bandbreite: 1 nm; Punktabstand: 1,0 nm; Integrationszeit: 1 s; schrittweise

Alle Messungen wurden mehrfach wiederholt, die arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Messwerte wurden mit, unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Basislinienmessungen mit Pufferlösung korrigiert.

4.6 Auswählte Proteine

4.6.1 Myoglobin

Myoglobin, ein globuläres Protein mit hohem α -helikalen Anteil, wurde vor allem ausgewählt weil vier, sich im Bereich unterhalb von 175 nm unterscheidende Spektren publiziert worden sind (Wallace 2000a, Matsuo *et al.* 2003, Matsuo *et al.* 2004 und Wallace *et al.* 2004) und es in nahezu jedem Datensatz zur Sekundärstrukturbestimmung zu finden ist. Aufgrund der Häm-Gruppe, deren Beitrag zum Fern-UV-CD-Spektrum nicht bekannt ist, ist Myoglobin für einen Datensatz zur Sekundärstrukturbestimmung eigentlich weniger geeignet.

4.6.2 Lysozym

Lysozym, ein globuläres $\alpha+\beta$ Protein, wurde ausgewählt, da es auch in nahezu jedem Datensatz zur Sekundärstrukturbestimmung zu finden ist, es in hoher Konzentration gelöst und preiswert in hoher Reinheit erworben werden kann.

4.6.3 Concanavalin A

Concanavalin A, ein globuläres β -Faltblatt Protein das zu den Lectinen gehört, wird häufig als Beispiel für β -Faltblatt Proteine gewählt und aus diesem Grund in dieser Arbeit verwendet.

4.6.4 Chymotrypsinogen

Chymotrypsinogen ist das Zymogen der Serinprotease Chymotrypsin. Es ist ein weiteres globuläres β -Faltblatt Protein, das in vielen CD-Spektren-Datensätzen zur Sekundärstrukturbestimmung enthalten ist.

4.6.5 Peptid A2

Das Peptid A2 sollte als Beispiel für eine isolierte α -Helix dienen, deren CD-Spektrum nicht durch das CD-Signal aromatischer Aminosäurereste beeinflusst ist. Die Sequenz Ac-NA(EAAAR)₅AGSGY des Peptids A2 wurde von mir so gewählt, dass es bei geringer Salzkonzentration und pH 6,5 einen möglichst hohen α -Helix-Anteil aufweist. Die Wahl der N-Terminalen Sequenz wurde aufgrund der Publikationen von Chakrabartty *et al.* (1993a), Doig und Baldwin (1995) und Penel *et al.* (1999) gewählt. Die sich wiederholende Sequenz sollte einerseits die α -Helix stabilisieren (Huyghues-Despointes *et al.* 1993) außerdem für eine gute Wasserlöslichkeit sorgen. Die Abhängigkeit von der Kettenlänge (Fiori *et al.* 1993) wurde berücksichtigt. Am C-Terminus sollte ein Tyrosinrest zur Konzentrationsbestimmung flexibel mit der α -Helix verknüpft werden um den Einfluss des Tyrosinrestes auf das CD-Signal möglichst gering zu halten (Chakrabartty *et al.* 1993b).

4.6.6 FBP28-D15N WW-Domäne

WW-Domänen sind dreisträngige, antiparallele Faltblätter, die in zahlreichen Signalproteinen von Eukaryonten vorkommen (Sudol *et al.* 1995, Sudol 1996). Die synthetische FBP28-D15N(4-37) WW-Domäne wurde von Jana Körner zur Verfügung gestellt (Körner 2007). Das CD-Spektrum des nativen Proteins im Fern-UV-Bereich bis 180 nm, ist dem Spektrum denaturierter Proteine sehr ähnlich, wenn man vom Beitrag der aromatischen Aminosäurereste absieht.

4.6.7 Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* (CSP *T. m.*)

Beim Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* (CSP *T. m.*) (Welker *et al.* 1999) wird das CD-Spektrum deutlich von den aromatischen Aminosäureresten dominiert und die eigentlich typische negative CD-Bande um 215 nm ist nicht zu sehen. Es war daher von Interesse, ob im erweiterten Messbereich für β -Faltblätter typische CD-Banden zu finden sind.

4.6.8 Internalin A496

Internalin A496 ist der die Aminosäurereste 36-496 umfassende Teil des Invasionsproteins Internalin aus dem humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes*, der als Internalin Domäne bezeichnet wird. Die Aminosäurereste 79 bis 414 bilden eine leucine-rich repeat (LRR)-Domäne. Diese bildet eine rechtsgängige solenoide Struktur, mit einem sechzehnsträngiges parallelen β -Faltblatt auf der einen Seite und fünfzehn 3_{10} -Helices auf der anderen Seite (Schubert *et al.* 2002).

5 Charakterisierung des SRCD-Messaufbaus

In diesem Teil werden erst Lichtquelle, Monochromator, photoelastischer Modulator und Detektor betrachtet und teilweise mit kommerziellen CD-Spektrometern sowie mit Literaturwerten anderer SRCD-Messplätze verglichen. Der Fehler im CD-Signal, die Stabilität der Basislinie und der Einfluss der verwendeten Küvetten auf diese werden gezeigt.

5.1 Lichtquelle und Monochromator

Der Photonenfluss der SRCD-Messplätze sowie kommerzieller CD-Spektrometer hängt von der Lichtquelle, von den Spiegeln im Strahlengang und vom Monochromator ab. Man kann als Nutzer die mechanischen Spaltbreiten beziehungsweise die spektrale Bandbreite des Monochromators ändern, gegebenenfalls die Wellenlängeneinstellung kalibrieren und bei kommerziellen CD-Spektrometern die Lampen tauschen. In den folgenden Kapiteln wird für die beiden SRCD-Messplätze sowie für kommerzielle CD-Spektrometer der Photonenfluss bei definierter spektraler Bandbreite gezeigt, der Zusammenhang zwischen Spalteinstellung und spektraler Bandbreite der beiden Messplätze am BESSY sowie des J-715 CD-Spektrometers dargestellt und Möglichkeiten der Überprüfung der Wellenlänge aufgezeigt. Auf weitere Maßnahmen wie beispielsweise den Tausch von Spiegeln wird nicht eingegangen.

5.1.1 Vergleich des Photonenflusses

Da im Synchrotron-Speicherung die Zahl der Elektronen und damit die Zahl der Photonen nach der Injektion kontinuierlich abnimmt (siehe Abbildung 4.1b) und am BESSY der Ringstrom nach Injektion in den letzten Jahren schrittweise erhöht wurde, sind Angaben zu Photonenfluss und Intensität in dieser Arbeit auf einen konstanten Ringstrom I_{RC} von 100 mA skaliert. Mit einer Photodiode, deren Quanteneffizienz in Abhängigkeit von der Wellenlänge von der PTB bestimmt worden ist, wurde der Photonenfluss am 3m-NIM-C, am U125-2_NIM und für ein Jasco J-715 CD-Spektrometer ermittelt. Der gemessene Photonenfluss Φ ist zusammen mit Herstellerangaben zum π^* -180 und Chirscan von Applied Photophysics in Abbildung 5.1 dargestellt und für eine Wellenlänge von 220 nm in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Im Vergleich mit den kommerziellen CD-Spektrometern J-715 und Chirscan ist der Photonenfluss an beiden SRCD-Messplätzen oberhalb von 180 nm geringer. Zur Messung von CD-Spektren bis 180 nm sind daher die kommerziellen CD-Spektrometer besser geeignet oder zumindest genau so gut wie die SRCD-Messplätze am BESSY.

Messplatz oder CD-Spektrometer	Lichtquelle	spekt. Bandbreite /nm	Größe des Lichtflecks	Photonenfluss ($\lambda=220$ nm) /Photonen s ⁻¹	Intensität ($\lambda=220$ nm) /Photonen s ⁻¹ mm ⁻²
3m-NIM-C	Dipol	1,11	1,1 mm x 1,9 mm	$2,5 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$
U125-2_NIM	Undulator	0,33	0,5 mm x 1 mm	$1,1 \cdot 10^{11}$	$2,2 \cdot 10^{11}$
J-715	Xe (150 W)	1	nicht bestimmt	$7,8 \cdot 10^{11}$	nicht bestimmt
Chirscan	Xe (150 W)	1	5 mm x 10 mm	$1,4 \cdot 10^{13}$	$2,8 \cdot 10^{11}$
π^* -180	XeHg(150 W)	1	5 mm x 8 mm	$2,4 \cdot 10^{12}$	$0,6 \cdot 10^{11}$

Tabelle 5.1 - Photonenfluss und Intensität

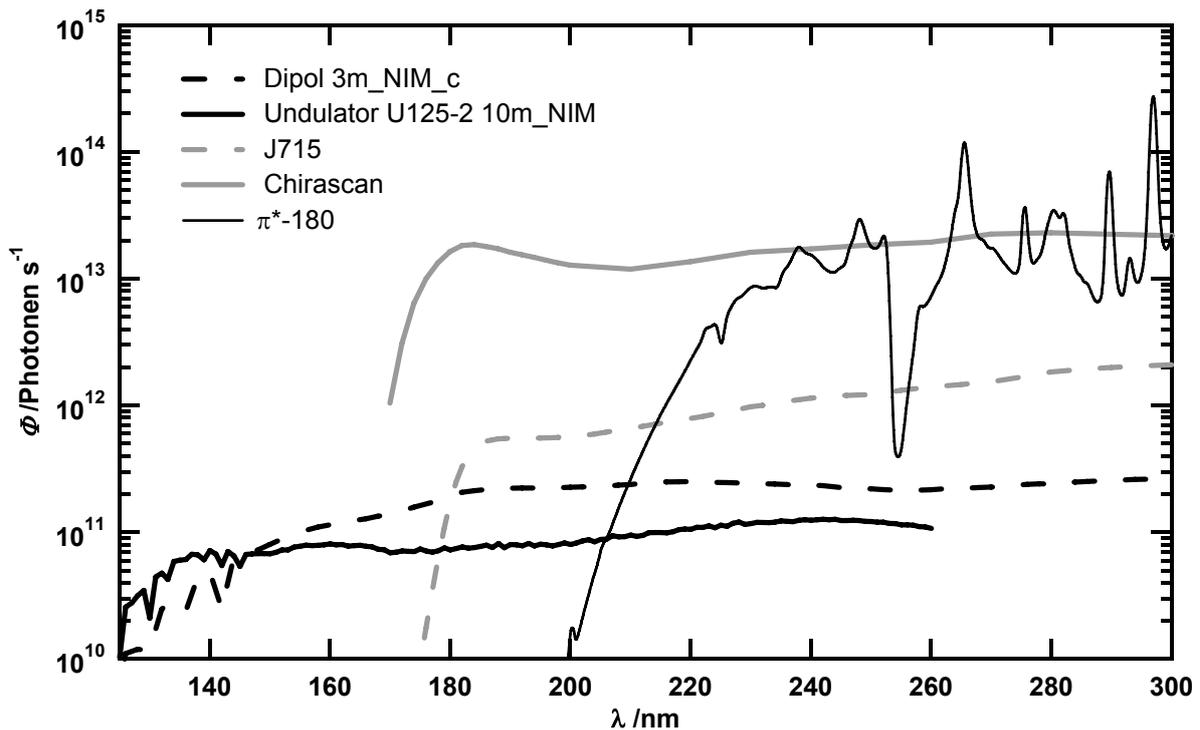


Abbildung 5.1 – Vergleich des Photonensflusses

Der Photonensfluss der beiden SRCD-Messplätze ist skaliert auf 100 mA Ringstrom angegeben. Die Messung am J-715 wurde mit einer 150 W Xenonlampe mit einer Laufzeit von 270 h durchgeführt. Die Angaben zum Chirascan stammen vom Hersteller, die Herstellerangaben zum π^* -180 wurden durch eigene Messungen ergänzt, bei denen der Photomultiplierstrom bei konstanter Hochspannung gemessen wurde.

Die Intensität der beiden SRCD-Messplätze liegt zwischen 260 und 180 nm in der gleichen Größenordnung wie die Intensität des Chirascans. Der Photonensfluss am 3m-NIM-C ist ähnlich hoch, wie der am SRCD-Messplatz CD1 am ASTRID in Århus, höher als der am SRCD-Messplatz 4B8 am BSRF in Beijing (Miles *et al.* 2007) und liegt unter denen der SRCD-Messplätze CD12 am SRS in Daresbury (Clarke und Jones 2004), U9B und U11 an der NSLS in Brookhaven (Wallace 2000b) und des Messplatzes am NSRL in Hefei (Zhang *et al.* 2007).

Auch bei den in kommerziellen CD-Spektrometern verwendeten Xenonlampen nimmt mit der Laufzeit die Intensität der Lampen ab (siehe Abbildung 5.2). Diese Abnahme erfolgt jedoch so langsam, dass sie bei der Extinktionsberechnung meist nicht ins Gewicht fällt. Am BESSY muss bei der Berechnung der Extinktion aus der

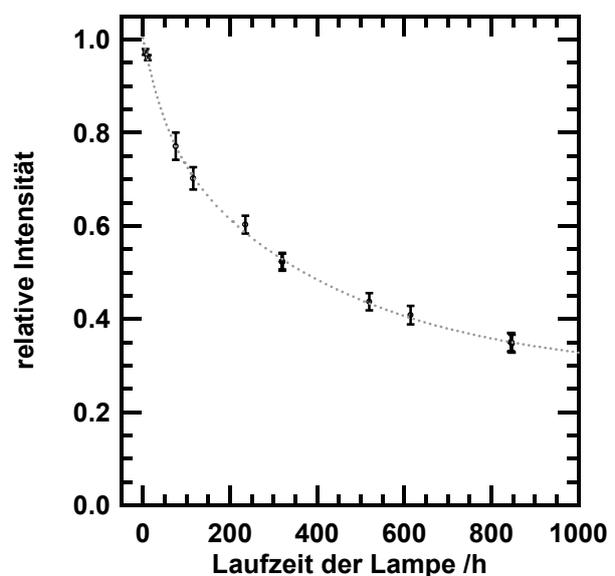


Abbildung 5.2 – Intensitätsabnahme einer Xenonlampe

Die anhand der Hochspannung berechnete Abnahme der relativen Intensität (Kreise) einer 150 W Xenonlampe kann mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden (Linie).

Hochspannung des Photomultipliers der Ringstrom berücksichtigt werden, wenn keine direkte oder indirekte Messung des Photonenflusses vor der Probe durchgeführt wird.

5.1.1.1 Falschlicht

Kommt am Detektor Licht an, das nicht der durch den Monochromator bestimmten Wellenlänge und spektralen Bandbreite entspricht, wird dieses als Falschlicht bezeichnet. Ist eine Probe in einem Wellenlängenbereich für Licht undurchlässig, so kann in diesem Bereich Falschlicht mit größerer Wellenlänge detektiert werden, wenn dabei die maximale Hochspannung des Photomultipliers nicht erreicht wird. Falschlicht kann zu Fehlern bei der Bestimmung von Zirkulardichroismus und Extinktion führen. Daher kann an einer Absorptionskante häufig ein Abfall des CD-Signals auf Null beobachtet werden. Liegen gleichermaßen monochromatisches und Falschlicht vor, so ist die Amplitude des CD-Signals um etwa 50 % reduziert. Es ist daher wichtig, dass auch nach Absorption durch die Probe bei CD-Messungen der Anteil des Falschlichts möglichst 1 % nicht überschreitet.

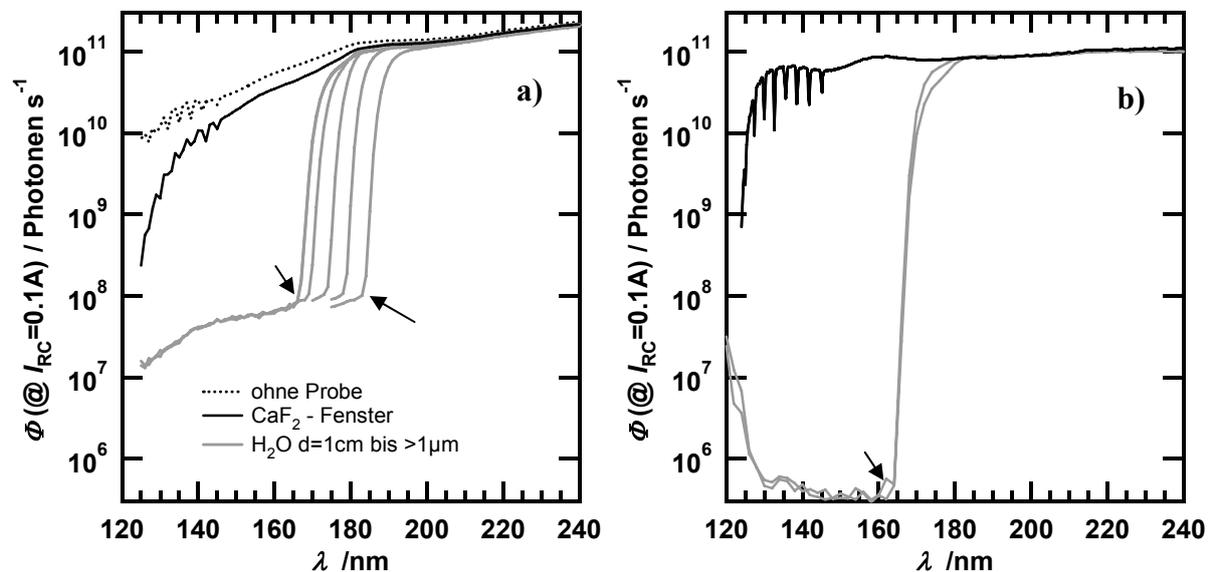


Abbildung 5.3 – Falschlicht an den SRCD-Messplätzen

Anhand von Wasserpräparationen, deren Pfadlänge so groß ist, dass sie im Bereich von 120 bis 160 nm kein Licht durchlassen (graue Linien) kann der Anteil längerwelligem Falschlichts im Vergleich zum für Messungen mit CaF_2 -Messzellen zur Verfügung stehenden Licht (schwarze Linie) für Messungen am 3m-NIM-C (a) und am U125_2_NIM (b) abgeschätzt werden. Der Bereich in dem der auf Absorption zurückzuführende Abfall des Photonenflusses stagniert (Pfeile) zeigt den Bereich an, in dem Falschlicht deutlich überwiegt.

Eine gezielte Untersuchung des Falschlichts über den gesamten Wellenlängenbereich wurde an den beiden SRCD Messplätzen nicht durchgeführt. Es gab aber ausreichend Messungen mit Pfadlängen, bei denen Wasser Licht unterhalb von 160 nm vollständig absorbierte. Anhand dieser Messungen wurde der Anteil des Falschlichts abgeschätzt. Am Messplatz 3m-NIM-C lag der Falschlichtanteil etwa drei bis vier Größenordnungen unter dem des monochromatischen Lichts. Da unterhalb von 140 nm die Reflexion an dem verwendeten CaF_2 -Fenster deutlich zunimmt, steigt hier auch der Falschlichtanteil im durchgelassenen Licht (Abbildung 5.3a), so dass bei 125 nm der Unterschied nur noch etwas mehr als eine Größenordnung beträgt. Am Messplatz U125_2-NIM lag der Falschlichtanteil etwa fünf Größenordnungen unter dem des

monochromatischen Lichts (Abbildung 5.3b). Falschlicht sollte am U125_2-NIM daher keinen Einfluss auf das CD-Signal haben. Das Fehlen der Stickstoffabsorptionsbanden ab 145 nm ist ein eindeutiges Indiz, dass in dem entsprechenden Wellenlängenbereich nur noch Falschlicht vorliegt.

Die Hochspannung im Jasco J-715 CD-Spektrometer war auf maximal 1 kV beschränkt. Eine geringere Hochspannung wurde für undurchlässige Proben nicht beobachtet, so dass an Stelle des Falschlichts die Photomultiplierhochspannung den Messbereich einschränkt. Nahe der 1 kV Grenze ist kommt es zu Verfälschung des CD-Signals, da nur die Wechselspannungsamplitude, nicht aber der Gleichspannungsanteil gemessen wird. Am Jasco J-715 CD-Spektrometer wurde daher eine Photomultiplierhochspannung von 850 V als Grenze für CD-Messungen gewählt.

5.1.2 spektrale Bandbreite

5.1.2.1 spektrale Bandbreite am SRCD-Aufbau

Die Normal-Incidence-Monochromatoren (NIM) der beiden Messplätze am BESSY haben beide sphärische Gitter, so dass deren Auflösungsvermögen $E/\Delta E$ mit $1/E$ abnimmt (Reichardt *et al.* 2001a; Reichardt *et al.* 2001b). Für die Spaltabhängigkeit der spektralen Bandbreite gilt in diesem Fall näherungsweise folgende Gleichung (5.1), in der S_1 die Größe des Eintrittspalts, S_2 die Größe des Austrittspalts, R der Radius des NIMs, d_l der Furchenabstand des Monochromatorgitters und m die Ordnung der Interferenz ist.

$$\Delta\lambda = \frac{d_l \cdot \sqrt{S_1^2 + S_2^2}}{R \cdot m} \quad (\text{Gleichung 5.1})$$

Ist der Eintrittsspalt gleichmäßig ausgeleuchtet, erhält man den höchsten Photonenfluss, wenn man für beide Spalte die gleiche Größe einstellt. Am BESSY ist die Strahlenquelle jedoch so klein, dass für einen Eintrittsspalt größer als 50 μm am 3m-NIM und größer als 30 μm am 10m-NIM der Photonenfluss nicht mehr zunimmt. Am 10m-NI-Monochromator wurden die Messungen bei einer spektralen Bandbreite von 0,33 nm durchgeführt ($R=10$ m, $d_l=1$ mm /300, $m=1$, $S_1=30$ μm und $S_2=1$ mm). Am 3m-NIM ($R=2,995$ m, $d_l=1$ mm /600, $m=1$ und $S_1=50$ μm) meist mit einer spektralen Bandbreite von 1,11 nm ($S_2=2$ mm) bzw. 1,06 nm ($S_2=1,9$ mm). Für besser aufgelöste Extinktionsmessungen wurde meist eine spektrale Bandbreite von 0,11 nm gewählt ($S_2=0,2$ mm).

Die Messung der Stickstoffabsorption zwischen 144 und 145 nm am Messplatz 3m-NIM-C, die im Anhang A2 gezeigt wird, deutet darauf hin, dass der Austrittsspalt S_2 bei einer Spaltbreite von Null nicht vollständig geschlossen und die maximale Spaltbreite von 2 mm nicht erreicht wird. Ein Vergleich der Breite der Absorptionsbande mit der berechneten spektralen Bandbreite zeigte zwischen 0,4 und 1,1 nm eine für CD-Messungen ausreichende Übereinstimmung. Die Stickstoffabsorption in diesem Bereich ist aber nicht geeignet, geringere spektrale Bandbreiten zu überprüfen, da hier zahlreiche Absorptionslinien vorliegen, für die experimentelle Überprüfung jedoch eine einzelne Emissionslinie als Lichtquelle optimal wäre.

5.1.2.2 spektrale Bandbreite bei kommerziellen CD-Spektrometern

Bei Geräten mit Prismenmonochromatoren, wie dem J-715 CD-Spektrometer ist die Bandbreite von der Wellenlänge abhängig, so dass für eine konstante Bandbreite die Spaltgrößen während der Messung geändert werden (Abbildung 5.4a). Sind Ein- und Austrittsspalt gleich groß, sollte zwischen Spalt- und Bandbreite ein linearer Zusammenhang bestehen, der Photonenfluss jedoch proportional zum Quadrat der Spaltbreite sein. Für CD-Messungen mit kommerziellen CD-Spektrometern wurde die spektrale Bandbreite auf 1 nm gestellt, wenn keine andere Bandbreite genannt ist.

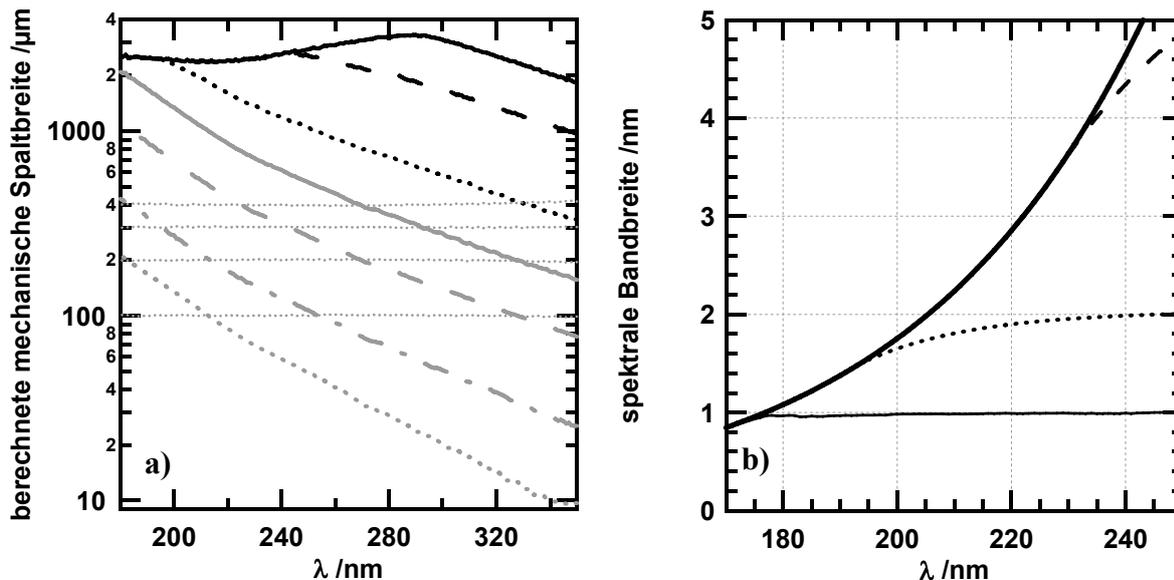


Abbildung 5.4 – Mechanische und spektrale Spaltbreiten am J-715

Unter a) sind die über die Hochspannung berechneten Spaltbreiten für spektrale Bandbreiten von 10 nm (schwarze durchgezogene), 5 nm (schwarz gestrichelt), 2 nm (schwarz gepunktet), 1 nm (grau durchgezogen), 0,5 nm (grau gestrichelt), 0,2 (grau Strich Punkt) und 0,1 nm (grau gepunktete Linie) zu sehen. Außerdem sind die Messungen bei konstantem Spaltbreiten von 100, 200, 300 und 400 µm abgebildet über die die Berechnung erfolgt ist.

Unter b) ist die Begrenzung der spektralen Bandbreite eines J-715 Spektropolarimeters im UV-Bereich als durchgezogene dicke schwarze Linie zu sehen (eingestellte Bandbreite 10 nm), wie sie sich aus den Hochspannungsverläufen bei verschiedenen Bandbreiten ergibt, wenn man davon ausgeht, dass sich bei Verdoppelung der Bandbreite die Intensität vervierfacht. Die berechnete Bandbreite bei einer eingestellten Bandbreite von 1 nm ist als dünne schwarze Linie, die bei 2 nm ist als gepunktete Linie und die bei 5 nm als gestrichelte Linie zu sehen.

Ausgehend von diesem Zusammenhang, stellt man bei einem Vergleich der Hochspannungsprofile bei verschiedenen Bandbreiten fest, dass beim J-715 und J-815 im UV-Bereich eine Limitierung der spektralen Bandbreite auftritt (Abbildung 5.4b), die auf das Erreichen einer maximalen Spaltbreite zurückzuführen ist. Dass die anhand der Hochspannung berechnete spektrale Bandbreite bei einer eingestellten Bandbreite von 2 und 5 nm auch schon vor Erreichen des für eine eingestellte spektrale Bandbreite von 10 nm berechneten Verlaufs leicht abfällt, deutet darauf hin, dass bei großen Spaltbreiten der Spalt nicht mehr gleichmäßig ausgeleuchtet ist oder die maximale Spaltgröße für Ein- und Austrittsspalt unterschiedlich ist.

Bei einer spektralen Bandbreite von 1 nm tritt diese Einschränkung bis 180 nm nicht auf. Erst im Bereich von 175 bis 170 nm verringert sich die Bandbreite geringfügig. Eine Bandbreite von 1 nm ist daher für

Fern-UV-CD-Messungen mit dem J-715 CD-Spektrometer ideal. Bei Bandbreiten 2 und 5 nm kommt es nach Erreichen der maximalen Spaltbreite zu Veränderungen in der Gerätebasislinie.

Bei Messungen am Chirascan und am π^* -180 ist eine vergleichbare Einschränkung der spektralen Bandbreite nicht aufgefallen. Eine Bestimmung des maximalen Auflösungsvermögens wurde nicht durchgeführt, da eine hohe Auflösung für CD-Spektren von Proteinen, Kohlehydraten und Nukleinsäuren in wässriger Lösung nicht erforderlich ist. Für gasförmige Moleküle kann ein höheres Auflösungsvermögen aber zu deutlichen Veränderungen im gemessenen CD-Spektrum führen, wie am Beispiel von (-)- α -Pinen und (+)-3-Methylcyclopentanon durch Snyder und Rowe (1980) gezeigt wurde.

5.1.3 Kalibrierung der Wellenlänge

Da am 3m-NIM mehrere Nutzer mit unterschiedlichen Spiegeleinstellungen am gleichen Monochromator messen, ist es erforderlich nach einem Nutzerwechsel den Monochromator auf die neue Spiegelposition einzustellen. Der Unterschied in der Lage der Nullten Ordnung führt zu einer Wellenlängenverschiebung von mehreren Nanometern. Die Einstellung der Wellenlänge kann über die Nullte Ordnung des Monochromators oder über Absorptionsbanden bekannter Lage erfolgen. Die Nullte Ordnung ist die Monochromatorposition bei der das meiste ungebeugte Licht den Austrittsspalt passiert. Diese Position kann z. B. durch Messen des Stroms, der auf Grund des photoelektrischen Effekts im Spiegel hinter dem Austrittsspalt induziert wird (I_{M4}), bestimmt werden. Die Wellenlänge in dieser Position wird in der Monochromatorsteuerung auf Null gesetzt. Diese Möglichkeit die Wellenlänge einzustellen wurde selten verwendet, da dabei viel energiereiches Licht vom Lithiumfluoridfenster absorbiert wird und in diesem dadurch Farbzentren entstehen können.

Bei einer Messung der Absorptionsbanden vom Benzendampf (Abbildung 5.5) nach vorheriger Einstellung des 3m-NI-Monochromators anhand der Nullten Ordnung zeigte sich ein Versatz der großen Absorptionsbanden um 0,55 nm gegenüber dem aus den Literaturwerten (Radle und Beck 1940) mit Lorenzfunktionen und einer Bandbreite von 0,1 nm berechneten Spektrum. Dies bedeutet, dass die Schrittweite des Monochromators um etwa 0,2 % zu groß ist.

In der Praxis wurde anstelle der Nullten Ordnung bzw. der Benzenabsorptionsbanden meist die erste gut messbare Stickstoffabsorptionsbande zur Einstellung genutzt, da hier nur eine Messung des mit Stickstoff gespülten Messaufbaus ohne Probe erforderlich war. Die Stickstoffabsorptionsbanden des mit dem Messaufbau verfügbaren Wellenlängenbereichs sind zusammen mit den aus Literaturwerten (Tilford *et al.* 1966) mit Lorenz- und Gaußfunktionen und einer Bandbreite von 0,1 nm berechneten Spektren in Abbildung 5.6 zu sehen. Die durch Tilford photographisch ermittelte Intensität der Absorptionslinien scheint bei intensiven Absorptionslinien zu klein zu sein. Die Übereinstimmung ist aber ausreichend um anhand der Lage der Absorptionsbanden die Wellenlänge einzustellen. Das Vorhandensein der Stickstoffabsorptionsbanden ist ein wichtiges Kriterium für Messungen in diesem Bereich. Fehlen diese bedeutet dies, dass die Probe in diesem Bereich nicht mehr transparent ist und nur noch Falschlicht den Detektor erreicht.

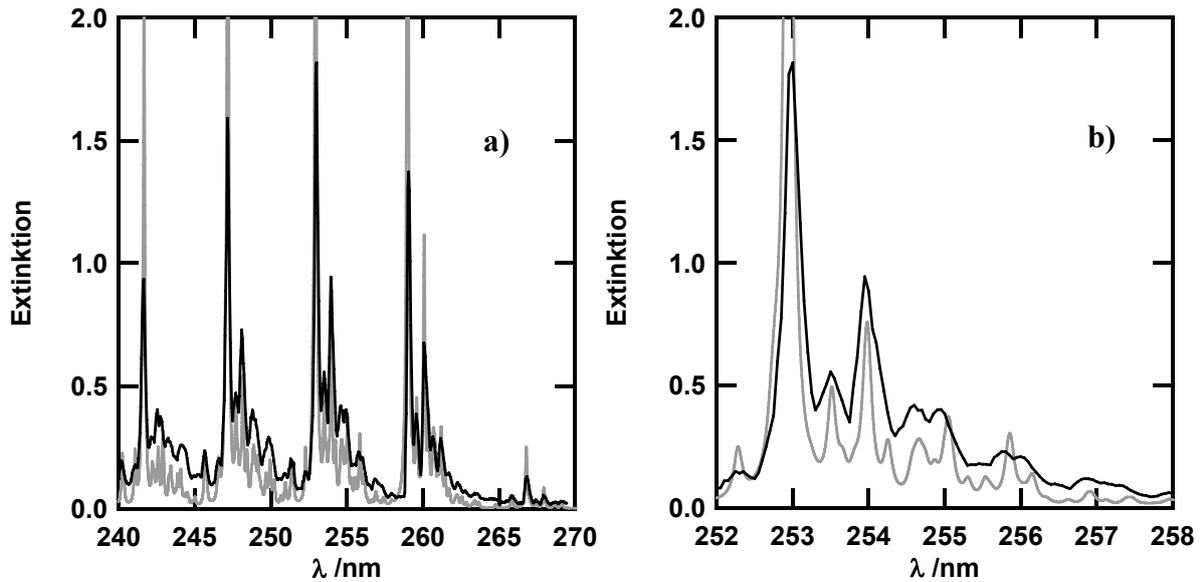


Abbildung 5.5 – Absorptionsspektrum von Benzen

Das mit einer spektralen Bandbreite von 0,1 nm und einem Punktabstand von 0,05 nm gemessene Absorptionsspektrum von Benzendampf, der über einem Tropfen Benzen in einer verschlossenen 1 cm Vollküvette entstand, ist als schwarze Linie zu sehen. Das aus den Literaturwerten (Radle und Beck 1940) mit Lorenz-funktionen und einer Bandbreite von 0,1 nm berechnete Spektrum ist mit einer grauen Linie dargestellt. Unter b) ist ein Ausschnitt des unter a) dargestellten Spektrums zu sehen.

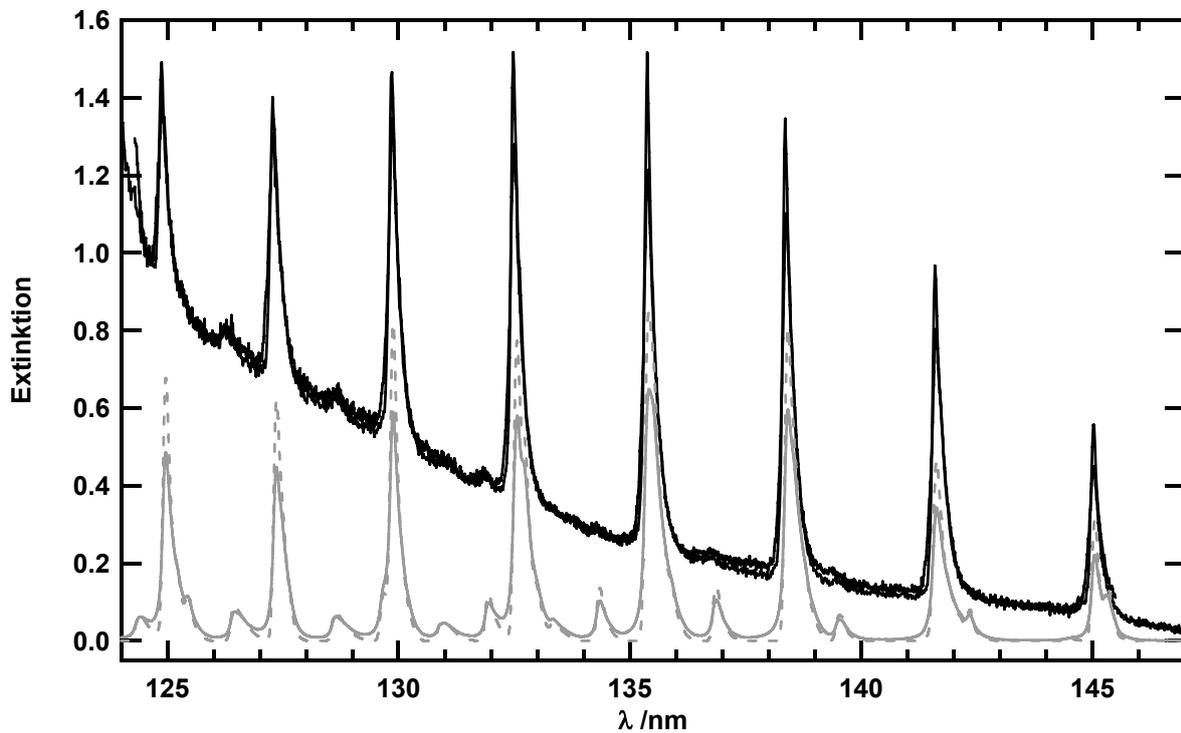


Abbildung 5.6 – Absorptionsspektrum von molekularem Stickstoff

Die Abbildung zeigt das mit einer spektralen Bandbreite von 0,1 nm und einem Punktabstand von 0,01 nm aus der Hochspannung berechnete Absorptionsspektrum von Stickstoff (schwarz) und die aus den Literaturwerten (Tilford et al. 1966) mit Lorenz- (grau) und Gaußfunktionen (grau gestrichelt) berechneten Spektren.

Des Weiteren wurden die Absorption von Acetondampf und Luft (Sauerstoff) gemessen. Die Form der Absorptionsspektren von Aceton (Abbildung 5.7) ändert sich bei Variation der spektralen Bandbreite nur geringfügig und ist so zur Kontrolle der Wellenlänge für Bandbreiten von 0,1 bis 1 nm geeignet.

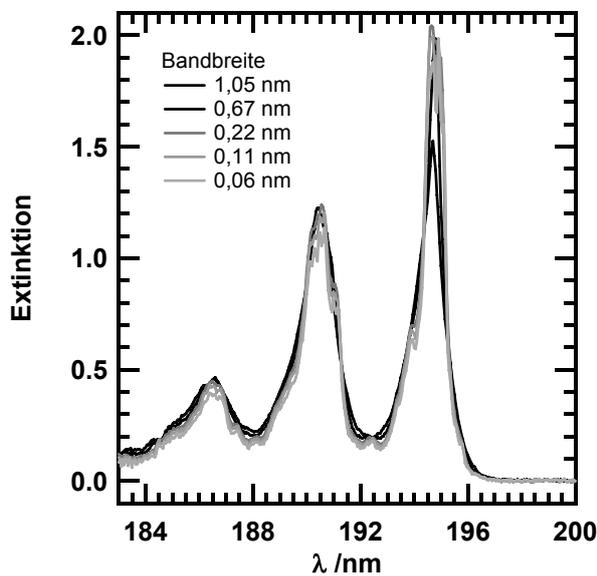


Abbildung 5.7 – Acetonabsorption

Die Abbildung zeigt das mit unterschiedlichen Bandbreiten am 3m-NIM-C gemessene Absorptionsspektrum von Acetondampf, der über einem Tropfen Aceton in einer verschlossenen 1 cm Vollküvette entstand.

Die angegebenen Bandbreiten wurden mit Gleichung 5.1 berechnet.

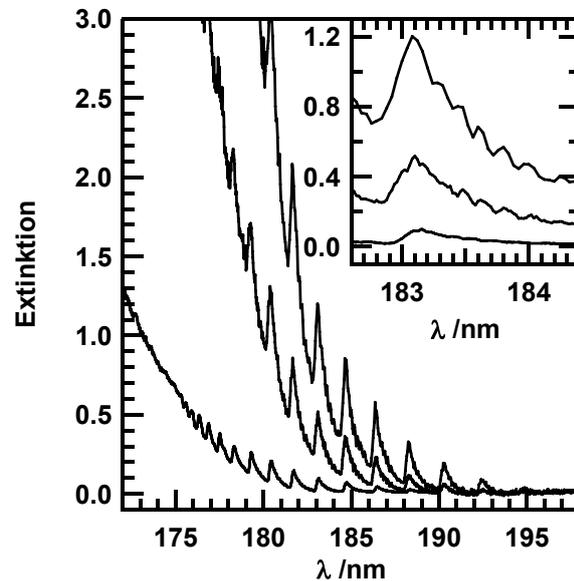


Abbildung 5.8 – Sauerstoffabsorption

Die Abbildung zeigt mit einer Bandbreite von 0,1 nm gemessene Absorptionsspektren von Luft. Das unterste der drei Spektren wurde mit einer Pfadlänge von 1 cm aufgenommen, die anderen beiden Spektren zeigen Messungen bei nicht vollständig geschlossenem Probenraum. Im eingefügten Diagramm ist der Bereich von 182,6 bis 184,4 nm vergrößert abgebildet.

Die Form der Spektren von Benzen, Sauerstoff und Stickstoff ändert sich bei einer Änderung der spektralen Bandbreite von 0,1 auf 1 nm hingegen deutlich, wie in Abbildung A.1c für Stickstoff zu sehen ist. Die Feinstruktur der Schuman-Runge Absorptionslinien von Sauerstoff (Abbildung 5.8) ist bei einer spektralen Bandbreite von 1 nm nicht mehr aufgelöst. Die Abbildung 5.8 macht deutlich, warum bei Normaldruck mit Luft im Strahlengang Messungen unterhalb von etwa 190 nm nicht mehr möglich sind, wenn der Abstand zwischen Lichtquelle und Detektor etwa ein Meter beträgt. Mit der am BESSY verwendeten Messkammer konnten innerhalb der ersten Stunde nach Probenwechsel noch größere Extinktionsänderungen unterhalb von 175 nm beobachtet werden, die auf die Verdrängung von Luftsauerstoff durch Stickstoff zurückzuführen sind.

Von kommerziellen Standards zur Kalibrierung der Wellenlänge, beispielsweise auf der Basis von Holmiumoxid (Travis *et al.* 2005) wird der Wellenlängenbereich zwischen 240 und 650 nm abgedeckt.

5.1.3.1 Stabilität der Wellenlängeneinstellung

Die Wellenlänge des Maximums der Stickstoffabsorptionsbande wurde am 3m-NIM-C zu Beginn eines Messtages auf $145,02 \pm 0,01$ nm gesetzt. Die Lage des Maximums bei Messungen am Ende von Messtagen (Abbildung 5.9), das heißt nach 8-12 h, zeigte eine Verteilung mit einem Mittelwert von

144,97 nm und einer Standardabweichung von 0,1 nm. Für die meisten Messungen liegt die systematische Abweichung der Wellenlänge bei 145 nm innerhalb von $\pm 0,2$ nm. Unter Berücksichtigung des anhand der Benzenmessung festgestellten Schrittwertefehlers wurde daher für die Wellenlänge eine „Standardabweichung“ von 0,2 nm am 3m-NIM-C angegeben. Da die CD-Messungen am 3m-NIM-C meist mit einer spektralen Bandbreite von 1 nm und einem Punktabstand von 0,5 oder 1 nm durchgeführt worden sind, ist die Stabilität der Wellenlängeneinstellung ausreichend.

Bei einigen der Messungen, war die Absorptionsbande verbreitert oder zeigte sogar ein zweites Maximum. Dies war auf eine Fehlpositionierung des Monochromatorgitters zurückzuführen. Diese konnte meist nach Fahren in die Nullte Ordnung mechanisch behoben werden.

Am Strahlrohr U125_2-NIM, das auch für Messungen mit deutlich kleineren spektralen Bandbreiten gedacht ist, war eine Kalibrierung der Wellenlängeneinstellung nicht erforderlich. Bei keiner der durchgeführten Messungen wurde eine Abweichung festgestellt.

5.1.4 Bestimmung des Strahlquerschnitts am 3m-NIM-C

Bei Messungen mit α -Chymotrypsinogen mit kleinen Pfadlängen und hoher Proteinkonzentration war aufgefallen, dass sich bei einer Probe nacheinander aufgenommene CD-Spektren unterscheiden. Die Veränderungen der Spektren deuteten auf eine Zunahme des β -Faltblatt-Anteils und auf Aggregation der Probe hin und unterschieden sich von den bei niedrigeren Konzentrationen beobachteten Änderungen infolge der Entstehung von Chymotrypsin. Eine Unterscheidung von durch Strahlung induzierten und präparationsbedingten Prozessen war daher nötig und möglich, da bei der CD-Messung nur ein kleiner Teil der Probe bestrahlt wird. Zur Untersuchung war eine Bestimmung der Strahlage und des Strahlquerschnitts notwendig. Daher wurde anstelle der Probe eine Lochblende (\varnothing 0,5 mm) in einen Halter (OVIS System 40) platziert, mit dem die Lage der Lochblende um 2,75 mm in horizontaler und vertikaler Richtung geändert werden konnte. Für einige vertikale Positionen der Lochblende wurde der Photonenfluss in Abhängigkeit von der horizontalen Position der Lochblende an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessen (Abbildung 5.10).

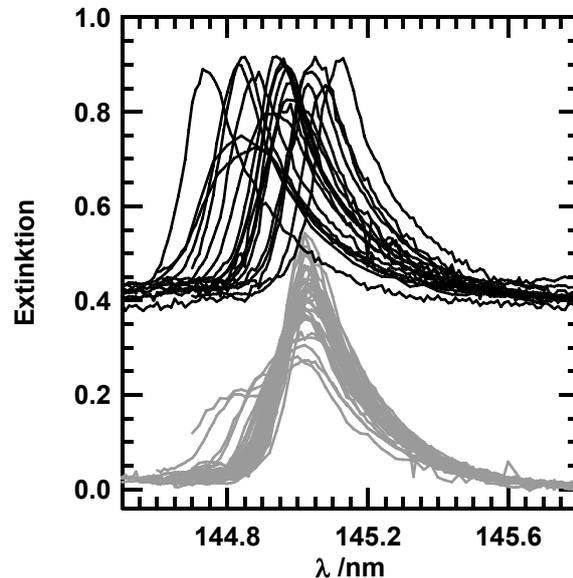


Abbildung 5.9 – Stickstoffbande bei 145 nm

Messungen der Stickstoffabsorptionsbande nach einstellen der Wellenlänge sind als graue Linien, vom Ende der Messzeiten als schwarze Linien um eine Extinktion von 0,4 verschoben dargestellt. Alle Messungen wurden mit einer Bandbreite von 0,11 nm durchgeführt.

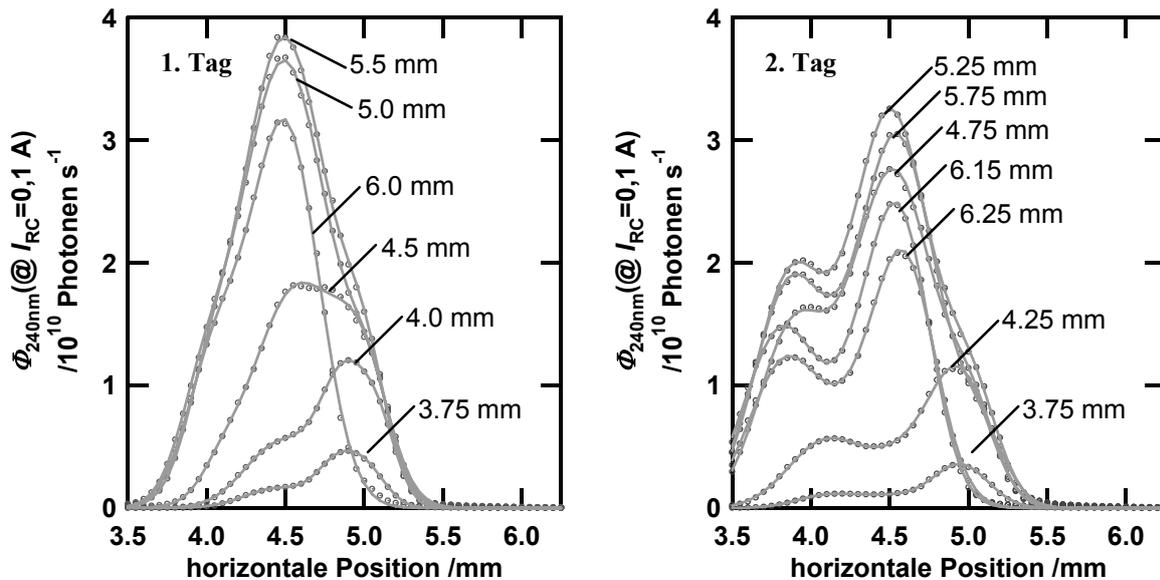


Abbildung 5.10 – Strahlquerschnitt

Die Abbildung zeigt den, mit einer Lochblende ($\varnothing 0,5 \text{ mm}$) bei einem Austrittsspalt von $1,9 \text{ mm}$ und einer Wellenlänge von 240 nm gemessenen Photonenfluss bei verschiedenen vertikalen Positionen (y) in Abhängigkeit von der horizontalen Position (x) an zwei aufeinander folgenden Tagen ohne Veränderung der Monochromatorposition. Die Lochblende wurde dabei entlang des Strahls so positioniert, dass die Abweichung zur Fokussposition unter 2 cm lag. Die Beschreibungen der Messwerte durch drei Gaußfunktionen sind als graue Linien abgebildet.

