

Über die Meß-Strategie bei der Untersuchung der Röntgenkleinwinkelstreuung von verdünnten monodispersen Lösungen von Makromolekülen, 1. Mitt.

Von

G. Damaschun, J. J. Müller und H.-V. Pürschel

Aus dem Physikalischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
Max-Wien-Platz 1, DDR

(Eingegangen am 12. August 1968)

Zur Untersuchung der Struktur von Proteinmolekülen und Viren wird die Röntgen-Kleinwinkelstreuung von verdünnten Lösungen gemessen. Die Registrierung der Streukurve erfolgt an diskreten Meßpunkten $b_i = 2 \lambda^{-1} \cdot \sin \vartheta_i$. Mit Hilfe des Sampling-Theorems wird gezeigt, daß der vollständige Verlauf der Streukurve aus diskreten Meßwerten rekonstruiert werden kann, wenn der Abstand zwischen den Meßpunkten kleiner als $\Delta b = (2L)^{-1}$ ist; L ist der Abstand der beiden voneinander entferntesten Atome in den untersuchten Molekülen oder Molekülaggregaten.

For the study of the structure of protein molecules and viruses the small angle X-ray scattering curves of dilute solutions are recorded on discrete measuring points $b_i = 2 \sin \vartheta_i / \lambda$. With help of the Sampling Theorem it is shown that the scattering curve is completely determined by the discrete sampling points, if the interval between these points $\Delta b = (2L)^{-1}$. L is the largest distance between two atoms of a single molecule or molecule agglomerate.

Problemstellung

Die Untersuchung der Röntgen-Kleinwinkelstreuung (RKWS) ist eine vielseitige Methode, um die Struktur von Biopolymeren in Lösung zu ermitteln. Die weitestgehenden Aussagen über die Struktur von Molekülen und Molekülaggregaten werden bei der Untersuchung von verdünnten

monodispersen Lösungen, z. B. von Proteinmolekülen und Viren, erhalten (s. z. B. ^{1, 2}).

Die Messung der *RKWS* erfolgt mit speziellen Kameras, bei denen ein strichförmiger Primärstrahl durch geometrische Strahlbegrenzungen³⁻⁶, durch Kristallkollimatoren⁷⁻¹¹ oder durch totalreflektierende Optiken¹²⁻¹⁴ ausgeblendet wird. Auf Grund der meist geringen Impulsraten wird die Streukurve punktweise als Funktion des Streuwinkels 2ϑ registriert. Es ist zweckmäßig, als Koordinate in der Registrierebene den Betrag des reziproken Gittervektors $b = 2\lambda^{-1} \cdot \sin \vartheta$ zu verwenden; λ ist die Wellenlänge der benutzten Röntgenstrahlung. Eine umfangreiche zusammenfassende Darstellung über experimentelle Fragen der *RKWS* hat *Kratky*¹⁵ gegeben.

Die *RKWS* ist eine empfindliche Methode für den Nachweis von Strukturänderungen durch Variation der Lösungsbedingungen oder nach chemischen Reaktionen^{3, 16}. Dieser Aussagekraft stehen als Nachteil die langen Registrierzeiten in der Größenordnung von 1 Stde. bis 20 Stdn. gegenüber, die die für solche Untersuchungen erforderlichen Meßreihen oft zu aufwendig erscheinen lassen.

¹ *O. Kratky*, Progr. in Biophysics **13**, 105 (1963).

² *W. W. Beeman, P. Kaesberg, J. W. Anderegg und M. B. Webb*, in: Hb. Physik **32** (S. Flügge, Hrsg.), 321, Springer-Verlag: Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957.

³ *A. T. Dembo, N. I. Sosfenow und L. A. Feigin*, Kristallografia **11**, 581 (1966).

⁴ *O. Kratky*, Z. Elektrochem. **62**, 66 (1958).

⁵ *O. Kratky und Z. Skala*, Z. Elektrochem. **62**, 73 (1958).

⁶ *J. W. Anderegg, W. W. Beeman, S. Shulman und P. Kaesberg*, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2927 (1955).

⁷ *H. N. Ritland, P. Kaesberg und W. W. Beeman*, J. Appl. Physics **21**, 838 (1950).

⁸ *H. Jagodzinski und K. Wohlleben*, Z. Elektrochem. **64**, 212 (1960).

⁹ *V. Luzzati, J. Witz und R. Baro*, J. Physique Rad. **24**, 141 A (1963).

¹⁰ *U. Bonse und M. Hart*, Z. Physik **189**, 151 (1966).

¹¹ *U. Bonse und M. Hart*, in Proc. of the Conf. held at Syracuse University 1965 „Small-Angle X-Ray Scattering“, *H. Brumberger* (Hrsg.), Gordon & Breach, New York-London-Paris. 1967.

¹² *G. Damaschun*, Naturwissensch. **51**, 378 (1964).

¹³ *G. Damaschun*, Exp. Techn. Physik **13**, 224 (1965).