Die Halbwertsbreite der in Abbildung 5.10 gezeigten Photonenflussprofile kann als zur Bestimmung des Strahlquerschnitts nur eingeschränkt verwendet werden, da zum Teil mehrere Banden zu erkennen waren. Bei einer Beschreibung mit drei Gaußfunktionen waren die Abweichungen nur gering (Abbildung 5.10). Daher wurden diese Profile mit ein bzw. drei Gaußfunktionen (Gleichung 5.2; $n = 1 \ \& \ 3$) beschrieben.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp \left[- \left(\frac{2\sqrt{\ln(2)}}{x_{1/2,i}} \right)^2 (x - x_{m,i})^2 \right] \quad (\text{Gleichung 5.2})$$

Bei einer Beschreibung des Profils mit drei Gaußfunktionen mussten Startparameter angegeben werden. Diese wurden so gewählt, dass die erste Gaußfunktion den größten Teil der Peakfläche abdeckt, die zweite den größten Teil der verbleibenden Fläche und die dritte die restliche Fläche ausfüllt und so wurde meist ein entsprechendes lokales Minimum gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.1 und A.2 zusammengefasst. Um für diese beiden Fälle eine Breite in vertikaler Richtung zu erhalten, wurde das Produkt aus Amplitude (A_i) und Halbwertsbreite ($x_{1/2,i}$) über alle Gaußfunktionen aufsummiert und gegen die vertikale Position aufgetragen. In Abbildung 5.11 sind die Messpunkte eines Photonenflussprofils und ihre Beschreibung mit einer und drei Gaußfunktionen und eine Auftragung der zuvor genannten Summen der Produkte gegen die vertikale Position zu sehen.

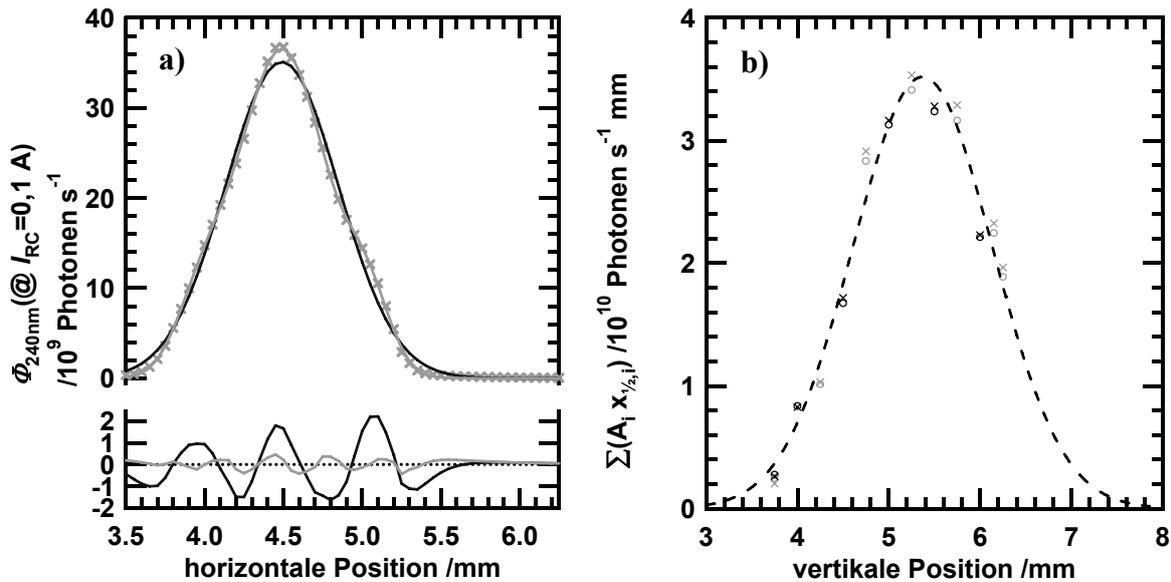


Abbildung 5.11– Auswertung der Photonflussprofile

Unter a) ist exemplarisch die Auswertung eines der Photonflussprofile (y-Position: 5,0 mm) wobei die Messpunkte als graue Kreuze, die Beschreibung mit einer Gaußfunktion und deren Abweichung von den Messpunkten als schwarze Linien, die mit drei Gaußfunktionen als graue Linien dargestellt ist.

Unter b) ist die Summe der Produkte aus Amplitude und Halbwertsbreite, der die den Photonfluss in horizontaler Richtung beschreibende Gaußfunktionen, gegen die vertikale Position aufgetragen. Schwarze Symbole stehen für Werte des ersten, graue Symbole für Werte des zweiten Messtages, Kreuze für die Auswertung mit einer und Kreise für die Auswertung mit drei Gaußfunktionen. Die gestrichelte Linie zeigt die Gaußfunktion, die alle Punkte am besten beschreibt.

Die größte Halbwertsbreite in horizontaler Richtung bei Verwendung einer Gaußfunktion beträgt 0,85 mm am ersten und 1,16 mm am zweiten Messtag. Die Halbwertsbreite, die sich anhand der Gaußfunktion in Abbildung 5.11 b) für die vertikale Richtung ergibt ist 1,80 mm. Beschreibt man alle Messwerte eines Tages mit einer Gleichung (5.3) so erhält man Werte für x_w und y_w .

$$f(x, y) = A \cdot \exp \left[- \frac{1}{2(1 - cor^2)} \cdot \left[\left(\frac{x - x_m}{x_w} \right)^2 + \left(\frac{y - y_m}{y_w} \right)^2 - \left(\frac{2cor \cdot (x - x_m)(y - y_m)}{x_w \cdot y_w} \right) \right] \right] \quad (\text{Gleichung 5.3})$$

Um die Halbwertsbreite in horizontaler und vertikaler Richtung zu erhalten muss, man diese Werte noch mit $2\sqrt{2\ln(2)}$ multiplizieren. So ergeben sich Werte von 0,85 und 1,83 mm für den ersten sowie 1,15 und 1,80 mm für den zweiten Tag. Die Ursachen für die unterschiedlichen Profile an beiden Tagen sind nicht bekannt. Da der Durchmesser der Lochblende zum Teil größer ist als die Halbwertsbreite bei der Verwendung dreier Gaußfunktionen kann die bestrahlte Fläche deutlich kleiner und die Intensität lokal höher sein. Fehler des Monochromatorgitters können Ursache dafür sein, dass der Austrittsspalt nicht ideal im Fokus abgebildet wird und so mehrere Gaussfunktionen zur Beschreibung erforderlich sind. Die Bestimmung des Strahlquerschnitts ist ausreichend genau, um zwei nicht überlappende Bereiche innerhalb der Probenfläche auszuwählen (siehe Abbildung 6.15). Dies ist ausreichend, um Strahlung und Präparation als Ursache struktureller Änderungen unterscheiden zu können.

5.2 Kalibrierung des photoelastischen Modulators

Geringe Abweichungen der Phasenverschiebung δ des photoelastischen Modulators reduzieren das gemessene CD-Signal kaum (Velluz *et al.* 1965), führen aber dazu, dass eine partielle Empfindlichkeit gegenüber Lineardichroismus entsteht. Daher ist es notwendig die verwendeten photoelastischen Modulatoren zu kalibrieren. Von Peter Baumgärtel wurden daher alle PEMs, wie Handbuch des Herstellers beschrieben (Hinds 1998), kalibriert.

5.3 Eigenschaften der Photomultiplier

Am SRCD-Aufbau wurden drei verschiedene Channelphotomultiplier-Typen von PerkinElmer eingesetzt. Ein Photomultiplier des Typs C1382 ($\varnothing = 12,7$ mm, Messbereich 650-165 nm) wurde im Stopped-Flow Aufbau verwendet, da die zur Totzeit-Bestimmung vom Hersteller vorgeschlagenen Reaktionen im Bereich des sichtbaren Lichts detektiert werden und bei Messungen mit einer Pfadlänge von 1 mm aufgrund der Lösungsmittelabsorption unterhalb von 180 nm nicht mehr gemessen werden kann. Für alle anderen Messungen wurde Photomultiplier der Typen C921 ($\varnothing = 8,5$ mm, Messbereich 320-115 nm) und C1321 ($\varnothing = 12,7$ mm; Messbereich 320-115 nm) eingesetzt.

Unter den folgenden Unterpunkten werden die Ergebnisse der Bestimmung der für die Extinktionsberechnung mit Gleichung 2.23 erforderlichen Z-Werte der Photomultiplier gezeigt, der Fehler des CD-Signals, die Stabilität der Gerätebasislinie, die Drehwinkelabhängigkeit eines Photomultipliers dokumentiert.

5.3.1 Bestimmung der Z-Werte von Photomultipliern

Um die Gleichung 2.23 zur Berechnung der Extinktion benutzen zu können, muss die Größe von Z bekannt sein. Dazu wurden für einige der am BESSY verwendeten Photomultiplier Messungen durchgeführt, bei denen entweder bei konstantem Gleichstromanteil die Größe des Austrittsspalt des Monochromators variiert wurde oder bei konstantem Austrittspalt die Größe des Gleichstromanteils. Am 3m-NIM-C ist der Spiegel hinter dem Austrittsspalt (M4) elektrisch isoliert und ermöglicht es den auf Grund des photoelektrischen Effekts durch Bestrahlung induzierten Strom zu messen. Dabei ist Q_{M4} die Quanteneffizienz des Spiegels. Da die Größe des Austrittsspalt für kleine Spaltgrößen vom nominell eingestellten Wert abweicht, wurde dieser Spiegelstrom (I_{M4}) mit einem Elektrometer gemessen und als Maß für den Photonenfluss verwendet. Der Spiegelstrom wurde dabei mit dem bei geschlossenem Beamshutter bestimmten Dunkelstrom $I_{M4,D}$ korrigiert. An jedem Punkt wurde 25-mal für je eine Sekunde gemessen und daraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

$$I_{M4} = e \cdot Q_{M4}(\lambda) \cdot \Phi_0 + I_{M4,D} \quad (\text{Gleichung 5.4})$$

Ersetzt man Φ_0 in Gleichung 2.21 über Gleichung 5.4 und setzt für die Absorption Null ein so ergibt sich nach umstellen folgende Gleichung, über die die Z-Werte der Channelphotomultiplier ermittelt wurden.

$$\left(\frac{U_{DV}}{I_{M4} - I_{M4,D}} \right) = \left(\frac{Q_{\text{det}}(\lambda)}{Q_{M4}(\lambda)} \cdot R_{\text{det}} \cdot K_{\text{PM}} \right) \cdot (U_{HV})^Z \quad (\text{Gleichung 5.5})$$

5.3.1.1 Z-Werte der Photomultiplier am SRCD-Experiment

Die für die am BESSY verwendeten Photomultiplier bestimmten Z-Werte, sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt und wurden auf eine Nachkommastelle gerundet zur Extinktionsberechnung verwendet. Die Ergebnisse für den CPM C-1321 (A) wurden gemittelt. Die Auswertung ist exemplarisch für den Photomultiplier C-1321(B) in Abbildung 5.12 dargestellt, die Regression über den gesamten Messbereich ist dabei als Gerade zu sehen. Die Messpunkte zeigen eine geringe systematische Abweichung zu dieser Geraden die vor allem bei hohen Hochspannungswerten zu sehen ist und sich auch in unterschiedlichen Z-Werten für den niedrigen und hohen Hochspannungsbereich äußert (siehe Tabelle 5.2). Daher wurde für den Photomultiplier C-1321 (B) der Z-Wert für den Hochspannungsbereich bis 1,59 kV zur Berechnung der Extinktion verwendet, da dieser Bereich bei einer spektralen Bandbreite von 1 nm über einen weiten Wellenlängenbereich für Extinktionswerte bis zwei geeignet ist.

Für den Fall, dass der verwendete Photomultiplier in der Messdatei nicht vermerkt ist, wurde die Berechnung mit einem Z-Wert von 15 durchgeführt, da die Herstellerangaben für die mittlere Verstärkung σ sich damit beschreiben ließen.

Photomultiplier	Z-Werte	Fehler	U_{HV} -Bereich
CPM C-0921	15,28	0,03	1,04-1,29 kV
CPM C-1321 (A)	14,9	0,1	1,09-1,22 kV
CPM C-1321 (A)	15,1	0,3	1,32-1,53 kV
CPM C-1321 (B)	16,21	0,04	1,07-1,59 kV
CPM C-1321 (B)	15,7	0,2	1,45-1,89 kV
CPM C-1321 (B)	16,00	0,03	1,07-1,89 kV
CPM C-1382	15,49	0,05	1,06-1,57 kV

Tabelle 5.2 - Z-Werte der Photomultiplier

Die Z-Werte wurden mittels gewichteter linearer Regression über Gleichung 5.5 bestimmt.

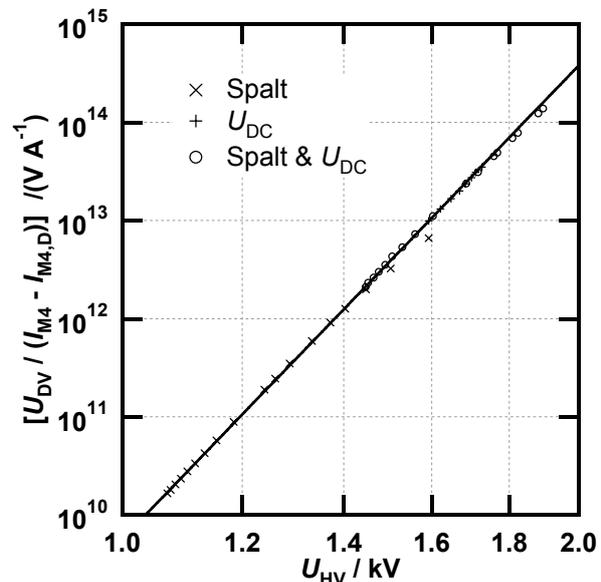


Abbildung 5.12 - Z-Wertbestimmung

Die Messungen wurden bei 235 nm (Kreuz und Plus) bzw. bei 125,6 nm (Kreis) durchgeführt. Um die Unterschiede in Quanteneffizienz von CPM und Spiegel auszugleichen, wurden die bei 125,6 nm gemessenen Werte mit 1550 multipliziert.

5.3.1.2 Vergleich mit kommerziellen CD-Spektrometern

Für Chirascan CD-Spektrometer wurde aus dem Zusammenhang zwischen Hochspannung, Gleichstromanteil und Extinktionswerten der vom Hersteller verwendete Z-Wert bestimmt. An die für das J-715 und J-815 vom Hersteller verwendete Umrechnung der Hochspannung in Extinktionswerte wurde Gleichung 2.24 angepasst und so ein Z-Wert bestimmt. Die Terme für Gleichspannung und Ringstrom entfielen dabei.

Die vom Hersteller für die CD-Spektrometer J-715 und J-815 in die Software integrierte Umrechnung von Hochspannungs- in Extinktionswerte ist in Abbildung 5.13 als schwarze Linie dargestellt. Die Umrechnung erfolgt im Bereich zwischen 278 und 438 V sowie zwischen 438 und 608 V jeweils mit

einem Polynom 3. Ordnung. Unterhalb von 278 V und über 608 V wurden lineare Gleichungen verwendet. Mittels nichtlinearer Regression wurde die Gleichung 2.23 ohne die Terme für Gleichspannung und Ringstrom im Bereich zwischen 230 und 800 V an zwei Datensätze minimiert, die vom Verlauf identisch sind, sich aber in Anzahl und Verteilung der Datenpunkte unterscheiden. Die Abweichung der beiden Regressionen von der Umrechnung durch die Software ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen. Sie liegt zwischen 230 und 650 V unter 0,010 und im Bereich zwischen 223 und 775 V unter 0,02. Bei einer spektralen Bandbreite von 1 nm und einer Extinktion der Probe von weniger als 2 sollte die Hochspannung des Photomultipliers zwischen 350 und 185 nm im Bereich von 230-650 V liegen. Da die Abweichung im Bereich von

230 bis 650 V meist unterhalb der vom Hersteller angegebenen Genauigkeit für photometrische Messungen von $\pm 0,01$ liegt halte ich eine Berechnung der Extinktion über Gleichung 2.23 für zulässig.

Bei größeren spektralen Bandbreiten können Hochspannungswerte von unter 230 V auftreten. Im Bereich unterhalb von 185 nm kann die Photomultiplierhochspannung auch deutlich über 650 V liegen, obwohl die Extinktion der Probe noch unter 2 liegt. In diesen Bereich liefern die CD-Spektrometer weniger Licht und ein Teil davon wird auch noch durch Reste von Luftsauerstoff absorbiert. Für Hochspannungswerte unterhalb von 200 V und über 800 V unterscheiden sich die nichtlineare Regression über Gleichung 2.23 und die Umrechnung durch die Software deutlich. Da die Umrechnung durch die Software beschreibend ist und nicht auf einem physikalischen Modell der Signalverstärkung durch einen Photomultiplier basiert und mir nicht bekannt ist, ob die linearen Zusammenhänge zwischen Extinktion und Spannung durch Messwerte belegt oder extrapoliert sind, halte ich die Extinktionswerte, die sich dann berechnen lassen für weniger zuverlässig. Die nichtlineare Regression ergab für Z Werte von 7,530 und 7,539 und für $U_{HV,K}$ Werte von 204,6 V und 204,8 V.

Da gleichzeitige oder zumindest zeitnahe Messung von Photonenfluss, Photomultiplierhochspannung und Gleichstromanteil des Photomultipliers bei kommerziellen CD-Spektrometern ohne Modifikationen nicht möglich ist, kann der Z-Wert nicht über Gleichung 5.5, wie für die am SRCD-Experiment verwendeten Photomultiplier, bestimmt werden. Der Photonenfluss kann aber an allen CD-Spektrometern durch die Variation der spektralen Bandbreite geändert werden. Geht man davon aus, dass bei kommerziellen CD-Spektrometern eine Verdopplung der spektralen Bandbreite zu einer Vervierfachung des Photonenflusses führt und am BESSY ein linearer Zusammenhang besteht, erlaubt dies eine Bestimmung von Z-Werten.

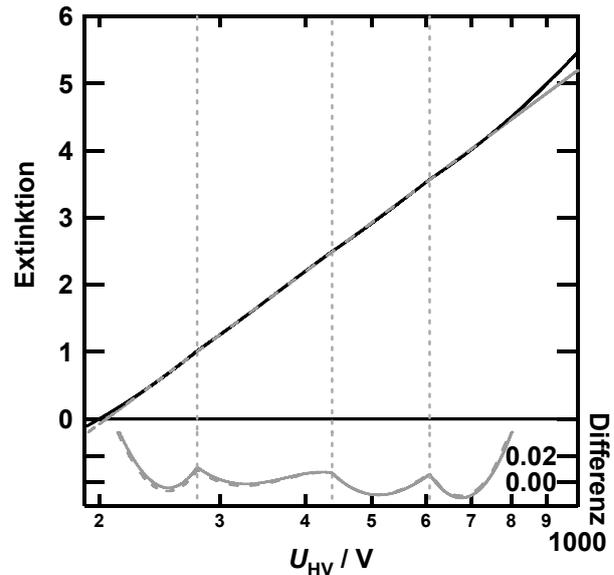


Abbildung 5.13 – U_{HV} -> OD Umrechnung

Die schwarze Linie zeigt die Umrechnung von Hochspannung in Extinktion wie sie in der Software durchgeführt wird. Die graue durchgezogene sowie die gestrichelte Linie zeigen die Gleichung 2.18 entsprechenden Regressionen, an zwei Datensätze.

Daher wurden Messungen bei verschiedenen spektralen Bandbreiten durchgeführt. Der dekadische Logarithmus der durch ein Volt geteilten Hochspannung wurde berechnet und über einen geeignet erscheinenden Wellenlängenbereich gemittelt. Zieht man den Mittelwert von den logarithmierten Werten ab, führt dies zu einer Überlagerung der bei verschiedenen spektralen Bandbreiten ermittelten Kurven (Abbildung 5.14).

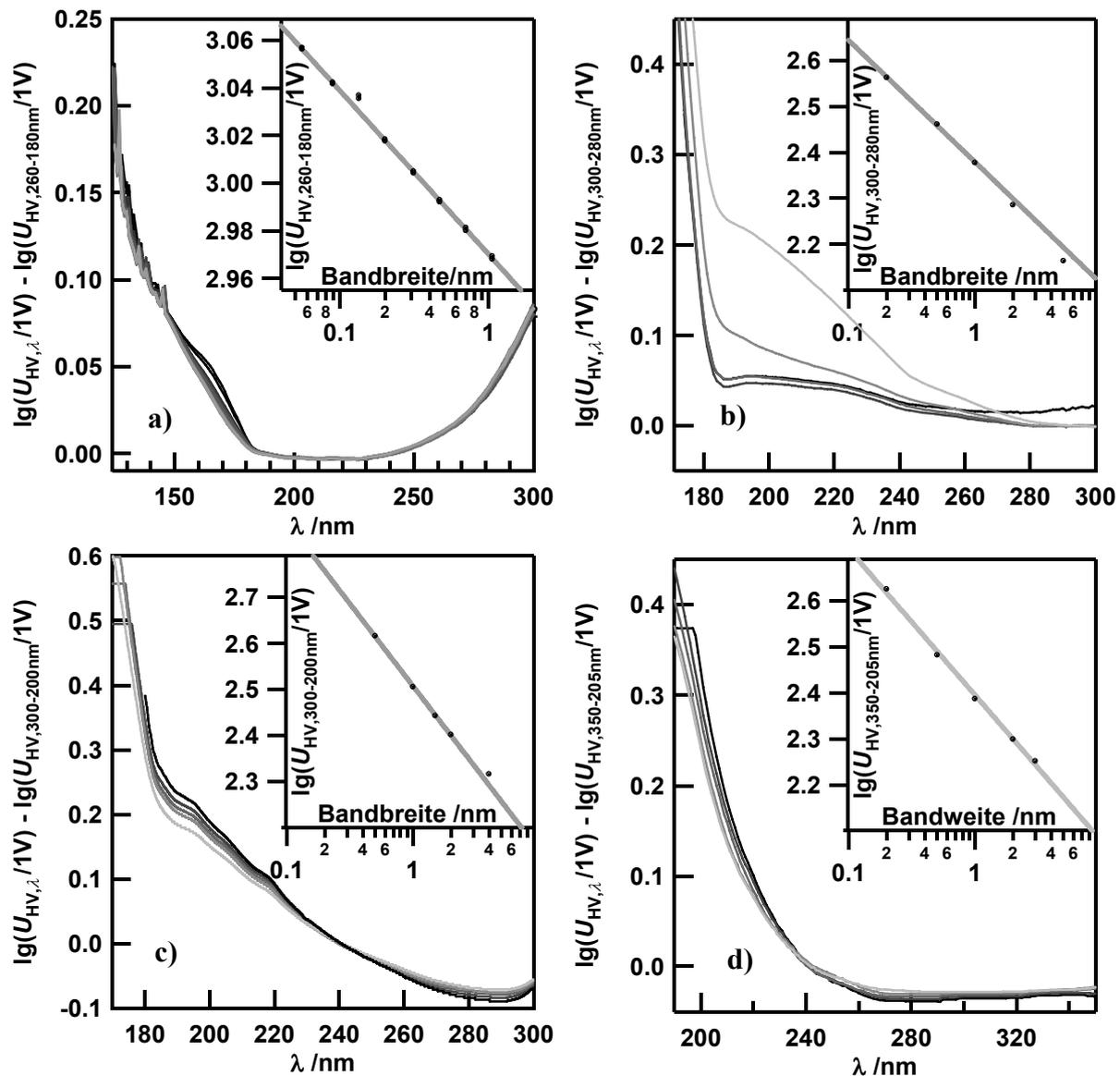


Abbildung 5.13 – Z-Wertbestimmung über Messungen bei verschiedenen Bandbreiten

Ein Vergleich der Hochspannungsverläufe bei verschiedenen Bandbreiten ist möglich, wenn der dekadische Logarithmus der Hochspannung berechnet und um einen Mittelwert reduziert wird. Die so ermittelten Werte wurden für am BESSY verwendeten CPM C921 (a), für das J-715 (b), für ein π^* -180 (c) und für ein Chirascan (d) hier in Graustufen dargestellt, wobei die kleinste Bandbreite als eine schwarze, die größte als eine hellgraue Linie zu sehen ist. Die Auftragung zur Bestimmung der Z-Werte ist in der oberen rechten Ecke der entsprechenden Diagramme abgebildet, wobei die Mittelwerte als Punkte und die Regression als graue Linie zu sehen ist.

Trägt man die Mittelwerte gegen den dekadischen Logarithmus des Quotienten aus spektraler Bandbreite durch ein Nanometer auf, so erhält man eine Gerade mit dem Anstieg $-2/Z$ an den kommerziellen CD-Spektrometern, wenn der Photonenfluss proportional zum Quadrat der Bandbreite ist ($n=2$) und dem

Anstieg $-1/Z$ am BESSY, wenn für die verwendeten Spaltbreiten ein linearer Zusammenhang zwischen Photonenfluss und spektraler Bandbreite $\Delta\lambda$ besteht ($n=1$) und der Ringstrom konstant ist (Gleichung 5.6). Diese Geraden sind in der oberen rechten Ecke der Graphen in Abbildung 5.14 dargestellt.

$$\lg\left(\frac{U_{HV}}{[IV]}\right) = -\frac{n}{Z} \cdot \lg\left(\frac{\Delta\lambda}{[nm]}\right) \quad (\text{Gleichung 5.6})$$

Die Überlagerung zeigen, dass die Annahme, eine Verdopplung der spektralen Bandbreite führt zu einer Vervierfachung des Photonenflusses, bei den kommerziellen CD-Spektrometern nicht erfüllt ist. Die Abweichung der eingestellten von der tatsächlichen spektralen Bandbreite wurde für das J-715 CD-Spektrometer von Jasco schon unter Punkt 5.1.2.2 gezeigt. Beim π^* -180 (Abbildung 5.14c) und Chirascan (Abbildung 5.14d)) von Applied Photophysics könnte eine ungleichmäßige Ausleuchtung des Eintrittspaltes die Ursache sein. Werden hier andere Wellenlängenbereiche zur Mittelwertberechnung ausgewählt ändert sich der Z-Wert. Die am BESSY aufgenommenen Werte ergeben hingegen nahezu deckungsgleiche Kurven über den gemessenen Wellenlängenbereich mit etwas größeren unterschieden im Bereich der Sauerstoffabsorptionsbande um 165 nm und der Stickstoffabsorptionsbanden unterhalb von 145 nm.

	BESSY	Jasco J-715	AP π^* -180	AP Chirascan
Z (Photomultiplier)	15,15 ± 0,19	7,55 ± 0,18	5,59 ± 0,09	6,30 ± 0,20
n (Monochromator)	1	2	2	2
Vergleichswerte Z	15,28	7,53/7,54	--	6,79

Tabelle 5.3 – über die Bandbreite ermittelte Z-Werte

Die Ergebnisse der Z-Wertbestimmung sind in Tabelle 5.3 dargestellt. Die Fehlerangaben stammen aus der Regression, wobei die Fehler für π^* -180 und Chirascan aufgrund der zuvor schon genannten Abhängigkeit von Wellenlängenbereich größer sind. Zum Vergleich sind der Z-Wert aus Tabelle 5.2 und sich aus den Herstellerangaben ergebende Z-Werte angegeben.

5.3.2 Statistischer Fehler des CD-Signals

Die Umwandlung von Photonen in Elektronen an der Photokathode eines Photomultipliers entspricht statistisch betrachtet einer Poissonverteilung. Für eine große Anzahl an Ereignissen entspricht die Poissonverteilung einer Gaußverteilung wobei die Standardabweichung der Wurzel der Ereignisse entspricht. Der Photonenfluss am BESSY und an den kommerziellen CD-Spektrometern sollte ausreichend hoch sein, so dass der Photomultiplierstrom für links zirkular polarisiertes Licht und rechts zirkular polarisiertes Licht bei einer Messzeit von einer Sekunde eine Gaußverteilung aufweist. Kommt durch die Signalverarbeitung keine nicht einer Gaussverteilung entsprechende Fehlerquelle hinzu, sollte auch das CD-Signal einer Gaußverteilung entsprechen. Unter der Annahme, dass eine Gaußverteilung vorliegt, wird am BESSY für Gleichspannung, Wechselspannungsamplitude und Photomultiplierhochspannung, sowie für die davon abgeleiteten Größen wie das CD-Signal, die Standardabweichung und Fehler berechnet.

Da bei den kommerziellen CD-Spektrometern der Fehler des CD-Signals nicht angegeben wird, wurden hier mehrere Einzelmessungen durchgeführt, um eine Standardabweichung für die Einzelmessungen und

einen Fehler für den Mittelwert dieser Messungen angeben zu können. Da die Standardabweichung des CD-Signal umgekehrt proportional zur Wurzel aus Photonenfluss und Quantenausbeute ist, sollte eine doppellogarithmische Auftragung dieser Standardabweichung gegen Hochspannung des Photomultipliers eine Gerade mit einem Anstieg von $Z/2$ ergeben, wenn der Gleichstromanteil des Photomultipliers konstant ist. Diese Auftragung ist für vier kommerzielle CD-Spektrometer in Abbildung 5.15 dargestellt. Die Geraden für das Jasco J-715 und das Jasco J-815 CD-Spektrometer sind fast gleich, die Geraden der beiden Chirascan CD-Spektrometer unterscheiden sich von denen der Jasco CD-Spektrometer und auch untereinander deutlich. Ein Vergleich der Hochspannung verschiedener CD-Spektrometer ist aus diesem Grund nicht sinnvoll.

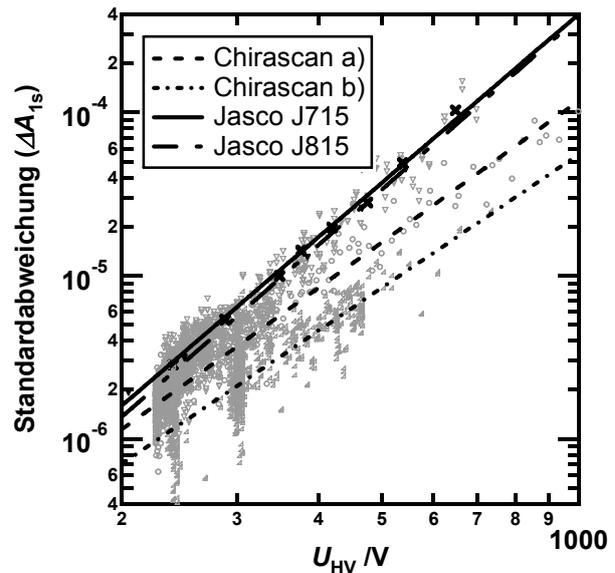


Abbildung 5.15 – Standardabweichung und Photomultiplierhochspannung

Die Standardabweichungen wurde aus 10-12 aufeinander folgenden Messungen des Leergeräts mit einer Integrationszeit von 1 s bestimmt (graue Marker) und in einer doppellogarithmischen Auftragung durch Geraden beschrieben.

Dass die Streuung der Standardabweichung bei 10-12 Messungen relativ groß ist und die Punkte auch sehr ungleichmäßig verteilt sind, könnte Ursache dafür sein, dass die so ermittelten Z-Werte etwa 6-9 % kleiner sind als die in Tabelle 5.3.

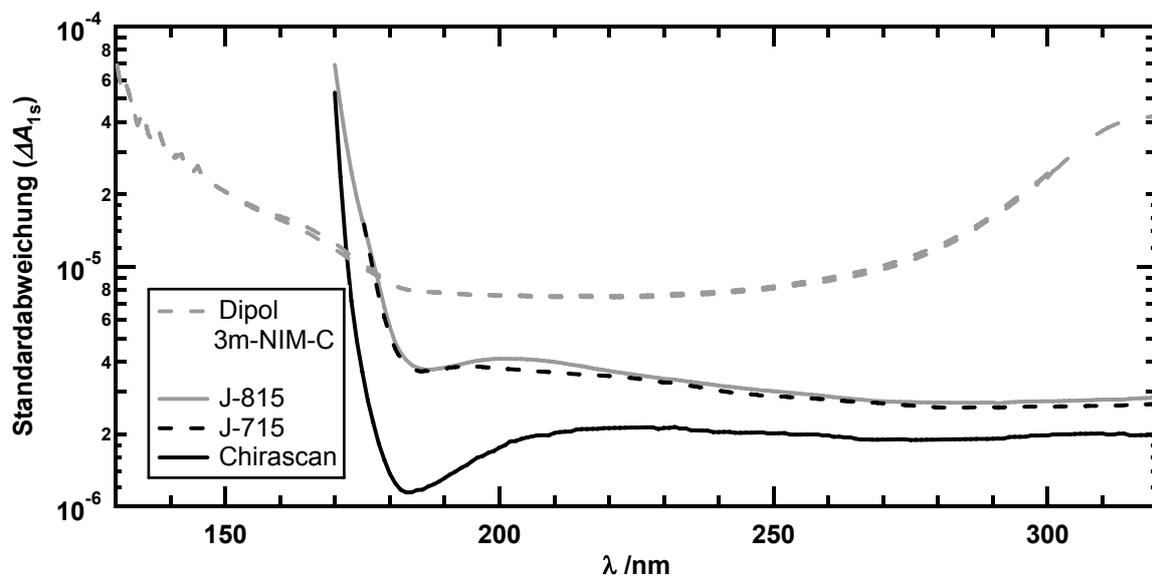


Abbildung 5.16 – Vergleich der Standardabweichung

Die Stickstoffspülung betrug am 3m-NIM-C 25-35 l min⁻¹, am J-815 15 l min⁻¹, am J-715 6 l min⁻¹ und am Chirascan 5 l min⁻¹. Der Ringstrom lag bei etwa 200 mA. Das Lampenalter der kommerziellen Spektropolarimeter lag unter 200 h.

Verwendet man den ermittelten Zusammenhang zwischen Standardabweichung und Hochspannung um aus der Hochspannung einer Gerätebasislinie die Standardabweichung zu berechnen, kann man verschiedene Spektrometer miteinander vergleichen (Abbildung 5.16).

Dabei zeigt sich, dass die Standardabweichung des CD-Signals am 3m-NIM-C erst unterhalb von 180 nm im Vergleich zum J-715 und J-815 und unterhalb von 175 nm im Vergleich zum Chirascan kleiner ist. Bei den kommerziellen CD-Spektrometern nimmt die Standardabweichung unterhalb von etwa 180 nm deutlich zu, der Bereich unterhalb von etwa 190 nm ist stark von der Stickstoffspülung abhängig. Die Abhängigkeit von der Stickstoffspülung ist darauf zurückzuführen, dass über Öffnungen in den CD-Spektrometern ein Austausch mit der Luft der Umgebung möglich ist und so ein Zusammenhang zwischen der Stickstoffspülung und der Sauerstoffkonzentration im CD-Spektrometer besteht. Wie die Abbildung 5.8 zeigt, können schon geringe Mengen Luft die Photonenzahl im Bereich unterhalb von 190 nm deutlich reduzieren. Die Zunahme der Standardabweichung oberhalb von etwa 280 nm am Dipol ist auf die Abnahme der Quanteneffizienz des verwendeten Photomultipliers (Perkin-Elmer C-921) zurückzuführen. Um am 3m-NIM-C für den Bereich zwischen 185 und 250 nm den gleichen statistischen Fehler wie mit dem J-715 oder dem J-815 CD-Spektrometer zu erreichen, benötigt man etwa eine fünf- bis zehnfach längere Messzeit. Wie im folgenden Kapitel gezeigt, liegen am 3m-NIM-C die systematischen Basislinienschwankungen aber schon über dem statistischen Fehler, so dass eine Messzeit von mehr als drei Sekunden pro Messpunkt nur bei einer höheren Probenextinktion von Bedeutung ist.

5.3.2.1 Stabilität der Basislinie

Exemplarisch sind in Abbildung 5.17a) die am 3m-NIM-C über einen Zeitraum von drei Wochen gemessenen Gerätebasislinien dargestellt. Innerhalb dieses Zeitraums fanden am 3m-NIM keine Nutzerwechsel, keine Ausrichtung des Messaufbaus und keine Neuordnung der optischen Elemente statt. Für zwei an aufeinander folgenden Messtagen gemessene Basislinien sind die als Symbole dargestellten Messwerte durch Linien verbunden in schwarz dargestellt. Diese beiden Gerätebasislinien weisen oberhalb von etwa 230 nm teilweise deutlich über den Fehler der Einzelmessung hinausgehende Abweichungen voneinander auf. Für Messungen an einem Tag waren die Unterschiede bei aufeinander folgenden Messungen meist kleiner oder unterschieden sich im Rahmen des Fehlers nicht. Da diese Veränderungen keinen einheitlichen Trend aufwiesen und zum Teil auch sprunghaft auftraten, war ein Ausgleich nicht möglich. Änderte sich die Gerätebasislinie über einen Zeitraum nicht, so wurde davon ausgegangen, dass die Basislinie für in diesem Zeitraum durchgeführte Messungen stabil war. Ein Vergleich der Standardabweichung der in Abbildung 5.17a) gezeigten Basislinien mit dem Mittelwerte der Fehler dieser Basislinien ist im Anhang unter A4 dargestellt, dort ist auch ein weiteres Beispiel für die Stabilität am 3m-NIM-C zu sehen. Diese und weitere Daten deuten darauf hin, dass am 3m-NIM die Strahlage in Folge von Monochromatorbewegungen leicht variiert und dies zu systematischen Schwankungen in der Basislinie führt.

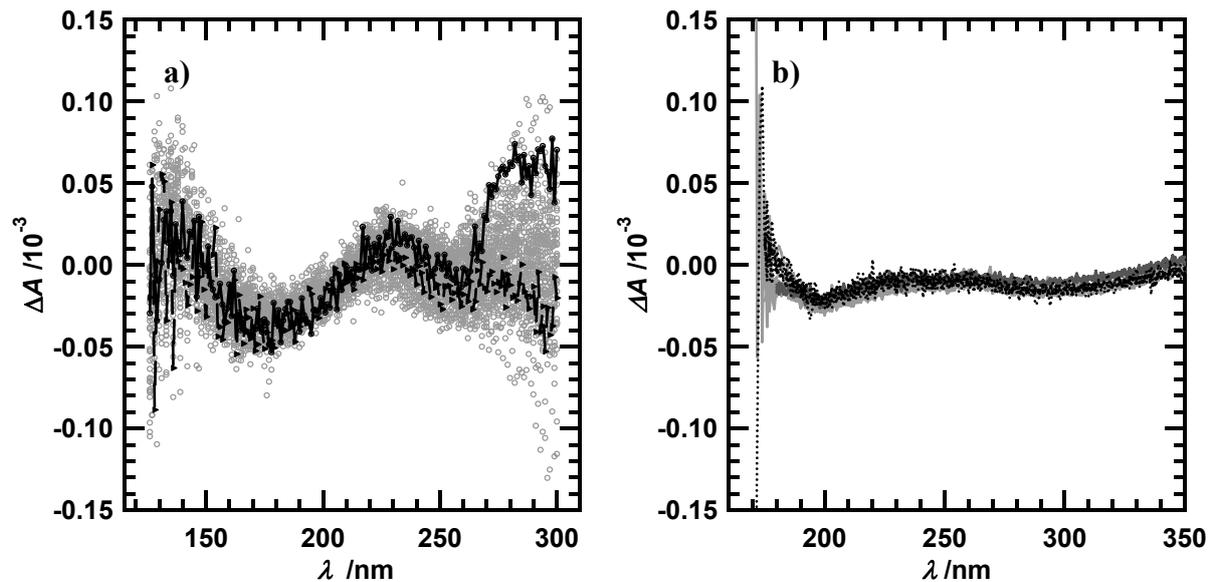


Abbildung 5.17 – Gerätebasislinien

Gerätebasislinien am 3m-NIM-C ($t_i = 3$ s) und am Jasco J-715 ($t_i = 4$ s). Details im Text

Am U125-2_NIM konnte eine Veränderung der Gerätebasislinie in Folge von Monochromatorbewegungen nicht festgestellt werden, da die Unterschiede zwischen Standardabweichung und Mittelwert der Fehler deutlich kleiner sind als am 3m-NIM-C. Durch Nutzerwechsel können aber signifikante Änderungen der Gerätebasislinie eintreten. Die Unterschiede zwischen Standardabweichung und Mittelwert der Fehler sowie die Änderungen der Gerätebasislinie durch Nutzerwechsel sind im Anhang unter A5 dargestellt.

In Abbildung 5.17b) sind an einem Jasco J-715 CD-Spektrometer über eine Lampenlaufzeit von 850 h verteilt gemessene Gerätebasislinien dargestellt. Die durch Aus- und Einbau des Peltierkühlerhalters entstandenen Variationen in der Gerätebasislinie, sind durch Gruppierung der Basislinien (hellgrau, dunkelgrau und schwarz gepunktet) in Abbildung 5.17b) zu sehen. Die hell- und dunkelgrau dargestellten Basislinien unterscheiden sich im Bereich von 350 bis 200 nm um etwa $1 \cdot 10^{-5}$ und die schwarz gepunktet dargestellten Basislinien liegen dazwischen, zeigen aufgrund der verringerten Lampenintensität aber ein größeren Fehler. Unterhalb von 200 nm nimmt die Abweichung zwischen den Gruppen zu. Vom Hersteller wird für das Jasco J-715 eine Basislinienstabilität von etwa $6 \cdot 10^{-6}/h$ angegeben. Eine Stabilität von etwa $6 \cdot 10^{-6}$ lag hier auch über einen längeren Zeitraum vor, solange keine Änderungen am Aufbau vorgenommen wurden.

Die geringe Größe des Lichtflecks an den Messplätzen U125-2_NIM und 3m-NIM-C macht den Messaufbau empfindlich gegenüber Änderungen der Strahlage, da sich Quantenausbeute und Polarisationsabhängigkeit der verwendeten Photomultiplier abhängig von Lage des Strahls ändern. Am 3m-NIM-C konnten mit der Monochromatorbewegung in Zusammenhang stehende Variationen der Strahlage beobachtet werden. Durch Erhöhung der Messzeit pro Punkt werden die Änderungen der Basislinien deutlicher, zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses muss jedoch die Zahl der Messungen je Probe erhöht werden. Am U125-2_NIM kommt es infolge von Nutzerwechseln zu

Änderungen der Basislinie. Daher müssen Probe und Kontrolle in der Zeit bis zum Nutzerwechsel, in der Regel nach 8 Stunden, gemessen werden. Die Stabilität der Basislinie des Jasco J-715 CD-Spektrometers war deutlich besser als die am 3m-NIM-C Messplatz am BESSY. Die Zahl der bis zum Nutzerwechsel gemessenen Basislinien am U125-2_NIM war immer zu gering, um einen Vergleich mit dem Jasco J-715 CD-Spektrometer vorzunehmen.

5.3.3 Abhängigkeit der CD-Basislinie vom Drehwinkel des Photomultipliers

Die polarisationsabhängige Empfindlichkeit des Photomultipliers führt dazu, dass das CD-Signal im Standardmessaufbau mit einem photoelastischen Modulator (SPM) vom Drehwinkel des Photomultipliers abhängt. Da der Lichtstrahl an den Messplätzen am BESSY den Photomultiplier weder gleichmäßig noch vollständig ausleuchtet, besteht darüber hinaus eine Abhängigkeit von der Strahlage und eine vom Abstand zum Fokus des jeweiligen Strahlrohres. Die Abhängigkeiten von der Strahlage und vom Abstand zum Fokus wurden jedoch nicht systematisch untersucht, da dies nur in Kombination mit der Drehwinkelabhängigkeit sinnvoll wäre. Dies wäre deutlich aufwendiger und würde deutlich mehr Zeit in Anspruch nehmen.

In Abbildung 5.18a) ist die Abhängigkeit vom Drehwinkel ϕ für einen der verwendeten Photomultiplier dargestellt. Da die Verfälschung des CD-Signals von der Doppelbrechung im Aufbau $\delta(\beta)$ und vom Drehwinkel des Photomultipliers ϕ abhängig ist, kann, wie in Abbildung 5.19a) dargestellt, ein Photomultiplierwinkel gewählt werden, bei dem diese Verfälschung gering ist und die Wellenlängenabhängigkeit minimal ist.

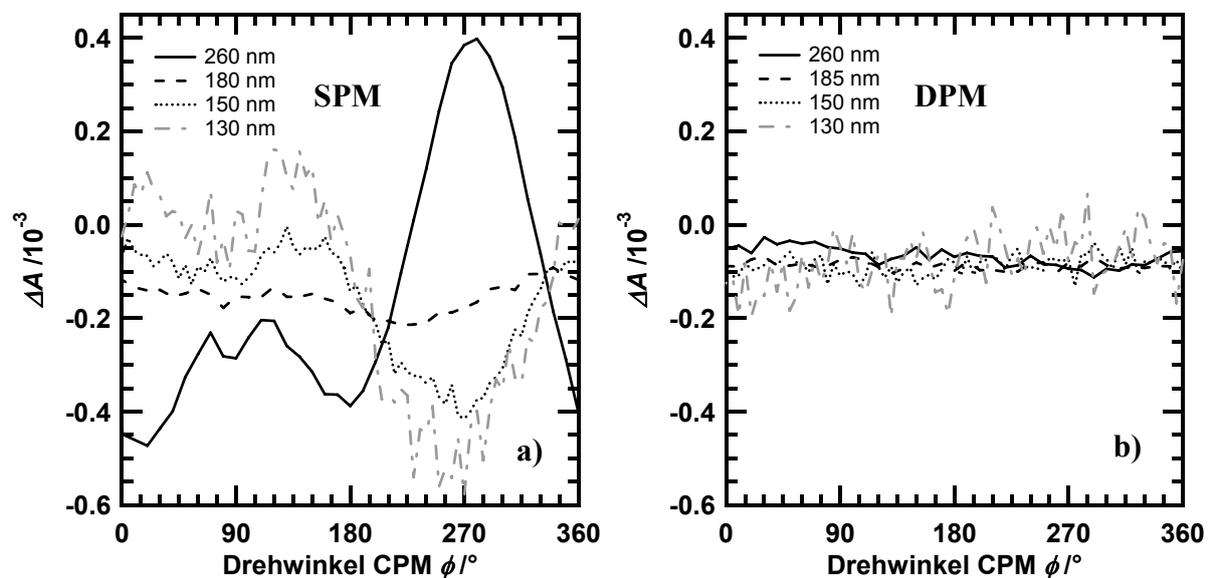


Abbildung 5.18 – Abhängigkeit des CD-Signals vom Drehwinkel des Photomultipliers

Die Abhängigkeit des CD-Signals vom Drehwinkel des Photomultipliers CPM1321-A ist in 3.16a) für den Standardaufbau (SPM) und in 3.16b) für den Aufbau mit zwei photoelastischen Modulatoren (DPM) dargestellt.

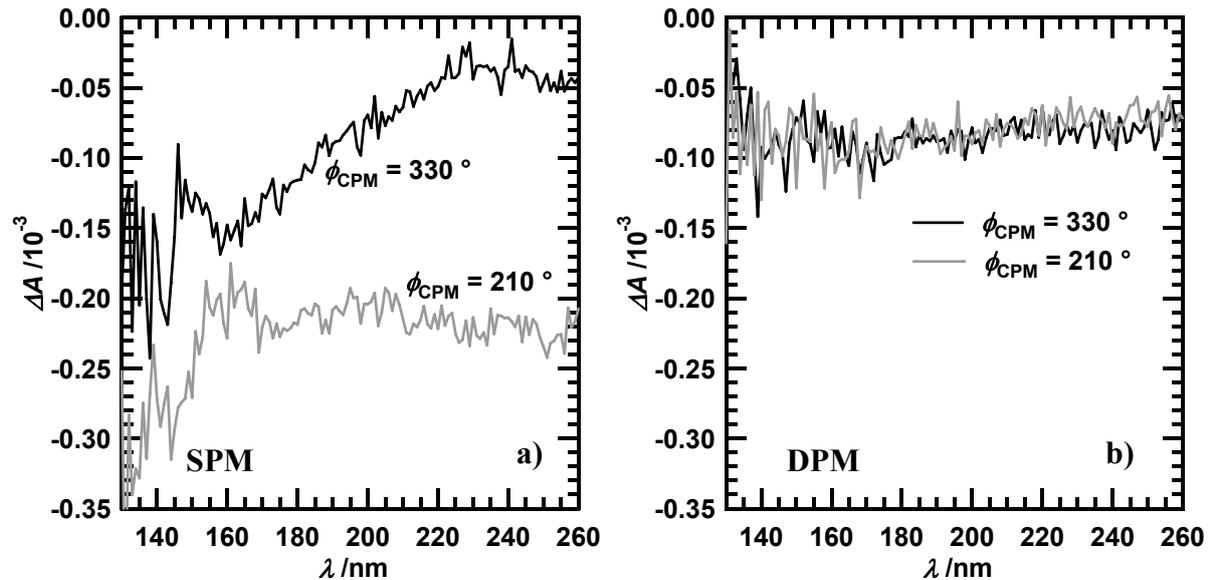


Abbildung 5.19 – Abhängigkeit der Gerätebasislinie vom Drehwinkel des Photomultipliers

Die Gerätebasislinie bei im Standardaufbau günstigen Photomultipliertrehwinkeln, die für Standardaufbau (SPM) in 3.17a) und für den Aufbau mit zwei Photoelastischen Modulatoren (DPM) in 3.17b) dargestellt ist.