¹⁴ *G. Damaschun und J. J. Müller*, Z. Naturforsch. **20a**, 1274 (1965).

¹⁵ *O. Kratky*, in Proc. of the Conf. held at Syracuse University 1965 „Small-Angle X-Ray Scattering“, *H. Brumberger* (Hrsg.), Gordon & Breach, New York-London-Paris. 1967.

¹⁶ *V. Luzzati*, in: X-Ray Optics and X-Ray Microanalysis, 133, Academic Press, New York (1963).

Zur Behebung dieses Nachteils sind in letzter Zeit von verschiedener Seite¹⁷⁻²² automatische *RKW*-Diffraktometer beschrieben worden. Diese Automaten sind u. a. dadurch gekennzeichnet, daß vor der Messung auf mechanischem oder auf elektronischem Wege alle Meßpunkte $b_1, b_2, \dots, b_i, \dots, b_n$ gespeichert werden und nach Beginn der Messung automatisch die Impulsraten an diesen vorgewählten Punkten gemessen werden.

Der Programmierer muß die Meßpunkte b_i und ihren Abstand Δb vor der Messung optimal festlegen. Ein zu geringer Abstand bedingt eine unnötig lange Meßzeit und ein zu großer Abstand führt zu Informationsverlusten über die streuenden Objekte. Es gibt verschiedene Lösungen dieses Optimierungsproblems, die sich dadurch unterscheiden, daß der Experimentator unterschiedliche Information über die zu untersuchende Probe erhalten hat, bevor die Messung der *RKWS* erfolgt. Drei Lösungen für drei praktisch wichtige Grenzfälle sollen in dieser Arbeit und in zwei folgenden mitgeteilt werden.

Der Probensatz

Von *Kotelnikow*²³ und von *Shannon*²⁴ wurde gezeigt, daß zur Rekonstruktion des Verlaufs einer beliebigen Funktion $f(t)$, die zur Klasse der Funktionen mit einer endlichen oberen Grenzfrequenz M gehört, die Kenntnis der Funktionswerte an den Probenpunkten im Abstand $(2M)^{-1}$ ausreicht. Dieser Satz wird in der Literatur zur Informationstheorie (s. z. B.²⁵) als Satz von *Kotelnikow*, Sampling-Theorem oder Probensatz bezeichnet.

Die Signalfunktion $S(b)$, die man bei der Untersuchung der Röntgenkleinwinkelstreuung einer isotropen Probe erhält, ist durch die Integralgleichungen²⁶

¹⁷ Ch. Kratky und O. Kratky, Z. Instrum.-Kde **72**, 302 (1964).

¹⁸ H. Leopold, Elektronik **14**, 359 (1965).

¹⁹ J. Jecny, Cas. Pest. Mat. Fys. **A 16**, 342 (1966).

²⁰ L. A. Feigin und N. I. Sosfenow, Vortrag auf der 9. wissenschaftl. techn. Konf. über die Anwendung von Röntgen-Strahlen zur Materialuntersuchung zu Ehren des 50. Jahrestages der Großen Soz. Oktoberrev., Leningrad (1967).

²¹ H. Leopold, Z. angew. Physik **25**, 81 (1968).

²² R. Breiner, Arch. techn. Messen **312**, SR 2 (1962).

²³ W. A. Kotelnikow, in: Tagungsberichte von der ersten Allunionskonf. der Nachrichtentechnik, Moskau (1933).

²⁴ C. E. Shannon, BSTJ **27**, 379 (1948); **27**, 623 (1948).

²⁵ S. Goldman, Information Theory, Prentice-Hall, New York (1954).

²⁶ G. Porod, Kolloid-Z. **124**, 83 (1951); **125**, 51 (1951).

$$S(b) = G_1(b) \left[G_2(b) * \int_{-\infty}^{+\infty} dt P(t) I(\sqrt{b^2 + t^2}) \right] + N(b) \quad (1)$$

$$I(b) = 2 \bar{S} b^{-1} \int_{-\infty}^{+\infty} dx x C(x) \sin 2\pi b x \quad (2)$$

gegeben. G_1 , G_2 und P sind charakteristische Funktionen der Meßapparatur und N ist eine stochastische Funktion, die den Einfluß der Meßfehler beschreibt^{27, 28}. $C(x)$ ist die ortsabhängige Korrelationsfunktion der untersuchten Probe²⁶.

$S(b)$ ist meist eine symmetrische Funktion; dann ist

$$s(x) = 2 \int_0^{\infty} db S(b) \cos 2\pi b x \quad (3)$$

das Spektrum der Signalfunktion.

Wenn vor der Messung bekannt ist, daß $s(x)$ nur für Werte $x < X$ merklich von Null verschieden ist, lautet nach dem Probensatz die Lösung obigen Problems:

Für den Abstand der Meßpunkte Δb muß die Beziehung

$$\Delta b \leq (2X)^{-1} \quad (4)$$

erfüllt sein, damit aus den Meßwerten der Verlauf der Funktion $S(b)$ rekonstruiert werden kann. Der Verlauf von $S(b)$ ist durch die Formel

$$S^*(b) = \sum_{k=-\infty}^{k=+\infty} S\left(\frac{k}{2X}\right) \frac{\sin(2\pi Xb - k\pi)}{2\pi Xb - k\pi} \quad (5)$$

gegeben.