Dies bedeutet aber nur, dass der additive Term über dem Bruchstrich in Gleichung 3.4 fast Null ist. Eine einfache Beschreibung der Abhängigkeit vom Drehwinkel in Abbildung 5.18a) mit Gleichung 3.4 ist nicht möglich, da auch das Fenster des Photomultipliers anteilig zur Doppelbrechung $\delta(\beta)$ beiträgt und bei Änderung der Drehwinkel des Photomultipliers auch der Drehwinkel der Doppelbrechung β geändert wird. Kommt durch die Probenzelle zusätzliche Doppelbrechung in den Aufbau, führt dies ebenfalls zu einer Änderung von $\delta(\beta)$ und β und ist so im gemessenen CD-Signal sehen.

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \left(\frac{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)}{\sqrt{2}} \right) \cdot \frac{\Delta A - \frac{2}{\ln 10} \cdot D_{Pol}(\phi) \cdot \delta_B(\lambda) \sin(2(\beta - \phi))}{1 + D_{Pol}(\phi) \cdot J_0(\delta_M^0) \cos(2\phi)} \quad (\text{Gleichung 3.4})$$

Durch den Einsatz eines zweiten photoelastischen Modulators wird diese Abhängigkeit deutlich reduziert (Abbildung 5.18b) und die Gerätebasislinie zeigt im Vergleich zum Standardaufbau eine geringere Wellenlängenabhängigkeit (Abbildung 5.19b) Gemäß Gleichung 3.6 es ist möglich, einen Drehwinkel einzustellen, bei dem der Einfluss von Doppelbrechung auf das gemessene CD-Signal deutlich reduziert ist. Diesen Winkel zu bestimmen, war ohne zusätzliche Doppelbrechung nicht möglich, da wie in Abbildung 5.18b) dargestellt, der CD-Fehler so groß war, dass die aus Gleichung 3.6 erwartete $\sin(2\phi)$ -Abhängigkeit nicht zu beobachten war.

$$\frac{U_{|AV|}}{U_{DV}} = \left(\frac{\ln 10 \cdot J_1(\delta_0)}{\sqrt{2}} \right) \cdot \Delta A - \frac{2 \cdot D_{Pol}(\phi) \cdot \delta_B(\lambda)}{\ln 10} (\cos 2\beta \sin 2\phi) \quad (\text{Gleichung 3.6})$$

Daher wurde hinter dem ersten photoelastischen Modulator ein Kompensator platziert, dessen Einstellung bei 260 nm so gewählt wurde, dass aufgrund der zusätzlichen Doppelbrechung im SPM-

Aufbau ein gut messbares CD-Signal entstand und die Drehwinkelabhängigkeit des Photomultipliers bei Kompensatordrehwinkeln β_{COM} zwischen -45 und $+45^\circ$ relativ zur Polarisationssebene des Lichts hinter dem Polarisator wurde gemessen.

Eine Beschreibung der Messwerte über die Gleichungen 3.4 und 3.6 ist nicht praktikabel. Eine entsprechende Regression würde die Parameter D_{Pol} , δ_B , β_0 (Winkel von δ_B) und ϕ_0 (Winkel von D_{Pol}) sowie die Variablen β und ϕ enthalten. D_{Pol} ist relativ klein, so dass $1 + D_{\text{Pol}}(\phi) \cdot J_0(\delta_M^0) \cos(2\phi) \approx 1$. Dadurch sind die Größen D_{Pol} und δ_B sowie die Winkel β_0 und ϕ_0 in der Regression stark voneinander abhängig und die Regression konvergiert nicht. Hinzu kommt, dass δ_B abhängig vom Drehwinkel des Kompensators war. Bei einer benutzerdefinierten Regression müssen außerdem geeignete Startwerte für die Parameter angegeben werden müssen, da sonst keine Lösung gefunden wird, die die Messwerte beschreibt. Aus diesen Gründen wurde die, in der zur Auswertung verwendeten Software IgorPro (WaveMetrics, USA) enthaltene Standardregression für Sinus-Funktionen verwendet, die durch Festlegung eines Parameters auf zwei Parameter unbekannter Größe reduziert wurde (Gleichung 5.7). Nach Abzug der Basislinie ohne Kompensator (Abbildung 5.18) können die CD-Messwerte mit dieser Gleichung beschrieben werden. Dabei ist ΔA das Messsignal. Die Amplitude ΔA_{max} enthält bei SPM $-2/\ln 10 \cdot D_{\text{Pol}} \cdot \delta_B$ und bei DPM $-2/\ln 10 \cdot D_{\text{Pol}} \cdot \delta_B \cdot \cos(2\beta)$. Der Winkel ϕ_{CPM} entspricht bei SPM $(\beta - \beta_0 - \phi_0)$ und bei DPM ϕ_0 . Entspricht der Drehwinkel ϕ_{CPM} sollte dies der optimale Winkel für den DPM-Aufbau sein.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{max}} \cdot \sin(2(\phi_{\text{CPM}} - \phi_{0,\text{CPM}})) \quad (\text{Gleichung 5.7})$$

Die entsprechenden CD-Messwerte, die Regressionsfunktionen und die Abweichung der Werte von den Regressionsfunktionen sind in Abbildung 5.20a) für SPM und in Abbildung 5.20b) für DPM dargestellt. Für SPM besteht der erwartete linearer Zusammenhang zwischen β und ϕ_0 mit einer Steigung von 1 (Abbildung 5.18c). Für DPM wird ein Anstieg von etwa -0.07 beobachtet. Die Abweichung ist darauf zurückzuführen, dass neben dem Kompensator auch die anderen optischen Elemente statische Doppelbrechung aufweisen, diese Doppelbrechung durch Abzug der Basislinie eventuell nicht vollständig kompensiert wurde. Diese Doppelbrechung dominiert das CD-Signal sogar bei Kompensatorwinkeln von -45 und $+45^\circ$ und führt auch zu den systematischen Abweichungen der Messwerte von den Regressionsfunktionen, die im Bereich von $\pm 1 \cdot 10^{-4}$ liegen. Lineare Doppelbrechung in Polarisationsrichtung des Polarisators angeordnet zwischen PEM und Probe führt dazu, dass zirkular polarisiertes Licht anteilig in linear polarisiertes Licht umgewandelt und entsprechend anteilig Lineardichroismus anstelle von Zirkulardichroismus gemessen wird. Dies sollte bei orientierten Proben berücksichtigt werden um nicht Linear- als Zirkulardichroismus zu interpretieren wie z. B. im Artikel von Adachi *et al.* (2007). Dieser Effekt ist unabhängig von der Wirkung des Photomultipliers als partieller Polarisator. Soll das CD-Signal geordneter Proben gemessen werden, sollte daher keine entsprechende lineare Doppelbrechung vorliegen. Die Auswertung entsprechender Messungen wurde beispielsweise von Kuball *et al.* (2005) beschrieben.

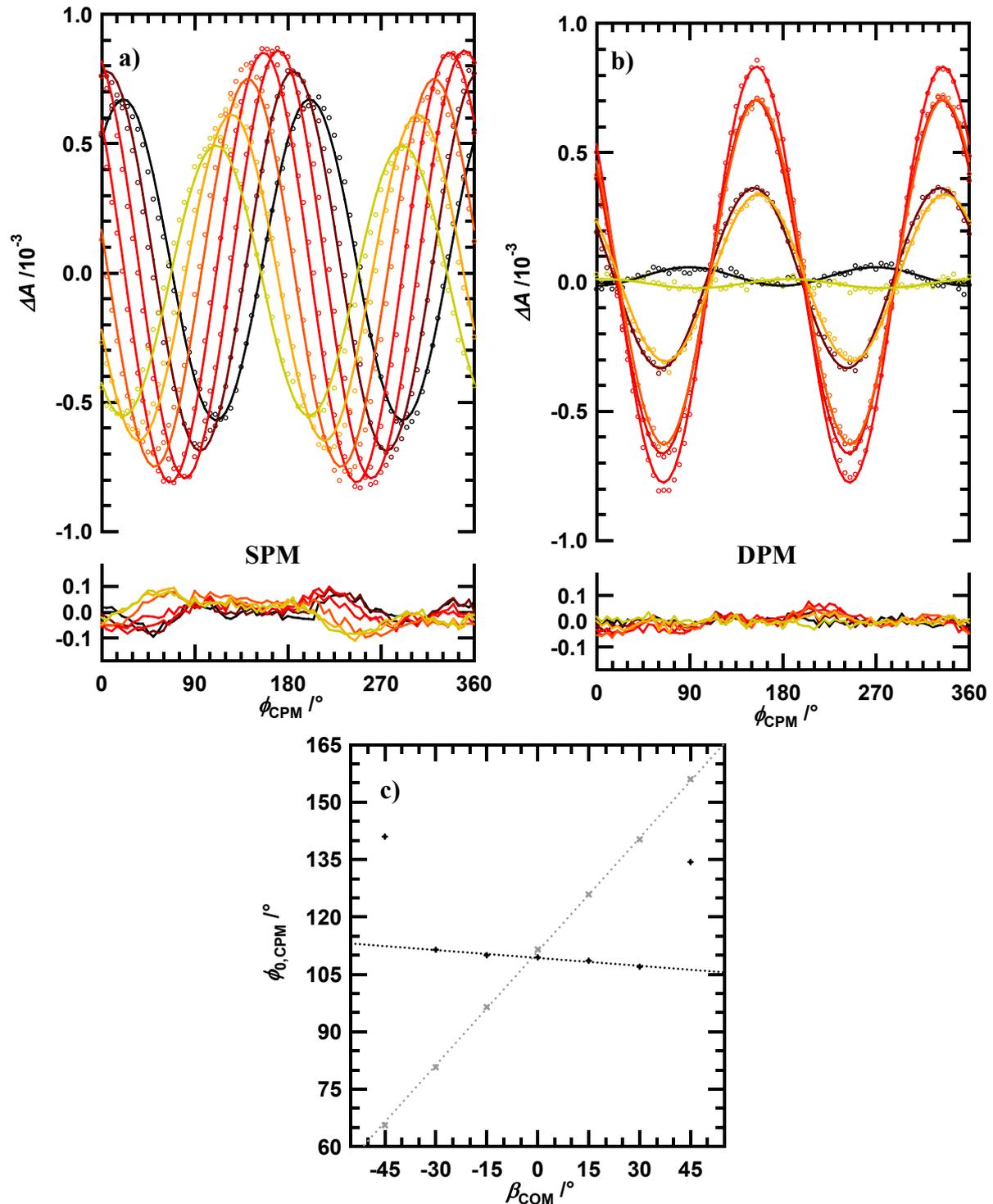


Abbildung 5.20 – Bestimmung eines geeigneten Photomultiplierwinkels

Zur Bestimmung eines geeigneten Photomultiplierwinkels ϕ_{CPM} wurde der Einfluss eines Kompensators auf das CD-Signal bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen. Der Kompensator wurde dazu hinter dem ersten PEM, mit einem Drehwinkel β_{COM} relativ zur Ebene des linear polarisierten Lichts nach dem Polarisator platziert.

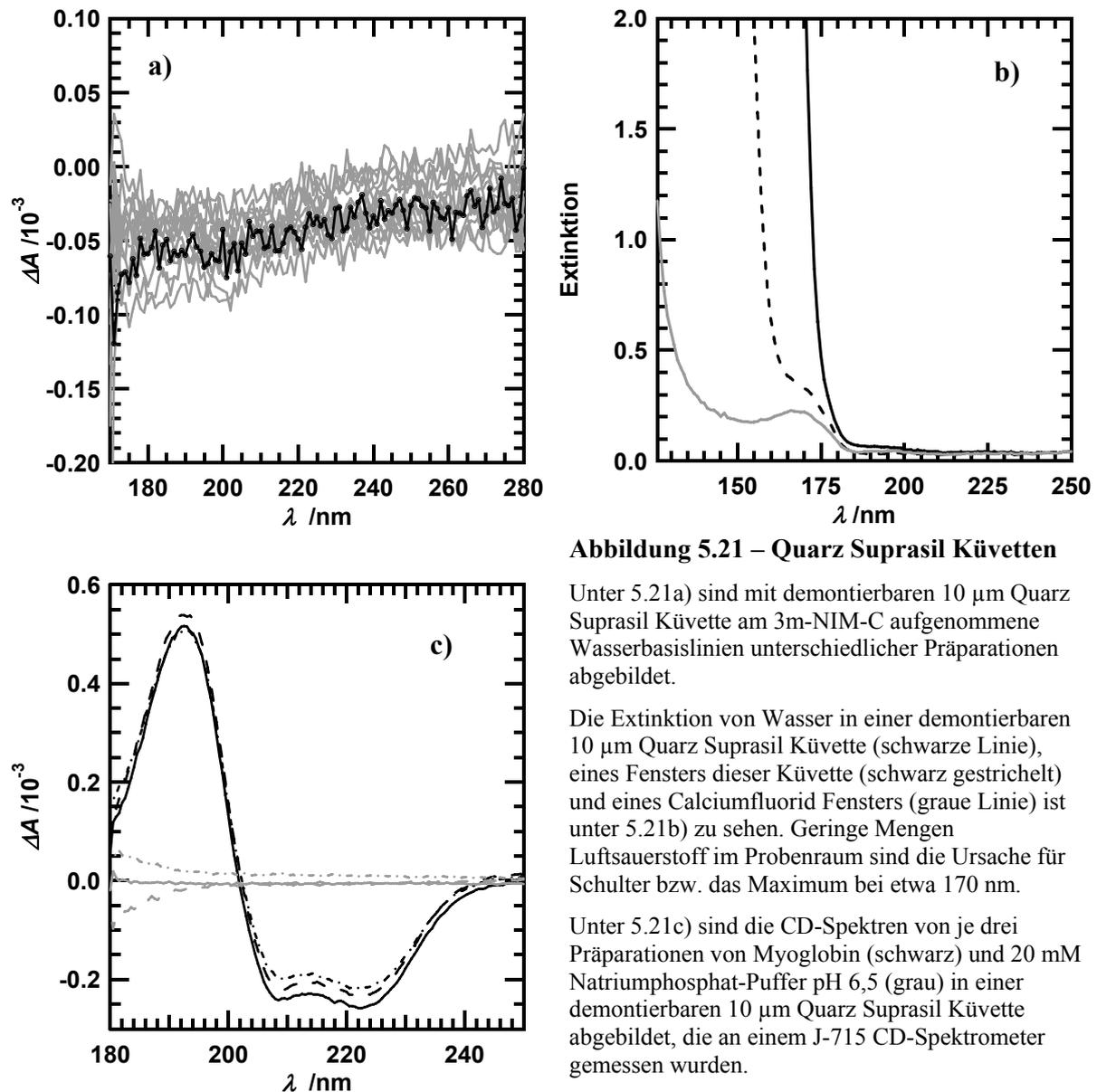
Das mit einer entsprechenden Basislinie (Abb. 5.16) korrigierte CD-Signal ist für SPM unter 5.20a) und für DPM unter 5.20b) mit Kreissymbolen dargestellt. Die Messwerte wurden mit Gleichung 5.5 entsprechenden Regressionsgleichungen beschrieben. Die Abweichung im unteren Teil der Abbildungen dargestellt.

Die Werte für $\phi_{0,\text{CPM}}$ sind unter 3.18c) gegen β_{COM} dargestellt. Die grauen Symbole stehen dabei für den SPM-Aufbau die schwarzen Symbole für den DPM-Aufbau. Bei den gepunkteten Linien handelt es sich um Geraden, die die beobachtete Abhängigkeit vom Drehwinkel des Kompensators beschreiben.

5.4 Eigenschaften der verwendeten Messzellen

5.4.1 Quarz-Suprasil-Küvetten (Hellma)

Die vom Hersteller polarimetrisch vermessenen Quarz-Suprasil-Küvetten zeigten nur ein geringes CD-Signal (Abbildung 5.21a). Die Unterschiede zwischen verschiedenen Präparationen am 3m-NIM-C liegen ungefähr in der Größenordnung, wie die der Basislinie selbst (siehe Abbildung 5.17a).



Bei einer Pfadlänge von 10 μm sind am 3m-NIM-C mit wässrigen Lösungen Messungen im Wellenlängenbereich unter 170 nm nicht möglich, da die Extinktion von Wasser schon bei etwa zwei liegt. Sollte die chirale Probe selbst auch eine Extinktion von etwa eins aufweisen, ist der Photonenfluss schon auf die Größenordnung des Falschlichts reduziert. Mit Quarzküvetten ist der Wellenlängenbereich unter 160 nm nicht zugänglich, da die Quarz selbst in diesem Wellenlängenbereich absorbiert. Die Extinktionswerte sind exemplarisch für eine mit Wasser gefüllte demontierbare Quarz-Suprasil-Küvette ($d = 10 \mu\text{m}$), ein Fenster dieser Küvette und ein Calciumfluorid-Fenster in Abbildung 5.21 b) zu sehen.

Bei der Verwendung demontierbarer Küvetten ist zu bedenken, dass Variationen in Pfadlänge und im CD-Signal zwischen verschiedenen Probenpräparationen auftreten können, wie in Abbildung 5.21c) zu sehen ist. Die Variationen im CD-Signal entstehen entweder durch auf die Präparation zurückzuführende Spannungsdoppelbrechung oder durch geringe Variationen im Neigungswinkel der Probenpräparation. Versuche mit Quarzküvetten geringerer Pfadlänge den Messbereich noch etwas auszudehnen, wurden nicht unternommen, da die Transparenz von Quarz stark von der Qualität abhängt. Küvetten aus CaF_2 hingegen sind bei geeigneter Pfadlänge noch Messungen bis 130 nm oder darüber hinaus möglich. Das Messsignal einzelner Quarz-Fenster und deren Drehwinkelabhängigkeit wurden nicht untersucht.

5.4.2 Calciumfluorid-Küvetten

Da im Fern-UV-Bereich die meisten Lösungsmittel das Licht stark absorbieren, ist es erforderlich, kleine Pfadlängen zu verwenden. Dazu kann die Probe zwischen zwei Fenstern ohne Abstandshalter platziert werden. Auf diese Weise können Pfadlängen von etwa 1 μm und kleiner erreicht werden.

Bei der Verwendung rechteckiger Calciumfluorid-Fenster der Firma Hellma wurde festgestellt, dass diese im Wellenlängenbereich unterhalb von 190 nm zum Teil ein Messsignal von $5 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ und unterhalb von 150 nm ein Messsignal von bis zu $6 \cdot 10^{-4}$ zeigten (Abbildung 5.22). Ursachen dafür sind die in den Fenstern vorhandene Spannungsdoppelbrechung, die scheinbar ähnlich der intrinsischen Doppelbrechung von Calciumfluorid (Burnett *et al.* 2001) von der Orientierung der Fenster zum Lichtstrahl abhängt.

Bei den rechteckigen Calciumfluoridfenstern der Firma Korth wurde die optimale Orientierung bei der Herstellung berücksichtigt, um die Spannungsdoppelbrechung zu reduzieren. Diese Fenster wiesen jedoch eine geringere Bruchfestigkeit auf, so dass sie aufgrund der Druckausübung für Probenpräparationen mit geringer Schichtdicke einen hohen Verschleiß aufwiesen.

Die runden Calciumfluoridfenster der Firma Korth sollten eine freie Wahl des Drehwinkels ermöglichen, hatten die optimale Orientierung des Kristallgitters zum Strahl und waren aufgrund der größeren Fensterstärke ausreichend bruchfest.

Durch Messung bei einem festen Winkel muss Spannungsdoppelbrechung in den Fenstern nicht festgestellt werden, da der Einfluss auf das Messsignal vom Drehwinkel abhängt. Um die Qualität der Fenster einschätzen zu können, muss daher eine vom Drehwinkel abhängige Untersuchung durchgeführt werden. Nur so kann die Größe der Spannungsdoppelbrechung richtig eingeschätzt werden.

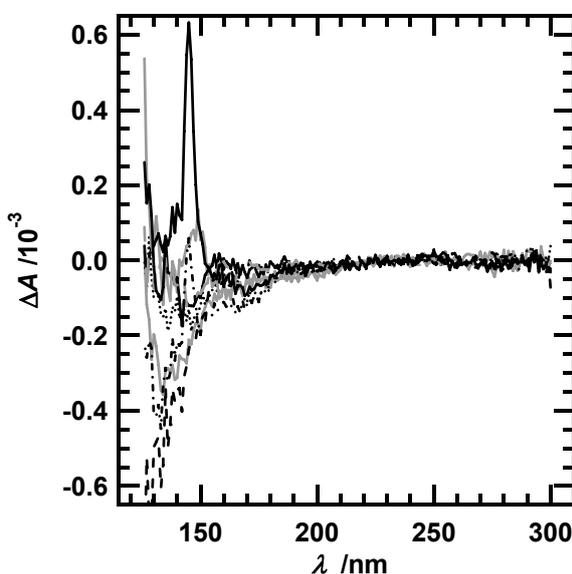


Abbildung 5.22 – Calciumfluorid-Fenster

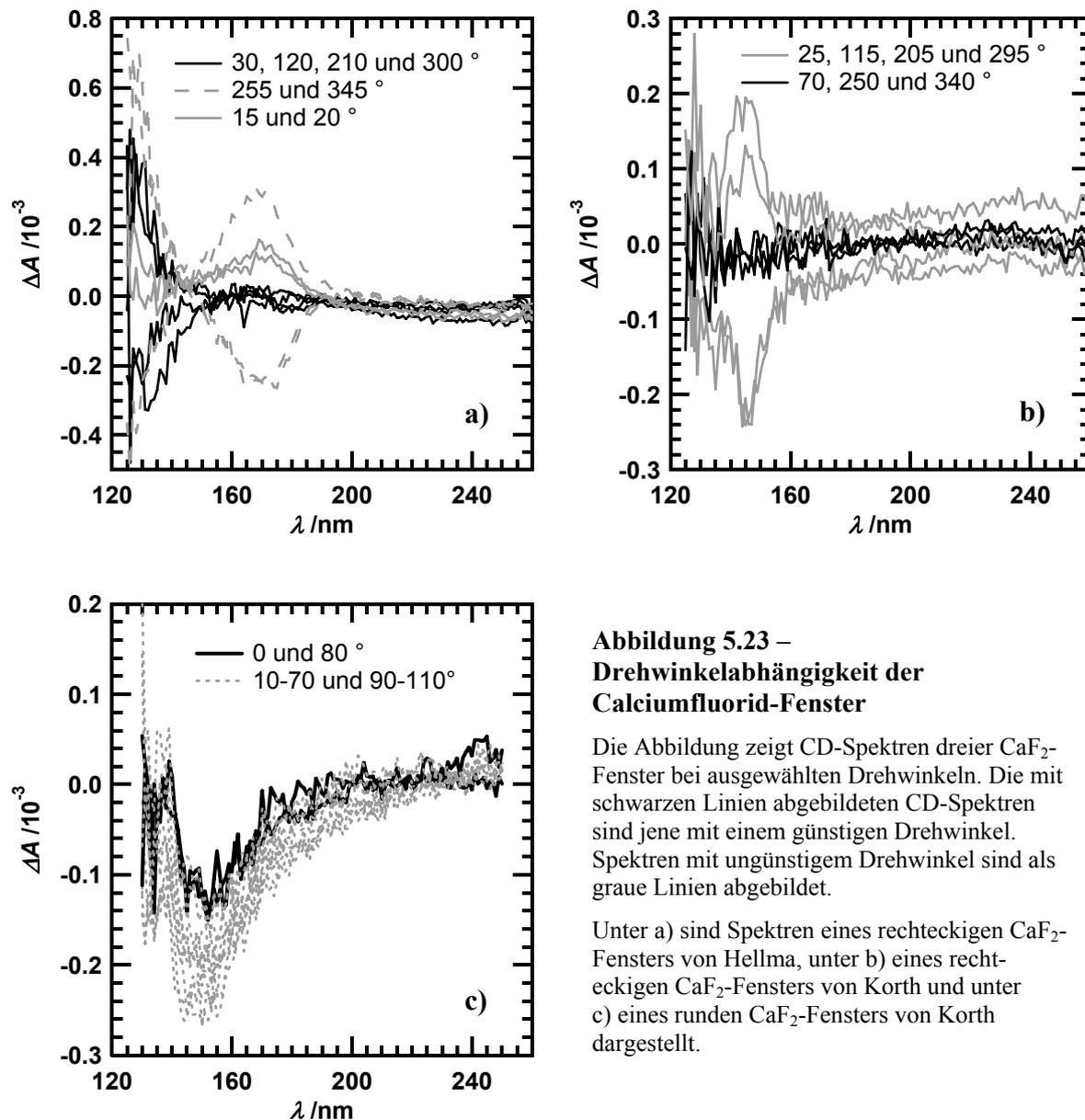
Messwerte rechteckiger Calciumfluorid Fenster der Firma Hellma

5.4.2.1 Drehwinkelabhängigkeit des Messsignals von Calciumfluoridfenstern

Um die verschiedenen Calciumfluoridfenster miteinander zu vergleichen, wurde exemplarisch die Drehwinkelabhängigkeit untersucht, indem im SPM-Aufbau bei verschiedenen Fenster-Drehwinkeln Spektren gemessen wurden. Die Auswertung der Drehwinkelabhängigkeit des CD-Signals erfolgte über folgende Gleichung 5.8, bei der ΔA_{\max} die Amplitude des vom Drehwinkel β abhängigen CD-Signals, β_0 ein optimaler Drehwinkel und ΔA_0 der drehwinkelunabhängige Anteil des CD-Signals des Fensters bei der jeweiligen Wellenlänge ist.

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \cdot \sin(2(\beta - \beta_0)) + \Delta A_0 \quad (\text{Gleichung 5.8})$$

Die Drehwinkelabhängigkeit und die Ergebnisse der Regression sind im Anhang A6 - Abbildung A.4 dargestellt. In Abbildung 5.23 ist eine Auswahl der gemessenen Spektren abgebildet.



**Abbildung 5.23 –
Drehwinkelabhängigkeit der
Calciumfluorid-Fenster**

Die Abbildung zeigt CD-Spektren dreier CaF_2 -Fenster bei ausgewählten Drehwinkeln. Die mit schwarzen Linien abgebildeten CD-Spektren sind jene mit einem günstigen Drehwinkel. Spektren mit ungünstigem Drehwinkel sind als graue Linien abgebildet.

Unter a) sind Spektren eines rechteckigen CaF_2 -Fensters von Hellma, unter b) eines rechteckigen CaF_2 -Fensters von Korth und unter c) eines runden CaF_2 -Fensters von Korth dargestellt.

Das rechteckige Calciumfluorid-Fenster der Firma Hellma zeigte im CD-Signal ein lokales Maximum von ca. $2,5 \cdot 10^{-4}$ bei etwa 170 nm und ein auf ca. $6 \cdot 10^{-4}$ zunehmendes CD-Signal unterhalb von 150 nm. Eine Minimierung des CD-Signals über den gesamten Messbereich war nicht möglich, da sich vor und nach Nulldurchgang der optimale Drehwinkel unterschied (Abbildung 5.23a) und A.4a) bis c)). Das rechteckige Calciumfluorid-Fenster der Firma Korth zeigte im CD-Signal ein lokales Maximum von ca. $2 \cdot 10^{-4}$ bei etwa 145 nm, eine Minimierung des CD-Signals über den gesamten Messbereich durch Wahl eines geeigneten Drehwinkels war möglich (Abbildung 5.23b) und A.4d) bis f)). Beim den runden Calciumfluoridfenstern der Firma Korth wurde zwar ein CD-Signal festgestellt (Abbildung 5.23c) und A.4k) bis m)), die typische Drehwinkelabhängigkeit bestand jedoch nicht. Da dieses Einzelfenster im Halter nicht richtig fixiert war, kann eine Neigung dieses Fensters als Ursache für das artifizielle CD-Signal nicht ausgeschlossen werden.

Für runde CaF_2 -Küvetten wurde immer ein Winkel mit kleinem Messsignal gesucht und die Küvetten entsprechend markiert, um diese reproduzierbar im Küvettenhalter positionieren zu können.

5.4.2.2 Neigungswinkelabhängigkeit des Messsignals von Calciumfluoridfenstern

Im Idealfall fällt das eingestrahelte Licht senkrecht auf die Fenster. Bei rechteckigen Calciumfluoridfenstern sowie bei den demontierbaren Quarz-Suprasil-Küvetten halte ich eine Abweichung von $\pm 0,5^\circ$ für realistisch. Um mögliche Auswirkungen auf das CD-Signal zu untersuchen, wurden rechteckige Calciumfluoridfenster unter größeren bestimmbareren Neigungswinkeln (γ) eingesetzt.

Unter Abbildung 5.24a) sind die CD-Spektren eines Fensters mit und ohne einen Lysozymfilm bei verschiedenen Neigungswinkeln abgebildet. Die gemessenen CD-Spektren zeigen dabei eine mit dem Neigungswinkel zunehmende Abweichung. Zieht man von den CD-Spektren des Lysozymfilms die Spektren des Calciumfluoridfensters mit gleichem Neigungswinkel ab, so zeigt sich dass der Zirkulardichroismus des Proteinfilms und die Doppelbrechung des geneigten Calciumfluoridfensters nicht additiv sind, da die so korrigierte CD-Spektren mit zunehmenden Neigungswinkel größer werdende Abweichungen zeigen (Abbildung 5.24b)). Der Proteinfilm befand sich auf der dem Strahl zugewandten Seite des Calciumfluoridfensters. Befindet sich der Proteinfilm auf der dem Strahl abgewandten Seite des Fensters ist eine sich davon unterscheidende Abweichung möglich, da eine Positionsabhängigkeit besteht (O'Handley 1973, Shindo und Nakagawa 1985). Die Neigung führt auch zu einer Erhöhung der Schichtdicke des Proteinfilms, wie die Extinktionswerte in Abbildung 5.24c) zeigen. Die Abweichung des CD-Signals mit zunehmenden Neigungswinkel lässt sich näherungsweise mit einem Polynom 2. Ordnung beschreiben, wie im in Abbildung 5.24d) eingefügten Diagramm für das CD-Signal bei 180 nm gezeigt ist. Verwendet man diesen Zusammenhang zur Berechnung der Abweichung bei einen kleinen Neigungswinkel, so erhält man für $0,5^\circ$ die in Abbildung 5.24d) gezeigte Abweichung. Da die Neigungswinkel nur auf von $\pm 1^\circ$ genau berechnet werden konnten und bei kleinen Neigungswinkeln keine Punkte außer dem „Nullpunkt“ vorliegen, könnte auch ein anderer mathematischer Zusammenhang zwischen Neigungswinkel und Messsignal bestehen. Die abgebildete Abweichung soll daher nur zur Orientierung dienen, in welcher Größenordnung der Einfluss des Neigungswinkels auf das CD-Signal wahrscheinlich liegt. Es ist möglich, dass sich Vorzeichen und Amplitude von Fenster zu Fenster unterscheiden.

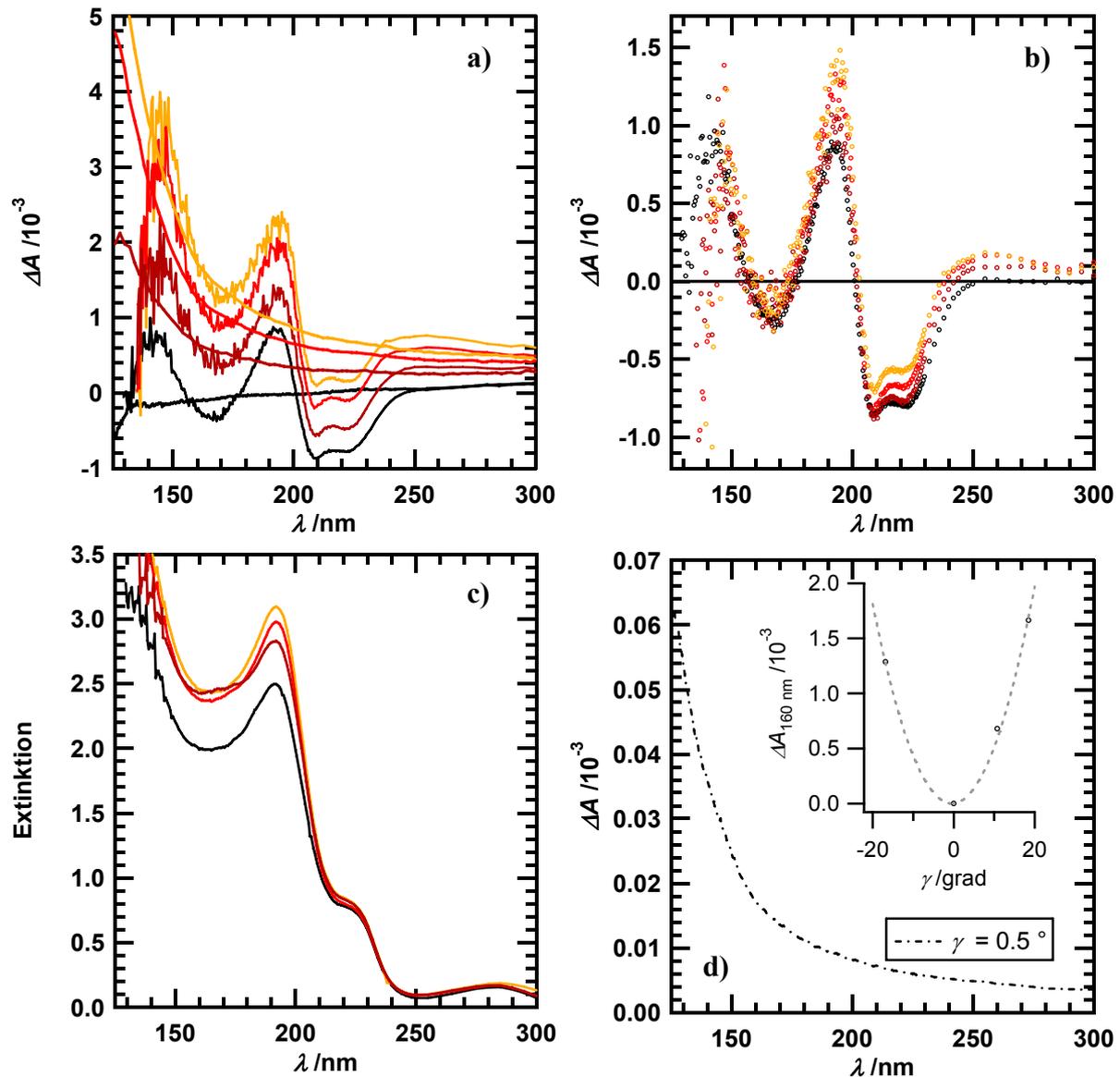


Abbildung 5.24 – Neigungswinkelabhängigkeit der Calciumfluorid-Fenster

Unter a) sind CD-Spektren eines CaF_2 -Fensters bei verschiedenen Neigungswinkeln γ (schwarz 0° ; braun $10,8^\circ$; rot $-16,8^\circ$ und orange $18,6^\circ$) mit und ohne Proteinfilm aus Lysozym abgebildet. Unter b) sind die, mit dem dem Neigungswinkel entsprechenden CD-Spektrum der Fenster korrigierten Spektren des Proteinfilms abgebildet. Unter c) sind dazugehörigen Extinktionswerte abgebildet. Unter d) ist die für einen Neigungswinkel von $0,5^\circ$ berechnete Abweichung gezeigt, unter der Annahme das eine Beschreibung der Neigungswinkelabhängigkeit mit einer Normalparabel zulässig ist (siehe Insert).

5.4.2.3 Basislinien von mit Wasser präparierter Proben mit kleiner Pfadlänge

Bei Messungen mit Wasser präparierter Proben mit kleiner Pfadlänge wurden über die Schwankungen der Gerätebasislinie hinausgehende Variationen des Messsignals festgestellt, die deutlich über den Variationen für demontierbare Küvetten liegen (5.21a)). Für ein Paar der runden Calciumfluoridfenster der Firma Korth sind diese Variationen in Abbildung 5.25a) dargestellt. Die Orientierung der Fenster war einheitlich. Die Variation des Drehwinkels lag innerhalb von 5° und kann als Ursache ausgeschlossen werden, da die CaF_2 -Fenster selbst zwischen 200 und 260 nm keine von Null abweichende Basislinie zeigten. Die Variationen des Messsignals sind entweder auf die Präparation zurückzuführende zusätzliche

Spannungsdoppelbrechung zurückzuführen oder die Präparationen weisen häufiger als erwartet Neigungswinkel von deutlich über $0,5^\circ$ auf. Eine Verschiebung der Spektren wird beispielsweise von (Miles und Wallace 2006) als Möglichkeit beschrieben, solche Abweichungen auszugleichen.

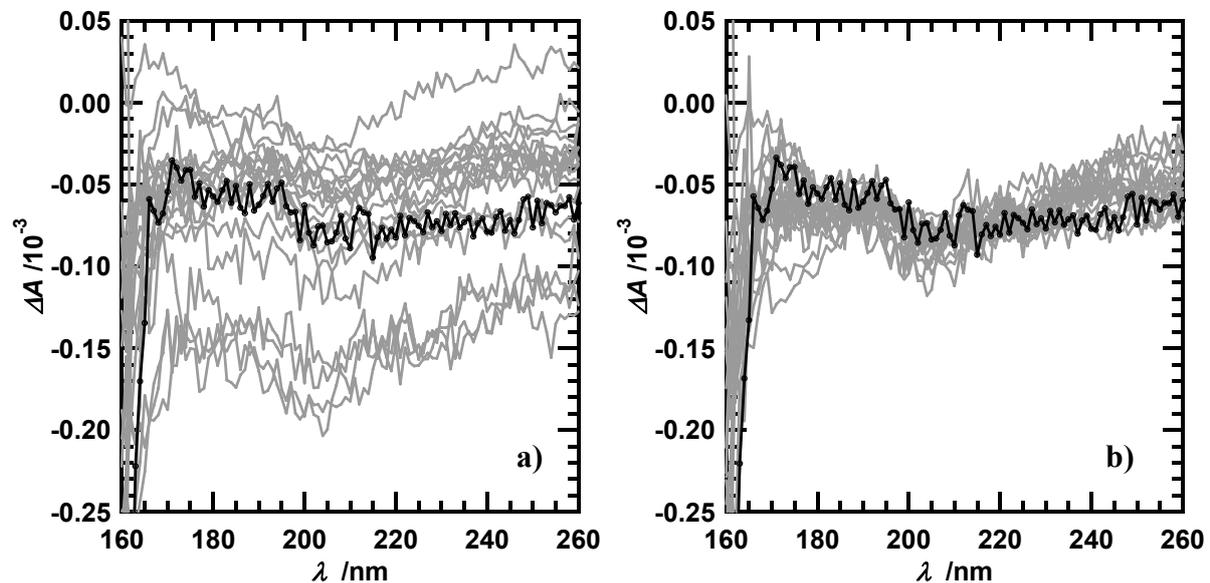


Abbildung 5.25 – Basislinien von mit Wasser präparierter Proben mit kleiner Pfadlänge

Unter 5.25a) sind mit dem Standardaufbau (SPM) gemessene Wasserbasislinien abgebildet, die mit einem Paar von CaF_2 -Fentern von Korth gemessen wurden. Unter b) die gleichen Basislinien nach Verschiebung.

Für die hier gezeigten Wasserbasislinien (Abbildung 5.25a)) liegen nach Subtraktion der mittleren Abweichung die Spektren so nah beieinander (Abbildung 5.25b)), dass die Standardabweichung der Wasserspektren in der gleichen Größenordnung wie die Standardabweichung der Gerätebasislinie liegt.

5.4.2.4 Basislinien mit DPM-Aufbau

Durch einen zweiten photoelastischen Modulator zwischen der Probenzelle und dem Photomultiplier (DPM-Aufbau) kann der Einfluss von linearer Doppelbrechung der Probenzelle auf das Messsignal deutlich reduziert werden. Dazu muss der Photomultiplier so gedreht werden, dass das durch lineare

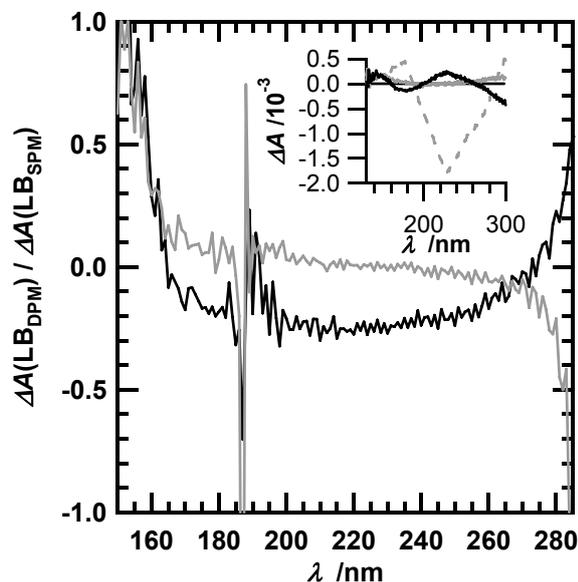


Abbildung 5.26 – Reduktion des Einflusses linearer Doppelbrechung auf das Messsignal

Am 3m-NIM-C konnte der Einfluss linearer Doppelbrechung auf das Messsignal mit dem DPM-Aufbau durch Drehen des Photomultipliers bei 260 nm über einen großen Wellenlängenbereich auf etwa 20 % reduziert werden (schwarze Linie). Durch das Drehen bei 230 nm konnte eine Reduzierung auf unter 10 % erreicht werden (graue Linie).

Im eingefügten Diagramm ist das Messsignal mit Kompensator im SPM-Aufbau (graue gestrichelte Linie), im DPM-Aufbau nach Einstellen des Photomultipliertrehwinkels bei 260 nm (schwarze Linie) und nach Einstellen des Photomultipliertrehwinkels bei 230 nm (graue durchgezogene Linie) abgebildet.

Doppelbrechung erzeugte Messsignal minimal ist (Abbildung 5.26). Wie auch im Standardaufbau (SPM) kann die Gerätebasislinie im DPM-Aufbau von Messung zu Messung variieren (Abbildung 5.27a)). Die aus den Messungen berechnete Standardabweichung ist größer als der Fehler der einzelnen Messpunkte (Abbildung 5.27b)), das heißt es liegen systematische Schwankungen der Gerätebasislinie vor, die durch eine Erhöhung der Messzeit nicht reduziert werden können.

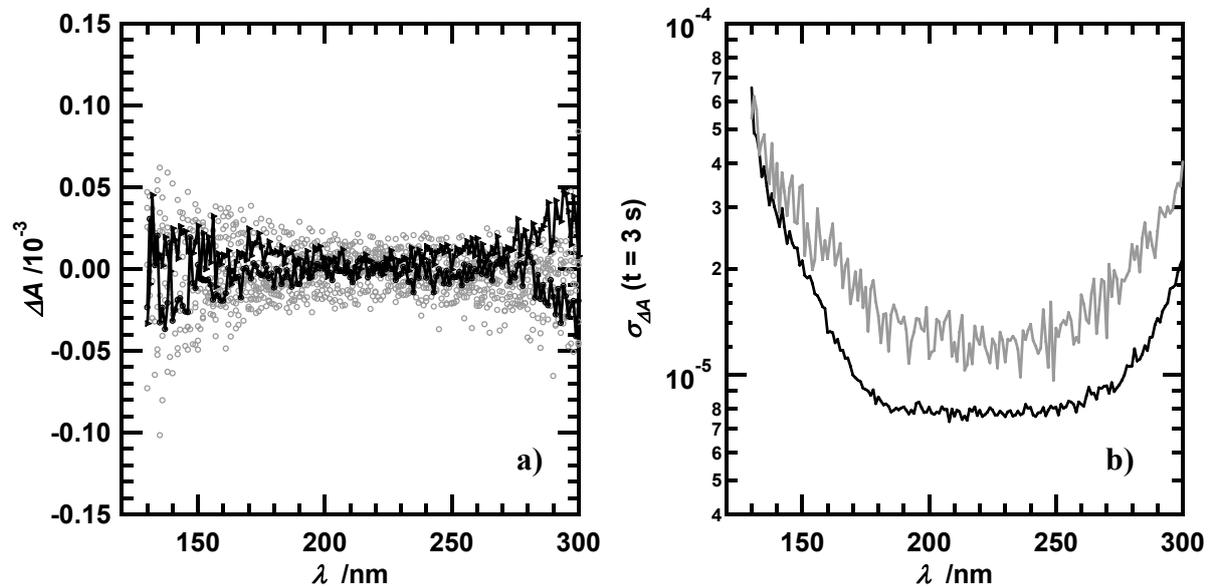


Abbildung 5.27 – Gerätebasislinien des DPM-Aufbaus

Unter 5.27a) sind mit dem DPM-Aufbau am 3m-NIM-C gemessene Gerätebasislinien (graue Kreise) abgebildet. Für zwei der Basislinien wurden die Messpunkte mit schwarzen Symbolen (Kreis & Dreieck) mit Linien verbunden dargestellt. Unter 5.27 b) ist die Standardabweichung der Basislinien (graue Linie) und der mittlere statistische Fehler der einzelnen Messpunkte abgebildet.

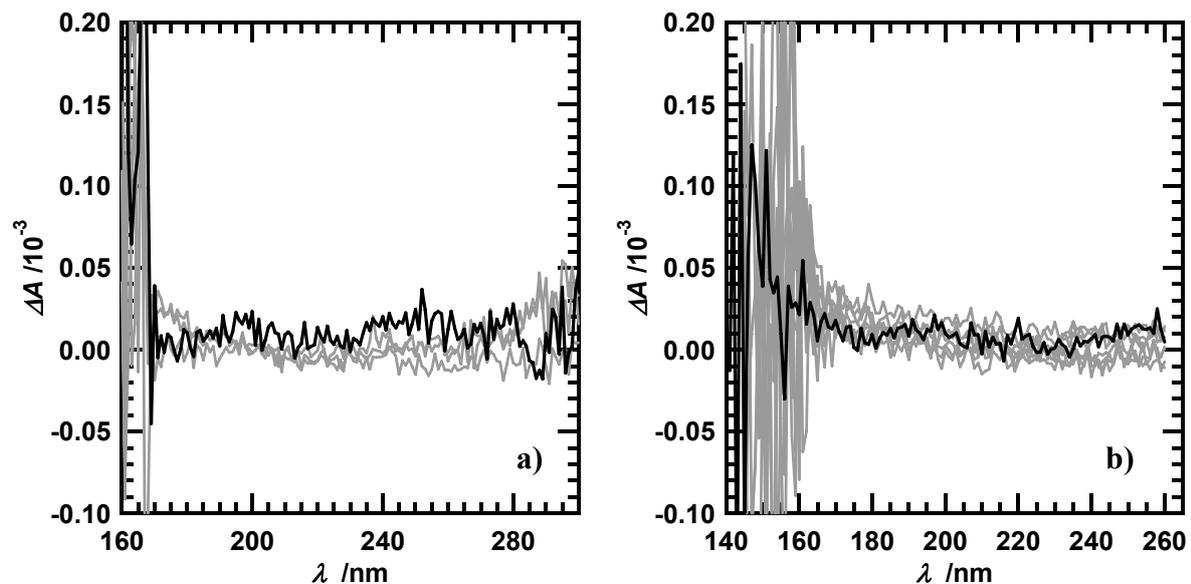


Abbildung 5.28 – Gerätebasislinien des DPM-Aufbaus

Unter 5.28a) sind mit dem DPM-Aufbau am 3m-NIM-C mit eine 4,2 μm -Küvette von HellmaOptik gemessene Wasserbasislinien (graue Linien) abgebildet. Unter 5.28 b) sind mit dem DPM-Aufbau am 3m-NIM-C mit einem Fensterpaar von Korth gemessene Wasserbasislinien (graue Linien) mit kleiner Pfadlänge abgebildet. Jeweils eine der Linien wurde schwarz hervorgehoben.

Einige Wasserbasislinien von einer demontierbaren Küvette von HellmaOptik sind in Abbildung 5.28a) dargestellt. Wasserbasislinien von durch Zusammendrücken eines Paares von CaF_2 -Fenstern erzeugten Wasserproben sind in Abbildung 5.28b) dargestellt. Die Variationen liegen bis etwa 165 nm in derselben Größenordnung wie die der Gerätebasislinie (Abbildung 5.27). Unterhalb von 165 nm nimmt der statistische Fehler aufgrund der Wasserabsorption zu, da hier deutlich weniger Licht den Photomultiplier erreicht. Für Extinktionswerte über zwei muss mit systematischen Fehlern durch Falschlicht gerechnet werden. In Abbildung 5.29 sind die Extinktionswerte zu den In Abbildung 5.28 dargestellten Wasserbasislinien zu sehen.