Das Spektrum der Signalfunktion

Um das Spektrum der Signalfunktion zu berechnen, werden folgende Näherungen

$$G_1(b) = c_1, P(t) = c_2 \text{ und } c_1 c_2 = c, \quad (6)$$

die bei vielen Untersuchungen der *RKWS* erfüllt sind, und die Abkürzung

$$\hat{I}(b) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt I(\sqrt{b^2 + t^2}) \quad (7)$$

²⁷ G. Damaschun, J. J. Müller und H.-V. Pürschel, *Acta biol. med. germ.* **20**, 379 (1968).

²⁸ G. Damaschun, *Wiss. Ztg. Friedrich-Schiller-Univ. Jena, Math.-Nat. Reihe* **16**, 479 (1967).

eingeführt. Gl. (1) lautet dann

$$S(b) = c [G_2(b) * \hat{I}(b)] + N(b). \quad (1a)$$

Das Spektrum der Signalfunktion erhält man durch die Fourier-Cosinus-Transformation (3)

$$s(x) = c g_2(x) \cdot \hat{C}(x) + n(x). \quad (8)$$

Die Funktion $\hat{C}(x)$ hängt mit der Korrelationsfunktion $C(x)$ durch folgende Beziehung zusammen

$$\hat{C}(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} du C(\sqrt{x^2 + u^2}). \quad (9)$$

Diese Integralgleichung entspricht derjenigen, die die Spalthöhenverschmierung der Streukurve beschreibt. Betrachtet man $C(x)$ als dreidimensionale, radialsymmetrische Dichtefunktion im Raum, wird durch Gl. (9) die Projektion dieser Funktion auf eine beliebige durch den Koordinatenursprung gehende Ebene beschrieben. Falls

$$C(x) \equiv 0 \text{ für } x > X, \quad (10)$$

ist auch

$$\hat{C}(x) \equiv 0 \text{ für } x > X. \quad (11)$$

Der Probenpunktabstand bei der Registrierung der Streukurve ist also durch den Bereich bestimmt, in welchem die Korrelationsfunktion der untersuchten Substanz von Null verschieden ist.

Der größte Atomabstand

Bei der Untersuchung von verdünnten Lösungen von Viren und nativen Proteinmolekülen kann man vor der Messung der *RKWS* mit Hilfe anderer Untersuchungsverfahren (Ultrazentrifuge, Elektrophorese u. a.) nachweisen, daß die Lösung monodispers ist. Liegt ferner eine echte verdünnte Lösung mit vernachlässigbaren intermolekularen Kräften vor, d. h. mit einer rein zufälligen Verteilung der gegenseitigen Abstände und gegenseitigen Orientierungen, gilt für die Korrelationsfunktion der untersuchten Probe $C_P(x)$

$$C_P(x) = C_0(x), \quad (12)$$

$C_0(x)$ ist die Korrelationsfunktion eines gelösten Objektes.

Diese Funktion ist identisch Null für alle Werte von x , für die $x > L$ ist. L ist der Abstand zwischen den beiden Atomen des untersuchten

Objektes, die am weitesten voneinander entfernt sind. Für den Meßpunkt-
abstand, der bei der Registrierung nicht überschritten werden darf, gilt

$$\Delta b = \frac{1}{2L} . \quad (13)$$

Den größten Durchmesser der zu untersuchenden Viren oder Protein-
moleküle kann man aus vorangegangenen *RKW*-Diagrammen berech-
nen²⁹⁻³¹. Falls solche Untersuchungen nicht vorliegen, kann man den
größten Durchmesser aus elektronenmikroskopischen Bildern oder aus
kristallographischen Untersuchungen abschätzen. Falls z. B. keine Gründe
für die Annahme vorliegen, daß wesentliche Strukturänderungen beim
Übergang Kristall—Lösung auftreten, muß der größte Durchmesser der
Objekte kleiner sein, als der größte Durchmesser der Elementarzelle des
Kristalls. Auch aus anderen Untersuchungsdaten sind derartige Ab-
schätzungen möglich. Es genügt ja, eine obere Schranke für den größten
Durchmesser zu kennen, um den Meßpunktabstand so zu wählen, daß
keine Information verlorenght. Wenn in der untersuchten Lösung die
Möglichkeit der Bildung von Dimeren besteht, ist natürlich für den
Probenpunktabstand $\Delta b = (4L)^{-1}$ zu wählen usw.

²⁹ A. G. Malmon, *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 233 (1957).

³⁰ G. Damaschun, G. Kley, J. J. Müller und H.-V. Pürschel, *Acta biol. med.*
germ. **20**, 409 (1968).

³¹ G. Damaschun, J. J. Müller und H.-V. Pürschel, *Physik. Verh.* **19**,
155 (1968).