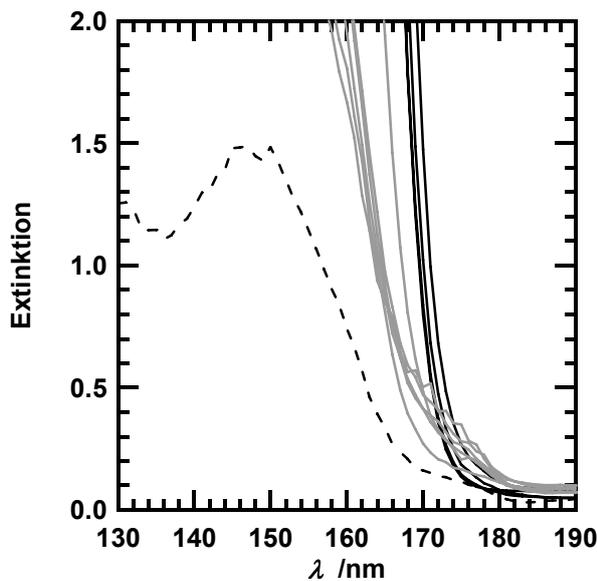


Abbildung 5.29 – Extinktion der Wasserbasislinien

Die Extinktionswerte der mit dem DPM-Aufbau am 3m-NIM-C mit eine $4,2 \mu\text{m}$ -Küvette von HellmaOptik gemessene Wasserbasislinien sind als schwarze durchgezogene Linien abgebildet.

Die Extinktionswerte der mit dem DPM-Aufbau am 3m-NIM-C gemessenen, durch zusammendrücken eines Wassertropfens zwischen zwei CaF_2 -Fenstern von Korth präparierten Wasserproben sind als graue Linie dargestellt.

Die Extinktionswerte der Messung, die in Abbildung 5.28b) als schwarze Linie zu sehen ist, sind hier als schwarze gestrichelte Linie abgebildet.

5.5 Stopped-Flow-Messungen am SRCD-Messplatz

In den Messaufbau wurde ein Stopped-Flow-Experiment (Applied Photophysics) integriert und am BESSY am Messplatz 3m-NIM-C getestet. Zum Test wurde die Rückfaltung von in 6 M Guanidiniumchlorid-Lösung entfaltetem Lysozym verfolgt, da dieser Prozess schon untersucht worden ist (Chaffotte *et al.* 1992, Radford *et al.* 1992, Hooke *et al.* 1994) und Lysozym in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand. Das Signal-Rausch-Verhältnis am SRCD-Messplatz war um mehr als eine Größenordnung schlechter als ein einem π^* -180 Stopped-Flow-CD-Instrument. Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung lagen in der gleichen Größenordnung. Eine Totzeitamplitude, wie sie von Chaffotte *et al.* (1992) beschrieben wurde und am π^* -180 Stopped-Flow-CD-Instrument zu sehen ist, konnte am SRCD-Messplatz nicht beobachtet werden (Abbildung 5.30a)). Die Ursache dafür wurden nicht untersucht, da an den beiden für das SRCD-Experiment am BESSY zu Verfügung stehenden Strahlrohren der Photonenfluss deutlich unter dem eines kommerziellen Stopped-Flow-CD-Instruments liegt. Mit dem geringen Photonenfluss sind Stopped-Flow-CD-Messungen am BESSY nicht sinnvoll. Aufgrund der Pfadlängen der Stopped-Flow-Zelle ist eine Erweiterung des Messbereichs gegenüber konventionellen Stopped-Flow-CD nicht möglich, so dass ein entsprechendes Experiment höchstens von einem höheren Photonenfluss profitieren könnte.

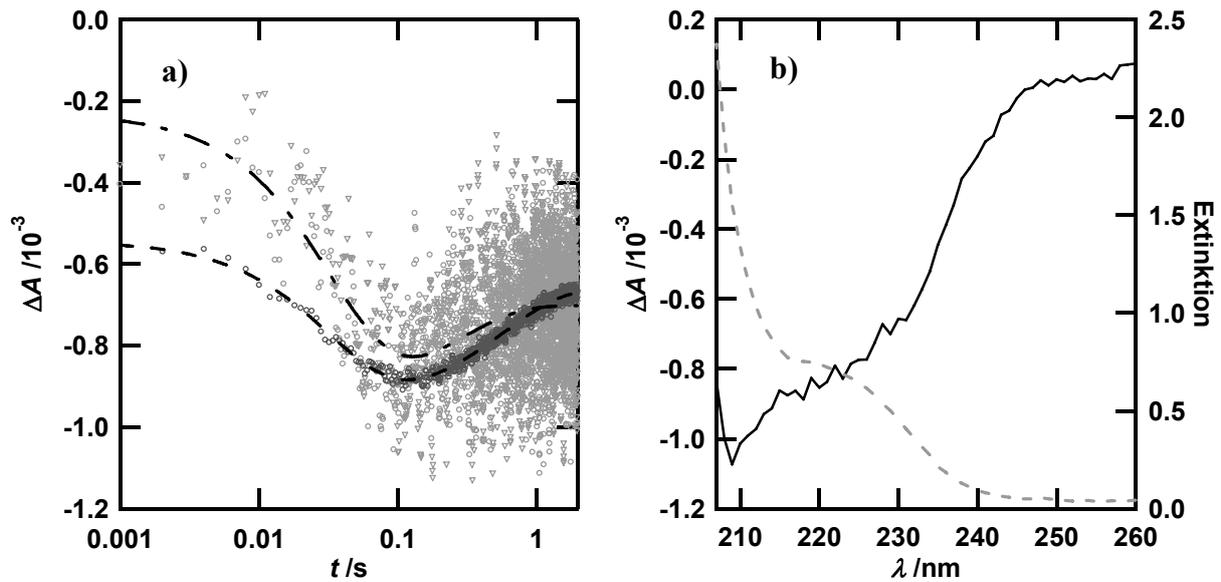


Abbildung 5.30 – Stopped-Flow-Messungen an einem SRCD-Messplatz

Unter a) sind die Mittelwerte von jeweils acht Stopped-Flow-Läufen als Symbole dargestellt, die die Rückfaltung von Lysozym aus 6 M Guanidiniumchlorid zeigen. Die dunkelgrauen Symbole zeigen die an einem π^* -180 Stopped-Flow-CD-Instrument ermittelten Werte, hellgraue Symbole zeigen die am BESSY am 3m-NIM-C ermittelten Werte. Im Stopped-Flow-Experiment wurde eine 0,25 ml Spritze mit einer LysozymbLösung mit einer Konzentration von 2,2 bzw. 4,5 mg/ml in 20 mM Natriumphosphatpuffer, 6 M Guanidiniumchlorid pH 6,9 und eine 2,5 ml Spritze mit 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,9 eingesetzt. Im π^* -180 CD-Stopped-Flow-Instrument wurde eine Messzelle mit einer Pfadlänge von 2 mm eingesetzt, die Messung erfolgte bei 225 nm mit einer spektralen Bandbreite von 4 nm. Am 3m-NIM-C hatte die Messzelle eine Pfadlänge von 1 mm und die Kinetik wurde bei 222 nm mit einer spektralen Bandbreite von etwa 1 nm aufgenommen. An die Mittelwerte wurde jeweils eine biexponentielle Funktion angepasst, die als schwarze gestrichelte Linie (π^* -180) bzw. als Punkt-Strich-Linie (3m-NIM-C) abgebildet ist.

Unter b) sind das CD-Spektrum (schwarze Linie) und die Extinktion (graue gestrichelte Linie) nach der Rückfaltung abgebildet. Die Messzeit betrug 3s pro Punkt.

6 CD-spektroskopische Untersuchungen an Proteinen

6.1 Reinheit der Proteine

Da Verunreinigungen mit anderen Proteinen oder DNA das CD-Spektrum verfälschen können, wurde die Reinheit der Proteine mittels SDS-PAGE überprüft.

6.1.1 Met-Myoglobin

Im Met-Myoglobin von Calbiochem waren mehrere geringfügige Verunreinigungen enthalten. Die Reinheit des Proteins lag über 95 %. Durch Größenausschlusschromatographie (SEC) mit einer Superdex 75 *prep grade* konnten ein Großteil der Verunreinigungen entfernt werden. Das Chromatogramm sowie ein Bild der dazugehörigen SDS-PAGE sind unter Abbildung 6.1a dargestellt. Nach dem Chromatographieschritt lag die Reinheit über 99 %.

6.1.2 Lysozym

Das Lysozym aus Hühnereiweiß von SERVA enthielt eine geringfügige Verunreinigung von unter 1 %, die durch Größenausschlusschromatographie entfernt werden konnte (Abbildung 6.1b)). Im Lysozym von Sigma-Aldrich konnten keine Verunreinigungen festgestellt werden.

6.1.3 Concanavalin A

Concanavalin A ist ein Lectin mit zwei Bindestellen für zweiwertige Metallionen. Die Bindung von Kohlenhydraten durch Concanavalin A wird durch die reversible Bindung von Mn^{2+} und Ca^{2+} ermöglicht. Die Bindung der Metallionen geht mit der trans zu cis Isomerisierung der Peptidbindung zwischen Ala207 und Asp208 einher (Bouckaert *et al.* 2000). Bei einem Affinitätschromatographielauf mit einer Sephadex G100-Säule in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 wurden nur etwa 30% des Proteins von Sigma-Aldrich auf der Säule gebunden. Nach Zusatz von 1 mM $CaCl_2$ und 1 mM $MgCl_2$ konnte der Anteil gebundenen Proteins auf über 95% gesteigert werden. Die Affinitätssäule wurde mit 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 / 150 mM NaCl gewaschen und das Protein mit 1 M Glucose in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 / 150 mM NaCl eluiert und fraktioniert aufgefangen. Im SDS-Polyacrylamid-Gel (Abbildung 6.1c) sind neben der Bande von Concanavalin A zwei weitere Banden zu sehen, die einen nicht zu vernachlässigenden Anteil am Gesamtprotein ausmachen und die auf nicht vollständig prozessiertes Concanavalin A zurückzuführen sind, bei dem die Peptidbindung zwischen den beiden Vorläuferpeptiden noch nicht ausgebildet ist (Carrington *et al.* 1985). Der Anteil weiterer Banden lag unter 1 %.

6.1.4 Chymotrypsinogen

Das Chymotrypsinogen von Sigma-Aldrich enthält schon etwas Chymotrypsin und in verdünnter Lösung tritt eine weitere Konvertierung von Chymotrypsinogen zu Chymotrypsin auf. Bei einer Lösung von etwa 10 mg ml⁻¹ Protein in 20 mM Phosphatpuffer pH 7 wird innerhalb von zwei Tagen ein großer Teil des Chymotrypsinogens zu α -Chymotrypsin aktiviert. Dies führt zu einer deutlichen Änderung des CD-Spektrums (Abbildung 6.1d).

6.1.5 Peptide

Das Peptide A2 und FBP28-D15N WW-Domäne wurden mit in reiner Form zur Verfügung gestellt.

6.1.6 Kälteschockprotein CSP *T.m.*

Das Kälteschockprotein CSP *T.m.* wurde wie von (Welker *et al.* 1999) beschrieben gereinigt. Es wurden keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen festgestellt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Präparation noch Spuren von Oligonukleotiden enthält.

6.1.7 InlA496

InlA496 wurde als Gluthathion-S-Transferase-Internalin(32-496) Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* exprimiert und bis zu einer Reinheit von etwa 99% aufgereinigt (Lengefeld 2003).

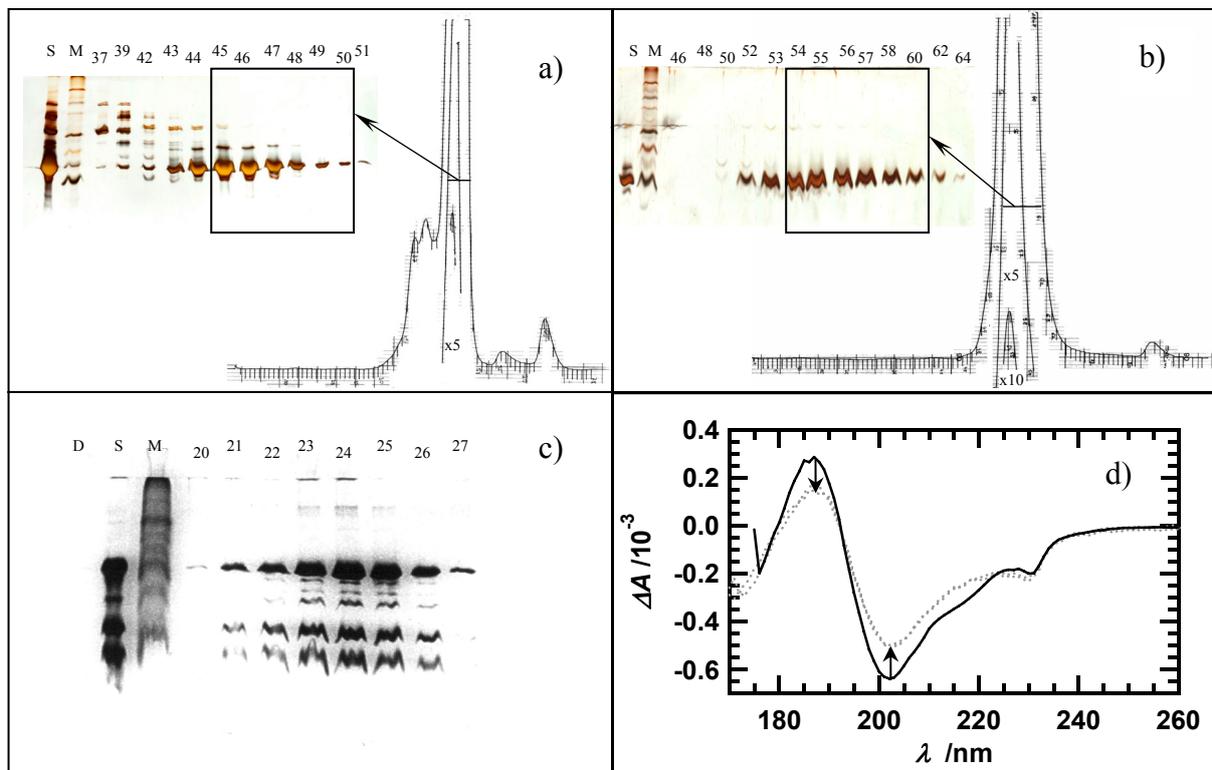


Abbildung 6.1 – Reinheit der Proteine

Unter a) und b) sind die Chromatogramme von Größenausschlusschromatographieläufen mit einer Superdex 75 *prep grade*, bei einem Auftragsvolumen von 0,7 ml einer Proteinlösung mit ca. 10 mg/ml, einer Laufgeschwindigkeit von 0,8 ml/min und 2 ml Fraktionsgröße für a) Met-Myoglobin und b) Lysozym von SERVA abgebildet. Als Laufpuffer wurde 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 150 mM NaCl pH 6,5 verwendet. Daneben sind die Gele von silbergefärbte SDS-PAGE (12,5%) abgebildet. Dabei steht (S) für die Lösung des lyophilisierten Proteins, (M) für den Molekularmassenmarker und die Nummern entsprechen der Faktionsnummern der Größenausschlusschromatographie. Die für die weitere Verwendung vereinigten Fraktionen sind eingerahmt und der entsprechende Bereich im Chromatogramm markiert.

Unter c) ist das silbergefärbte Gel einer SDS-PAGE (12,5%) des Affinitätschromatographielaufes mit Concanavalin A abgebildet. Dabei steht (D) für Durchlauf, (S) für die Lösung des lyophilisierten Proteins, (M) für den Molekularmassenmarker und die Nummern entsprechen der Faktionsnummern.

Unter d) ist das CD-Spektrum einer Lösung von etwa 10 mg ml^{-1} von Chymotrypsinogen von Sigma-Aldrich in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 nach Lösen des Proteins (durchgezogene Linie) sowie nach zwei Tagen (gepunktete Linie) abgebildet.

6.2 Absorption des Lösungsmittels

6.2.1 Wasserabsorption

Die Wasserabsorption ist der Faktor, der CD-Messungen zu kleineren Wellenlängen entscheidend begrenzt. Bis Mitte der 60er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts waren die optischen Eigenschaften von flüssigem Wasser nur bis zu einer Wellenlänge von etwa 170 nm bekannt. Ende der 60er Jahre wurden die ersten Daten zur Absorptionskante zwischen 170 und 125 nm veröffentlicht, die durch Messung von Transmission (Onaka und Takahashi 1968, Verrall und Senior 1969) und Reflexion (Painter *et al.* 1968) ermittelt wurden. Es folgten weitere Publikationen zu Transmissionsmessungen (Sowers *et al.* 1972) und Reflexionsmessungen (Kerr *et al.* 1972, Heller *et al.* 1974, Heller *et al.* 1977). In den Publikationen von Verrall und Senior (1969) und von Heller *et al.* (1977) befinden sich auch Vergleiche mit D₂O.

Die Ergebnisse unterscheiden sich untereinander bezüglich Höhe und Lage der Absorptionsmaxima zum Teil deutlich. Neuere Arbeiten mit unelastischer Lichtstreuung (Hayashi *et al.* 2000) liefern im für Transmissionsmessungen interessanten Bereich auch nicht genauere Absorptionswerte. Aus diesen Publikationen ergibt sich aber eine Pfadlänge von etwa 100 bis 300 nm, um Transmissionsmessungen im Bereich bis etwa 125 nm durchzuführen, der Einsatz von D₂O bringt hierbei kaum Vorteile, da das Maximum zwar leicht verschoben aber auch etwas größer ist. Bei Pfadlängen von mehr als einem Mikrometer kann man mit D₂O an Stelle von Wasser wenige Nanometer weiter zu kleineren Wellenlängen messen. In Abbildung 6.2 sind die Ergebnisse eigener Messungen zusammengefasst. Im Anhang A7 sind für Wasser die Extinktionswerte tabellarisch und in Abbildung mit linearer Ordinatenachse aufgeführt.

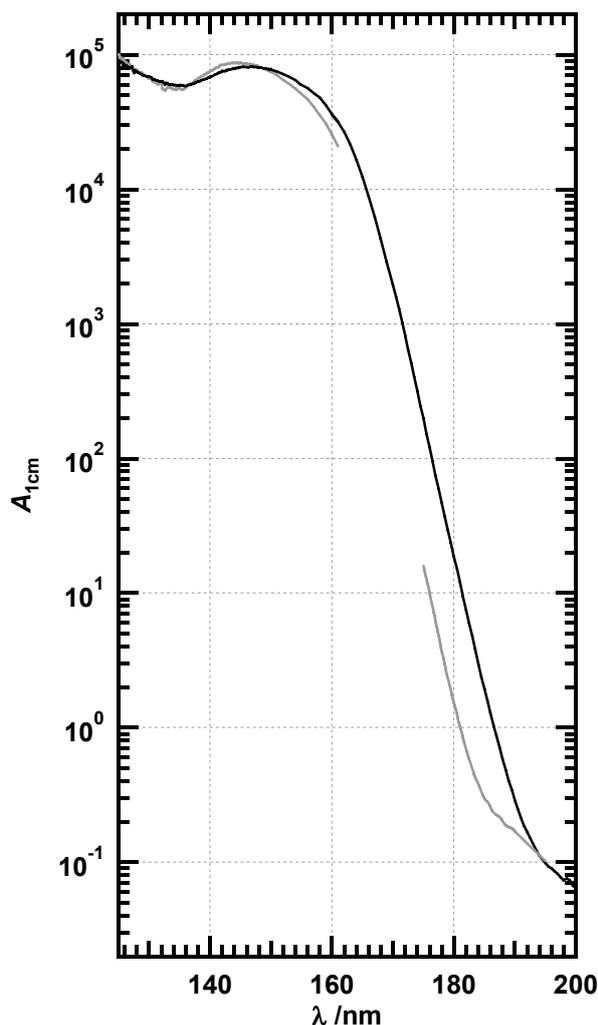


Abbildung 6.2 - Wasserabsorption

Die Absorption von Wasser (schwarze Linie) und Deuteriumoxid (graue Linie) für eine Pfadlänge von 1 cm wurde anhand von Messungen bei 1 cm, 5, 2 und 1 mm, 100 und 10 μ m sowie Messungen bei kleineren Pfadlängen berechnet. Da bei den kleineren Pfadlängen die genaue Schichtdicke nicht bekannt war, wurden diese durch Skalierung mit den Messungen bei bekannter Pfadlänge in Deckung gebracht. Da für über drei Größenordnungen keine Pfadlängeninformation vorlag könnte im Maximum eine systematische Abweichung von bis 50% vorliegen. Die Deuteriumoxidmessung bei kleiner Pfadlänge wurde anhand der Daten von Verrall und Senior (1969) und Heller *et al.* (1977) skaliert. Alle Daten unterhalb von 175 nm wurden an einem SRCD-Messplatz gemessen. Die Absorptionswerte wurden relativ zu einem Quarz-Suprasil- bzw. einem Calciumfluorid-Fenster gemessen.

In Abbildung 6.2 sind die Ergebnisse eigener Messungen zusammengefasst. Im Anhang A7 sind für Wasser die Extinktionswerte tabellarisch und in Abbildung mit linearer Ordinatenachse aufgeführt.

Wasser ist für die Struktur und Funktion von Proteinen in Kristallen und in Lösung von großer Bedeutung (Rupley und Careri 1991). Untersuchungen an Proteinfilmern mit IR- (Careri *et al.* 1979) und CD-Spektroskopie (Chirgadze und Ovsepyan 1972) zeigten strukturelle Änderungen in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit. In dieser Arbeit untersuchte Proteinfilmern sind im Kapitel 6.3 zu finden. Bei einigen Proteinen, die in Lösung keine geordnete Struktur aufweisen, bildet sich infolge des Austrocknens Sekundärstruktur aus (Tolleter *et al.* 2007). Werden organische Substanzen oder Salze zugesetzt, die die Hydrathülle von Proteinen und Peptiden verändern, so geht dies häufig mit strukturellen Änderungen einher. So können durch Zugabe von Trifluorethanol oder Natriumdodecylsulfat (Jirgensons 1978, Jirgensons 1980) zum Wasser, helikale Strukturen in Proteinen und Proteinfragmenten begünstigt werden. Konzentrierte Guanidiniumchlorid- und Harnstofflösungen stabilisieren Polypeptide im entfalteten Zustand.

6.2.2 Extinktion einiger Salzlösungen

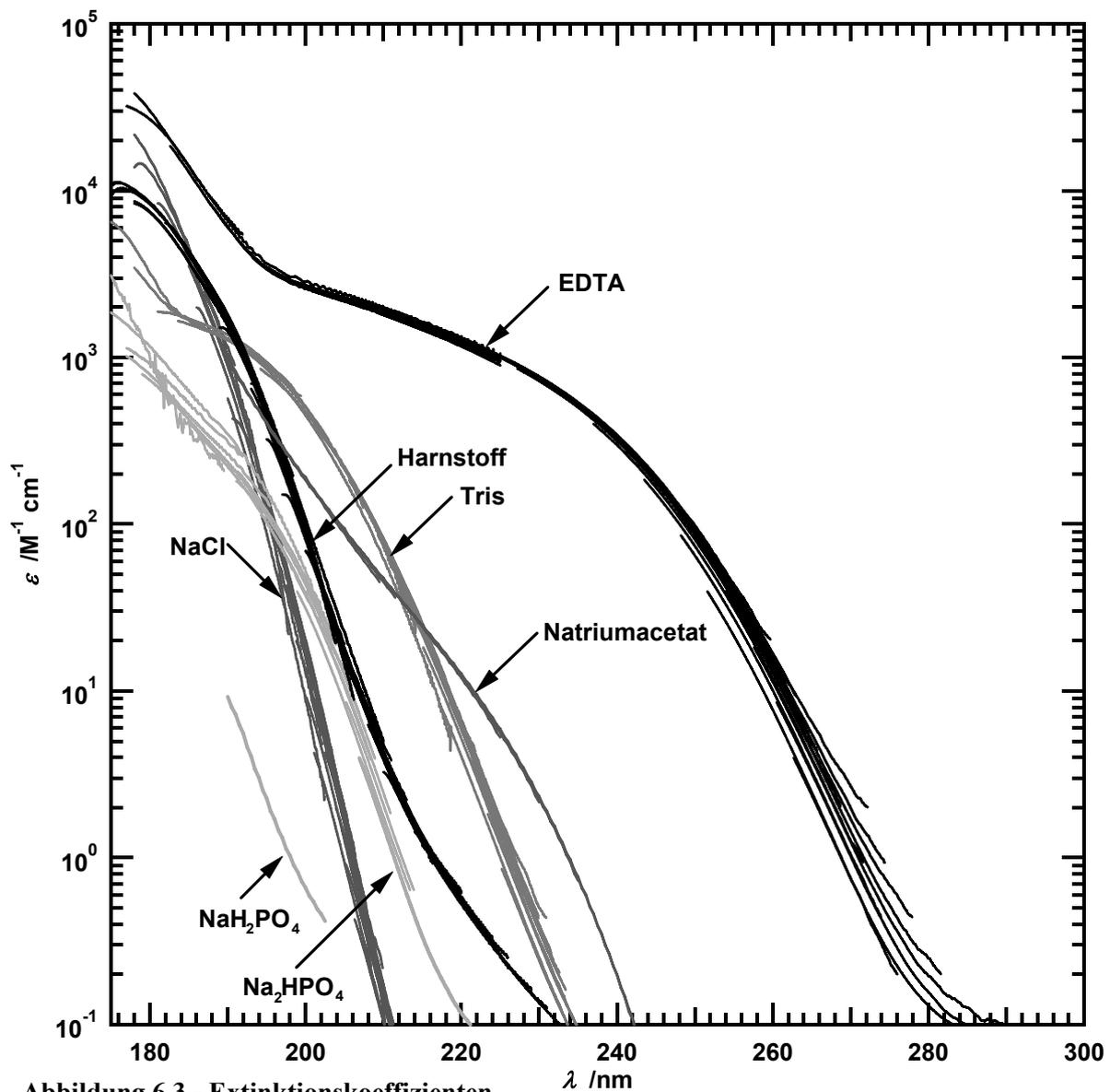


Abbildung 6.3 - Extinktionskoeffizienten

Die Extinktionskoeffizienten einiger Salzlösungen, die durch Extinktionsmessungen mit Wasser als Leerwert bestimmt wurden. Die Berechnung erfolgte anhand bekannter Konzentration und Pfadlänge.

Viele organische und anorganische Salze, die in wässrigen Lösungen als Puffer oder zur Erhöhung der Ionenstärke eingesetzt werden führen zu einer Zunahme der Extinktion im Vergleich zu Wasser. Da ich neben Spektren von (Buck *et al.* 1954) und den Absorptionsspektren einiger Salzfilme von (Schneider und O'Bryan 1937) kaum Daten für den UV-Bereich unterhalb von 190 nm gefunden habe, habe ich für ein paar Salzlösungen die Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu Wasser bestimmt (Abbildung 6.3).

6.3 Proteinfilme

Da die Messungen unterhalb von 180 nm durch die Absorption des Wassers stark eingeschränkt sind, bieten Proteinfilme eine Möglichkeit, den messbaren Bereich auszudehnen. Bei allen Messungen mit Proteinfilmen wurden im vergleichbaren Bereich Unterschiede zu den Messungen in Lösung festgestellt, wie hier an den Spektren von Filmen mit Myoglobin, Lysozym und Concanavalin A exemplarisch gezeigt wird. Bei Myoglobin sind sich CD-Spektren von Filmen und Lösung sehr ähnlich, wie die Abbildung 6.4a) zeigt. Wird das Vergleichsspektrum über das CD-Spektrum skaliert, so ist bei den CD-Spektren aller Myoglobinfilme die Amplitude des Minimums bei 209 nm etwas größer und die Amplitude des Minimums bei 222 nm etwas kleiner als beim Spektrum in Lösung. Die Unterschiede sind signifikant und konnten bei allen Myoglobinfilmen beobachtet werden. Ursache dafür ist der reduzierte Wassergehalt des Films (Chirgadze und Ovsepyan 1972). Die Filme zeigen gegenüber der Lösung erhöhte Extinktionswerte, wie in Abbildung 6.4b) zu sehen ist. Dies ist auf Lichtstreuung durch den Proteinfilm zurückzuführen.

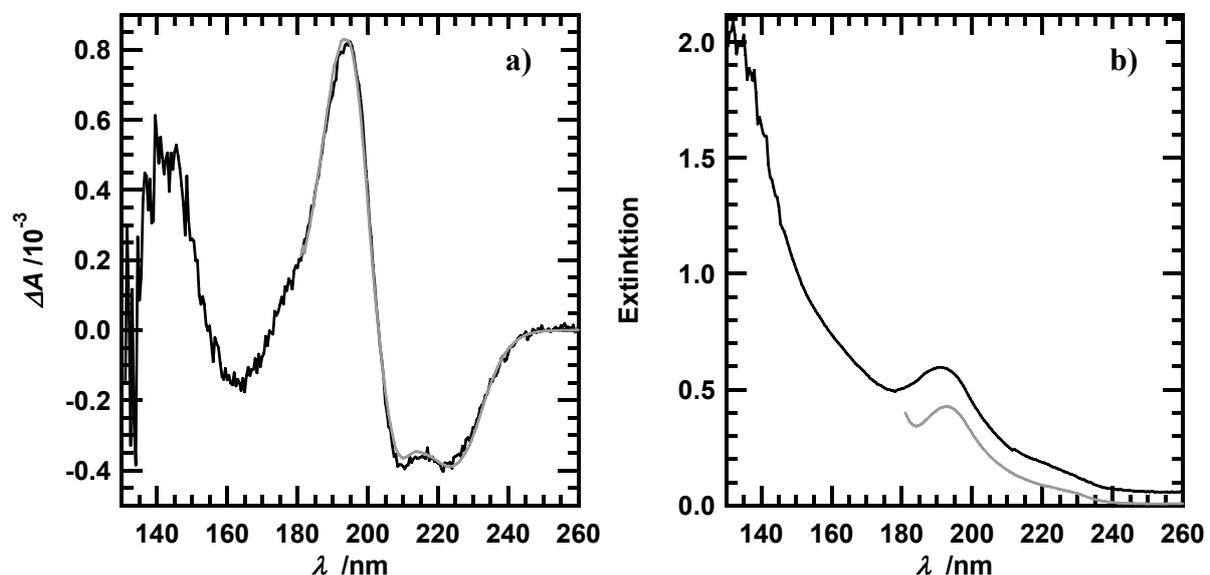


Abbildung 6.4 – CD- und Extinktionsspektrum eines Myoglobinfilms

Unter a) sind das CD-Spektrum eines Myoglobinfilms auf einem CaF₂-Fenster als schwarze Linie, zum Vergleich das skalierte Spektrum einer Myoglobinlösung als graue Linie dargestellt. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionswerte zu sehen.

Bei Lysozym-Filmen sind deutliche Unterschiede zu den Spektren in Lösung sichtbar (Abbildung 6.5). Die Amplitude des Minimums bei 222 nm etwas größer als beim Spektrum in Lösung, die Amplitude des Minimums bei 209 nm kleiner und die Amplitude des Maximums bei 192 nm ist deutlich reduziert sowie das Maximum auf etwa 195 nm verschoben. In der Extinktion (Abbildung 6.5b)) können durch Lichtstreuung erhöhte Werte beobachtet werden und deutlich reduzierte Werte für das Maximum bei

190 nm. Ähnliche Spektren wurden für Lysozymfilme mit höherer und geringerer Schichtdicke gemessen wie die im Anhang unter A7 gezeigt wird.

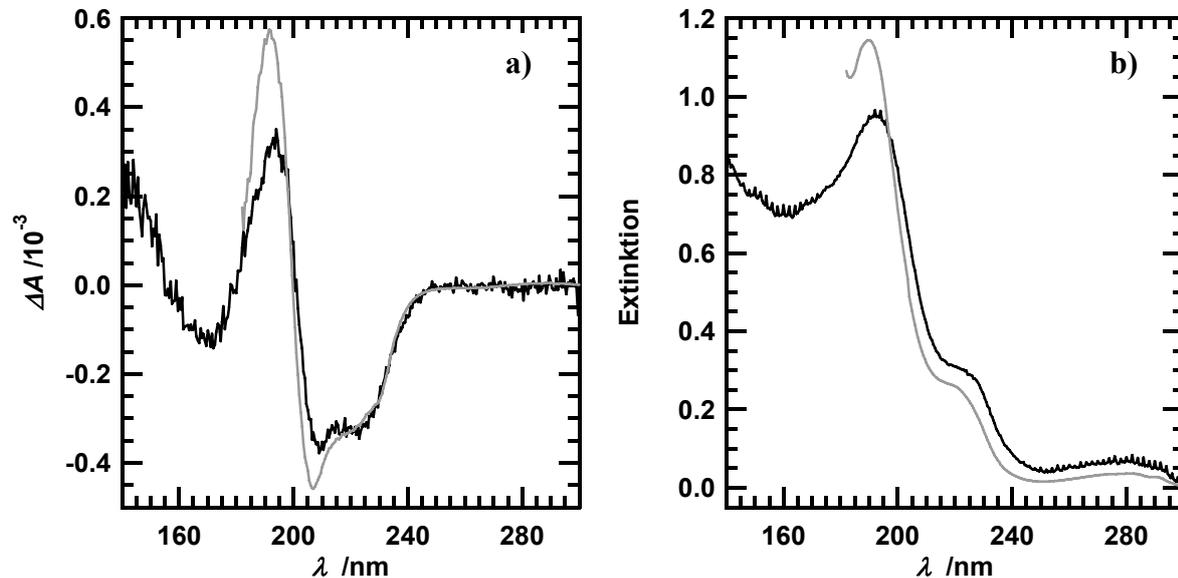


Abbildung 6.4 – CD- und Extinktionsspektrum eines Lysozymfilms

Unter a) sind das CD-Spektrum eines Lysozymfilms auf einem CaF_2 -Fenster als schwarze Linie, zum Vergleich das skalierte Spektrum einer Lysozymlösung als graue Linie dargestellt. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionswerte zu sehen.

Bei der Messung des CD-Spektrums eines Films aus Concanavalin A zeigten sich, wie auch mit Lysozym, deutliche Abweichungen zu dem in Lösung gemessenen CD-Spektrum (Abbildung 6.6). Das Minimum bei 223 nm scheint leicht zu längeren Wellenlängen verschoben (Abbildung 6.6a)). Die Maxima im CD-Spektrum und Extinktion bei etwa 195 nm sind deutlich reduziert.

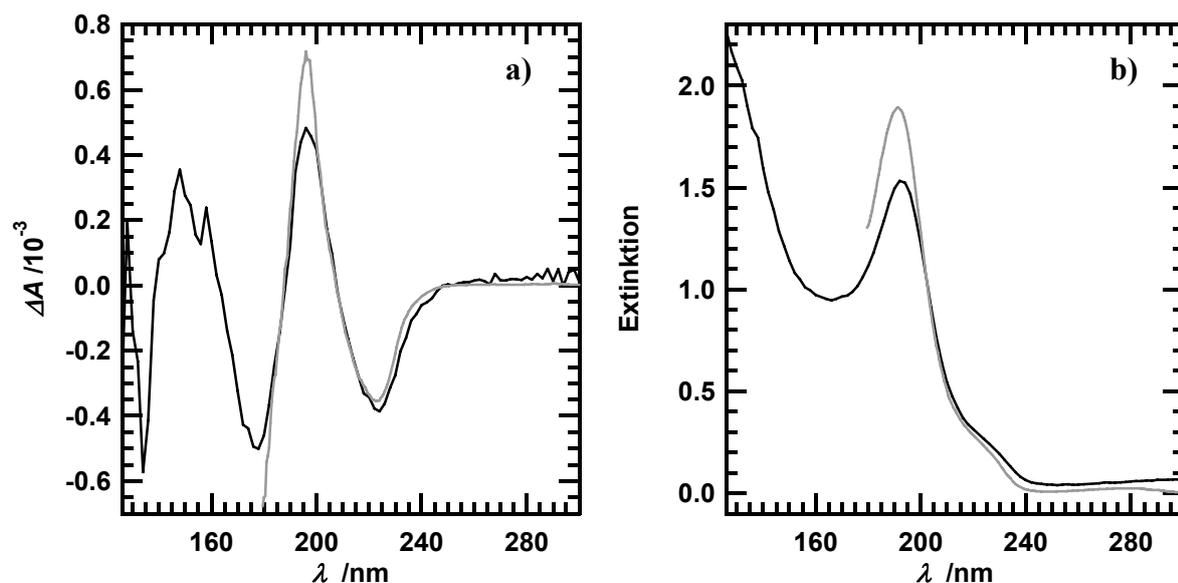


Abbildung 6.6 – CD- und Extinktionsspektrum einer Filmpräparation mit Concanavalin A

Unter a) sind das CD-Spektrum einer Filmpräparation mit Concanavalin A auf einem CaF_2 -Fenster als schwarze Linie, zum Vergleich das skalierte Spektrum einer Lösung von Concanavalin A als graue Linie dargestellt. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionswerte zu sehen.

Bei einer weiteren Filmpräparation konnte eine noch deutlichere Signalreduktion beobachtet werden, so dass das Extinktionsmaximum bei etwa 195 nm um etwa 50 % gegenüber dem Spektrum der Lösung, das CD-Maximum bei etwa 195 nm sogar um etwa 70 % reduziert ist (Abbildung 6.7).

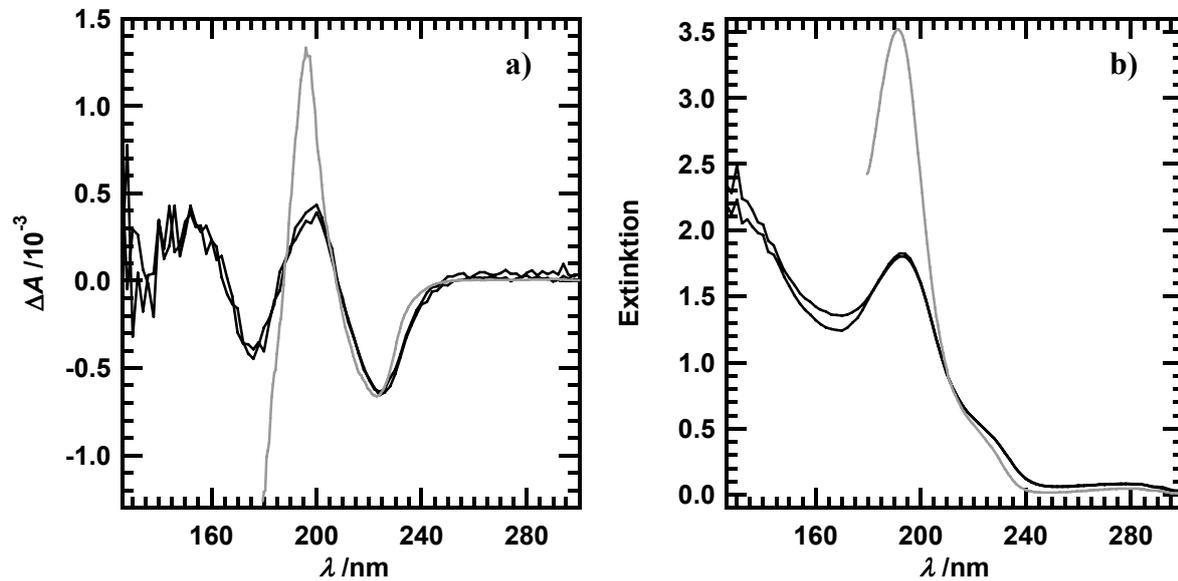


Abbildung 6.7 – CD- und Extinktionsspektrum einer Filmpräparation mit Concanavalin A

Unter a) sind das CD-Spektrum einer Filmpräparation mit Concanavalin A auf einem CaF_2 -Fenster als schwarze Linie, zum Vergleich das skalierte Spektrum einer Lösung von Concanavalin A als graue Linie dargestellt. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionswerte zu sehen.

6.4 Proteinpräparationen mit kleiner Pfadlänge

6.4.1 Myoglobin

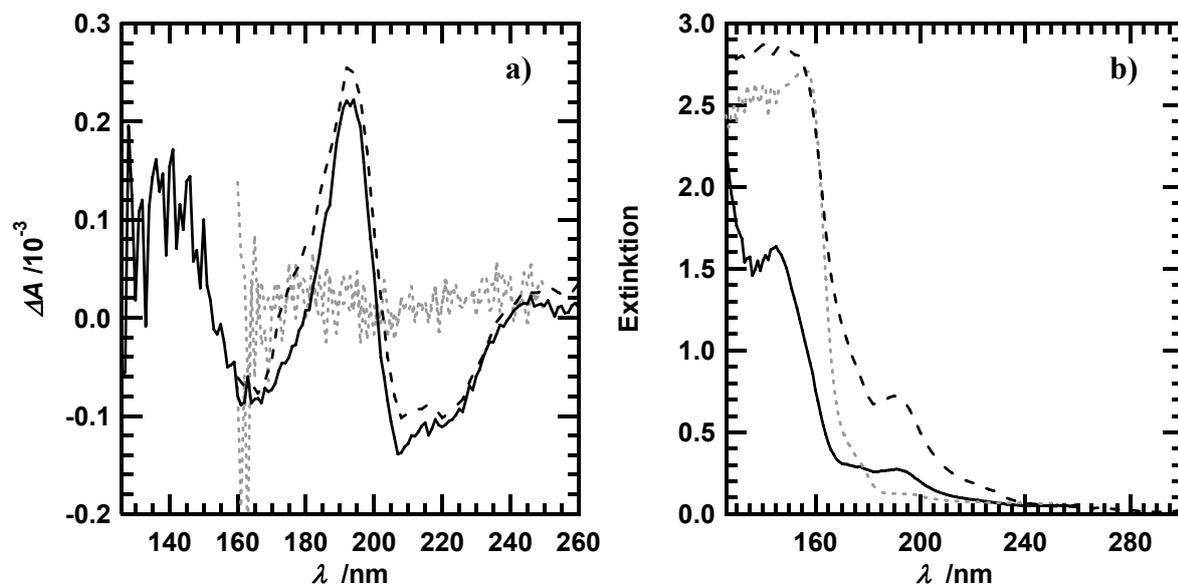


Abbildung 6.8 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit Myoglobin

Unter a) sind die CD-Spektren zweier Präparationen mit Myoglobin (schwarze Linien) zwischen zwei CaF_2 -Fenstern (Hellma) sowie einer entsprechenden Präparation mit Wasser (graue gestrichelte Linie) abgebildet. Zur Präparation wurden Myoglobin-Lösungen mit einer Konzentration von $0,2 \text{ g ml}^{-1}$ (durchgezogene Linie) und $0,3 \text{ g ml}^{-1}$ (gestrichelte Linie) verwendet. Das CD-Spektrum mit höherer Konzentration und Pfadlänge wurde mit 0,24 multipliziert. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionswerte abgebildet.

In Abbildung 6.8 sind für zwei Myoglobinpräparationen die CD- und Extinktionsspektren dargestellt. Die Präparation mit höherer Konzentration und Pfadlänge konnte nur bis nahe an 160 nm gemessen werden. Eine zweite Präparation, deren Pfadlänge etwa ein Drittel der Pfadlänge der ersten Präparation betrug, konnte bis 125 nm gemessen werden. Unterhalb von 135 nm könnte diese Messung aber durch Falschlicht beeinträchtigt sein. Im Rahmen des Messfehlers stimmt dieses CD-Spektrum gut mit dem CD-Spektrum des Proteinfilms (Abbildung 6.4) überein. Beide Spektren zeigen zwischen 160 und 165 nm ein Minimum und bei etwa 145 nm ein Maximum. Das Extinktionsspektrum wird unterhalb von 160 nm durch die Absorption von Wasser dominiert. Da der Myoglobinkonzentration in diesem Fall mit $0,2 \text{ g ml}^{-1}$ schon sehr hoch war, kann man davon ausgehen, dass das Signal-Rausch-Verhältnis für derartige immer ungünstig und die CD-Signale für Protein klein sein werden.

6.4.2 Lysozym

In Abbildung 6.9 sind zwei Präparationen von Lysozym mit $10 \mu\text{m}$ Quarz-Suprasil-Küvetten (Hellma) zusammen mit einer Präparation zwischen zwei CaF_2 -Fenstern abgebildet. Diese zeigt bis 180 bzw. 171 nm eine gute Übereinstimmung der Spektren im Rahmen des Messfehlers. Die Messpunkte bei 170 und 170,5 nm der am 3m-NIM-C gemessenen Präparation mit der $10 \mu\text{m}$ Quarz-Suprasil-Küvetten zeigen eine Abweichung die deutlich über den statistischen Fehler hinausgeht. Diese zeigt, dass durch Falschlicht das Messsignal nicht auf Null abfallen muss, sondern auch große Werte annehmen kann.

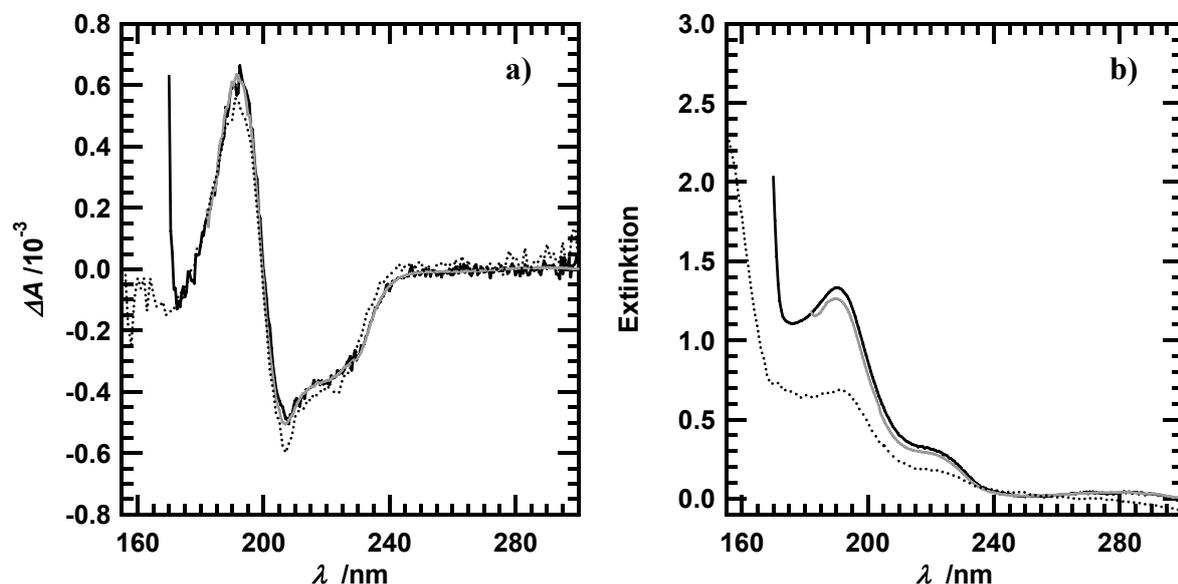


Abbildung 6.9 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit Lysozym

Unter a) ist ein am 3m-NIM-C gemessenes, mit einem Faktor von 1,9 multipliziertes CD-Spektrum einer Präparationen zwischen zwei CaF_2 -Fenstern (Hellma) mit einer Lysozymlösung mit einer Konzentration von etwa $0,15 \text{ g ml}^{-1}$ als gepunktete Linie abgebildet. Eine geeignete Wasserbasislinie fehlte. Zum Vergleich sind die mit einer Wasser- bzw. Pufferbasislinie korrigierte Spektren zweier Präparationen einer Lysozymlösung mit einer Konzentration von 14 g l^{-1} in $10 \mu\text{m}$ QS Küvetten abgebildet (grau J-715; schwarz 3m-NIM-C). Unter b) sind die entsprechenden Extinktionswerte abgebildet.

Bei Präparationen die über die Wasserabsorptionsbande hinaus gehen, sind die Messwerte sehr klein und haben ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. Für das in Abbildung 6.10a) gezeigte Spektrum fehlt eine

passende Wasserpräparation. Die in Abbildung 6.10c) gezeigten, am U125-2_NIM gemessene Spektren verdeutlichen, dass die Wasserbasislinie im Bereich der Wasserabsorptionsbande aufgrund von Spannungsdoppelbrechung ein ähnlich großes Messsignal aufweisen kann, wie eine Proteinpräparation selbst.

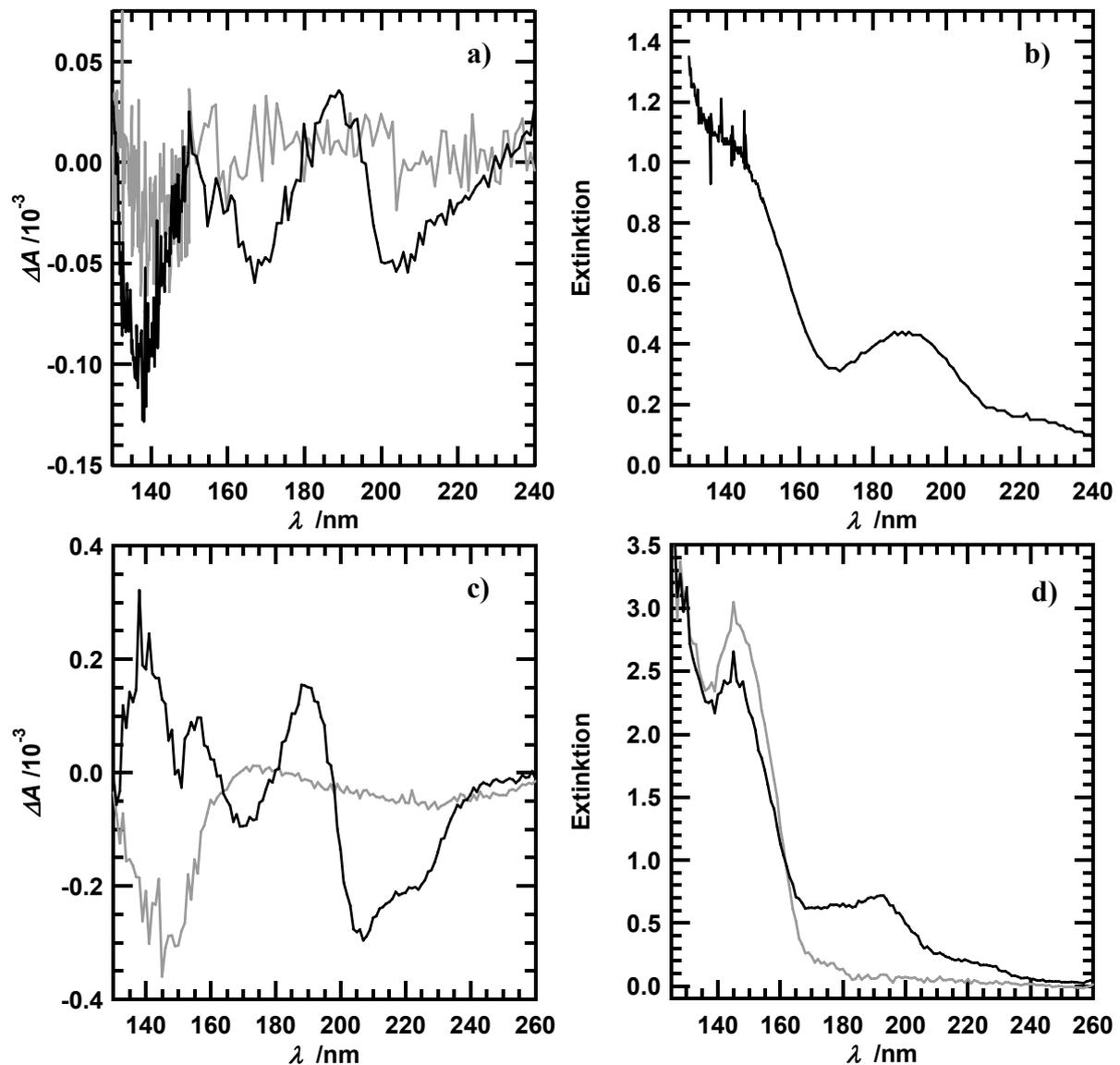


Abbildung 6.10 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit Lysozym

Unter a) ist ein am U125-2_NIM gemessenes CD-Spektrum einer Präparationen zwischen zwei CaF₂-Fenstern (Hellma) mit einer Lysozymlösung mit einer Konzentration von etwa 0,2 g ml⁻¹ als schwarze Linie abgebildet. Eine Gerätebasislinie ist als graue Linie zum Vergleich abgebildet, da eine geeignete Wasserpräparation fehlte. Unter b) ist das entsprechende Extinktionsspektrum zu sehen.

Unter c) ist ein am U125-2_NIM gemessenes CD-Spektrum einer weiteren Präparationen zwischen zwei CaF₂-Fenstern (Hellma) mit einer Lysozymlösung mit einer Konzentration von etwa 0,2 g ml⁻¹ (schwarze Linie) sowie eine vergleichbare Wasserpräparation (graue Linie) abgebildet. Unter d) sind die entsprechenden Extinktionsspektren zu sehen.

6.4.3 Peptid A2

Die mit der jeweiligen Wasserbasislinie korrigierten und skalierten CD-Spektren mehrerer Präparationen mit dem α -helikalen Peptid A2 stimmen relativ gut überein (Abbildung 6.11a). Bei zwei der sieben Präparationen war die CD-Bande bei 190 nm aufgrund von Strahlenschäden reduziert. Wie bei Myoglobin liegt zwischen 160 und 165 nm ein Minimum vor. Eine Präparation mit geringerer Pfadlänge konnte bis 125 nm gemessen werden (Abbildung 6.11c). Mit dieser konnte ein Maximum bei etwa 145 nm beobachtet werden. Im Maximum bei 190 nm kam es zu einer Signalabnahme durch Strahlenschäden.

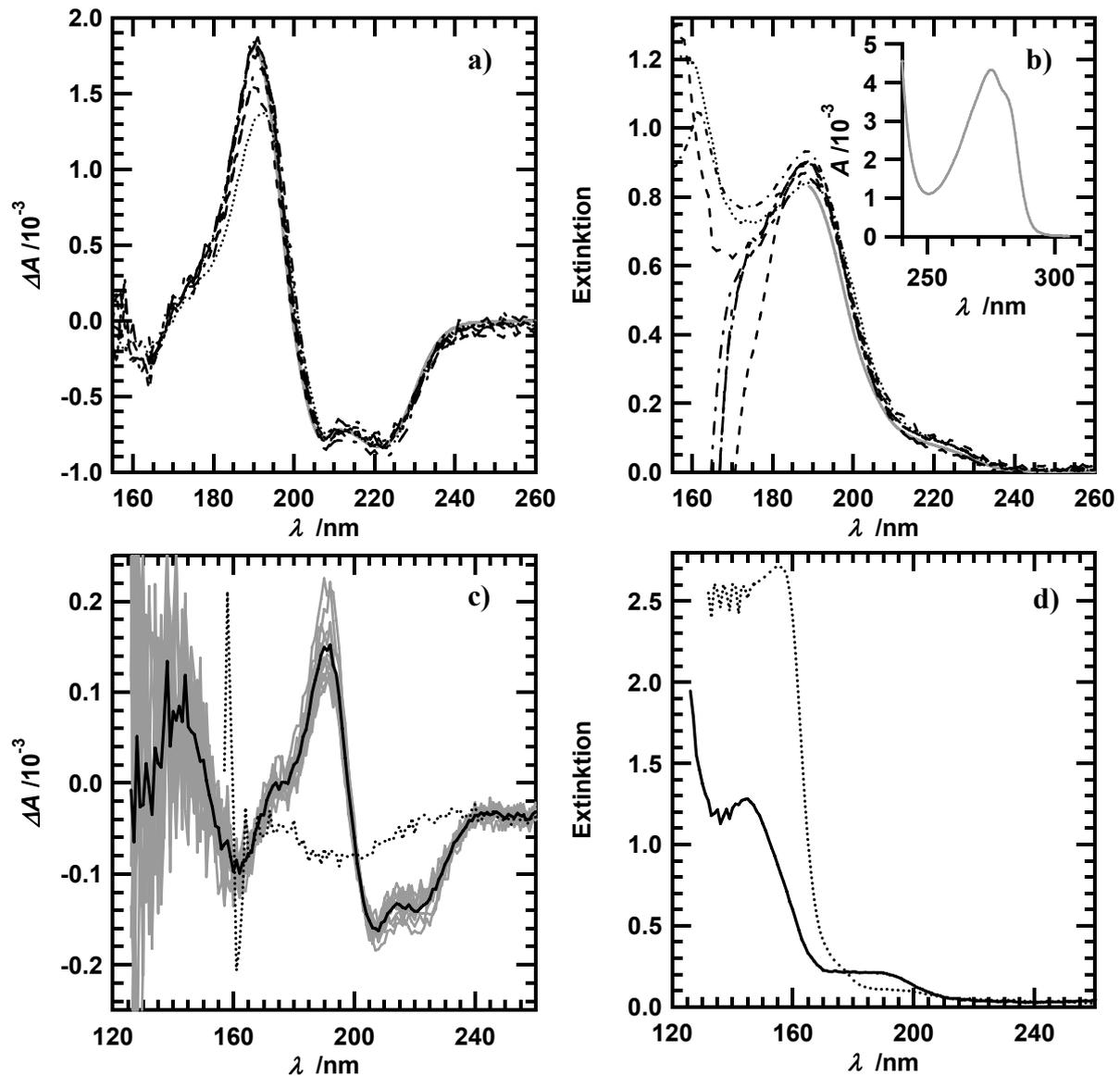


Abbildung 6.11 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit dem Peptid A2

Unter a) ist sind am 3m-NIM-C gemessene, skalierte CD-Spektren von sieben Präparationen zwischen zwei CaF_2 -Fenstern (Hellma) mit einer Lösung von Peptid A2 mit einer Konzentration von etwa $0,1\text{--}0,2 \text{ g ml}^{-1}$ als schwarze Linien abgebildet. Ein am J-715 mit einer 1 mm Küvette gemessenes Spektrum ($0,97 \text{ g l}^{-1}$) ist als graue Linie abgebildet. Unter b) sind die entsprechende Extinktionsspektren zu sehen.

Unter c) ist ein am 3m-NIM-C gemessenes CD-Spektrum einer weiteren Präparationen zwischen zwei CaF_2 -Fenstern (Hellma) zu sehen. Einzelmessungen mit einer Integrationszeit von 3 s pro Punkt sind als graue Linien, der Mittelwert als schwarze durchgezogene Linie abgebildet. Da keine Wasserpräparation mit entsprechender Pfadlänge gelang, ist eine mit größerer Pfadlänge als schwarze gepunktete Linie abgebildet. Unter d) sind die entsprechenden Extinktionswerte dargestellt.

6.4.4 FBP28-D15N WW-Domäne

Die FBP28-D15N WW-Domäne ist ein kleines dreisträngiges β -Faltblatt, das bei 230 nm eine für WW-Domänen typische positive CD-Bande aufweist, die bei Raumtemperatur (am BESSY) weniger stark ausgeprägt ist als bei 8 °C (Abbildung 6.12a)). Die letzten beiden Punkte bei 170 und 171 nm sind durch Falschlicht verfälscht. Bei kleinen Pfadlängen betragen die Abweichungen zwischen den einzelnen Spektren verschiedener Präparationen bis zu 20 % der Signalamplitude (Abbildung 6.12c)). Zwischen 170 und 175 nm liegt ein Minimum in CD-Signal vor.

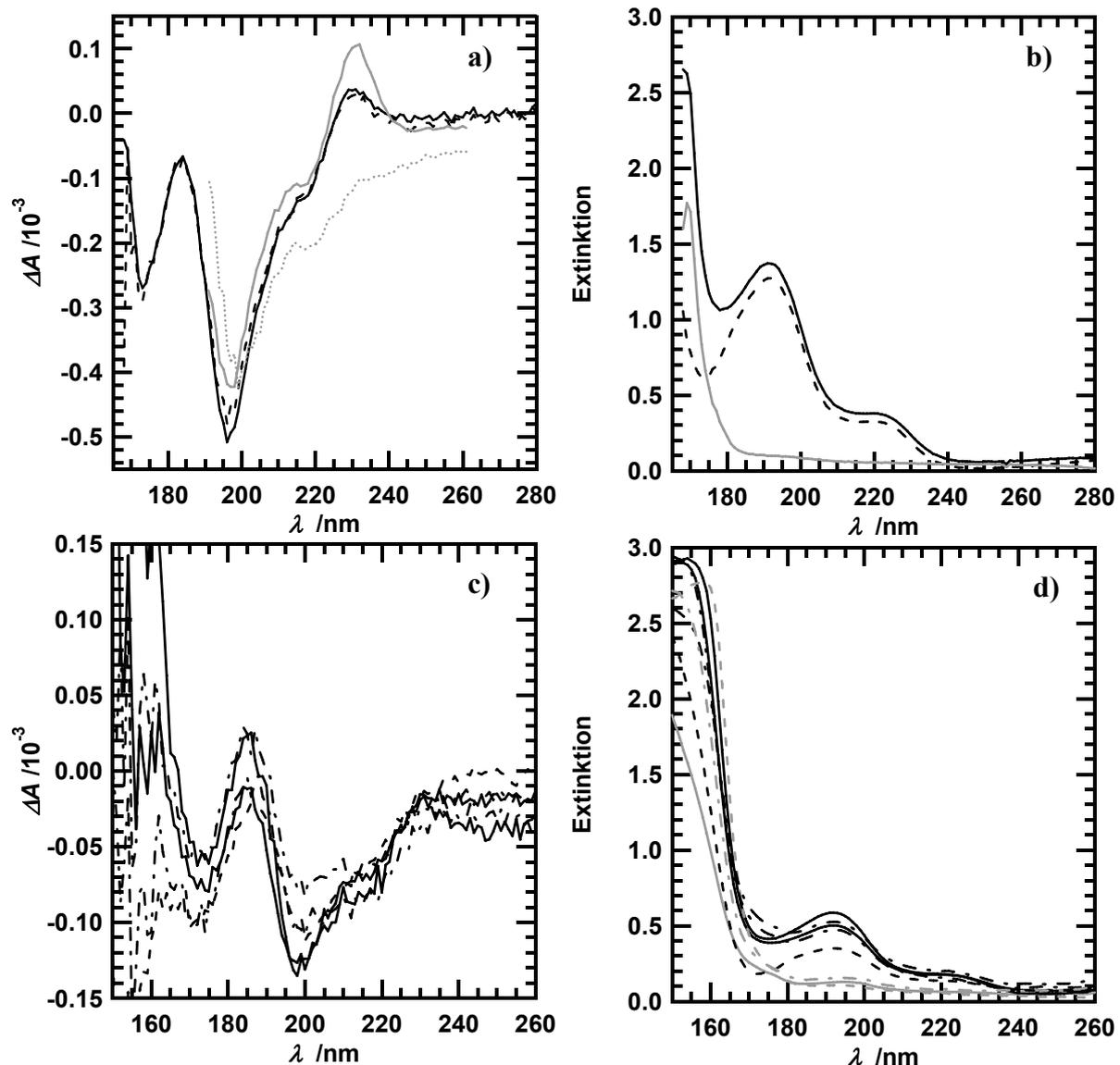


Abbildung 6.12 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit der FBP28-D15N WW-Domäne

Unter a) ist sind am 3m-NIM-C mit Quarz Suprasil Küvetten (10 μm) bei Raumtemperatur und einer Konzentration von etwa 10 g l^{-1} gemessene CD-Spektren als schwarze Linien dargestellt. Zum Vergleich sind die am J-715 gemessenen CD-Spektren bei 8 °C (durchgezogene graue Linie) und 90 °C (gepunktete graue Linie) abgebildet, die mit einer 1 mm Quarzküvette bei einer Konzentration von $0,1 \text{ g l}^{-1}$ gemessen wurden. Unter b) sind ein Extinktionsspektrum einer Messung mit der 10 μm Küvette für die Proteinlösung (schwarze Linie) und für Wasser (graue Linie) sowie die Differenz der beiden (gestrichelte Linie). Unter c) sind die, mit Wasserbasislinien korrigierten CD-Spektren mit kleiner Pfadlänge abgebildet. Zur Probenpräparation wurden runde CaF_2 -Fenster von Korth verwendet. Unter d) sind die Extinktionsspektren der entsprechenden Proben (schwarz) sowie der zur Korrektur verwendeten Wasserbasislinien (grau) abgebildet.

6.4.5 Kältschockprotein CSP *T. m.*

Das Kälteschockprotein CSP *T. m.* ist ein kleines β -Faltblatt-Protein, dessen Spektrum bis 180 nm stark durch die aromatischen Seitenketten geprägt ist (Abbildung 6.13a). Bei den in Abbildung 6.13c) gezeigten Spektren für Präparationen mit kleinen Pfadlänge liegt die Signalamplitude im Bereich oberhalb von 170 nm in der gleichen Größenordnung wie die systematischen Schwankungen der Basislinie.

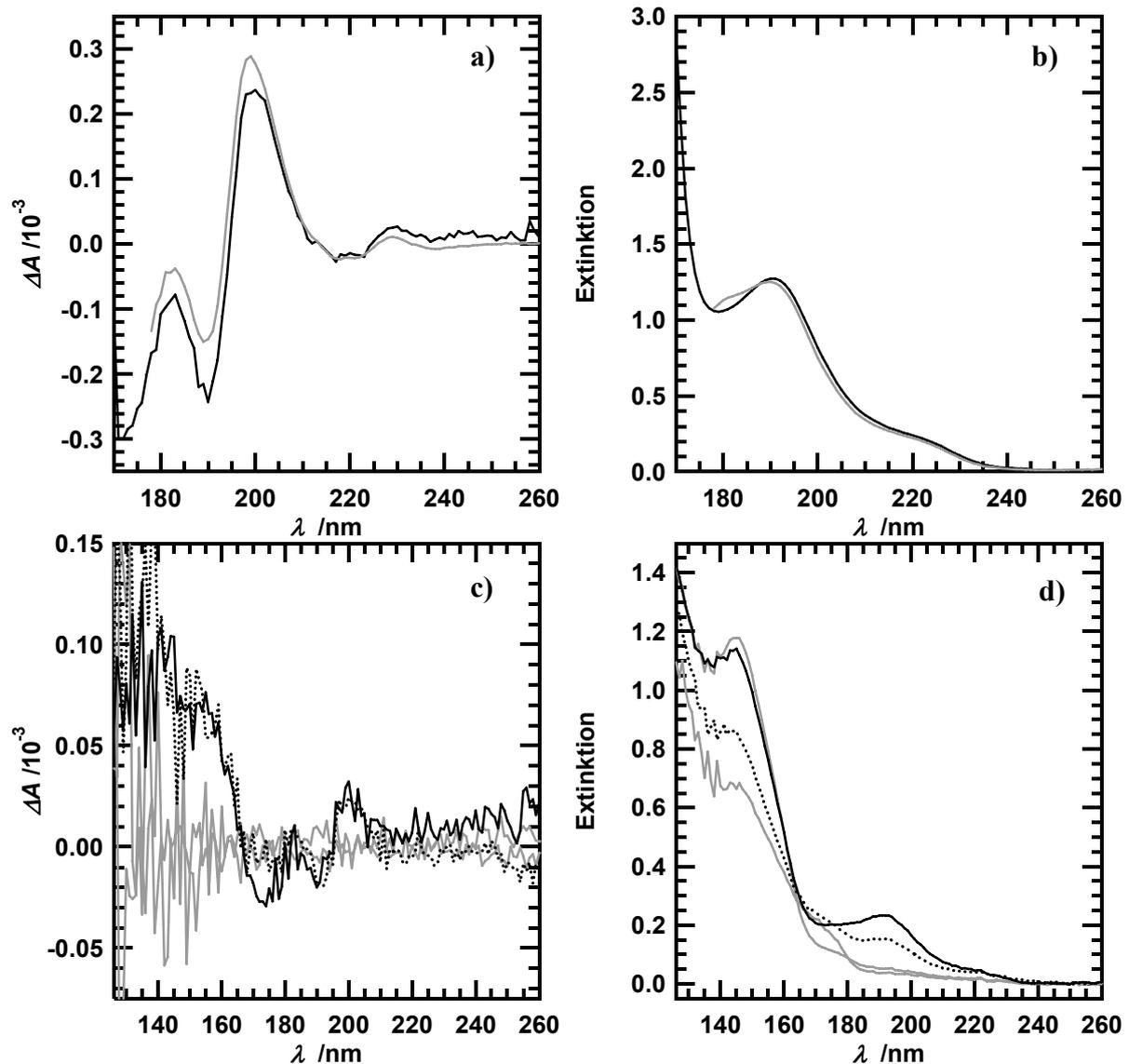


Abbildung 6.13 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit CSP *T. m.*

Unter a) ist ein am 3m-NIM-C mit Quarz Suprasil Küvetten (10 μm) bei einer Konzentration von etwa 13 g l^{-1} gemessene CD-Spektren als schwarze Linie dargestellt. Zum Vergleich ist ein am J-715 gemessenes CD-Spektrum als graue Linie abgebildet, das mit einer 0,1 mm Quarzküvette bei einer Konzentration von $1,3 \text{ g l}^{-1}$ gemessen wurde. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionsspektren abgebildet.

Unter c) sind die CD-Spektren zweier Präparationen mit CSP *T. m.* mit einer Konzentration von etwa $0,1 \text{ g ml}^{-1}$ als schwarze Linien sowie mit Wasser als graue Linien abgebildet. Die Präparationen wurden mit rechteckigen CaF_2 -Fenstern von Korth durchgeführt. Unter d) sind die entsprechenden Extinktionsspektren abgebildet.

6.4.6 Internalin A496

Internalin ist ein Beispiel, das zeigt wie schwierig die Ausdehnung des Messbereichs am 3m-NIM-C ist. Unter Abbildung 6.14 a) und b) sind Vergleichspektren abgebildet. In Abbildung 6.14 d) ist gezeigt, dass durch Variation des Probenvolumens die Pfadlänge bei Präparationen zwischen zwei Fenstern um etwa eine Größenordnung variiert werden kann. Während bei höherer Pfadlänge die Probenabsorption den Messbereich begrenzt (Abb. 6.14c) – gepunktete Linien) ist für die kleinsten Pfadlängen (Abb. 6.14c) – gestrichelte Linien) der systematische Fehler im CD-Signal im Bereich unterhalb von 180 nm schon so groß wie das CD-Signal selbst oder sogar größer.

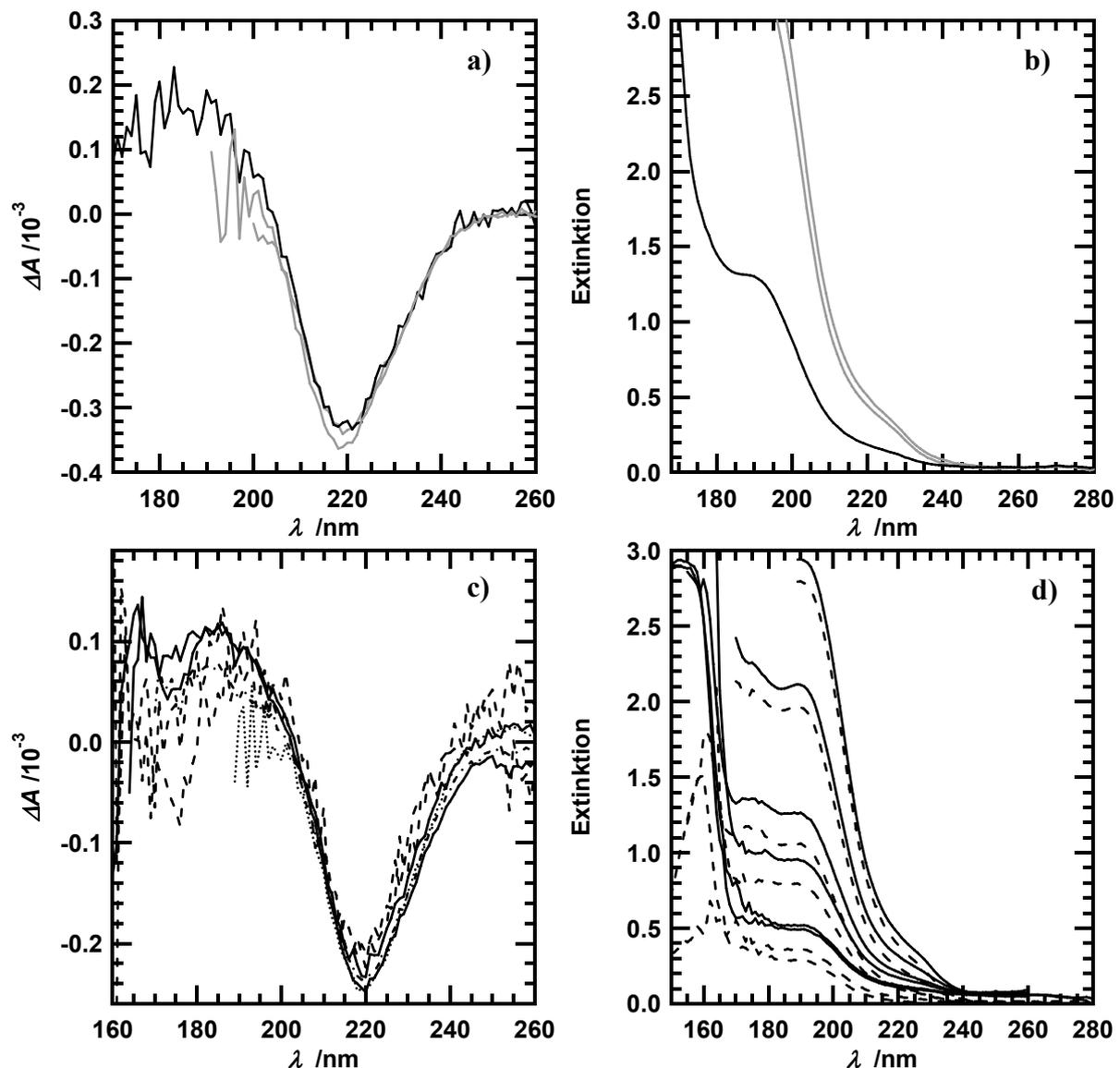


Abbildung 6.14 – CD- und Extinktionsspektren von Präparationen mit Internalin A496.

Unter a) sind am 3m-NIM-C mit Quarz Suprasil Küvetten (10 μm) bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessene CD-Spektren dargestellt. Unter b) sind die entsprechenden Extinktionsspektren abgebildet.

Unter c) sind die CD-Spektren einiger Präparationen mit Internalin A496 mit einer Konzentration von etwa $0,05 \text{ g ml}^{-1}$ abgebildet die mit einer geeigneten Messung mit Wasser korrigiert und anhand der Extinktion bis 200 nm skaliert worden sind. Die Präparationen wurden mit runden CaF_2 -Fenstern von Korth unter Verwendung von $<0,5$ bis $5 \mu\text{l}$ Proteinlösung durchgeführt. Unter d) sind die Extinktionsspektren relativ zur Messaufbau ohne Messzelle (durchgezogene Linien) und zu Wasser (gestrichelte Linien) abgebildet.

6.5 Schäden durch Synchrotronstrahlung

Die SRCD-Messplätze am BESSY gehören nicht zu den SRCD-Messplätzen mit hoher Lichtintensität. Bei allen CD-Messungen mit Proteinen sind nur bei α -Chymotrypsinogen bei aufeinander folgenden Messungen signifikante Änderungen zwischen den CD-Spektren aufgefallen. Um diese Änderung zu untersuchen wurde am Messplatz 3m-NIM-C die Größe des Synchrotronstrahls bestimmt. Die Proben wurden so im Strahl platziert ($x=6,25$; $y=5,5$), dass der bestrahlte Bereich die zur Verfügung stehende Fläche optimal nutzt, wenn die Calciumfluoridzellen von Hellma Optik verwendet werden. Durch Drehen der Probe um 180° konnte so im Anschluss an eine Messung ein zuvor nicht bestrahlter Bereich der Probe gemessen werden (Abbildung 6.15). Dadurch war es möglich präparationsbedingte von strahlungsinduzierten Änderungen zu unterscheiden. Um zu verhindern, dass Licht außerhalb des Probenbereichs, die Küvette passiert wurde eine Blende mit einem Durchmesser von sieben Millimeter vor der Küvette platziert.

Da nur ein kleiner Bereich intensiver Strahlung ausgesetzt ist, liegt die Schädigung der Probe in niedrigen Prozentbereich, auch wenn das Messsignal auf eine deutliche Schädigung der Probe hindeutet.

Ein Strahlenschaden an einem Proteinmolekül liegt vor, wenn es ionisiert wird, es durch anschließende Folgereaktionen oder durch Reaktionen mit ionisierten Lösungsmittelmolekülen zu einer Änderung der Primärstruktur kommt. Die Strahlenschäden sind abhängig von der Intensität und Wellenlänge der Strahlung, von der Ionisierbarkeit der Chromophore innerhalb des Proteinmoleküls und der Lösungsmittelmoleküle. Die möglichen Folgereaktionen sind abhängig von der Struktur des Proteins sowie von der Konzentration.

Durch SDS-PAGE könnten Strahlenschäden nachgewiesen werden, die mit Fragmentierung, kovalenter Quervernetzung oder Primärstrukturänderungen mit Änderung der Nettoladung verbunden sind. Den kleinen Anteil bestrahlter Moleküle neben den hohen Anteil nicht bestrahlter Moleküle nachzuweisen ist schwierig. Es konnte mittels SDS-PAGE kein Unterschied zu vollständig unbestrahlten Proben festgestellt werden. Einer Untersuchung möglicher Änderungen in der Primärstruktur mittel quantitativer

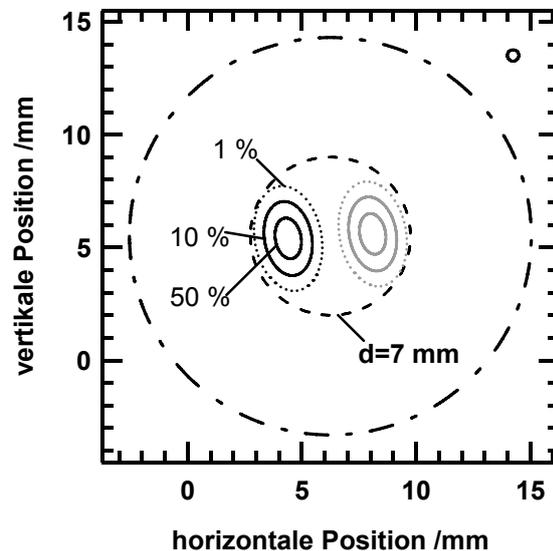


Abbildung 6.15 – Schema Bestrahlung

Basierend auf der dreidimensionalen Regression der Messwerte der Strahlquerschnittbestimmung des zweiten Tages sind die Bereiche mit mehr als 1, 10 und 50 % der maximalen Intensität als schwarze Ellipsen dargestellt. In grau sind die entsprechenden Bereiche nach Drehung um 180° zu sehen. Der Durchmesser der Blende und der im Küvettenhalter verwendeten Teflonringe sind als Kreise dargestellt. Der kleine Kreis in der oberen rechten Ecke zeigt die Lochblende um deren Durchmesser die dargestellten Ellipsen zu groß sein können.

Aminosäureanalyse wurde nicht vorgenommen, da auch hierfür der Anteil bestrahlter Moleküle zu gering erschien.

Eine Auswahl aus Serien nacheinander gemessener CD-Spektren von α -Chymotrypsinogen für eine Probenpräparation mit einer Pfadlänge von etwa $1\ \mu\text{m}$ und eine Probenpräparation mit einer Pfadlänge von $26,2\ \mu\text{m}$ sind in Abbildung 6.16 abgebildet. Dabei sind von Messung zu Messung kontinuierliche Änderungen im CD-Spektrum feststellbar, die bei der Probenpräparation mit kleiner Pfadlänge und hoher Konzentration deutlich stärker ausgeprägt sind.

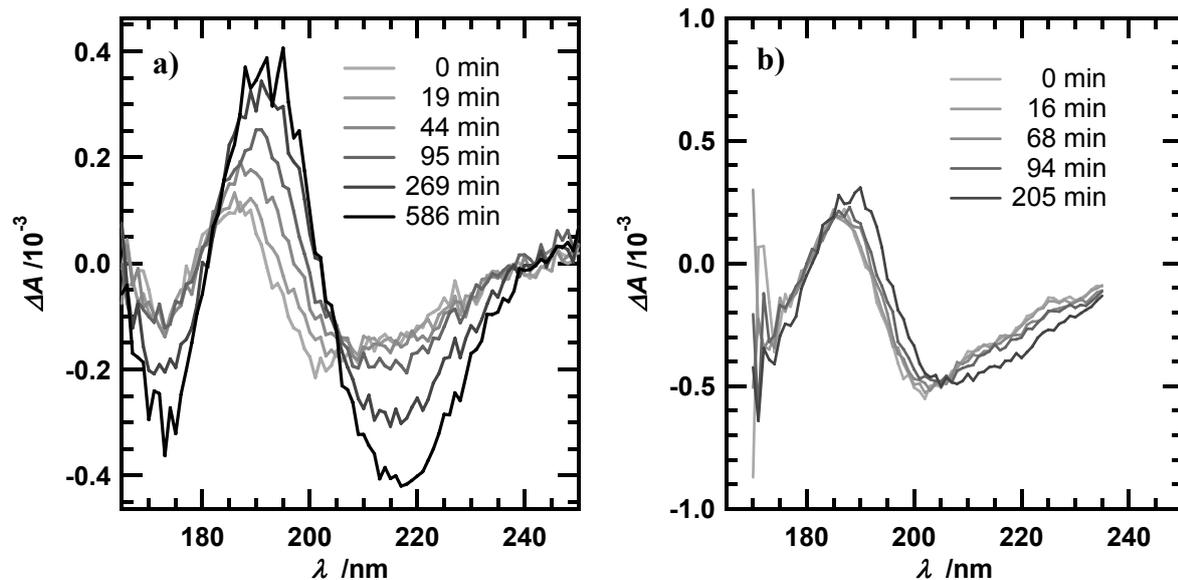


Abbildung 6.16 – Strahlenschädigung von α -Chymotrypsinogen (1)

Eine Auswahl einer Serie von CD-Spektren im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 165 nm für eine Probenpräparation mit einer Pfadlänge von etwa $2\ \mu\text{m}$ und einer Konzentration von etwa $1,15\ \mu\text{M}$ ist und a) abgebildet. Eine weitere Auswahl von Spektren ist für eine Probenpräparation mit einer Pfadlänge von $26,2\ \mu\text{m}$ und einer Konzentration von $0,19\ \mu\text{M}$ ist unter b) abgebildet. In den Legenden sind die Zeiten zwischen dem Beginn der jeweiligen Messung relativ zum Beginn der ersten Messung angegeben.

Bei einer Betrachtung der zugehörigen Extinktionsspektren fiel auf, dass es im Verlauf der Messungen zu einer Zunahme der Extinktion kam. Die Vergleichsmessung nach Abschluss der Messserie an einer zuvor nicht bestrahlten Position der gleichen Probe zeigte, dass die Änderung der CD-Spektren allein auf die Bestrahlung und nicht auf die Probenpräparation zurückzuführen war und eine lokale Konzentrationszunahme und nicht eine Änderung der Pfadlänge Grund für die Extinktionszunahme war. Die Extinktionszunahme zeigt, dass entweder die durch Bestrahlung entstehenden Aggregate an die Calciumfluoridfenster binden oder so groß sind, dass diese deutlich langsamer diffundieren als unbestrahlte Proteinmoleküle. Zwischen beiden Möglichkeiten kann nicht unterschieden werden, da die Proteinlösung nach trennen der Fenster sofort auf diesen eintrocknet und nach Waschen mit Wasser kein Protein auf den Fenstern zurückbleibt.

Um die Konzentrationsänderung zu kompensieren wurde zuerst die relative Extinktionsänderung anhand der Extinktionsspektren bis 190 nm ausgehend vom ersten Spektrum mittels linearer Regression ermittelt. In der berechneten relativen Extinktionsänderung in Abbildung 6.17a) sind in Bereich zwischen 3 und

10 h zahlreiche Einbrüche im Signal zu sehen, die in gleicher Größenordnung auch im CD-Signal auftraten. Da diese bei Messungen mit fester Wellenlänge nicht aufgetreten sind, ist die einzige Ursache einer Änderung der Strahlage infolge der Monochromatorbewegung. Anhand dieser relativen Extinktionsänderung wurden Extinktions- und CD-Spektren skaliert.

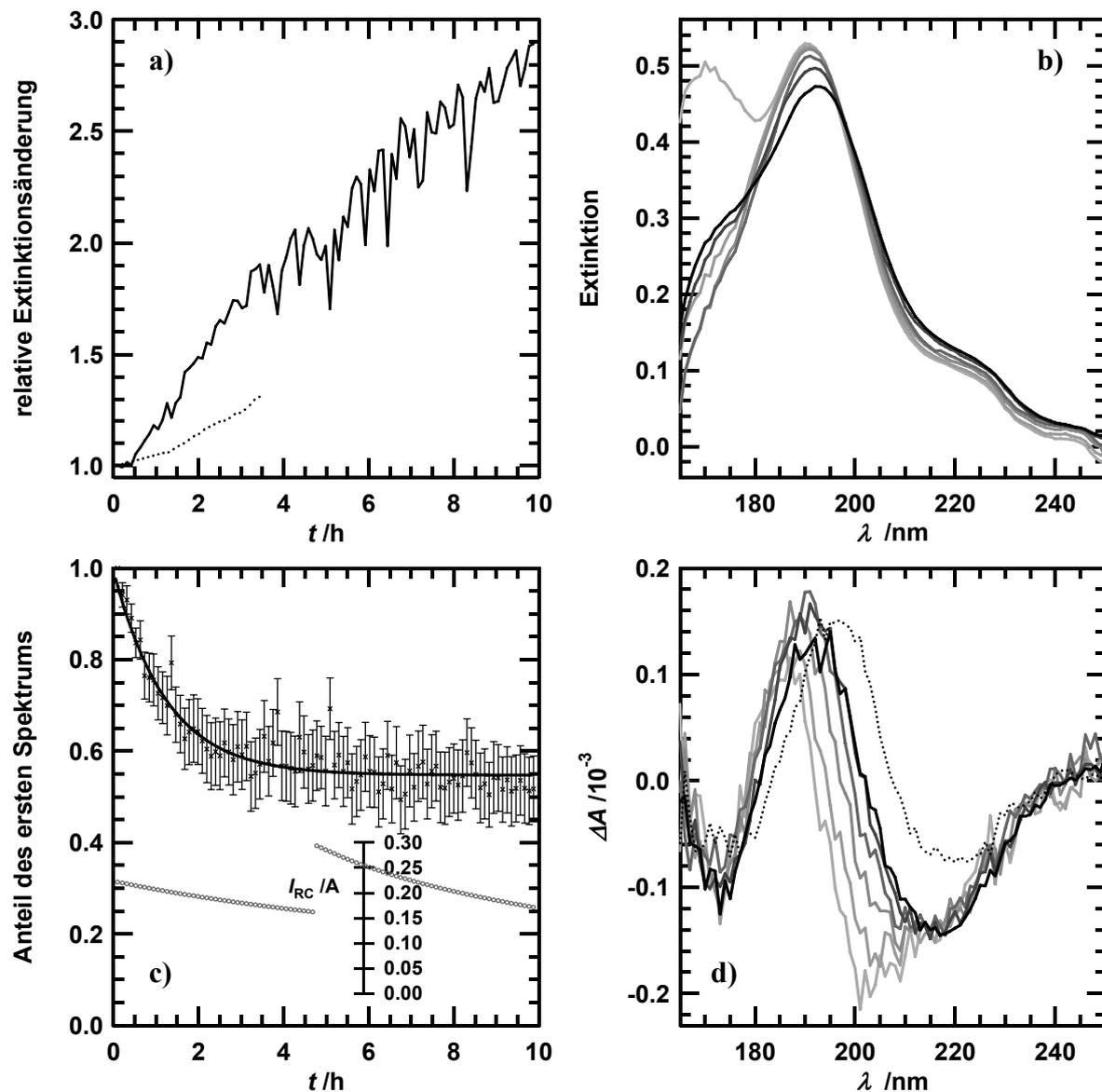


Abbildung 6.17 – Strahlenschädigung von α -Chymotrypsinogen (2)

Unter a) ist die relative Zunahme der Extinktion gezeigt, die wie im Text beschreiben berechnet wurde. Die durchgezogene Linie zeigt die relative Zunahme der Extinktion bei der Präparation mit einer Pfadlänge von etwa $2 \mu\text{m}$, die gepunktete Linie die relative Zunahme der Extinktion bei der Präparation mit einer Pfadlänge von $26,2 \mu\text{m}$.

Unter b) sind die der Auswahl unter 6.15 entsprechenden, anhand der relativen Extinktionsänderung skalierten Extinktionswerte abgebildet.

Unter c) ist der mittels linearer Regression ermittelte Anteil des ersten Spektrums angegeben, sowie im unteren Teil der Verlauf des Ringstroms während der Messungen.

Unter d) sind die anhand der relativen Extinktionswerte skalierten CD-Spektren abgebildet, sowie als gepunktete Linie das mittlere Differenzspektrum der letzten 10 Messungen nach Abzug des unter c) angegebenen Anteils des ersten Spektrums.

Die skalierten Extinktionswerte in Abbildung 6.17b) zeigen, dass die Probe mit der Zeit zunehmend das Licht streute und es zu einer relativen Abnahme der Extinktionsbande bei 190 nm kam.

Anhand von Änderungen des CD-Signals im Fern-UV-Bereich sind weder qualitative noch quantitative Aussagen zu den ursächlichen Strahlenschäden möglich. Für Proteine wie α -Chymotrypsinogen tragen hunderte Peptidbindungen zur CD-Signal bei. Kommt es infolge eines Strahlenschadens zur Modifikation einer Peptidbindung, so ist die unmittelbar daraus folgende Änderung des CD-Signals gering. Destabilisiert diese Modifikation für sich oder mit weiteren Strahlenschäden innerhalb eines Proteinmoleküls die im nativen Molekül vorliegende Sekundärstruktur aber soweit, dass es in Teilen oder dem gesamten Proteinmolekül zu einer Änderung der Sekundärstruktur kommt, so sind deutliche Änderungen im Fern-UV-CD-Signal zu erwarten. Die nach einer Ionisierung möglichen Folgereaktionen und deren Einfluss auf die Stabilität der nativen Struktur unterscheiden sich von Protein zu Protein. Um die Änderungen ausgehend von den Spektren unabhängig vom jeweiligen Protein auszuwerten wurden die Anteile f_a des ersten Spektrum ΔA_a an den folgenden Spektren und die Abweichung ΔA_r mittels linearer Regression bestimmt (Gleichung 6.1).

$$\Delta A = f_a \cdot \Delta A_a + \Delta A_r \quad (\text{Gleichung 6.1})$$

Der Anteil des ersten an den folgenden Spektren ist für die Serien nacheinander gemessener CD-Spektren von α -Chymotrypsinogen mit einer Pfadlänge von etwa $2 \mu\text{m}$ in Abbildung 6.17c) gegen die Zeit der Bestrahlung aufgetragen. Im unteren Teil der gleichen Abbildung ist der Ringstrom des Synchrotronrings aufgetragen. Die mittlere Abweichung der letzten zehn Spektren ist zusammen mit den der Extinktionsänderung entsprechend skalierten Auswahl der CD-Spektren in Abbildung 6.17d) dargestellt und ist etwa so groß, wie die skalierten CD-Spektren. Dies bedeutet dass sich die Spektren am Ende der Serie deutlich vom ersten Spektrum unterscheiden.

Da im Fall von α -Chymotrypsinogen ein Plateau bei etwa 55% des Ausgangsspektrums erreicht wird und sich die Proteinkonzentration im Strahl über zehn Stunden im Vergleich zu Ausgangszustand nahezu verdreifacht hat, kann man das Spektrum der letzten Messungen, als Spektrum einer aggregierten Form ΔA_b des Proteins definieren. Da auch das erste gemessene Spektrum schon Veränderungen im Vergleich zur Präparation bei größerer Pfadlänge aufweist, wurde das Ausgangsspektrum entsprechend angepasst. Wird die Serie der CD-Spektren aus diesem mittels einer Regression als Summe zweier Spektren interpretiert (Gleichung 6.2) so ergibt sich der in Abbildung 6.18 dargestellte Verlauf. Dieser zeigt, dass α -Chymotrypsinogen während der ersten Messung zu mehr als 10 % geschädigt wird und innerhalb von etwa zwei Stunden nahezu vollständig in die aggregierte Form umgewandelt wird.

$$\Delta A = f_a \cdot \Delta A_a + f_b \cdot \Delta A_b + \Delta A_r \quad (\text{Gleichung 6.2})$$

Eine Auswertung der verbleibenden Abweichung ΔA_r mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) ergab das im Verlauf der Messungen zwischenzeitlich ein weiteres Spektrum auftritt (siehe Abbildung 6.18).

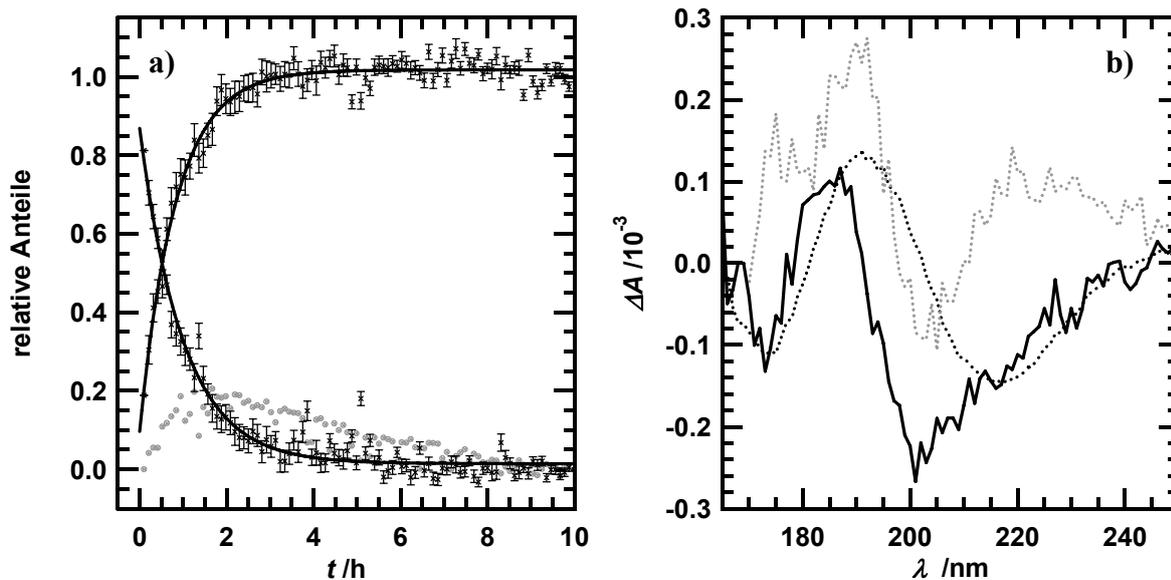


Abbildung 6.18 – Strahlenschädigung von α -Chymotrypsinogen (3)

Unter a) sind die Abnahme des Anteils des CD-Spektrums von α -Chymotrypsinogen und die Zunahme des Anteils der letzten 10 gemessenen CD-Spektren als Kreuze dargestellt. Der Verlauf kann durch monoexponentielle Funktionen beschrieben werden, die als schwarze Linien dargestellt sind. Mit grauen Symbolen ist der „Anteil“ eines mit PCA ermittelten weiteren Spektrums dargestellt.

Unter b) ist das Ausgangsspektrum als schwarze durchgezogene Linie, das Endspektrum als schwarze gepunktete Linie und das mit PCA ermittelten Spektrums als graue gepunktete Linie dargestellt.

Ohne die Möglichkeit Änderungen in der Primärstruktur zu untersuchen und mit den beobachteten spektroskopischen Änderungen in Verbindung zu bringen ist es nicht sinnvoll die Folgen der Bestrahlung detailliert zu diskutieren. Es wurden noch Messungen durchgeführt, bei denen α -Chymotrypsinogen einer Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen 220, 200, 190 und 175 nm ausgesetzt worden ist. In allen Fällen konnte eine Zunahme von Extinktion und CD-Signal beobachtet werden. Da die Proben sich in ihrer Pfadlänge, der Anfangsextinktion und der Intensität der Lichts unterschieden und auch nur bei 200 nm ein ausreichender spektroskopischer Unterschied zwischen Ausgangs- und „Endzustand“ bestand, konnte eine eindeutige Wellenlängenabhängigkeit nicht festgestellt werden. Um weitere Informationen über die

strukturellen Änderungen an α -Chymotrypsinogen durch die Messung der CD-Spektren zu erhalten wurden im Anschluss an eine dreistündige CD-Messung am 3m-NIM-C FTIR-Spektren von bestrahlten

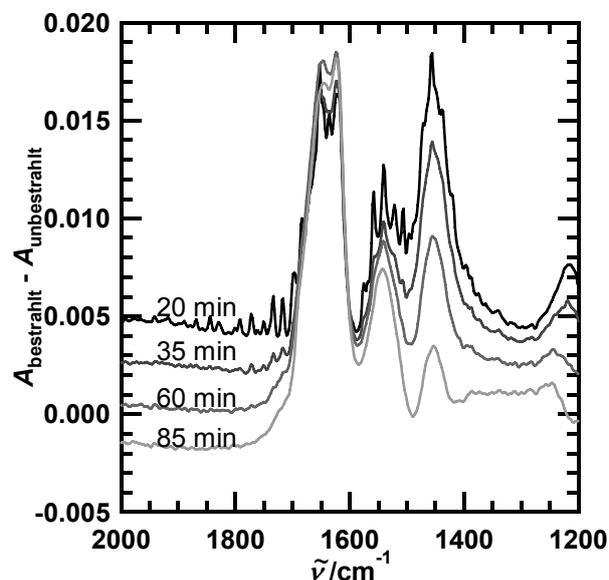


Abbildung 6.19 – FTIR-Differenzspektrum

In der Abbildung sind FTIR-Differenzspektren zwischen bestrahlten und unbestrahlten Bereich zu sehen, die zu den angegebenen Zeiten nach Abschluss einer 3h Messung am 3m-NIM-C aufgenommen worden sind. Die Messung wurde an einem mit getrockneter Druckluft gespülten Bruker IF66 Interferometer durchgeführt.

und unbestrahlten Bereichen der Probe aufgenommen. Da es in den Spektren zeitabhängig Unterschiede in der Wasserdampfabsorption und im Bereich der Basislinie zwischen 2000 und 1720 cm^{-1} gab und es infolge der Strahlenschäden zum einem erhöhten H/D-Austausch kam war eine strukturelle Interpretation der FTIR-Differenz (Abbildung 6.19) nicht möglich.

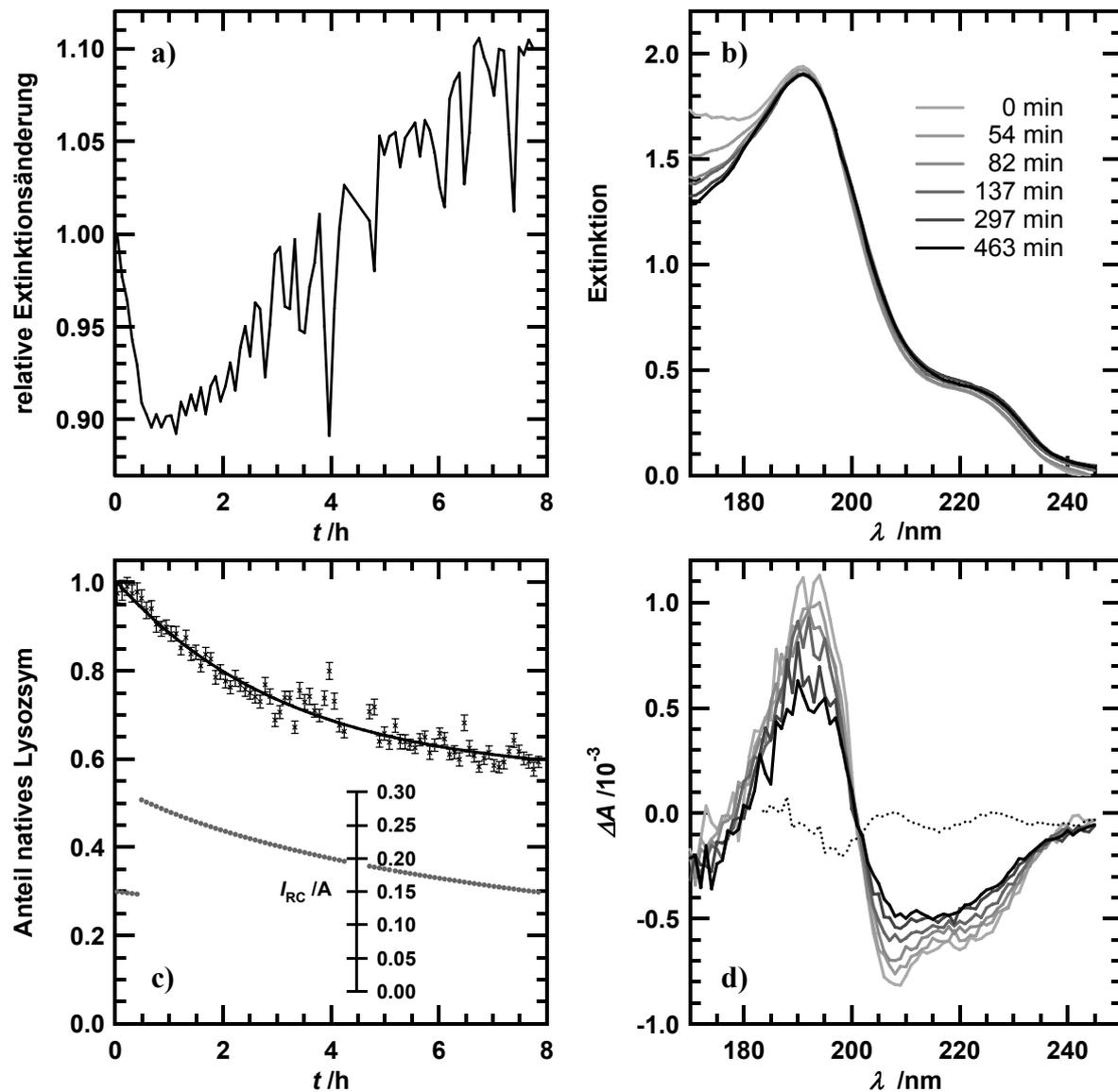


Abbildung 6.20 – Strahlenschädigung von Lysozym

Unter a) ist die relative Extinktionsänderung dargestellt.

Unter b) sind für eine Auswahl, die anhand der relativen Extinktionsänderung skalierten Extinktionswerte abgebildet.

Unter c) ist der mittels linearer Regression ermittelte Anteil des ersten Spektrums angegeben, sowie im unteren Teil der Verlauf des Ringstroms während der Messungen.

Unter d) sind die anhand der relativen Extinktionswerte skalierten CD-Spektren abgebildet, sowie als gepunktete Linie das mittlere Differenzspektrum der letzten 10 Messungen nach Abzug des unter c) angegebenen Anteils des ersten Spektrums.

Für die Aufnahme von Spektren ist nur die Rate der Schädigung von Bedeutung, da diese bestimmt über welchen Zeitraum gemessen werden kann. Im Falle von α -Chymotrypsinogen fand bei Präparationen mit

kleinen Pfadlängen ($< 5 \mu\text{m}$) schon eine Schädigung während der ersten Messung statt, die zu einer spektroskopischen Änderung von einigen Prozent führte.

Auch bei Lysozym (Abbildung 6.20) und Myoglobin (Abbildung 6.21) kam es bei einer Bestrahlung über mehrere Stunden zu einer deutlichen Änderung im CD-Spektrum.

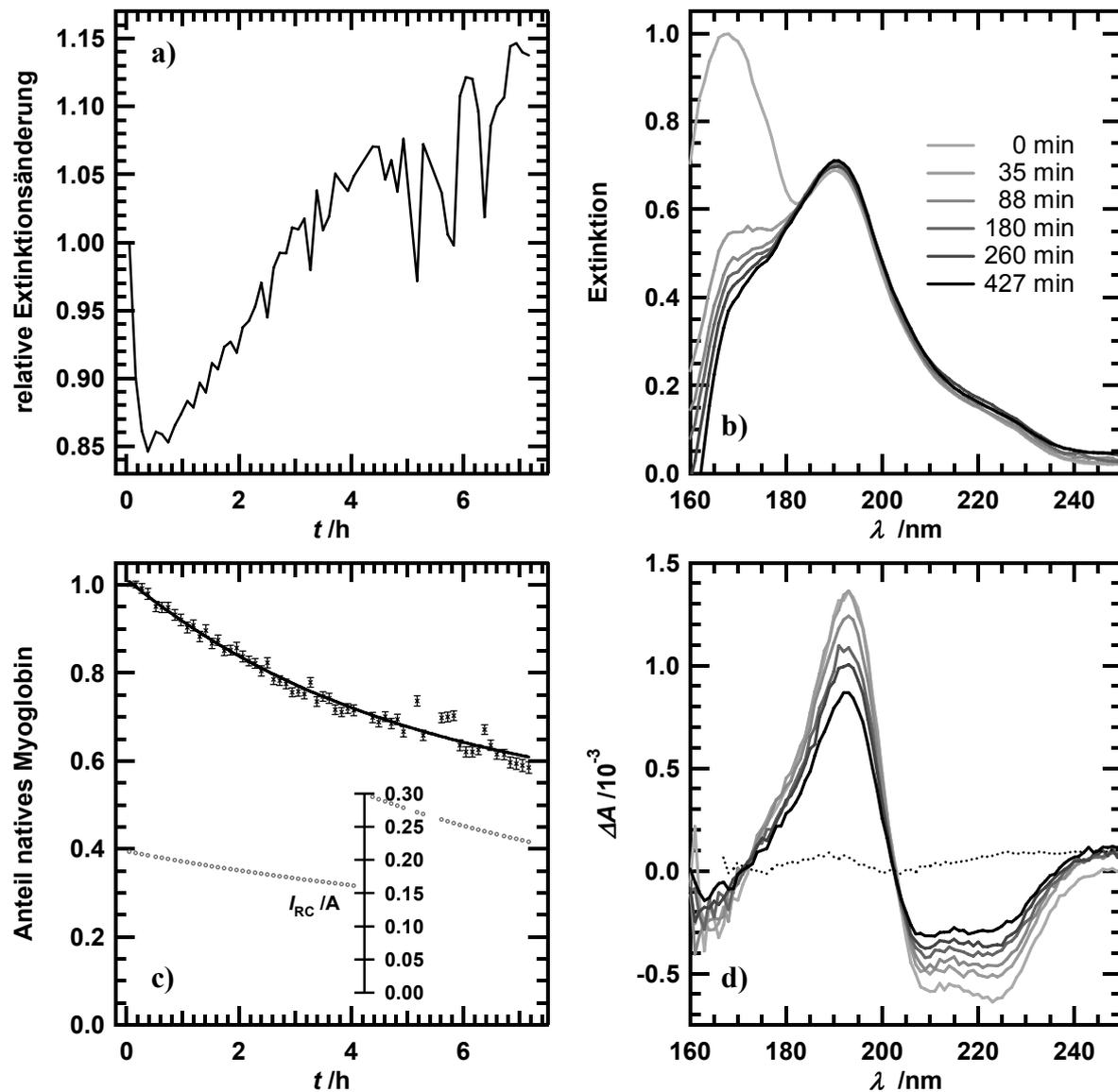


Abbildung 6.21 – Strahlenschädigung von Myoglobin

Unter a) ist die relative Extinktionsänderung dargestellt.

Unter b) sind für eine Auswahl, die anhand der relativen Extinktionsänderung skalierten Extinktionswerte abgebildet.

Unter c) ist der mittels linearer Regression ermittelte Anteil des ersten Spektrums angegeben, sowie im unteren Teil der Verlauf des Ringstroms während der Messungen.

Unter d) sind die anhand der relativen Extinktionswerte skalierten CD-Spektren abgebildet, sowie als gepunktete Linie das mittlere Differenzspektrum der letzten 10 Messungen nach Abzug des unter c) angegebenen Anteils des ersten Spektrums.

7 Diskussion

Ausdehnung des Messbereichs

Zirkulardichroismus-Messungen mit wässrigen Lösungen im UV-Bereich sind in erster Linie durch die Absorption des Lösungsmittels und durch Reste von Luft im CD-Spektrometer begrenzt. Mit geeigneter Pfadlänge (4-5 μm) und ausreichender Stickstoffspülung ($\sim 30 \text{ l min}^{-1}$) sollten, sowohl an einem SRCD-Messplatz als auch mit einem der neueren kommerziellen CD-Spektrometer, wenn dieses in gutem Zustand ist, Messungen bis 170 nm möglich sein. Da die Absorptionskante von Quarz, abhängig von Pfadlänge und Qualität bei 145 nm oder auch deutlich darüber liegt, müssen für weitergehende Messungen die optischen Elemente wie Polarisator, photoelastischer Modulator, Fenster und Küvetten aus Calcium- Lithium- oder Magnesiumfluorid gefertigt sein. Darüber hinaus sind für Messungen mit wässrigen Lösungen bis 160 nm schon Pfadlängen unter 1 μm erforderlich (siehe Anhang Tabelle A.4). Unter Verzicht auf lichtdurchlässige optische Elemente wurden auch schon CD-Messungen gezeigt, die den Bereich unterhalb von 105 nm umfassen (Tanaka *et al.* 2009). Messungen an flüssigen oder gasförmigen Proben sind unter diesen Bedingungen jedoch nicht möglich.

Für die von 2000 bis 2003 publizierten SRCD-Spektren (Wallace 2000a, Ojima *et al.* 2001, Matsuo *et al.* 2002, Matsuo *et al.* 2003) sind Pfadlänge angegeben, bei denen die Extinktion von Wasser, für den Bereich unterhalb von 170 nm deutlich über zwei liegt. Die Extinktion der Proben wurde weder gezeigt noch thematisiert. Es kann daher nicht beurteilt werden kann, ob die Pfadlängen kleiner waren und bis zu welcher Wellenlänge die gezeigten Spektren realistisch sind. In späteren Arbeiten (Wallace *et al.* 2004, Wien und Wallace 2005) werden die Absorption von Wasser zwar als limitierend erwähnt, jedoch dabei Arbeiten mit Wasserdampf zitiert (Yoshino *et al.* 1996, Chung *et al.* 2001). In der Gruppe von Kunihiko Gekko wurden ab 2004 bei deutlich reduzierter Pfadlänge nur noch Messungen bis 160 nm publiziert (Matsuo und Gekko 2004, Matsuo *et al.* 2004, Matsuo *et al.* 2005). Bis zu welcher Extinktion das CD-Signal noch zuverlässig gemessen werden kann, mag von Messplatz zu Messplatz unterschiedlich sein. Dieser Bereich wurde bei den Messungen bis 160 nm und darüber hinaus jedoch überschritten. Für Myoglobin wurden beispielsweise vier sich im Bereich unterhalb von 175 nm unterscheidende Spektren publiziert (Wallace 2000a, Matsuo *et al.* 2003, Matsuo *et al.* 2004, Wallace *et al.* 2004). Die eigenen Messungen mit Myoglobin mit geeigneter Pfadlänge (Abbildung 6.7) oder als Film (Abbildung 6.3) legen nahe, dass in diesen Fällen der zugängliche Messbereich deutlich überschätzt wurde. Die Richtigkeit der Spektren bis 160 nm (Matsuo und Gekko 2004, Matsuo *et al.* 2004, Matsuo *et al.* 2005) würde ich im Bereich unterhalb von etwa 165 nm in Frage stellen. Im Spektrum von Lysozym beispielsweise konnte der Nulldurchgang bei etwa 170 nm (Matsuo *et al.* 2004) bei eigenen Messungen erst bei etwa 160 nm beobachtet werden. Im Spektrum von Myoglobin sollte der Nulldurchgang eher bei 155 nm liegen statt bei 160 nm. Da zu den Spektren Fehlerangaben für den Bereich unterhalb von 175 nm fehlen, kann man nicht beurteilen, ob nur der statistische Fehler zu groß ist oder auch systematische Abweichungen vorliegen. Geht man davon aus, dass der Bereich von 165 bis 160 nm fehlerhaft ist, so erklärt dies auch

dass keine Verbesserung (Matsuo *et al.* 2005) bzw. eine Verschlechterung (Matsuo *et al.* 2004) der berechneten Sekundärstrukturanteile bei einer Ausdehnung des Bereiches bis 160 nm auftrat.

Die Art und Weise, in der durch B. A. Wallace SRCD mit konventioneller CD-Spektroskopie verglichen wird, ist sehr einseitig. So wurde in einigen Publikationen der Messbereich für kommerzielle CD-Spektrometer auf bis 190 nm begrenzt dargestellt (Wallace 2000a, Wallace 2000b, Wallace und Janes 2001, Wallace und Janes 2003) und in einer weiteren sogar der Bereich unterhalb von 190 nm als nur mit SRCD zugänglich gekennzeichnet (Miles und Wallace 2006). Parallel dazu werden Spektren bis 175 nm präsentiert (Lees *et al.* 2006), die so auch mit kommerziellen CD-Spektrometern messbar sind. Aus meiner Sicht kann nur mit einem schlechten Zustand des Messgeräts oder eine unzureichende Stickstoffspülung erklärt werden, dass sich der Photonenfluss bei kommerziellen CD-Messgeräten bei 180 nm im Vergleich zu 240 nm um zwei (Wallace 2000b) beziehungsweise vier Größenordnungen verringern soll (Wallace 2000a). Bei eigenen Messungen mit J-715 und J-815 CD-Spektrometern konnte nur eine Verringerung des Photonenflusses um weniger als einer Größenordnung festgestellt werden. Bei einem Chirscan CD-Spektrometer lag nahe 180 nm sogar der höchste Photonenfluss im Bereich unterhalb von 300 nm vor.

Um über die Wasserabsorptionsbande bei etwa 145 nm hinaus messen zu können, sind Pfadlängen zwischen 100 und 300 nm notwendig. Pfadlängen von etwa 1 μm und kleiner konnten durch Zusammenrücken der Probe zwischen zwei Fenstern ohne Platzhalter erreicht werden (siehe Kapitel 6.4), aber nur bei einem kleinen Teil dieser Probenpräparationen wurden so kleine Pfadlängen erreicht, dass über die Wasserabsorptionsbande bei etwa 145 nm gemessen werden konnte (z.B. Abbildung 6.9, 6.10 und 6.12). Während Probenpräparationen mit Proteinlösung über Stunden stabil waren und das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis im Bereich der Wasserabsorptionsbande durch eine größere Messzeit teilweise kompensiert werden konnte, wurde bei Präparationen mit Wasser dieses häufig schon nach 10-30 min teilweise durch Stickstoff verdrängt, entweder durch Verdunstung des Wassers oder durch Umverteilung zwischen den Fenstern. Um die Verdunstung von Wasser und die Verdrängung der Probe durch Stickstoff zu verhindern, könnten die Präparationen mit Vakuumfett abgedichtet werden. Alternativ können Calciumfluorid-Küvetten mit einer Vertiefung verwendet werden, wie sie von (Wien und Wallace 2005) beschrieben wurden. Bei diesen wird ein größeres Probenvolumen verwendet, so dass überschüssiges Probenvolumen in die Vertiefung um den Messbereich fließt. Dies verhindert, dass die Probe im Messbereich eintrocknet. Es wurden solche Calciumfluorid-Küvetten mit Pfadlängen von 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 μm von HellmaOptik gefertigt. Ob und wie reproduzierbar mit den Küvetten mit Pfadlängen von 2 μm und kleiner die entsprechende Pfadlänge mit Probe auch erreicht werden, muss noch untersucht werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass zum Erreichen der entsprechenden Pfadlängen die beiden Teile der Küvetten zusammengepresst werden müssen. Mit den schon verwendeten Küvetten dieses Typs, mit Pfadlängen von 4,2 μm ; 5,6 μm und 12,6 μm konnten noch nicht beobachtet werden, dass die erreichten Pfadlängen systematisch größer als Vertiefung der Küvetten waren. Da die Küvetten auch kombinierbar sind, sind weitere Pfadlängen bis 40 μm möglich. Es kann mit einer Proteinlösung mit hoher Proteinkonzentration, die für den jeweiligen Messbereich geeignete Pfadlänge ausgewählt und so Nah- und Fern-UV-Bereich bis 178 nm mit wenigen Messungen abgedeckt werden.

Spektren wie in Abbildung 3.2 können so mit einer Proteinkonzentration gemessen werden. Im Vergleich mit Spektren, die mit geringer Konzentration aufgenommen wurden, können konzentrationsabhängige Konformationsänderungen festgestellt oder ausgeschlossen werden.

Um bei Präparationen zwischen zwei Fenstern die Pfadlänge besser kontrollieren zu können, wäre es günstig, ein konstantes Volumen zwischen den Fenstern mit definierten Druck für eine definierte Zeit zusammenzudrücken. Dadurch sollte sich die Anzahl geeigneter Probenpräparationen, für Messungen über die Wasserabsorptionsbande hinaus, steigern lassen.

Zuverlässigkeit der CD-Messung

Die Messungen am 3m-NIM-C sind bei hoher und niedriger Probenextinktion durch systematische Fehler eingeschränkt. Am 3m-NIM-C liegt mit 0,03-0,1 % vergleichsweise viel Falschlicht vor (Abbildung 5.3), so dass bei einer Probenextinktion von zwei der Falschlichtanteil bei 3-10 % liegen kann. Der Falschlichtanteil des Messplatzes 4B8 am BSRF ist mit 0,01-0,06 % (Tao *et al.* 2009) nur geringfügig besser. Der für den CD12-Messplatz gezeigte Falschlichtanteil von 0,004-0,01 % zwischen 180 und 240 nm (Clarke und Jones 2004), sollten in diesem Messbereich zuverlässige CD-Messungen bis zu einer Extinktion von zwei erlauben. Da an den Messplätzen CD12 und 4B8 der Photonenfluss unterhalb von 150 nm aber deutlich abnimmt, wären in diesem Bereich auch mit deutlich schlechteren Messbedingungen zu rechnen. Am 3m-NIM-C nimmt unterhalb von 140 nm der Falschlichtanteil weiter zu, da hier die optischen Bauteile das Licht stärker reflektieren und absorbieren. Am U125-2_NIM ist der Falschlichtanteil mit ca. 0,001 % deutlich geringer und Messungen bis zu einer Extinktion von zwei bis drei möglich.

Bei niedriger Extinktion bzw. bei Probenpräparationen, die für Messungen über die Wasserabsorptionsbande bei 145 nm hinaus geeignet sind, ist CD-Signal sehr klein. In diesem Fall wird am 3m-NIM-C das Signal-Rausch-Verhältnis durch den systematischen Fehler der Basislinie dominiert. Die mit diesem Fehler verbundenen Schwankungen der Basislinie können unter günstigen Bedingungen (Abb. 6.10a) etwa 2 % der Signalamplitude bei 190 nm betragen, bei Messungen über die Wasserabsorptionsbande hinaus jedoch in der gleichen Größenordnung wie das CD-Signal liegen (Abb. 6.12c).

Bei den Präparationen mit kleiner Pfadlänge können durch die Präparation Spannungen in den Fenstern auftreten. Die dabei auftretende Spannungsdoppelbrechung führt im Standardaufbau (SPM) zu einem größeren systematischen Fehler des CD-Signals (siehe Abbildung 5.25). Der Einfluss von Spannungsdoppelbrechung auf das CD-Signal kann mit Hilfe eines zweiten photoelastischen Modulators deutlich reduziert werden (siehe Abbildung 5.28). Der am 3m-NIM-C auftretende systematische Fehler im CD-Signal wird dadurch aber nicht reduziert (siehe Abbildung 5.27). Die Möglichkeiten, den Einfluss von Spannungsdoppelbrechung auf das CD-Signal zu reduzieren, wurden noch nicht ausgeschöpft, da die duale Polarisationsmodulation noch nicht, wie im Artikel von Nafie (2000) beschrieben, optimal eingesetzt wurde. Eine weitere Reduktion des Einflusses von Spannungsdoppelbrechung auf das Messsignal war am 3m-NIM-C auf Grund des systematischen Fehlers jedoch nicht nachweisbar.

Ursache für den hohen systematischen Fehler am 3m-NIM-C sind Variationen in der Lage des Lichtstrahls. Die optischen Bauelemente sind nicht ideal. Die Empfindlichkeit von Photomultipliern ist beispielsweise abhängig von Position und Polarisation des Lichtstrahls. Aus diesem Grund kann eine Abhängigkeit des Messsignals vom Drehwinkels des Photomultipliers beobachtet werden (Abbildung 5.18) und für CaF₂-Fenster können verschiedene „CD-Spektren“ beobachtet werden (Abbildung 5.22). Aus dem gleichem Grund ist das CD-Signal von der Strahlage abhängig. Die Wellenlängenabhängigkeit der Strahlage an sich führt nicht zu den systematischen Fehlern, sondern die Variationen der Strahlachse die von Messung zu Messung bei gleicher Wellenlängeneinstellung in Folge der Monochromatorbewegung auftreten. In seltenen Fällen kann auch die Position des Elektronenstrahls im Speicherring nicht stabil sein. Dies führt ebenfalls zu Variationen in der Lage des Lichtstrahls.

Am U125-2_NIM ist die Lage des Lichtstrahls deutlich stabiler, so dass auch Continuous-Flow-CD-Messungen mit mikrofluidischen Mischtechniken möglich sind (Hoffmann *et al.* 2007, Kane *et al.* 2008). Der Photonenfluss ist dort aber noch geringer als am 3m-NIM-C, so dass für ein geeignetes Signal-Rausch-Verhältnis einige Stunden Messzeit erforderlich sind. Da die Lichtintensität am U125-2_NIM und 3m-NIM-C in der gleichen Größenordnung liegen (siehe Tabelle 5.1) sind bei Messungen über diesen Zeitraum bei Probenpräparationen mit kleiner Pfadlänge deutliche Strahlenschäden zu erwarten, wie sie am 3m-NIM-C (siehe Kapitel 6.5) beobachtet werden konnten.

Zu bedenken ist, dass der systematische Fehler und der Falschlichtanteil durch einen höheren Photonenfluss nicht reduziert werden. Um jedoch zuverlässig auch bei hoher Extinktion messen zu können ist nicht nur ein hoher Photonenfluss sondern auch ein niedriger Falschlichtanteil erforderlich. Ursache für das Falschlicht bei Gittermonochromatoren ist vor allem Streulicht der Nullten Beugungsordnung (Clarke und Jones 2004). Der Anteil und Einfluss von Falschlicht kann durch Optimierung des Monochromators und dem Einsatz solarblinder Photomultiplier reduziert werden (Tao *et al.* 2007). Für Messungen bis zu einer Extinktion von zwei sollte der Anteil von Falschlicht etwa vier bis fünf Größenordnungen kleiner sein als der des monochromatischen Lichts. Bei einer um eins größeren Extinktion muss der Falschlichtanteil um eine weitere Größenordnung kleiner sein. Misst man unter Bedingungen unter denen die Extinktion am Ende des Messbereichs stark ansteigt, wie beispielsweise mit Wasser bei Pfadlängen über 1 μm so kann mit einem höheren Photonenfluss und geringerem Falschlichtanteil der Messbereich nur um wenige Nanometer erweitert werden. Der Fehler ist bei hoher Extinktion auch deutlich größer und man muss daher auch länger in einem Energiebereich messen, in dem Strahlenschäden auftreten können. Daher halte ich den Ansatz mit einem höheren Photonenfluss den Messbereich auszudehnen, in dem auch bei hoher Extinktion gemessen wird, für falsch. Stattdessen die Pfadlänge und damit die Extinktion weiter zu reduzieren halte ich für den richtigen Weg, auch wenn dafür systematische Schwankungen im CD-Signal deutlich verringert werden müssen.

Die Qualität publizierten CD-Spektren kann in vielen Fällen nur schwer eingeschätzt werden. Häufig werden diese normiert und geglättet abgebildet. Angaben zu Fehlern fehlen oder sind unvollständig. Auch die Extinktionswerte werden häufig nicht gezeigt. Sind Falschlichtanteil und Basislinienstabilität bekannt

kann über Fehlerangaben und Extinktionswerte die Qualität von CD-Spektren beurteilt werden. Eine öffentlich zugängliche Datenbank (Wallace *et al.* 2006) könnte wichtige Impulse in diese Richtung setzen.

Strahlenschäden bei Messungen im UV-Bereich

Für die Ionisierung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Nikogosyan und Görner 1992) und einige aliphatische Aminosäuren (Nikogosyan und Görner 1995) ist ein Photon mit der Wellenlänge 193 nm ausreichend. Man kann daher davon ausgehen, dass im Wellenlängenbereich um 193 nm einige Prozent der absorbierten Photonen zu einer Ionisierung von Proteinen wie auch von Aminosäuren führen und auch dass für Photonen höherer Energie eine Ionisierung nicht auszuschließen ist. Während die Aminosäuren in Folge der Ionisierung häufig zersetzt werden (Nikogosyan und Görner 1992), (Nikogosyan und Görner 1995) und es bei Dipeptiden häufig zur Spaltung der Peptidbindung kommt (Mulcahy *et al.* 2000) sind in Proteinen die Folgereaktionen stark von der lokalen Umgebung abhängig. Im Inneren von Proteinen sind Reaktionen zwischen Elektron und Radikal, also die Rekombination zur ursprünglichen Struktur oder die Ausbildung einer leicht modifizierten Struktur viel wahrscheinlicher als in Bereichen wo Reaktionen mit dem Lösungsmittel möglich sind. Da auch die Stabilität der jeweiligen Proteinstruktur und deren Empfindlichkeit gegenüber von Strahlenschäden unterschiedlich sein können, muss man anhand der Stabilität der CD-Spektren entscheiden über welchen Zeitraum die Struktur „stabil“ ist. Dazu kann man einerseits feststellen, ob im Verlauf der Spektren ein Trend zu erkennen ist und diesen mit dem Fehler des gemittelten Spektrums vergleichen. Solange der Fehler größer ist als die Änderung ist das Spektrum „stabil“. Das gemittelte Spektrum kann in einem zweiten Schritt mit Spektren mit kleinerem Messbereich verglichen werden, bei denen Strahlenschäden weniger wahrscheinlich sind. Bei Messungen über einen größeren Zeitraum an den Messplätzen am BESSY sind Strahlenschäden feststellbar. Diese können wie im Fall von Chymotrypsinogen auch schon während der Messung des ersten Spektrums auftreten (Abbildung 6.17). Um die Strahlenschäden zu reduzieren, können die Proben außerhalb des Strahlfokus platziert werden, so dass die Intensität geringer ist. Sollte dies nicht ausreichen, muss man mehrere Proben des gleichen Proteins messen. Es können auch Flusszellen eingesetzt werden. Da mit Flusszellen Pfadlängen unter 1 µm nicht praktikabel sein werden, wäre mit diesen der Messbereich auf Wellenlängen oberhalb von 160 nm beschränkt. Ein Einsatz von Wasser zur Verringerung des Photonenflusses (Janes und Cuff 2005) ist kontraproduktiv, da die Absorption des Lichts durch Wasser den Messbereich begrenzt. Die Wahl eines kleineren Eintrittsspalts am Monochromator sollte jedoch die Intensität gleichmäßig über den gesamten Wellenlängenbereich reduzieren.

Mit Modellrechnungen basierend auf der Publikation von Witte (1971) (Anhang A10) wurden Änderungen der Temperatur in Folge der Bestrahlung berechnet. Die sich dabei ergebenden Temperaturerhöhungen sollten selbst bei einem hundertfachen der Leistung nicht für eine thermische Denaturierung von Proteinen ausreichen. Bei den in den Modellrechnungen verwendeten Pfadlängen wurde innerhalb von wenigen Sekunden eine konstante Temperatur erreicht. Ein Prozess, der sich in Falle von Lysozym (Abbildung 6.19) und Myoglobin (Abbildung 6.20) über Stunden erstreckt, kann daher nicht durch thermische Denaturierung erklärt werden. Eine lokale Aufheizung der Probe als Ursache für die

Denaturierung von Proteinen durch Bestrahlung mit Synchrotronstrahlung, wie durch Wien *et al.* (2005) beschrieben, kann damit ausgeschlossen werden. Die Häufigkeit der Ionisierung sollte proportional zum Photonenfluss und Intensität verhalten. Die Wahrscheinlichkeit einer mehrfachen Schädigung und Denaturierung von Proteinen sollte mit steigender Intensität aber stärker ansteigen. Eine Schwelle in der Intensität, unterhalb der auch bei längerer Bestrahlung keine Schädigung auftritt, existiert nicht, wenn die Messungen auch Wellenlängenbereiche umfasst, in denen einzelne Photonen zur Ionisierung führen. Die Art und Weise wie Miles *et al.* (2008) einen Einfluss von hoher Strahlungsintensität auf stopped-flow Messungen aufgrund der kurzen Messzeit ausschließen, halte ich für falsch. In diesem Fall muss gezeigt werden, dass man bei wenigen Messungen mit hoher Intensität das gleiche Ergebnis erhält wie bei vielen Messungen mit niedriger Intensität.

Proteinfilme

Um Spektren über die Wasserabsorptionsbande hinaus zu messen, sind Proteinfilme theoretisch eine Alternative zu sehr kleinen Pfadlängen. Bei eigenen Messungen lag aber nur mit Myoglobin (Abbildung 6.3) eine gute Übereinstimmung für die Spektren des Proteins in Lösung und als Film vor. Bei Lysozym (Abbildung 6.4 und Anhang A.6) und Concanavalin A (Abbildung 6.5 und 6.6) waren hingegen deutliche Unterschiede in den Amplituden der Extinktionswerte und der CD-Spektren sichtbar. Diese Amplitudenunterschiede nahmen mit abnehmender Wellenlänge zu. Ähnliche Unterschiede sind auch in der Arbeit von (Nesgaard *et al.* 2008) zu sehen, in der die CD-Spektren über die Extinktion bei 190 nm skaliert wurden. Meiner Meinung nach sind diese Unterschiede nicht auf einen zu geringen Wassergehalt der Proben zurückzuführen. Ein zu geringer Wassergehalt kann auch zu Änderungen in der Struktur der Proteine führen, wie die Untersuchungen von Careri *et al.* (1979) sowie von Chirgadze und Ovsepyan (1972) gezeigt haben. Der Einfluss von Lichtstreuung und eine größer werdende Abnahme der Amplituden von Extinktion und CD-Signal mit abnehmender Wellenlänge wurden schon für Suspensionen im Vergleich zur Messung mit homogener Lösung beschrieben. Liegt statt einer homogenen Lösung eine Suspension vor, so kann es durch die ungleichmäßige Verteilung zu einer Reduktion der Extinktion (Duysens 1956) und durch Lichtstreuung zu einer Erhöhung der Extinktion (Leach und Scheraga 1960) kommen. Bei Messung der Proteinfilme treten meiner Meinung nach vergleichbare Effekte auf. Eine Korrektur dieser Effekte, die auch für Suspensionen sehr schwierig sein kann (Bustamante und Maestre 1988), halte ich für Filme für ausgeschlossen. Die Proteine liegen in den Filmen wahrscheinlich in Clustern oder in mehr oder weniger geordneten kleinen aggregierten Haufen vor. Die Schichtdicke war durch zonenweises Eintrocknen positionsabhängig. Die Proteinfilme müssten in ihren Schichtdicken gleichmäßiger werden und die Aggregation oder vergleichbare Prozesse reduziert werden, um diese Effekte zu verringern. Aggregate und Mikrokristalle in Proteinfilmen führen dazu, dass diese zumindest partiell geordnet sind. In diesem Fall liegt Anisotropie vor, so dass das CD-Spektrum sich von dem in Lösung unterscheidet (Kuball *et al.* 2005). Bei Anisotropie kann auch Lineardichroismus in der Probe auftreten, der das gemessene CD-Spektrum verfälscht. In Spektren der niedermolekularen Campher-10-sulfonsäure sind beispielsweise deutliche Unterschiede zwischen den Spektren in wässriger Lösung und Filmspektren zu sehen (Anhang A10), die entweder auf Unterschiede in der Konformation

oder aber auf Anisotropie zurückzuführen sind. Nur wenn Aggregation, Anisotropie, erhöhte Lichtstreuung und die Amplitudenreduktion in den Spektren durch alternative Präparationsbedingungen für alle so präparierte Proteinfilmte ausgeschlossen werden können, stellen diese eine Alternative dar.

Ausblick

Am sich im Aufbau befindlichen neuen SRCD-Messplatz am BESSY (Seckler 2007-2010) wird der Schwerpunkt auf Continuous-Flow-CD-Messungen mit mikrofluidischen Mischern liegen. Eine stabile Strahlage und damit eine stabilere Basislinie als am 3m-NIM-C sind Voraussetzung für solche Messung und der Grund dafür, dass bisher diese Messungen am U125-2_NIM durchgeführt worden sind. Für solche Messungen ist auch ein deutlich höherer Photonenfluss wünschenswert, da dadurch die Messzeit reduziert werden kann oder Proteine auch in geringerer Ausgangskonzentration als bisher eingesetzt werden können (Kane *et al.* 2008). Für die bisherigen Versuche wurden Proteinkonzentrationen von etwa 50 g l⁻¹ eingesetzt (Hoffmann *et al.* 2007, Kane *et al.* 2008). Nur mit einem höheren Photonenfluss kann die für diese Messungen erforderliche Proteinmenge reduziert und so eine größerer Anwenderkreis erschlossen werden.

Der systematische Fehler im CD-Signal, Falschlicht und die auftretenden Strahlenschäden sind die Faktoren, die die Zuverlässigkeit der CD-Spektren im erweiterten Messbereich einschränken. Indem die Probe außerhalb des Fokus platziert wird, kann der Photonenfluss auf eine größere Fläche verteilt und so die Intensität der Strahlung und auch die Strahlenschäden reduziert werden. Eine Stabilisierung der Strahlage am 3m-NIM-C ist nicht ohne weiteres möglich. Mit einer stabileren Strahlage und einer möglichst gleichmäßigen Verteilung des Photonenflusses über eine größere Fläche sollte sich der systematische Fehler reduzieren lassen. Sollte das neue Strahlrohr einen höheren Photonenfluss und gleichzeitig einen deutlich kleineren systematischen Fehler aufweisen, so wäre es sowohl für Continuous-Flow-CD-Messungen mit mikrofluidischen Mischern als auch für Messungen mit erweitertem Messbereich geeignet. Bei den Continuous-Flow-CD-Messungen würde die Probe im Strahlfokus platziert, da Strahlenschäden aufgrund des permanenten Austauschs der Probe keinen Einfluss auf das Messsignal haben sollten. Bei Messungen mit erweitertem Messbereich müsste hingegen der Photonenfluss idealer Weise gleichmäßig auf eine möglichst große Fläche verteilt auf die Probe treffen.

Unter solchen Bedingungen und indem der Einfluss der Spannungsdoppelbrechung in den Probenfenstern auf das Messsignal durch Einsatz eine zweiten oder auch dritten photoelastischen Modulators reduziert wird, sollten auch im erweiterten Messbereich zuverlässige CD-Messungen möglich sein. Eine technische Lösung, die die Probenpräparation für kleine Pfadlängen teilweise automatisiert und den Nutzer eine Pfadlänge zwischen 100 und 300 nm reproduzierbar erreichen lässt, würde die CD-Messungen über die Wasserabsorptionsbande hinaus deutlich erleichtern.

Für eine Verbesserung der Protein-Sekundärstrukturberechnungen aus CD-Spektren sind genaue Daten bis 160 nm sicherlich ausreichend. Eine Ausdehnung bis 130 nm kann jedoch zum Verständnis der Anregungsprozesse in diesem Energiebereich beitragen. Die gewonnenen Informationen könnten zur Verbesserung theoretischer Zirkulardichroismus-Berechnungen führen. Die CD-Spektren selbst können

zur Evaluierung dieser Berechnungen eingesetzt werden. Auch für die Untersuchung von Oligo- und Polynukleotiden und vor allem von Kohlenhydraten dürfte eine erfolgreiche Ausdehnung des Messbereichs bis 130 nm von Interesse sein.

Continuous-Flow-CD-Messungen mit mikrofluidischen Mischern und CD-Messungen über die Wasserabsorptionsbande hinaus sind die beiden Anwendungsmöglichkeiten, die Synchrotronstrahlung im UV-Bereich bietet. CD-Spektren bis 170 nm sind hingegen ohne Synchrotronstrahlung möglich und mit kommerziellen CD-Spektrometern auch deutlich preiswerter.

8 Anhang

A1 Aufbau einer Datei des SRCD-Messprogramms (Version 1.5)

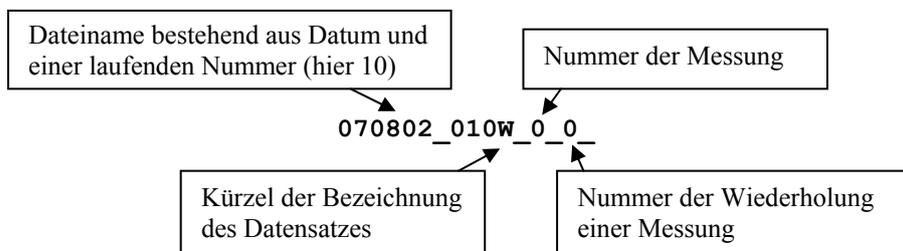
Der Aufbau einer Datei mit Messdaten ist hier anhand der Datei 070802_010.srcd gezeigt. Die Datei besteht aus zwei Teilen, dem Kopf, der Angaben über die Messeinstellungen und einige optionale vom Nutzer ausgewählte Angaben enthält und dem Datenbereich, der die Messdaten in Form einer Tabelle enthält. Als Trennzeichen werden Tabulatoren verwendet.

```

SRCDver          1.5
date             02.08.2007
time            11:17:53
Beamline        Dipol 12.1 3m NIM 1C
CPM             921-A
PEM
Microchip       no
flow rate A     none
flow rate B     none
WaitBeforePoint 0.000
CD_Faktor       1.083
Mode            1
WStart          260
WDelta          1
WStop           130
TStart
TStop           3
Repeat          0
TC              100ms
Rate            500
Sens            500µV
LStart
LDelta
LStop
SP1
SP2
SP3
SP4
SP5
Scan
070802_010W_0_0_   070802_010WE_0_0_   070802_010CD_0_0_   070802_010I_0_0_   ...
260.00079346      0.20000000      -0.00197100      1.16083057E+11    ...
258.99990845      0.20000000      -0.00226647      1.17724357E+11    ...
...               ...               ...               ...               ...

```

In einer Datei können mehrere Messungen gespeichert und jede diese Messungen kann mehrfach wiederholt worden sein. Als Betriebsmodi gibt es Wellenlängenabhängige Messungen, kinetische Messungen bei konstanter Wellenlänge mit und ohne Stopped-Flow, Drehwinkelabhängige Messungen und Positionsabhängige Messungen (z.B. Continuous-Flow-Messungen mit einem Mikrochip). Die Bezeichnung eines Datensatzes ist wie folgt aufgebaut:



Die Kürzel und ihre Bedeutung sind in der Tabelle auf der folgenden Seite angegeben, die Erweiterung eines Kürzel um ein E steht für die zugehörige Standardabweichung, die Erweiterung um EE für den Fehler des entsprechenden Wertes. Sind als Werte in einem Datensatz ausschließlich Null angegeben so ist dieser Datensatz nicht in gebrauch.

Kürzel*1	Bezeichnung / Bedeutung	Einheit	Standard- abweichung	Fehler
W	Wellenlänge	nm	WE*2	--
AC	Wechselstromamplitude des Channel-Photomultipliers (CPMs) entsprechende Spannung	V	ACE	ACEE
DC	Gleichstrom des CPMs entsprechende Spannung	V	DCE	DCEE
HV	Hochspannung des CPMs	kV	HVE	HVEE
CD	Elliptizität (berechnet)	grad	CDE	CDEE
LXY	Phase des Lock-In Verstärkers		LXYE	LXYEE
CDK	Elliptizität (berechnet unter Berücksichtigung von LXY)	grad	CDKE	CDKEE
I	Auf 0,1 A Ringstrom skalierter Photonenfluss, berechnet anhand der Hochspannung unter Verwendung der Herstellerangaben für Quanteneffizienz und Verstärkung	Photonen s ⁻¹ @ 0,1A Ringstrom	IE	IEE
R	Ringstrom	mA	--	--
OV	vertikaler Orbit des Elektronenstrahls		--	--
OH	horizontaler Orbit des Elektronenstrahls (nur Undulator)		--	--
GAP	Spaltgröße Undulator		--	--
MT	Messzeit des Messpunktes	s	--	--
SEN	Empfindlichkeit des Lock-In Verstärkers	AU*3	--	--
TC	Zeitkonstante des Lock-In Verstärkers	AU*3	--	--
KE	Strommessung Keithley 6514 System Electrometer (z. B. Spiegelstrom)	A	KEE	KEEE
VC	Steuerspannung PEM	V (0-5)	--	--
VCN	Steuerspannung 2. PEM	V	--	--
PX	x-Position	mm	--	PXEE
PY	y-Position	mm	--	PYEE
PZ	z-Position	mm	--	PZEE
PA	Winkel Drehtisch	grad	--	PAEE
PD	Diagonale Position entlang einer durch die Punkte P ₁ (x ₁ ;y ₁) und P ₂ (x ₂ ;y ₂) definierten Strecke	mm	--	PDEE
T	Zeit	s	--	--
SP1-SP4	Nutzerangabe z.B. Größe Austrittspalt	--	--	--

*1 Weitere in der Tabelle nicht aufgeführte Datensätze sind waren während meiner Arbeit noch nicht in Gebrauch und sind erst bei Einbau eines zweiten Photomultipliers, der Verwendung eines zweiten Lock-In Verstärkers oder eines dritten photoelastischen Modulators von Bedeutung.

*2 Die Standardabweichung der Wellenlänge wird bei einer Messung nicht bestimmt. Der für den Messplatz 3m-NIM-C angegebene Wert von 0,2 nm besagt nur, dass die systematische Abweichung der Lage der Stickstoff-Absorptionsbande bei 145 nm an Ende eines Messtages in etwa 60 % der Fälle innerhalb von 0,2 nm und in etwa 95 % der Fälle innerhalb von 0,4 nm lag.

*3 Empfindlichkeit und Zeitkonstante, konnten stufenweise geregelt werden. Beide Werte sind im Kopf der Datei angegeben. Anstelle dieser Werte ist im Datensatz der programminterne Nummernkode der Stufen angegeben.

Tabelle A.1 – Datensätze der Messdaten am SRCD-Experiment

A2 Abhängigkeit der Stickstoffabsorptionsbande von der Größe des Austrittsspalts

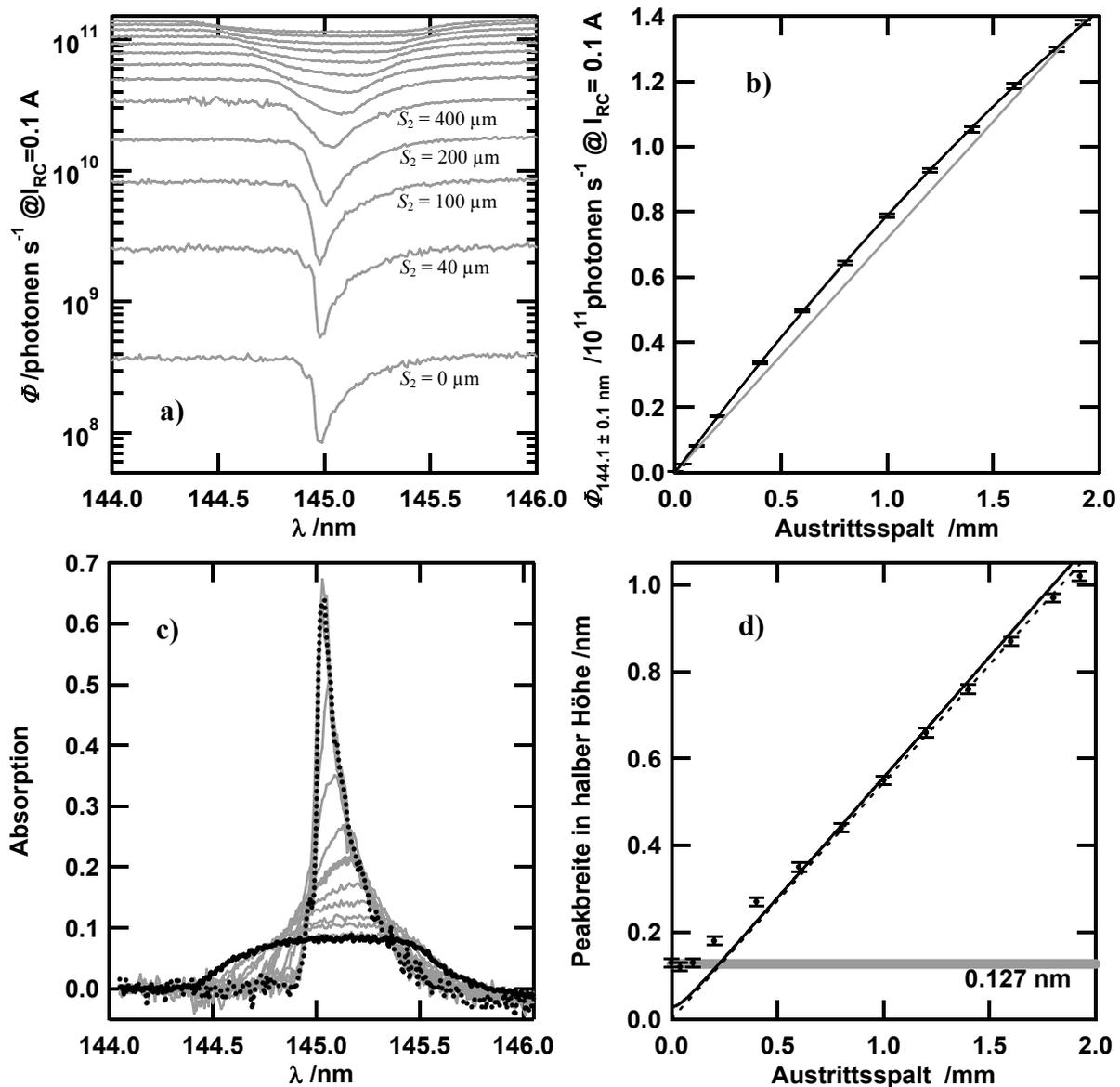


Abbildung A.1 – Stickstoffabsorption & Spektrale Bandbreite

- Zeigt den aus der Hochspannung berechneten, auf einen Ringstrom von 0,1 A normierten Photonenfluss.
- Die Punkte mit Fehlerbalken zeigen den mittleren Photonenfluss im Bereich von 144,0 bis 144,2 nm, die schwarze Linie ist ein Regressionskurve mit einem Polynom 2. Ordnung und mit der grauen Linie ist der Punkt bei der größten Spaltbreite mit dem Koordinatenursprung verbunden. Der bei einer Spaltbreite von 2,0 mm gemessene Punkt wurde auf 1,925 mm verschoben, da Photonenfluss und die Breite des Stickstoffabsorptionsbande auf eine kleinere Spaltbreite deuten und eine Spaltbreite von 2,0 mm bei maximal geöffnetem Austrittsspalt daher wahrscheinlich nicht erreicht wird.
- Zeigt die Stickstoffabsorptionsbande in Abhängigkeit vom Austrittsspalt, die unter der Verwendung der zuvor genannten Mittelwerte als Φ_0 berechnet wurden. Die schwarze durchgezogene Linie wurde für einen Austrittsspalt von 1,925 mm, die dicke graue Linie für einen Austrittsspalt von 0,6 mm und die schwarze gepunktet Linie für einen Austrittsspalt von 100 μm berechnet. Die Absorptionsbanden bei 0, 40 und 100 μm Austrittsspalt unterscheiden sich im Rahmen des Fehlers nicht.
- Die Punkte mit Fehlerbalken zeigen die Breite der Absorptionsbande in halber Höhe. Die schwarze durchgezogene Linie ist die über Gleichung 5.1 berechnete spektrale Bandbreite am 3m-NIM. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt eine lineare Regression mit einem Achsenabschnitt von Null ohne Berücksichtigung der vier Punkte mit einem Austrittsspalt zwischen 0 und 0,2 mm. Die dicke graue Linie zeigt die mittlere Breite der Absorptionsbande für die Messungen mit 0 bis 0,1 mm Austrittsspalt.

Die Stickstoffabsorptionsbande im Bereich von 144 bis 146 nm mit einem Punktabstand von 0,01 nm gemessen (Abbildung A.1a)). Der beobachtete Zusammenhang zwischen Photonenfluss neben der beobachteten Stickstoffabsorptionsbande und der Größe des Austrittspalts war nicht linear, wie in Abbildung A.1b) zu sehen ist. Da nur der Austrittspalt variiert wird, sollte zwischen Photonenfluss und Spaltbreite im Idealfall ein linearer Zusammenhang bestehen.

Die Messungen deuten darauf hin, dass man bei maximal geöffnetem Austrittsspalt eine Spaltbreite von 2,0 mm noch nicht erreicht hat und auch bei geschlossenem Spalt kommt noch Licht am Detektor an. Die für Spaltbreiten zwischen 0,6 und 1,6 mm beobachtete Breite der Stickstoffabsorptionsbande (Abbildung A.1d)) passt zu den mit Gleichung 5.1 berechneten spektralen Bandbreiten. Bei kleineren Spaltbreiten ist die beobachtete Breite der Absorptionsbande größer als für eine einzelne Absorptionslinie zu erwarten wäre und erreicht ein Plateau bei einer Breite von 0,127 nm. Die kleinste spektrale Bandbreite ist wahrscheinlich etwas kleiner, da mehrere Stickstoffabsorptionslinien (Tilford *et al.* 1966) innerhalb dieses Wellenlängenbereichs liegen. Aus diesem Grund ändert sich auch die Position des Maximums bei Änderung des Austrittspalts.

A3 Bestimmung des Strahlquerschnitts - Parameter der bestimmten Gaußfunktionen

y-Position	3.75 mm	4.00 mm	4.50 mm	5.00 mm	5.50 mm	6.00 mm
A /10 ¹⁰	0.43±0.02	1.12±0.04	1.94±0.03	3.51±0.03	3.73±0.04	3.05±0.06
x _m /mm	4.849±0.011	4.836±0.012	4.667±0.006	4.491±0.004	4.507±0.004	4.412±0.006
x _½ /mm	0.57±0.02	0.69±0.03	0.83±0.01	0.85±0.01	0.83±0.01	0.67±0.02
A ₁ /10 ¹⁰	0.162±0.003	0.532±0.010	1.79±0.03	3.65±0.01	3.84±0.01	3.10±0.03
x _{m,1} /mm	4.451±0.009	4.469±0.010	4.574±0.018	4.492±0.002	4.493±0.002	4.499±0.004
x _{½,1} /mm	0.49±0.01	0.53±0.01	0.66±0.06	0.68±0.02	0.68±0.02	0.50±0.01
A ₂ /10 ¹⁰	0.33±0.05	1.02±0.06	0.16±0.07	0.64±0.06	0.49±0.05	1.18±0.04
x _{m,2} /mm	4.826±0.019	4.877±0.011	4.088±0.018	3.974±0.009	3.991±0.008	4.057±0.009
x _{½,2} /mm	0.30±0.02	0.35±0.02	0.28±0.08	0.37±0.02	0.32±0.02	0.44±0.01
A ₃ /10 ¹⁰	0.27±0.06	0.52±0.09	0.88±0.18	0.72±0.04	0.79±0.05	--
x _{m,3} /mm	5.02±0.02	5.10±0.01	5.00±0.01	5.04±0.01	5.01±0.01	--
x _{½,3} /mm	0.29±0.01	0.27±0.01	0.39±0.03	0.33±0.01	0.33±0.01	--

Tabelle A.2 – Parameter des ersten Tages

y-Position	3.75 mm	4.25 mm	4.75 mm	5.25 mm	5.75 mm	6.15 mm	6.25 mm
A /10 ¹⁰	0.32±0.02	0.88±0.05	2.50±0.06	2.90±0.08	2.66±0.09	1.99±0.11	1.68±0.09
x _m /mm	4.89±0.02	4.70±0.03	4.42±0.01	4.39±0.02	4.38±0.02	4.31±0.03	4.34±0.03
x _½ /mm	0.59±0.04	1.10±0.08	1.09±0.03	1.14±0.04	1.16±0.05	1.10±0.07	1.10±0.07
A ₁ /10 ¹⁰	0.10±0.02	0.41±0.36	2.75±0.01	3.23±0.01	3.03±0.01	1.9±3.1	1.9±1.6
x _{m,1} /mm	4.47±0.11	4.61±0.28	4.524±0.003	4.510±0.002	4.545±0.002	4.58±0.11	4.60±0.07
x _{½,1} /mm	0.66±0.43	0.60±0.79	0.61±0.02	0.59±0.01	0.59±0.01	0.45±0.05	0.47±0.04
A ₂ /10 ¹⁰	0.07±0.07	0.52±0.21	1.44±0.02	1.86±0.02	1.82±0.01	1.46±0.08	1.13±0.63
x _{m,2} /mm	4.06±0.04	4.08±0.09	3.89±0.01	3.87±0.01	3.87±0.01	3.81±0.02	3.82±0.11
x _{½,2} /mm	0.41±0.11	0.54±0.07	0.52±0.01	0.52±0.01	0.54±0.01	0.55±0.03	0.52±0.08
A ₃ /10 ¹⁰	0.34±0.03	0.99±0.78	0.65±0.04	0.84±0.04	0.52±0.02	0.9±2.4	0.6±1.1
x _{m,3} /mm	4.95±0.01	4.95±0.04	5.03±0.01	5.02±0.01	5.08±0.01	4.36±0.50	4.27±0.33
x _{½,3} /mm	0.40±0.01	0.43±0.06	0.37±0.02	0.40±0.01	0.38±0.02	0.5±0.4	0.6±1.1

Tabelle A.3 – Parameter des zweiten Tages

- A, A₁, A₂, A₃ – Amplitude der Gaußfunktion
x_m, x_{m,1}, x_{m,2}, x_{m,3} – x-Position/Maximum der Gaußfunktion
x_½, x_{½,1}, x_{½,2}, x_{½,3} – Halbwertsbreite der Gaußfunktion

A4 Stabilität der Basislinie am 3m-NIM-C

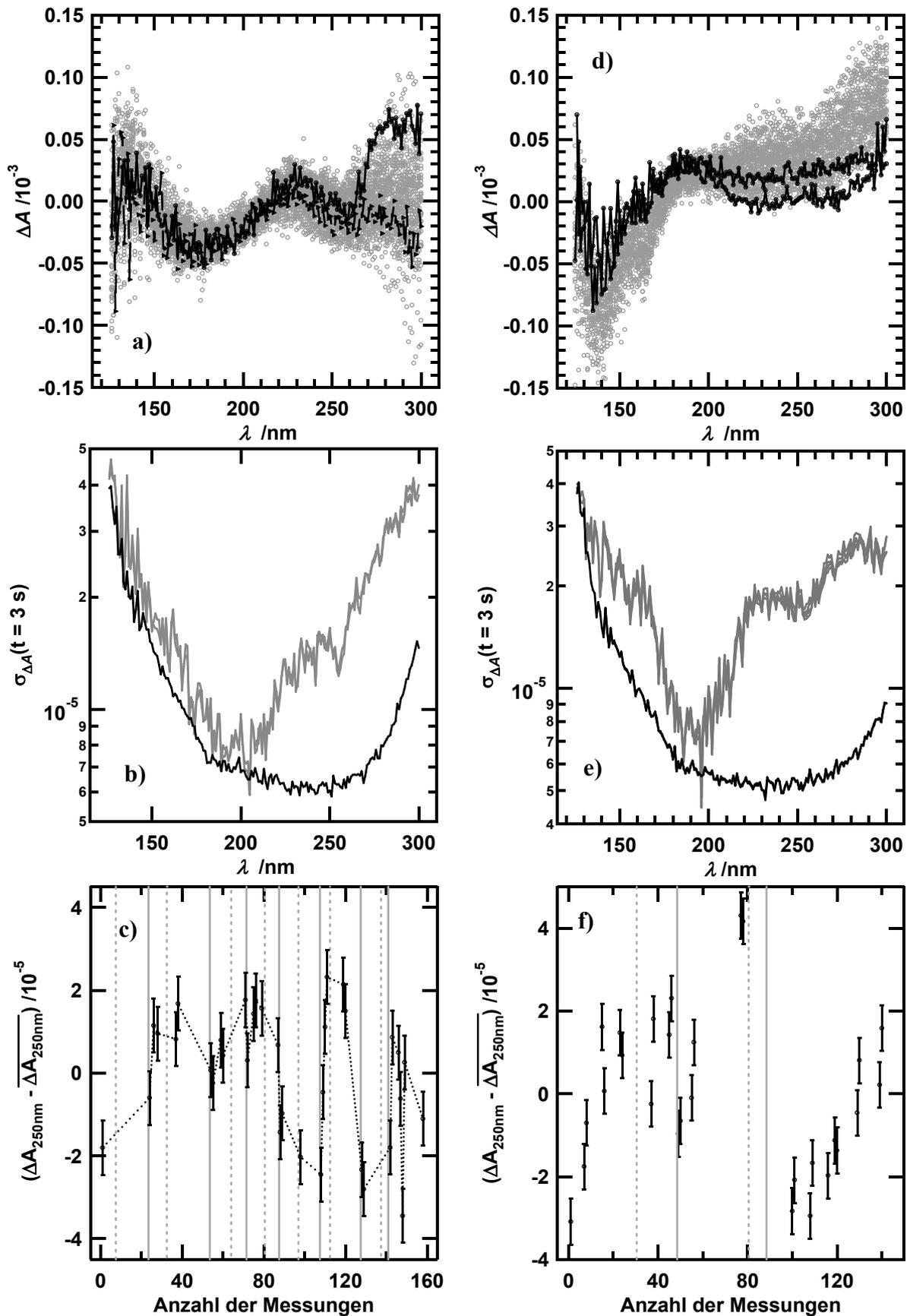


Abbildung A.2 – Stabilität der Basislinie am 3m-NIM-C

Legende auf der folgenden Seite

Abbildung A.2 – Stabilität der Basislinie am 3m-NIM-C

Die in einem Zeitraum von drei Wochen (a) und an drei Tagen (d) aufgenommenen Punkte von Gerätebasislinien sind als graue Kreise dargestellt. Innerhalb dieser Zeiträume fand kein Nutzerwechsel und keine Ausrichtung des Messaufbaus statt. Für jeweils zwei aufeinander folgende Basislinien sind die Kreise in schwarz mit Linien verbunden abgebildet. Der Mittelwert der Fehler der Punkte einer Wellenlänge sind unter (b) und (e) als schwarze Linien abgebildet, die Standardabweichung der Punkte einer Wellenlänge als graue Linie. Die Abweichungen der Messpunkte bei 250 nm vom Mittelwert sind unter (c) und (f) dargestellt. Die Fehler der einzelnen Messpunkte sind in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die durchgezogenen grauen senkrechten Geraden zeigen Pausen von mehr als acht Stunden an. Die gestrichelten grauen Geraden zeigen eine Injektion an.

A5 Stabilität der Basislinie am U125-2_NIM

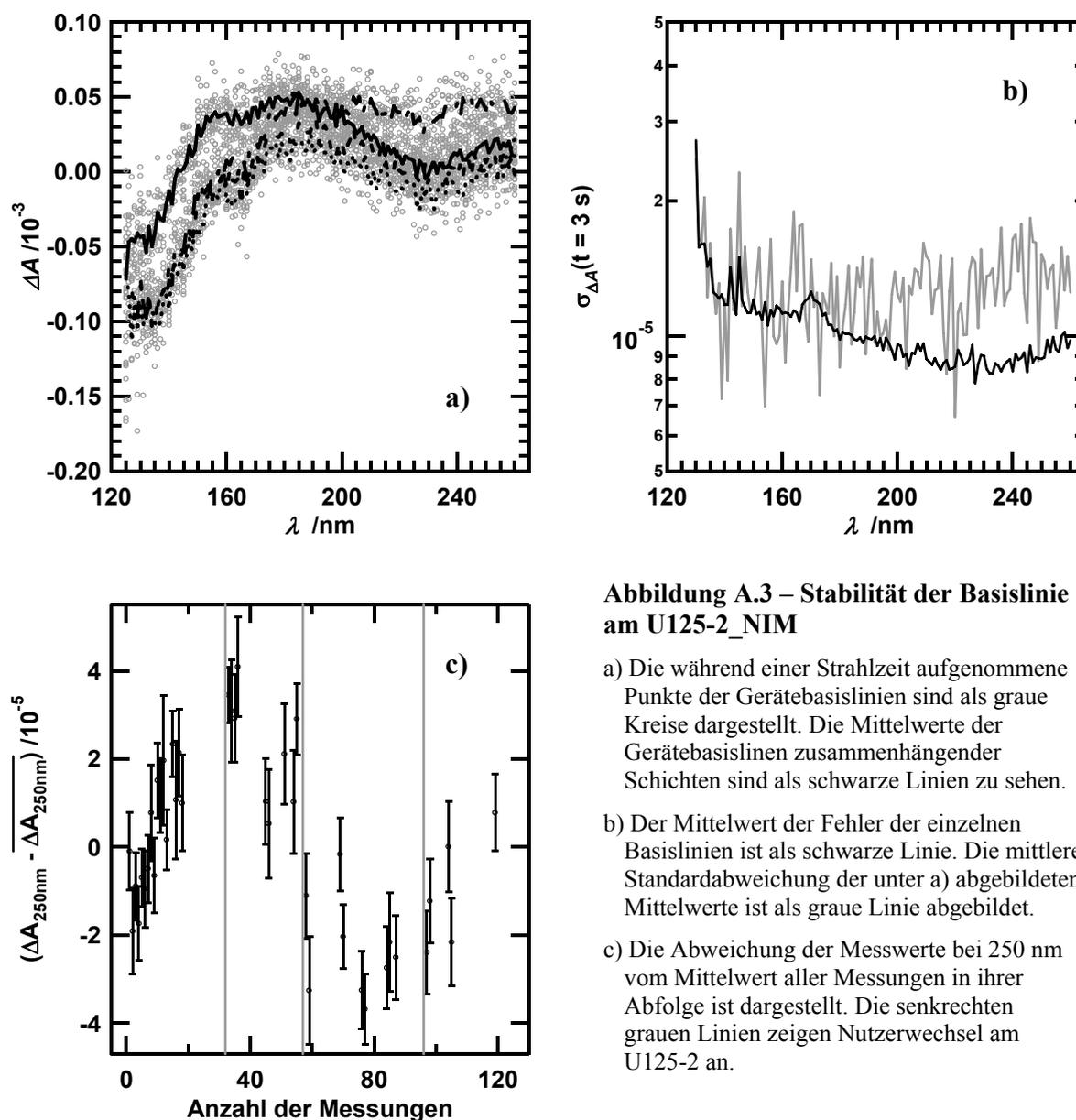


Abbildung A.3 – Stabilität der Basislinie am U125-2_NIM

- Die während einer Strahlzeit aufgenommene Punkte der Gerätebasislinien sind als graue Kreise dargestellt. Die Mittelwerte der Gerätebasislinien zusammenhängender Schichten sind als schwarze Linien zu sehen.
- Der Mittelwert der Fehler der einzelnen Basislinien ist als schwarze Linie. Die mittlere Standardabweichung der unter a) abgebildeten Mittelwerte ist als graue Linie abgebildet.
- Die Abweichung der Messwerte bei 250 nm vom Mittelwert aller Messungen in ihrer Abfolge ist dargestellt. Die senkrechten grauen Linien zeigen Nutzerwechsel am U125-2 an.

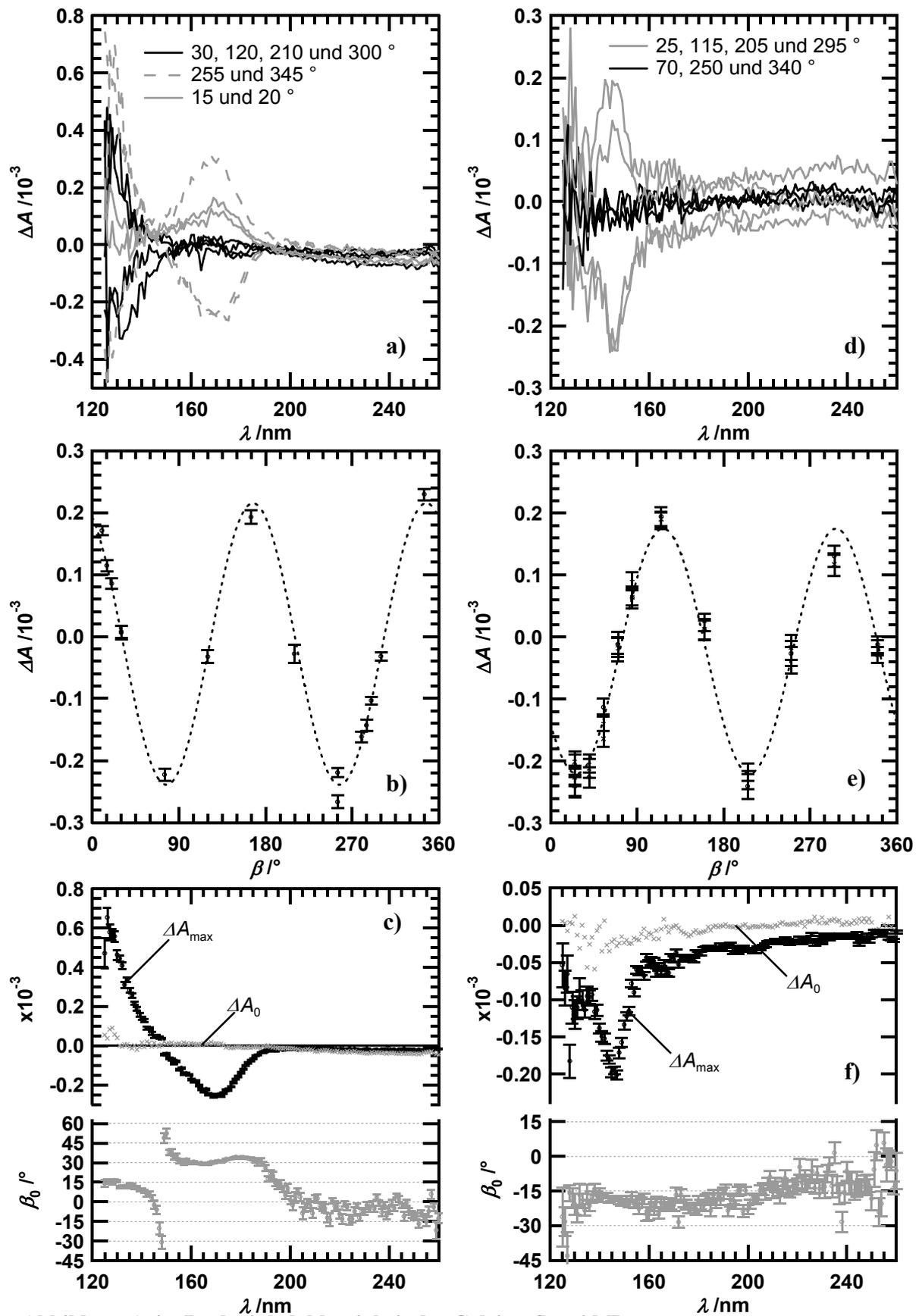
A6 Drehwinkelabhängigkeit des CD-Signals von CaF_2 -Fenstern

Abbildung A.4 – Drehwinkelabhängigkeit der Calciumfluorid-Fenster

Teil 1: rechteckiger Calciumfluorid Fenster der Firma Hellma (a-c) und Korth (d-f)

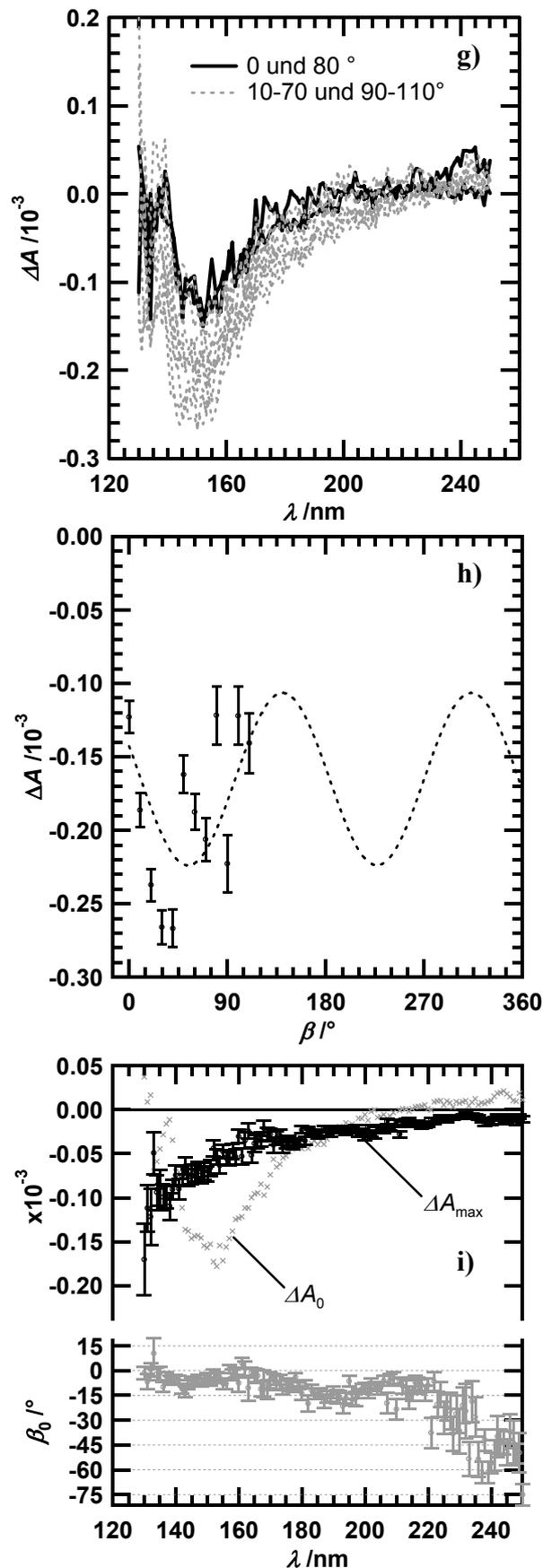


Abbildung A.4 – Drehwinkelabhängigkeit der Calciumfluorid-Fenster

Teil 2: runde Calciumfluorid Fenster von Korth (g-i)

In der Abbildung ist die Drehwinkelabhängigkeit für drei verschiedene Calciumfluoridfenster gezeigt. Die untereinander stehenden Diagramme gehören zu jeweils einem Fenster.

Die jeweils obersten Diagramme (a,d und g) zeigen eine Auswahl an CD-Spektren bei verschiedenen Drehwinkeln, von denen die mit dem geringsten CD-Signal in schwarz dargestellt sind.

Die mittleren Diagramme zeigen bei b) 175 nm, e) 145 nm, h) 150 nm die Messwerte als Kreise mit Fehlerbalken und die der Gleichung 5.8 entsprechende Regression als gestrichelte Linie.

Die unteren Diagramme zeigen die Ergebnisse der Regressionen. Im oberen Teil sind die drehwinkelabhängigen Anteile des Messsignals (ΔA_{max}) in schwarz der drehwinkelunabhängige Anteile (ΔA_0) in grau dargestellt. Im unteren Teil sind die optimalen Drehwinkel dargestellt.

A7 Wasserabsorption

λ /nm	A(1cm)	A(1mm)	A(0.1mm)	A(0.01mm)	A(1 μ m)	A(0.1 μ m)
195	0.10	0.01				
194	0.11	0.01				
193	0.14	0.01				
192	0.17	0.02				
191	0.21	0.02				
190	0.29	0.03				
189	0.40	0.04				
188	0.58	0.06				
187	0.87	0.09	0.01			
186	1.29	0.13	0.01			
185	1.94	0.19	0.02			
184		0.30	0.03			
183		0.48	0.05			
182		0.74	0.07			
181		1.20	0.12	0.01		
180		1.87	0.19	0.02		
179			0.30	0.03		
178			0.47	0.05		
177			0.75	0.07		
176			1.21	0.12	0.01	
175			1.98	0.20	0.02	
174				0.32	0.03	
173				0.51	0.05	
172				0.82	0.08	0.01
171				1.29	0.13	0.01
170				1.96	0.20	0.02
169					0.29	0.03
168					0.43	0.04
167					0.62	0.06
166					0.88	0.09
165					1.23	0.12
164					1.65	0.17
163					2.14	0.21
162						0.27
161						0.33
160						0.37
159						0.43
158						0.48
157						0.52
156						0.56
155						0.60
154						0.64
153						0.68
152						0.71
151						0.74
150						0.76
150						0.77
149						0.79
148						0.81
147						0.84
146						0.86
145						0.87
144						0.87
143						0.86
142						0.84
141						0.80
140						0.75
139						0.70
138						0.66
137						0.61
136						0.57
135						0.56
134						0.55
133						0.57
132						0.61
131						0.63
130						0.67
129						0.71
128						0.77
127						0.82
126						0.88
125						1.00

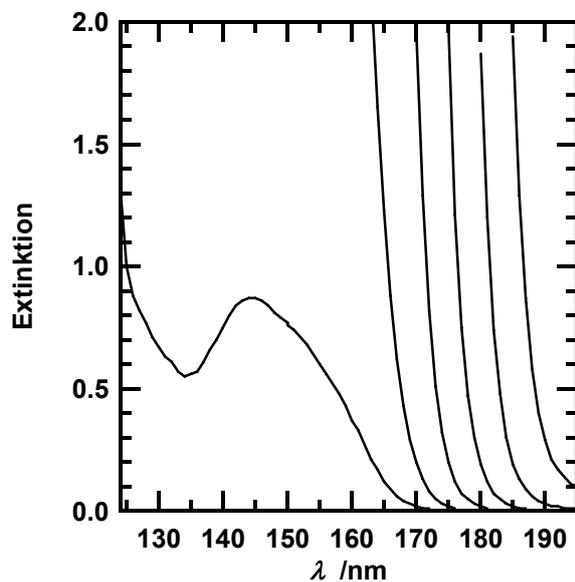


Tabelle A.4 – Extinktionswerte von Wasser

A8 Spektren von Lysozymfilmen verschiedener Schichtdicke

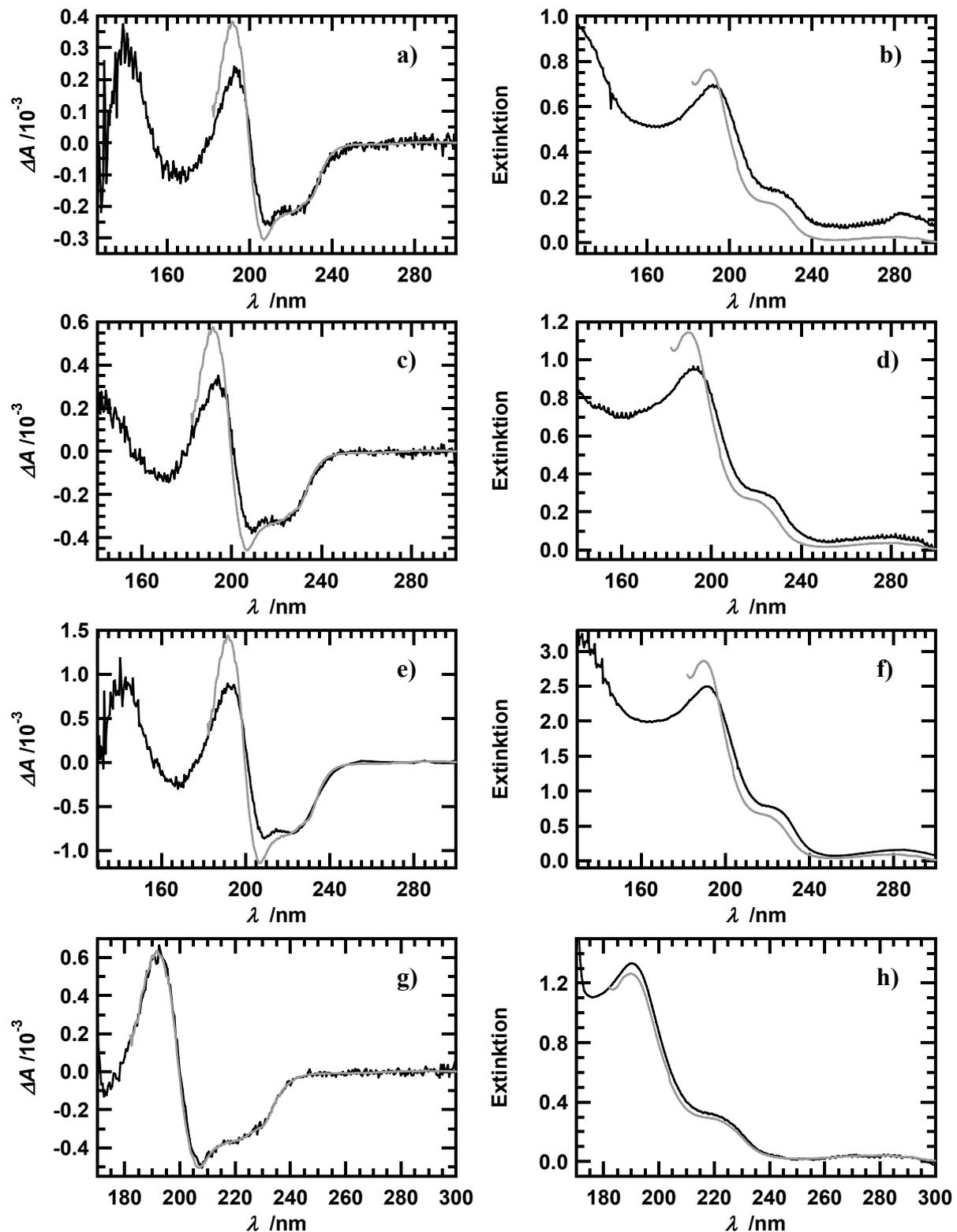


Abbildung A.6 – Lysozymfilme unterschiedlicher Schichtdicke

Unter Abbildung A.6 a), c) und e) sind am 3m-NIM-C gemessene CD-Spektren von Lysozymfilmen zunehmender Schichtdicke als schwarze Linie dargestellt. Ein am J-715 CD-Spektrometer gemessenes Vergleichsspektrum einer Lysozymlösung, das über den Bereich von 260-220 nm skaliert wurde, ist jeweils als graue Linie abgebildet. Unter b), d) und f) sind die dazugehörigen Extinktionsspektren abgebildet. Abbildung g) und h) zeigt, dass die Spektren einer Lysozymlösung, die am 3m-NIM-C und am J-715 gemessen wurde, nahezu identisch sind.

A9 Campher-10-sulfonsäure

Wässrige Lösungen von 1*S*(+)-Campher-10-sulfonsäure oder deren Ammoniumsalz (ACS) werden häufig zur Überprüfung oder Kalibrierung von CD-Spektrometern eingesetzt. Am BESSY konnten so Fehler in der Berechnung des CD-Signals festgestellt und behoben werden.

Das CD-Spektrum von Camphersulfonsäure (CSA) in wässriger Lösung ist in Abbildung A.7a) dargestellt. Das abgebildete CD-Spektrum ist das gewichtete Mittel zahlreicher Messungen. Dabei wurden der statistische Fehler und die Schwankungen der Basislinie berücksichtigt und bei Messungen mit 1*R*(-)-Campher-10-sulfonsäure das Vorzeichen umgekehrt. Die Messwerte mit einer Extinktion von über zwei wurden nicht berücksichtigt. Fehler sowie Extinktionswerte sind in Abbildung A.7b) dargestellt. Die Konzentration wurde für einige Messungen über den Extinktionskoeffizienten ermittelt (Chen und Yang 1977, Miles *et al.* 2004). Über Konzentration und Pfadlänge ergeben sich folgende Werte zum Vergleich mit der Literatur.

$\Delta\epsilon_{291 \text{ nm}}$	$2,36 \pm 0,04$	$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$		$\Delta\epsilon_{192 \text{ nm}} / \Delta\epsilon_{291 \text{ nm}} =$	$-2,07 \pm 0,05$
$\Delta\epsilon_{192 \text{ nm}}$	$-4,89 \pm 0,09$	$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$			
Nulldurchgang	$168,1 \pm 0,8$	nm			
$\Delta\epsilon_{158 \text{ nm}}$	$7,8 \pm 0,8$	$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$			

Der Wert bei 291 nm stimmt mit den Literaturwerten (Chen und Yang 1977, Schippers und Dekkers 1981, Hennessey und Johnson 1982) überein. Der Wert bei 192 nm entspricht dem von Hennessey und Johnson (1982) und liegt über dem von Chen und Yang (1977). Werte für die CD-Bande bei 158 nm wurden bisher noch nicht veröffentlicht. Unterhalb von 156 nm konnte bei den Messungen ein Abfall des CD-Signals beobachtet werden. Da die Extinktion bei allen Messungen in wässriger Lösung unter 156 nm einen Wert von zwei überschritten hat ist es nicht möglich zu unterscheiden ob dies dem realen Verlauf entspricht oder der Abfall des CD-Signals auf den zunehmenden Falschlichtanteil zurückzuführen ist.

Die Spektren einiger, aus wässriger Lösung hergestellter Filme von 1*S*(+)-Campher-10-sulfonsäure und 1*R*(-)-Campher-10-sulfonsäure sind in Abbildung A.7c) und d) dargestellt. Im Vergleich sind die CD-Bande bei 158 nm und 291 nm zwar ähnlich, im Bereich um 190 nm sind aber deutliche Unterschiede zu sehen. Im CD-Spektrum der Filmpräparationen ist die Bande auf etwa 188 nm verschoben und hat eine deutlich größere Amplitude. Die Schulter im Spektrum der wässrigen Lösungen bei etwa 180 nm kann für Filme nicht beobachtet werden. Ob Unterschiede in der Konformation oder eine Anisotropie der Filme Ursache für die Veränderungen im CD-Spektrum sind ist unklar.

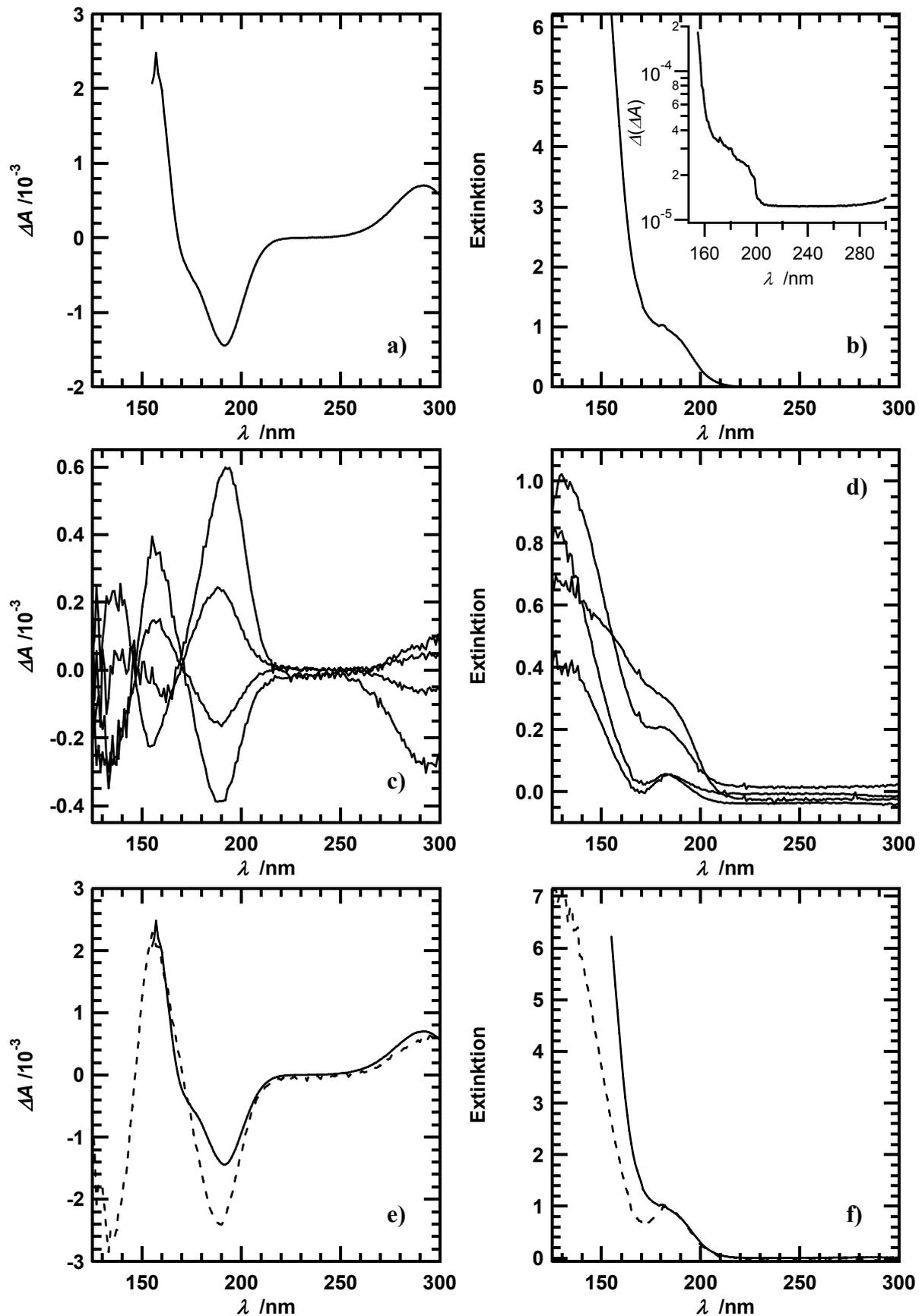


Abbildung A.7 – Campher-10-sulfonsäure

Unter a) ist das anhand zahlreicher Messungen in wässriger Lösung ermittelte CD-Spektrum von 1*S*(+)-Campher-10-sulfonsäure abgebildet, unter b) sind Extinktion und Fehler abgebildet. Unter c) sind die CD-Spektren, unter d) die Extinktion einiger Filmpräparationen zu sehen. Abbildung e) und f) zeigt die Spektren zum Vergleich.

A10 Berechnung der raum-zeitlichen Temperaturverteilung, bei Bestrahlung

Um den Einfluss der Synchrotronstrahlung auf die Proben temperatur abzuschätzen wurde basierend auf der Publikation von Witte 1971 die raum-zeitlichen Temperaturverteilung in einem Wasserfilm berechnet. Dabei wurde die Probenzelle nicht berücksichtigt, von einer vollständigen Absorption der Strahlung ($A \geq 2$) durch die Probe ausgegangen und die Ungleichverteilung der Leistungsaufnahme nicht berücksichtigt. Der äußere Rand der der Probe wird auf eine konstante Temperatur T_0 temperiert.

$$T(r, t) = T_0 + \sum_{k=1}^{\infty} J_0(\lambda_k r) \frac{2J_1(\lambda_k r_{SR}) r_{SR} \frac{P}{\pi r_{SR}^2 d}}{r_P^2 \lambda_k \left(\kappa \lambda_k^2 + \frac{8\sigma_E}{d} T_0^3 \right) J_1^2(\lambda_k r_P)} \left(1 - e^{-\left(\frac{\kappa}{C_T \rho} \lambda_k^2 + \frac{8\sigma_E}{d C_T \rho} T_0^3 \right) t} \right) \quad (\text{Gl. A.1})$$

λ_k Eigenwerte für $J_0(\lambda_k r_P) = 0$, $P = 1 \mu\text{W}$ Leistung, $r_{SR} = 1 \text{ mm}$ Synchrotronstrahlradius
 Probeneigenschaften: $r_P = 10 \text{ mm}$ Radius, $T_0 = 298 \text{ K}$, $d = 10 \mu\text{m}, 5 \mu\text{m}, 2 \mu\text{m}, 1 \mu\text{m}$ Schichtdicke,
 $C_T = 4187 \text{ J}/(\text{kg K})$ Wärmekapazität, $\rho = 1 \text{ g cm}^{-3}$ Dichte, $\kappa = 0,597 \text{ W}/(\text{m K})$ Wärmeleitfähigkeit
 $\sigma_E = 5,67 \cdot 10^{-8} \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-4}$ Emissionsverhalten (schwarzer Körper)

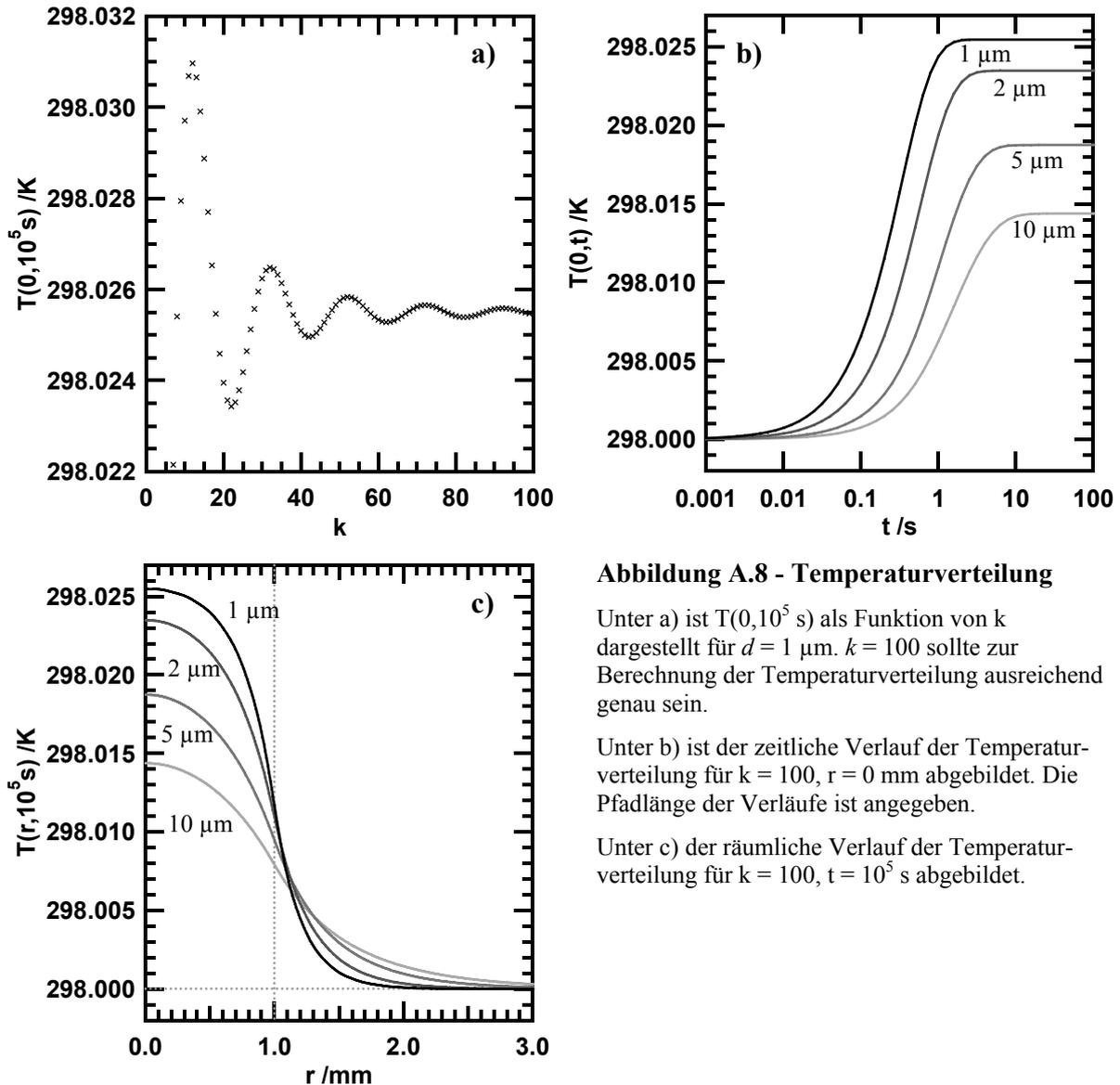


Abbildung A.8 - Temperaturverteilung

Unter a) ist $T(0, 10^5 \text{ s})$ als Funktion von k dargestellt für $d = 1 \mu\text{m}$. $k = 100$ sollte zur Berechnung der Temperaturverteilung ausreichend genau sein.

Unter b) ist der zeitliche Verlauf der Temperaturverteilung für $k = 100$, $r = 0 \text{ mm}$ abgebildet. Die Pfadlänge der Verläufe ist angegeben.

Unter c) der räumliche Verlauf der Temperaturverteilung für $k = 100$, $t = 10^5 \text{ s}$ abgebildet.

A11 Gleichungen zur Berechnung statistischer Größen

arithmetischer Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Gl. A.2})$$

Standardabweichung:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gl. A.3})$$

mittlerer quadratischer Fehler:

$$\Delta_x^1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot n}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gl. A.4})$$

einfacher mittlerer Fehler:

$$\eta_x = \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}| \quad (\text{Gl. A.5})$$

Fehlerwert zum Vergleich mit dem mittleren quadratischen Fehler:

$$\Delta_x^2 = \sqrt{\frac{\pi}{2n \cdot (n-1)}} \cdot \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}| \quad (\text{Gl. A.6})$$

mit der Standardabweichung gewichteter Mittelwert:

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\sigma_{x_i}}}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_{x_i}}} \quad (\text{Gl. A.7})$$

B1 Material**B1.1 Chemikalien**

Ammoniumperoxydisulfat	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit (USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
1S-(+)-Campher-10-sulfonsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
1R-(-)-Campher-10-sulfonsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glutathion (reduziert)	Boehringer Mannheim
Guanidiumchlorid (ultra pure)	ICN Biochemicals, Ohio USA
Guanidiumchloridlösung 8 M	Pierce (Perbio Science Deutschland, Bonn)
Harnstoff (ultra pure)	ICN Biochemicals, Ohio USA
HEPES	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Pantolacton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel30	Roth, Karlsruhe
Serva Blau R250	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TRIS	USB Corporation, Ohio (USA)

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden hatten den Reinheitsgrad *p. a.* und wurden von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Zur Herstellung wässriger Lösungen wurde mit einer Millipore-Anlage gereinigtes Wasser verwendet.

B1.2 Standards

Protein-Molekularmassenmarker	Sigma, St. Louis (USA)
Kalibrierstandard Holmiumoxid	Hellma, Müllheim
Kalibrierstandard Didymium-Filter	Hellma, Müllheim

B1.3 Proteine und Peptide

Chymotrypsinogen	Sigma-Aldrich	105K7690
Concanavalin A	Sigma-Aldrich	102K7044
Lysozym	Serva	23049

	Sigma-Aldrich	057K7045
	Sigma-Aldrich	051K7028
Myoglobin (oxidiert) (Met-)	Calbiochem	B45826
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich	86H7046
Cold Shock Protein <i>T.m.</i> (CSP <i>T.m.</i>)		
FBP28-N15 WW-Domäne	wurde von Jana Körner (Körner 2007) zur Verfügung gestellt	
Internalin A		
Peptid „A2“	wurde von Prof. Dr. Jens Schneider-Mergener zur Verfügung gestellt	

B1.4 Küvetten und Fenster

Quarz-Suprasil-Küvetten	Hellma, Müllheim
d=10 mm; H=45 mm /B=12,5 mm /T=12,5 mm	
d=5 mm; H=45 mm /B=12,5 mm /T=7,5 mm	
d=2 mm; H=45 mm /B=12,5 mm /T=4,5 mm	
d=1 mm; H=45 mm /B=12,5 mm /T=3,5 mm	
demontierbare Quarz-Suprasil-Küvetten	Hellma, Müllheim
d=0,1 mm H=45 mm /B=12,5 mm	
d=0,01 mm H=45 mm /B=12,5 mm	
demontierbare Calciumfluorid Küvetten	Hellma Optik, Jena
Ø=22 mm /d=4,2 µm; 5,6 µm; 12,6 µm	(Wien und Wallace 2005)
Calciumfluorid Fenster	
H=45 mm /B=12,5 mm /T=2 mm	Hellma, Müllheim
H=45 mm /B=12,5 mm /T=2 mm	Korth Kristalle, Altenholz
Ø=20 mm /T=4 mm	Korth Kristalle, Altenholz

B1.5 Sonstige Materialien

Dialyseschläuche Spectrapor	Spectrum, Houston (USA)
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Membranfilter RC55 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Sepharose G100	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilfilter (0,2 µm)	Renner, Darmstadt
Superdex 75 prep grade	Amersham Biosciences, Freiburg
Ultrafiltrationsmembranen	Amicon, Witten
Zentrifugationsfilter Ultrafree [®] -MC (0,1 µm)	Amicon, Witten

B2 Geräte

Absorptionsspektrometer	Cary 50 Probe V550, V560	Varian Jasco, Gross-Umstadt
Spektropolarimeter	Chirascan π^* -180 J-715, J-815	Applied Photophysics, Leatherhead (UK) Applied Photophysics, Leatherhead (UK) Jasco, Gross-Umstadt
Probenentgasung	ThermoVac	MicroCal, Milton Keynes (UK)

B2.1 Komponenten des SRCD-Messaufbaus am BESSY

Messkammer und Aufhängung	wurden im Rahmen des BMBF-Vorhabens entwickelt (siehe Abbildung 4.4)	
Optische Bank	OWIS System 65	OWIS, Staufen
Bauelemente für Optische Bank	OWIS System 40 mit Adaptern	OWIS, Staufen
Rochon Polarisator MgF ₂ Ø12 mm		Bernhard Halle Nachfl., Berlin
Photoelastischer Modulator		HINDS Instruments, Portland(USA)
PEM (Vakuum)		HINDS Instruments, Portland (USA)
Channel Photomultiplier (CPM)	C921, C1321, C1382	PerkinElmer Inc., Fremont (USA)
Hochspannungsversorgung	nach Snyder (1984) adaptiert für Channel Photomultiplier	BESSY
Analog-Digital-Wandlertarte		National Instruments, Austin (USA)
Lock-In Verstärker	7265 DSP	EG&G Instruments, Cypress (USA)
Elektrometer	6514 System Electrometer	Keithley Instruments, Cleveland (USA)

B3 weitere Methoden**B3.1 Absorptionsspektroskopie**

Absorptionsspektren wurden, wenn nicht anders erwähnt bei Raumtemperatur aufgenommen und mit einer geeigneten Kontrolle korrigiert. Bei Zirkulardichroismus-Messungen wurde die Extinktion, wie unter 2.4 beschrieben berechnet oder die vor Hersteller in die Software implementierte Umrechnung aus der Hochspannung verwendet. Extinktionswerte unterhalb von 190 nm wurden ausschließlich auf diese Weise ermittelt.

B3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und der Extinktionskoeffizienten

Die Proteinkonzentration wurde ausschließlich spektroskopisch durch Extinktionsmessung bestimmt. Dafür wurde die Extinktionskoeffizienten nach der Methode von Gill und von Hippel (1989) bestimmt oder entsprechend ermittelte Extinktionskoeffizienten verwendet. Für Metmyoglobin aus Pferdeherz wurden die von Bowen (1949) für den sichtbaren Wellenlängenbereich und einen pH-Wert zwischen 6 und 7 angegebenen Extinktionskoeffizienten verwendet.

Bei Proben deren Konzentration für eine direkte Konzentrationsbestimmung bei einer Pfadlänge von 1 cm oder 1 mm zu groß war, wurde die Konzentration berechnet indem die vom Hersteller angegebenen Pfadlängen für die verwendeten demontierbaren Küvetten zur Berechnung genutzt wurden. Bei Proteinkonzentrationen von mehr als 20 mg/ml wurde die Konzentration einer geeigneten Verdünnung bestimmt.

B3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse erfolgte im elektrischen Feld durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach King und Laemmli (1971) unter denaturierenden Bedingungen. Die verwendeten Gele hatten eine Acrylamidkonzentration von 12.5 % (w/v) und eine Größe von 10 x 8 x 0.075 cm. Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit je einem fünftel Volumen Auftragspuffer (325 mM Tris/HCl pH 6,8, 500 mg ml⁻¹ Glycerin, 0.5 mg ml⁻¹ Bromphenolblau, 10 mM DTE) und 10 %iger (w/v) SDS-Lösung versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V konstanter Spannung. Als Laufpuffer wurde das Puffersystem nach Fling und Gregerson (1986) verwendet.

B3.4 Proteinfärbung

B3.4.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde nach einer modifizierten Methode nach Fairbanks *et al.* (1971) durchgeführt. Die Gele wurden dabei zunächst 10 min in einer Mischung aus 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0.1 % (w/v) Serva Blau R250 vorinkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Färbung der Gele entsprechend den Angaben von Fairbanks *et al.* (1971). Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0.2 – 0.5 µg Protein mm⁻² Gel.

B3.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode, wie sie von Heukeshoven und Dernick (1985) beschrieben wurde. Bei dieser Methode liegt die Sensitivität bei etwa 0.05 – 0.1 ng Protein mm⁻² Gel.

C Quellenverzeichnis

- Abel, C.J., Goldbeck, R.A., Latypov, R.F., Roder, H. und Kliger, D.S. 2007. Conformational equilibration time of unfolded protein chains and the folding speed limit.
Biochemistry **46**: 4090-4099. DOI: 10.1021/bi0622930
- Adachi, R., Yamaguchi, K., Yagi, H., Sakurai, K., Naiki, H. und Goto, Y. 2007. Flow-induced alignment of amyloid protofilaments revealed by linear dichroism.
J. Biol. Chem. **282**: 8978-8983. DOI: 10.1074/jbc.M611738200
- Andrade, M.A., Chacon, P., Merelo, J.J. und Moran, F. 1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network.
Protein Engineering **6**: 383-390. DOI: 10.1093/protein/6.4.383
- Anson, M. und Bayley, P.M. 1974. Measurement of circular dichroism at millisecond time resolution - stopped flow circular dichroism system.
J. Phys. E Sci. Instrum. **7**: 481-486. DOI: 10.1088/0022-3735/7/6/024
- Anson, M., Martin, S.R. und Bayley, P.M. 1977. Transient CD measurements at submillisecond time resolution - application to studies of temperature-jump relaxation of equilibria of chiral biomolecules.
Rev. Sci. Instrum. **48**: 953-962. DOI: 10.1063/1.1135196
- Arndt, E.R. und Stevens, E.S. 1993. Vacuum ultraviolet circular dichroism studies of simple saccharides.
J. Am. Chem. Soc. **115**: 7849-7853. DOI: 10.1021/ja00070a034
- Arvinte, T., Bui, T.T.T., Dahab, A.A., Demeule, B., Drake, A.F., Elhag, D. und King, P. 2004. The multi-mode polarization modulation spectrometer: part 1: simultaneous detection of absorption, turbidity, and optical activity.
Anal. Biochem. **332**: 46-57. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.045
- Baumgärtel, P. 2003-2008. SRCDMess (Version 1.0 - 1.5). *persönliche Mitteilung*
- Baumgärtel, P. 2004-2008. IgorPro-Prozeduren zum Einlesen von Messdaten, zur Mittelwertbildung, zur Basislinienkorrektur, zur Extinktionsberechnung und zur Darstellung der Messdaten.
persönliche Mitteilung
- Böhm, G., Muhr, R. und Jaenicke, R. 1992. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks.
Protein Engineering **5**: 191-195. DOI: 10.1093/protein/5.3.191
- Bouckaert, J., Dewallef, Y., Poortmans, F., Wyns, L. und Loris, R. 2000. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization.
J. Biol. Chem. **275**: 19778-19787. DOI: 10.1074/jbc.M001251200
- Bowen, W.J. 1949. The absorption spectra and extinction coefficients of myoglobin.
J. Biol. Chem. **179**: 235-245.
- Boyce, J.C. 1941. Spectroscopy in the vacuum ultraviolet.
Rev. Mod. Phys. **13**: 0001-0033. DOI: 10.1103/RevModPhys.13.1
- Brahms, S., Brahms, J., Spach, G. und Brack, A. 1977. Identification of β, β -turns and unordered conformations in polypeptide chains by vacuum ultraviolet circular dichroism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 3208-3212.
- Buck, R.P., Singhadeja, S. und Rogers, L.B. 1954. Ultraviolet absorption spectra of some inorganic ions in aqueous solutions.
Anal. Chem. **26**: 1240-1242. DOI: 10.1021/ac60091a051
- Bulheller, B.M., Miles, A.J., Wallace, B.A. und Hirst, J.D. 2008. Charge-Transfer Transitions in the Vacuum-Ultraviolet of Protein Circular Dichroism Spectra
Journal of Physical Chemistry B **112**: 1866-1874 DOI: 10.1021/jp077462k
- Burnett, J.H., Levine, Z.H. und Shirley, E.L. 2001. Intrinsic birefringence in calcium fluoride and barium fluoride.
Phys. Rev. B **64**: 241102. DOI: 10.1103/PhysRevB.64.241102

- Bustamante, C. und Maestre, M.F. 1988. Statistical effects in the absorption and optical activity of particulate suspensions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 8482-8486.
- Careri, G., Giansanti, A. und Gratton, E. 1979. Lysozyme Film Hydration Events - IR and Gravimetric Study.
Biopolymers **18**: 1187-1203. DOI: 10.1002/bip.1979.360180512
- Carrington, D.M., Auffret, A. und Hanke, D.E. 1985. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A.
Nature **313**: 64-67. DOI: 10.1038/313064a0
- Cassim, J.Y. und Yang, J.T. 1969. A computerized calibration of the circular dichrometer.
Biochemistry **8**: 1947-1951. DOI: 10.1021/bi00833a026
- Chaffotte, A.F., Guillou, Y. und Goldberg, M.E. 1992. Kinetic resolution of peptide bond and side chain far UV circular dichroism during the folding of hen egg white lysozyme.
Biochemistry **31**: 9694-9702. DOI: 10.1021/bi00155a024
- Chakrabartty, A., Doig, A.J. und Baldwin, R.L. 1993a. Helix capping propensities in peptides parallel those in proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 11332-11336.
- Chakrabartty, A., Kortemme, T., Padmanabhan, S. und Baldwin, R.L. 1993b. Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities.
Biochemistry **32**: 5560-5565. DOI: 10.1021/bi00072a010
- Chang, C.T., Wu, C.S.C. und Yang, J.T. 1978. Circular Dichroic Analysis of Protein Conformation - Inclusion of β -Turns.
Anal. Biochem. **91**: 13-31. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90812-6
- Chen, E.F., Wen, Y.X., Lewis, J.W., Goldbeck, R.A., Kliger, D.S. und Strauss, C.E.M. 2005. Nanosecond laser temperature-jump optical rotatory dispersion: Application to early events in protein folding/unfolding.
Rev. Sci. Instrum. **76**: 083120. DOI: 10.1063/1.2009847
- Chen, G.C. und Yang, J.T. 1977. Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid.
Anal. Lett. **10**: 1195-1207. DOI: 10.1080/00032717708067855
- Chen, Y.H. und Yang, J.T. 1971. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism.
Biochem. Biophys. Res. Co. **44**: 1285-1291. DOI: 10.1016/S0006-291X(71)80225-5
- Cheng, J.C., Nafie, L.A. und Stephens, P.J. 1975. Polarization scrambling using a photoelastic modulator - application to circular dichroism measurement.
J. Opt. Soc. Am. **65**: 1031-1035. DOI: 10.1364/JOSA.65.001031
- Cheruvallath, V.K., Riley, C.M., Narayanan, S.R., Lindenbaum, S. und Perrin, J.H. 1997. A quantitative circular dichroic investigation of the binding of the enantiomers of ibuprofen and naproxen to human serum albumin.
J. Pharm. Biomed. Anal. **15**: 1719-1724. DOI: 10.1016/S0731-7085(96)01956-5
- Chirgadze, Y.N. und Ovseryan, A.M. 1972. Конформационные перестройки в глобулярных белках при гидратации (Conformational rearrangements in globular proteins during hydration).
Молекулярная Биология (russisch, Molekularbiologie) **6**: 721-726.
- Chung, C.Y., Chew, E.P., Cheng, B.M., Bahou, M. und Lee, Y.P. 2001. Temperature dependence of absorption cross-section of H₂O, HOD, and D₂O in the spectral region 140-193 nm.
Nucl. Instrum. Meth. A **467**: 1572-1576. DOI: 10.1016/S0168-9002(01)00762-8
- Clarke, D.T. und Jones, G. 2004. CD12: a new high-flux beamline for ultraviolet and vacuum-ultraviolet circular dichroism on the SRS, Daresbury.
J. Synchrotron Radiat. **11**: 142-149. DOI: 10.1107/S0909049503024142

- Cowieson, N.P., Miles, A.J., Robin, G., Forwood, J.K., Kobe, B., Martin, J.L. und Wallace, B.A. 2008. Evaluating protein: protein complex formation using synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **70**: 1142-1146. DOI: 10.1002/prot.21631
- Dartigalongue, T. und Hache, F. 2006. Time-resolved circular dichroism in carbonmonoxy-myoglobin: The central role of the proximal histidine. *Chirality* **18**: 273-278. DOI: 10.1002/chir.20254
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F. und George, J.M. 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **273**: 9443-9449. DOI: 10.1074/jbc.273.16.9443
- DeTar, D.F. 1969. Suggested Preliminary Standards for Calibration of Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism Instruments. *Anal. Chem.* **41**: 1406-1408. DOI: 10.1021/ac60280a009
- Doig, A.J. und Baldwin, R.L. 1995. N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in α -helical peptides. *Protein Science* **4**: 1325-1336. DOI: 10.1002/pro.5560040708
- Drake, A.F. 1986. Polarization modulation - the measurement of linear and circular dichroism. *J. Phys. E Sci. Instrum.* **19**: 170-181. DOI: 10.1088/0022-3735/19/3/002
- Duysens, L.N.M. 1956. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. *Biochimica et Biophysica Acta* **19**: 1-12. DOI: 10.1016/0006-3002(56)90380-8
- Evans, P., Bateman, O.A., Slingsby, C. und Wallace, B.A. 2007. A reference dataset for circular dichroism spectroscopy tailored for the $\beta\gamma$ -crystallin lens proteins. *Exp. Eye Res.* **84**: 1001-1008. DOI: 10.1016/j.exer.2007.01.016
- Fairbanks, G., Steck, T.L. und Wallach, D.F.H. 1971. Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617. DOI: 10.1021/bi00789a030
- Fiori, W.R., Miick, S.M. und Millhauser, G.L. 1993. Increasing Sequence Length Favors α -Helix over 3_{10} -Helix in Alanine-Based Peptides - Evidence for a Length-Dependent Structural Transition. *Biochemistry* **32**: 11957-11962. DOI: 10.1021/bi00096a003
- Fling, S.P. und Gregerson, D.S. 1986. Peptide and Protein Molecular-Weight Determination by Electrophoresis Using a High-Molarity Tris Buffer System without Urea. *Anal. Biochem.* **155**: 83-88. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90228-9
- Gilbert, A.T.B. und Hirst, J.D. 2004. Charge-transfer transitions in protein circular dichroism spectra. *J. Mol. Struct.-Theochem* **675**: 53-60. DOI: 10.1016/j.theochem.2003.12.038
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H. 1989. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90602-7
- Glazer, A.N. und Simmons, N.S. 1966. Structure-Function Relationships in Lysozyme by Circular Dichroism. *J. Am. Chem. Soc.* **88**: 2335-2336. DOI: 10.1021/ja00962a056
- Gray, D.M. 1996. Circular Dichroism of Protein-Nucleic Acid Interaction. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. (ed. G.D. Fasman), pp. 469-500. Plenum Press, New York.
- Greenfield, N. und Fasman, G.D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-4116. DOI: 10.1021/bi00838a031
- Greenfield, N.J. 1975. Circular dichroism studies of dihydrofolate reductase from a methotrexate-resistant strain of *Escherichia coli* B, Mb 1428 : ternary complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* **403**: 32-46. DOI: 10.1016/0005-2744(75)90006-6

- Hass, G. und Hunter, W.R. 1978. Transmittance of cultured crystalline quartz in vacuum ultraviolet before and after electron irradiation.
Appl. Optics **17**: 2310-2315. DOI: 10.1364/AO.17.002310
- Hayashi, H., Watanabe, N., Udagawa, Y. und Kao, C.C. 2000. The complete optical spectrum of liquid water measured by inelastic x-ray scattering.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 6264-6266. DOI: 10.1073/pnas.110572097
- Heller, J.M., Birkhoff, R.D. und Painter, L.R. 1977. Isotopic effects on electronic properties of H₂O and D₂O in vacuum UV.
J. Chem. Phys. **67**: 1858-1860. DOI: 10.1063/1.435142
- Heller, J.M., Hamm, R.N., Birkhoff, R.D. und Painter, L.R. 1974. Collective oscillation in liquid water.
J. Chem. Phys. **60**: 3483-3486. DOI: 10.1063/1.1681563
- Hennessey, J.P., Jr. und Johnson, W.C., Jr. 1981. Information content in the circular dichroism of proteins.
Biochemistry **20**: 1085-1094. DOI: 10.1021/bi00508a007
- Hennessey, J.P., Jr. und Johnson, W.C., Jr. 1982. Experimental Errors and Their Effect on Analysing Circular Dichroism Spectra of Proteins.
Anal. Biochem. **125**: 177-188. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90400-6
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. 1985. Characterization of a Solvent System for Separation of Water-Insoluble Poliovirus Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography.
J. Chromatogr **326**: 91-101. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)87434-3
- Hinds. 1998. *PEM-90 Photoelastic modulator systems user manual*. Hinds Instruments, Hillsboro.
- Hoffmann, A., Kane, A., Nettels, D., Hertzog, D.E., Baumgartel, P., Lengefeld, J., Reichardt, G., Horsley, D.A., Seckler, R., Bakajin, O. und Schuler B. 2007. Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 105-110. DOI: 10.1073/pnas.0604353104
- Holm, A.I.S., Worm, E.S., Chakraborty, T., Babu, B.R., Wengel, J., Hoffmann, S.V. und Nielsen, S.B. 2007. On the influence of conformational locking of sugar moieties on the absorption and circular dichroism of nucleosides from synchrotron radiation experiments.
J. Photoch. Photobio. A **187**: 293-298. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2006.10.025
- Holzwart, G. und Doty, P. 1965. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides.
J. Am. Chem. Soc. **87**: 218-228. DOI: 10.1021/ja01080a015
- Hooft, R.W.W., Vriend, G., Sander, C. und Abola, E.E. 1996. Errors in protein structures.
Nature **381**: 272-272. DOI: 10.1038/381272a0
- Hooke, S.D., Radford, S.E. und Dobson, C.M. 1994. The Refolding of Human Lysozyme: A Comparison with the Structurally Homologous Hen Lysozyme.
Biochemistry **33**: 5867-5876. DOI: 10.1021/bi00185a026
- Huyghues-Despointes, B.M.P., Scholtz, J.M. und Baldwin, R.L. 1993. Helical peptides with three pairs of Asp-Arg and Glu-Arg residues in different orientations and spacings.
Protein Science **2**: 80-85. DOI: 10.1002/pro.5560020108
- Janes, R.W. und Cuff, A. L. 2005. Overcoming protein denaturation caused by irradiation in a high-flux synchrotron radiation circular dichroism beamline.
Journal of Synchrotron Radiation **12**: 524-529 DOI: 10.1107/S0909049505007703
- JASCO. 1995. *Model J-715 Spectropolarimeter - Hardware Manual*. JASCO.
- Jensen, H.P., Schellman, J.A. und Troxell, T. 1978. Modulation Techniques in Polarization Spectroscopy.
Appl. Spectrosc. **32**: 192-200. DOI: 10.1366/000370278774331567
- Jirgensons, B. 1978. Circular dichroism studies on effects of sodium dodecyl sulfate on the conformation of some phytohemagglutinins.
Biochimica et Biophysica Acta **536**: 205-211. DOI: 10.1016/0005-2795(78)90066-1

- Jirgensons, B. 1980. Circular dichroism study on structural reorganization of lectins by sodium dodecyl sulfate.
Biochimica et Biophysica Acta **623**: 69-76. DOI: 10.1016/0005-2795(80)90008-2
- Johnson, W.C. 1971. A Circular Dichroism Spectrometer for the Vacuum Ultraviolet.
Rev. Sci. Instrum. **42**: 1283-1286. DOI: 10.1063/1.1685367
- Johnson, W.C. 1996. Determination of the Conformation of Nucleic Acids by Electronic CD. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. (ed. G.D. Fasman), pp. 433-468. Plenum Press, New York.
- Johnson, W.C. 1999. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures.
Proteins-Structure Function and Bioinformatics **35**: 307-312.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(19990515)35:3<307::AID-PROT4>3.0.CO;2-3
- Johnson, W.C., Jr. und Tinoco, I., Jr. 1972. Circular dichroism of polypeptide solutions in the vacuum ultraviolet.
J. Am. Chem. Soc. **94**: 4389-4392. DOI: 10.1021/ja00767a084
- Kabsch, W. und Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.
Biopolymers **22**: 2577-2637. DOI: 10.1002/bip.360221211
- Kane, A.S., Hoffmann, A., Baumgartel, P., Seckler, R., Reichardt, G., Horsley, D.A., Schuler, B. und Bakajin, O. 2008. Microfluidic Mixers for the Investigation of Rapid Protein Folding Kinetics Using Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy.
Anal. Chem. **80**: 9534-9541. DOI: 10.1021/ac801764r
- Kemp, J.C. 1969. Piezo-Optical Birefringence Modulators: New Use for a Long-Known Effect.
J. Opt. Soc. Am. **59**: 950-954. DOI: 10.1364/JOSA.59.000950
- Kerr, G.D., Williams, M.W., Birkhoff, R.D., Hamm, R.N. und Painter, L.R. 1972. Optical and Dielectric Properties of Water in Vacuum Ultraviolet.
Phys. Rev. A **5**: 2523-2527. DOI: 10.1103/PhysRevA.5.2523
- King, J. und Laemmli, U.K. 1971. Polypeptides of the Tail Fibres of Bacteriophage T4.
Journal of Molecular Biology **62**: 465-472. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90148-3
- King, S.M. und Johnson, W.C. 1999. Assigning secondary structure from protein coordinate data.
Proteins-Structure Function and Bioinformatics **35**: 313-320.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(19990515)35:3<313::AID-PROT5>3.0.CO;2-1
- Kiseleva, M.N., Zarochentseva, E.P. und Dodonova, N.Y. 1975. Спектры поглощения нуклеиновых кислот и родственных им соединений в спектральной области 120-280 нм (The absorption spectra of nucleic acids and their components in spectral region 120-280 nm).
Буофузика (russisch, Biophysik) **20**: 561-565.
- Konno, T., Meguro, H., Murakami, T. und Hatano, M. 1981. A critical study on circular dichroism measurement in longer side of visible region.
Chem. Lett. **10**: 953-956. DOI: 10.1246/cl.1981.953
- Körner, J. 2007. Untersuchung zur Faltung, Stabilität und zum Bindungsverhalten kleiner β -Faltblattstrukturen am Beispiel der FBP28 WW-Domäne. Im *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Kretschmar, M., Mayr, E.M. und Jaenicke, R. 1999. Kinetic and thermodynamic stabilization of the $\beta\gamma$ -crystallin homolog spherulin 3a from *Physarum polycephalum* by calcium binding.
Journal of Molecular Biology **289**: 701-705. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2833
- Krittanaï, C. und Johnson, W.C. 1997. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains.
Anal. Biochem. **253**: 57-64. DOI: 10.1006/abio.1997.2366

- Kuball, H.G., Dorr, E., Hofer, T. und Turk, O. 2005. Exciton chirality method. Oriented molecules - Anisotropic phases.
Monatsb. Chem. **136**: 289-324. DOI: 10.1007/s00706-005-0282-2
- Kuhn, W. und Braun, E. 1930. Measuring of circular dichroism in ultraviolet.
Z. Phys. Chem. B-Chem. Elem. Aufbau. Mater. **8**: 445-454.
- Le Bel, J.A. 1874. Sur Les Relations Qui Existent Entre Les Formules Atomiques Des Corps Organiques Et Le Pouvoir Rotatoire De Leur Dissolution.
Bull. Soc. Chim. Fr. **22**: 337-347.
- Leach, S.J. und Scheraga, H.A. 1960. Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectra.
J. Am. Chem. Soc. **82**: 4790-4792. DOI: 10.1021/ja01503a008
- Lees, J.G. und Janes, R.W. 2008. Combining sequence-based prediction methods and circular dichroism and infrared spectroscopic data to improve protein secondary structure determinations.
BMC Bioinformatics **9**: 24. DOI: 10.1186/1471-2105-9-24
- Lees, J.G., Miles, A.J., Wien, F. und Wallace, B.A. 2006. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space.
Bioinformatics **22**: 1955-1962. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl327
- Lengefeld, J. 2003. Stabilität, Faltung und Struktur von Internalin. Diplomarbeit *Physikalische Biochemie*. Universität Potsdam, Potsdam.
- Martin, S.R. und Bayley, P.M. 1986. The effects of Ca²⁺ and Cd²⁺ on the secondary and tertiary structure of bovine testis calmodulin - A circular-dichroism study.
Biochem. J. **238**: 485-490.
- Matsuo, K. und Gekko, K. 2004. Vacuum-ultraviolet circular dichroism study of saccharides by synchrotron radiation spectrophotometry.
Carbohydr. Res. **339**: 591-597. DOI: 10.1016/j.carres.2003.11.019
- Matsuo, K., Matsushima, Y., Fukuyama, T., Senba, S. und Gekko, K. 2002. Vacuum-ultraviolet circular dichroism of amino acids as revealed by synchrotron radiation spectrophotometer.
Chem. Lett. **31**: 826-827. DOI: 10.1246/cl.2002.826
- Matsuo, K., Sakai, K., Matsushima, Y., Fukuyama, T. und Gekko, K. 2003. Optical cell with a temperature-control unit for a vacuum-ultraviolet circular dichroism spectrophotometer.
Anal. Sci. **19**: 129-132. DOI: 10.2116/analsci.19.129
- Matsuo, K., Watanabe, H. und Gekko, K. 2008. Improved sequence-based prediction of protein secondary structures by combining vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy with neural network.
Proteins-Structure Function and Bioinformatics **73**: 104-112. DOI: 10.1002/prot.22055
- Matsuo, K., Yonehara, R. und Gekko, K. 2004. Secondary-structure analysis of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy.
J. Biochem. (Tokyo) **135**: 405-411. DOI: 10.1093/jb/mvh048
- Matsuo, K., Yonehara, R. und Gekko, K. 2005. Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy.
J. Biochem. (Tokyo) **138**: 79-88. DOI: 10.1093/jb/mvi101
- Miles, A.J., Hoffmann, S.V., Tao, Y., Janes, R.W. und Wallace, B.A. 2007. Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectroscopy: New beamlines and new applications in biology.
Spectrosc.-Int. J. **21**: 245-255.
- Miles, A.J., Janes, R.W., Brown, A., Clarke, D.T., Sutherland, J.C., Tao, Y., Wallace, B.A. und Hoffmann, S.V. 2008. Light flux density threshold at which protein denaturation is induced by synchrotron radiation circular dichroism beamlines.
Journal of Synchrotron Radiation **15**: 420-422. DOI: 10.1107/S0909049508009606

- Miles, A.J. und Wallace, B.A. 2006. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics.
Chem. Soc. Rev. **35**: 39-51. DOI: 10.1039/b316168b
- Miles, A.J., Wien, F., Lees, J.G., Rodger, A., Janes, R.W. und Wallace, B.A. 2003. Calibration and standardisation of synchrotron radiation circular dichroism and conventional circular dichroism spectrophotometers.
Spectrosc.-Int. J. **17**: 653-661.
- Miles, A.J., Wien, F. und Wallace, B.A. 2004. Redetermination of the extinction coefficient of camphor-10-sulfonic acid, a calibration standard for circular dichroism spectroscopy.
Anal. Biochem. **335**: 338-339 DOI: 10.1016/j.ab.2004.08.035
- Moffitt, W. und Moscovitz, A. 1959. Optical Activity in Absorbing Media.
J. Chem. Phys. **30**: 648-660. DOI: 10.1063/1.1730025
- Mulcahy, M., McInerney, J., Nikogosyan, D.N. und Görner, H. 2000. 193 nm photolysis of aromatic and aliphatic dipeptides in aqueous solution: Dependence of decomposition quantum yield on the amino acid sequence.
Biol. Chem. **381**: 1259-1262. DOI: 10.1515/BC.2000.154
- Nafie, L.A. 2000. Dual polarization modulation: A real-time, spectral-multiplex separation of circular dichroism from linear birefringence spectral intensities.
Appl. Spectrosc. **54**: 1634-1645. DOI: 10.1366/0003702001948664
- Nelson, R.G. und Johnson, W.C. 1972. Optical properties of sugars.1. Circular dichroism of monomers at equilibrium.
J. Am. Chem. Soc. **94**: 3343-3345. DOI: 10.1021/ja00765a013
- Nelson, R.G. und Johnson, W.C. 1976a. Optical properties of sugars.3. Circular dichroism of aldo- and ketopyranose anomers.
J. Am. Chem. Soc. **98**: 4290-4295. DOI: 10.1021/ja00430a047
- Nelson, R.G. und Johnson, W.C. 1976b. Optical properties of sugars.4. Circular dichroism of methyl aldopyranosides.
J. Am. Chem. Soc. **98**: 4296-4301. DOI: 10.1021/ja00430a048
- Nesgaard, L.W., Hoffmann, S.V., Andersen, C.B., Malmendal, A. und Otzen, D.E. 2008. Characterization of dry globular proteins and protein fibrils by synchrotron radiation vacuum UV circular dichroism.
Biopolymers **89**: 779-795. DOI: 10.1002/bip.21011
- Nikogosyan, D.N. und Görner, H. 1992. Photolysis of aromatic amino acids in aqueous solution by nanosecond 248 and 193 nm laser light.
J. Photochem. Photobiol. B-Biol. **13**: 219-234. DOI: 10.1016/1011-1344(92)85062-Y
- Nikogosyan, D.N. und Görner, H. 1995. Photolysis (193 nm) of aliphatic amino acids in aqueous solution.
J. Photochem. Photobiol. B-Biol. **30**: 189-193. DOI: 10.1016/1011-1344(95)07187-7
- O'Handley, R.C. 1973. Modified Jones calculus for the analysis of errors in polarization-modulation ellipsometry.
J. Opt. Soc. Am. **63**: 523-528. DOI: 10.1364/JOSA.63.000523
- Oberg, K.A., Ruyschaert, J.M. und Goormaghtigh, E. 2003. Rationally selected basis proteins: A new approach to selecting proteins for spectroscopic secondary structure analysis.
Protein Science **12**: 2015-2031. DOI: 10.1110/ps.0354703
- Ojima, N., Sakai, K., Matsuo, K., Matsui, T., Fukazawa, T., Namatame, H., Taniguchi, M. und Gekko, K. 2001. Vacuum-ultraviolet circular dichroism spectrophotometer using synchrotron radiation: Optical system and on-line performance.
Chem. Lett. **30**: 522-523. DOI: 10.1246/cl.2001.522
- Onaka, R. und Takahashi, T. 1968. Vacuum UV Absorption Spectra of Liquid Water and Ice.
J. Phys. Soc. Jpn **24**: 548-550. DOI: 10.1143/JPSJ.24.548

- Painter, L.R., Hamm, R.N., Arakawa, E.T. und Birkhoff, R.D. 1968. Electronic properties of liquid water in the vacuum ultraviolet.
Phys. Rev. Lett. **21**: 282-284. DOI: 10.1103/PhysRevLett.21.282
- Penel, S., Hughes, E. und Doig, A.J. 1999. Side-chain structures in the first turn of the alpha-helix.
Journal of Molecular Biology **287**: 127-143. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2549
- Perez-Iratxeta, C. und Andrade-Navarro, M.A. 2008. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra.
BMC Struct. Biol. **8**: 25. DOI: 10.1186/1472-6807-8-25
- PerkinElmer. 2000. *Model 7265 DSP Lock-in Amplifier Instruction Manual*. PerkinElmer Corporation.
- Preiss, J.W. und Setlow, R. 1956. Spectra of Some Amino Acids, Peptides, Nucleic Acids, and Protein in the Vacuum Ultraviolet.
J. Chem. Phys. **25**: 138-141. DOI: 10.1063/1.1742806
- Provencher, S.W. und Glockner, J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism.
Biochemistry **20**: 33-37. DOI: 10.1021/bi00504a006
- Pysh, E.S. 1976. Optical activity in the vacuum ultraviolet.
Annual Review of Biophysics and Bioengineering **5**: 63-75. DOI: 10.1146/annurev.bb.05.060176.000431
- Radford, S.E., Dobson, C.M. und Evans, P.A. 1992. The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways.
Nature **358**: 302-307. DOI: 10.1038/358302a0
- Radle, W.F. und Beck, C.A. 1940. An Experimental Study of the Near Ultraviolet Absorption Spectrum of Benzene.
J. Chem. Phys. **8**: 507-513. DOI: 10.1063/1.1750702
- Reichardt, G., Bahrtdt, J., Schmidt, J.S., Gudat, W., Ehresmann, A., Müller-Albrecht, R., Molter, H., Schmoranzler, H., Martins, M., Schwentner, N. und Sasaki S. 2001a. A 10m-normal incidence monochromator at the quasi-periodic undulator U125-2 at BESSY II.
Nucl. Instrum. Meth. A **467**: 462-465. DOI: 10.1016/S0168-9002(01)00359-X
- Reichardt, G., Noll, T., Packe, I., Rotter, P., Schmidt, J.S. und Gudat, W. 2001b. Adaption of the BESSY I-3m normal incidence monochromators to the BESSY II source.
Nucl. Instrum. Meth. A **467**: 458-461. DOI: 10.1016/S0168-9002(01)00357-6
- Rupley, J.A. und Careri, G. 1991. Protein Hydration and Function.
Adv. Protein Chem. **41**: 37-172. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60197-7
- Saxena, V.P. und Wetlaufer, D.B. 1971. A New Basis for Interpreting the Circular Dichroic Spectra of Proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**: 969-972.
- Schippers, P.H. und Dekkers, H.P.J.M. 1981. Direct Determination of Absolute Circular Dichroism Data and Calibration of Commercial Instruments.
Anal Chem **53**: 778-782. DOI: 10.1021/ac00229a008
- Schneider, E.G. und O'Bryan, H.M. 1937. The Absorption of Ionic Crystals in the Ultraviolet.
Physical Review **51**: 293. DOI: 10.1103/PhysRev.51.293
- Schnepp, O., Allen, S. und Pearson, E.F. 1970. The Measurement of Circular Dichroism in Vacuum Ultraviolet.
Rev. Sci. Instrum. **41**: 1136-1141. DOI: 10.1063/1.1684743
- Schönhofer, A., Kuball, H.G. und Puebla, C. 1983. Optical activity of oriented molecules. 9. Phenomenological mueller matrix description of thick samples and of optical elements.
Chem. Phys. **76**: 453-467. DOI: 10.1016/0301-0104(83)85227-6

- Schubert, W.D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T. und Heinz, D.W. 2002. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**: 825-836. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01136-4
- Seckler, R. 2001-2006. BMBF Projektträger: PT-DESY, Förderkennzeichen 05KS1IP1/1 und 05KS1IP1/2.
- Seckler, R. 2007-2010. BMBF Projektträger: PT-DESY, Förderkennzeichen 05KS7IP1.
- Serrano-Andres, L. und Fulscher, M.P. 1998. Theoretical study of the electronic spectroscopy of peptides. III. Charge-transfer transitions in polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 10912-10920. DOI: 10.1021/ja981148+
- Shindo, Y. und Nakagawa, M. 1985. Circular dichroism measurements.1. Calibration of a circular dichroism spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.* **56**: 32-39. DOI: 10.1063/1.1138467
- Shindo, Y. und Ohmi, Y. 1985. New polarization-modulation spectrometer for simultaneous circular dichroism and optical rotary dispersion measurements. (I). Instrument design, analysis, and evaluation. *Rev. Sci. Instrum.* **56**: 2237-2242. DOI: 10.1063/1.1138355
- Siegel, J.B., Steinmetz, W.E. und Long, G.L. 1980. A Computer-Assisted Model for Estimating Protein Secondary Structure from Circular Dichroic Spectra: Comparison of Animal Lactate Dehydrogenases. *Anal. Biochem.* **104**: 160-167. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90292-4
- Smith, L., Greenfield, N.J. und Hitchcockdegregori, S.E. 1994. The Effects of Deletion of the Amino-Terminal Helix on Troponin C Function and Stability. *J. Biol. Chem.* **269**: 9857-9863.
- Snyder, P.A. 1984. Status of natural und magnetic circular dichroism instrumentation using synchrotron radiation. *Nucl. Instrum. Meth. A* **222**: 364-371. DOI: 10.1016/0167-5087(84)90560-X
- Snyder, P.A. und Rowe, E.M. 1980. The first use of synchrotron radiation for vacuum ultraviolet circular dichroism measurements. *Nucl. Instrum. Methods* **172**: 345-349. DOI: 10.1016/0029-554X(80)90657-6
- Sowers, B.L., Arakawa, E.T. und Birkhoff, R.D. 1972. Optical Absorption of Liquid Water in the Vacuum Ultraviolet. *J. Chem. Phys.* **57**: 583-584. DOI: 10.1063/1.1678013
- Sprecher, C.A. und Johnson, W.C. 1977. Circular Dichroism of the Nucleic Acid Monomers. *Biopolymers* **16**: 2243-2264. DOI: 10.1002/bip.1977.360161012
- Sreerama, N., Manning, M.C., Powers, M.E., Zhang, J.X., Goldenberg, D.P. und Woody, R.W. 1999a. Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **38**: 10814-10822. DOI: 10.1021/bi990516z
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. und Woody, R.W. 1999b. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science* **8**: 370-380. DOI: 10.1110/ps.8.2.370
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. und Woody, R.W. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.* **287**: 243-251. DOI: 10.1006/abio.2000.4879
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. und Woody, R.W. 2001. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. *Anal. Biochem.* **299**: 271-274. DOI: 10.1006/abio.2001.5420

- Sreerama, N. und Woody, R.W. 1993. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism.
Anal. Biochem. **209**: 32-44. DOI: 10.1006/abio.1993.1079
- Stevens, E.S. 1996. Carbohydrates. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. (ed. G.D. Fasman), pp. 501-530. Plenum Press, New York.
- Sudol, M. 1996. Structure and function of the WW domain.
Prog. Biophys. Mol. Bio. **65**: 113-132. DOI: 10.1016/S0079-6107(96)00008-9
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. und Bork, P. 1995. Characterization of a novel protein-binding module - the WW domain.
FEBS Lett **369**: 67-71. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00550-S
- Sutherland, J.C. 1996. Circular Dichroism Using Synchrotron Radiation. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. (ed. G.D. Fasman), pp. 599-633. Plenum Press, New York.
- Tanaka, M., Yagi-Watanabe, K., Kaneko F. und Nakagawa K. 2009 First observation of natural circular dichroism spectra in the extreme ultraviolet region using a polarizing undulator-based optical system and its polarization characteristics.
Journal of Synchrotron Radiation **16**: 455-462. DOI: 10.1107/S0909049509012291
- Tao, Y., Huang, Y., Gao, Z., Zhuang, H., Zhou, A., Tan, Y., Li, D. und Sun, S. 2009. Developing VUV spectroscopy for protein folding and material luminescence on beamline 4B8 at the Beijing Synchrotron Radiation Facility
Journal of Synchrotron Radiation **16**: 857-863. DOI: 10.1107/S0909049509037236
- Tao, Y., Huang, Y., Qian, H., Yan, Y., Xu, J. und Zheng, H. 2007. High Photon Flux Beamline 4B8 for Vacuum Ultraviolet Spectroscopy at BSRF. *AIP Conference Proceedings (Ninth International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation)* **879**: 555-558. DOI: 10.1063/1.2436121
- Tetin, S.Y., Prendergast, F.G. und Venyaminov, S.Y. 2003. Accuracy of protein secondary structure determination from circular dichroism spectra based on immunoglobulin examples.
Anal. Biochem. **321**: 183-187. DOI: 10.1016/S0003-2697(03)00458-5
- Tilford, S.G., Wilkinso.Pg, Franklin, V.B., Naber, R.H., Benesch, W. und Vandersl.Jt. 1966. Summary of observed absorption lines of room-temperature molecular nitrogen between 1060 and 1520 Å.
Astrophys. J. **S 13**: 31-75. DOI: 10.1086/190136
- Tolleter, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulnier, P., Manon, S., Teyssier, E., Payet, N., Avelange-Macherel, M.H. und Macherel, D. 2007. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation.
Plant Cell **19**: 1580-1589. DOI: 10.1105/tpc.107.050104
- Toumadje, A., Alcorn, S.W. und Johnson, W.C. 1992. Extending CD Spectra of Proteins to 168 nm Improves the Analysis for Secondary Structures.
Anal. Biochem. **200**: 321-331. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90473-K
- Travis, J.C., Acosta, J.C., Andor, G., Bastie, J., Blattner, P., Chunnillal, C.J., Crosson, S.C., Duewer, D.L., Early, E.A., Hengstberger, F., Kim C., Liedquist L., Manoocheri F. und Mercader F. 2005. Intrinsic wavelength standard absorption bands in holmium oxide solution for UV/visible molecular absorption spectrophotometry.
J. Phys. Chem. Ref. Data **34**: 41-56. DOI: 10.1063/1.1835331
- Tuzimura, K., Konno, T., Meguro, H., Hatano, M., Murakami, T., Kashiwabara, K., Saito, K., Kondo, Y. und Suzuki, T.M. 1977. A Critical Study of the Measurement and Calibration of Circular Dichroism.
Anal. Biochem. **81**: 167-174. DOI: 10.1016/0003-2697(77)90610-8
- van 't Hoff, J.H. 1874. La chimie dans l'espace.
Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat. **9**: 445-454.
- Velluz, L., Legrand, M. und Grosjean, M. 1965. *Optical Circular Dichroism*. Academic Press Inc., New York und London.

- Venyaminov, S., Baikalov, I.A., Shen, Z.M., Wu, C.S. und Yang, J.T. 1993. Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set.
Anal. Biochem. **214**: 17-24. DOI: 10.1006/abio.1993.1450
- Venyaminov, S. und Vassilenko, K.S. 1994. Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra.
Anal. Biochem. **222**: 176-184. DOI: 10.1006/abio.1994.1470
- Verrall, R.E. und Senior, W.A. 1969. Vacuum-Ultraviolet Study of Liquid H₂O and D₂O.
J. Chem. Phys. **50**: 2746-2750. DOI: 10.1063/1.1671439
- Voet, D., Gratzer, W.B., Cox, R.A. und Doty, P. 1963. Absorption Spectra of Nucleotides, Polynucleotides, and Nucleic Acids in the Far Ultraviolet.
Biopolymers **1**: 193-208. DOI: 10.1002/bip.360010302
- Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. und Fersht, A.R. 1993. Circular Dichroism Studies of Barnase and Its Mutants: Characterization of the Contribution of Aromatic Side Chains.
Biochemistry **32**: 10303-10313. DOI: 10.1021/bi00090a005
- Wallace, B.A. 2000a. Conformational changes by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy.
Nat. Struct. Biol. **7**: 708-709. DOI: 10.1038/78915
- Wallace, B.A. 2000b. Synchrotron radiation circular-dichroism spectroscopy as a tool for investigating protein structures.
Journal of Synchrotron Radiation **7**: 289-295. DOI: 10.1107/S0909049500009262
- Wallace, B.A. und Janes, R.W. 2001. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics.
Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 567-571. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00243-X
- Wallace, B.A. und Janes, R.W. 2003. Circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy: tools for drug discovery.
Biochem. Soc. Trans. **31**: 631-633.
- Wallace, B.A., Whitmore, L. und Janes, R.W. 2006. The Protein Circular Dichroism Data Bank (PCDDDB): A Bioinformatics and Spectroscopic Resource.
Proteins-Structure Function and Bioinformatics **62**: 1-3. DOI: 10.1002/prot.20676
- Wallace, B.A., Wien, F., Miles, A.J., Lees, J.G., Hoffmann, S.V., Evans, P., Wistow, G.J. und Slingsby, C. 2004. Biomedical applications of synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy: identification of mutant proteins associated with disease and development of a reference database for fold motifs.
Faraday Discuss **126**: 237-243; discussion 245-254. DOI: 10.1039/b306055c
- Welker, C., Bohm, G., Schurig, H. und Jaenicke, R. 1999. Cloning, overexpression, purification, and physicochemical characterization of a cold shock protein homolog from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*.
Protein Science **8**: 394-403. DOI: 10.1110/ps.8.2.394
- Wen, Y.X., Chen, E.F., Lewis, J.W. und Kligler, D.S. 1996. Nanosecond time-resolved circular dichroism measurements using an upconverted Ti:sapphire laser.
Rev. Sci. Instrum. **67**: 3010-3016. DOI: 10.1063/1.1147422
- White, Z.W., Fisher, K.E. und Eisenstein, E. 1995. A Monomeric Variant of GroEL Binds Nucleotides but Is Inactive as a Molecular Chaperone.
J. Biol. Chem. **270**: 20404-20409. DOI: 10.1074/jbc.270.35.20404
- Wien, F., Miles, A.J., Lees, J.G., Hoffmann, S.V. und Wallace, B.A. 2005. VUV irradiation effects on proteins in high-flux synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy.
Journal of Synchrotron Radiation **12**: 517-523. DOI: 10.1107/S0909049505006953
- Wien, F. und Wallace, B.A. 2005. Calcium fluoride micro cells for synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy.
Appl. Spectrosc. **59**: 1109-1113. DOI: 10.1366/0003702055012546

-
- Witte, H.H. 1971. Berechnung der raum-zeitlichen Temperaturverteilung auf Materialien, die von einem CW-Laser bestrahlt werden, mit Anwendung auf eine Wasserhaut. *ZAMM - Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik* **51**: 621-626. DOI: 10.1002/zamm.19710510806
- Woody, R.W. 1996. Theory of Circular Dichroism of Proteins. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. (ed. G.D. Fasman), pp. 25-67. Plenum Press, New York.
- Woody, R.W. und Dunker, A.K. 1996. Aromatic and Cystine Side-Chain Circular Dichroism in Proteins. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. (ed. G.D. Fasman), pp. 109-157. Plenum Press, New York.
- Yoshino, K., Esmond, J.R., Parkinson, W.H., Ito, K. und Matsui, T. 1996. Absorption cross section measurements of water vapor in the wavelength region 120 to 188 nm. *Chem. Phys.* **211**: 387-391. DOI: 10.1016/0301-0104(96)00210-8
- Zhang, G., Shi, J., Qi, Z., Wu, W. und Fu, Y. 2007. High-Flux Beamline for Ultraviolet and Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism at NSRL. *AIP Conference Proceedings (Ninth International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation)* **879**: 591-594. DOI: 10.1063/1.2436130
- Zsila, F. und Iwao, Y. 2007. The drug binding site of human α_1 -acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochimica et Biophysica Acta - Gen Subjects* **1770**: 797-809. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.01.009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Herzlich danke ich Robert Seckler für die Betreuung, die fachlichen Ratschläge und Diskussionen.

Ich danke Peter Baumgärtel für gute Zusammenarbeit, die Unterstützung bei den Messungen, die hilfreichen Diskussionen und dass er bei technischen Problemen immer Zeit für mich hatte.

Gerd Reichardt danke ich, dass er bei Fragen zu und Problemen mit den Strahlrohren uns mit Rat und Tat zur Seite stand. Ulrich Schade, Michele Ortolani und Eglof Ritter danke ich für die Unterstützung bei den FTIR-Messungen am BESSY und die hilfreiche Diskussion der Ergebnisse. Ich danke Markus Sauerborn und den zahlreichen Mitarbeiter am HZB, die durch ihre Arbeit Anteil am erfolgreichen Betrieb des BESSY haben.

Bei Jana Kramer möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken. Ihr und allen anderen auch ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe physikalische Biochemie danke ich auch für das nette Arbeitsumfeld und die schöne Zeit. Besonders danke ich Klaus Gast, für die Diskussion, die zahlreichen Hinweise und Kommentare zur Arbeit.

Schließlich danke ich auch meiner Familie die mich immer unterstützt hat.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Diese Arbeit wurde bislang weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.