

# Proteindynamik unter hohem hydrostatischen Druck

Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Marc Moron**

Fakultät Physik  
Technische Universität Dortmund  
Februar 2023

Betreuer und Erstgutachter: Prof. Dr. Metin Tolan  
Betreuer und Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2023



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>7</b>
2.1	Aufbau und Eigenschaften von Proteinen . . . . .	7
2.1.1	Auswirkung von hydrostatischem Druck auf Proteine . . . . .	9
2.1.2	Der Einfluss ionisierender Strahlung auf Proteine . . . . .	13
2.1.3	Flüssig-flüssig Phasenseparation in Proteinlösungen . . . . .	14
2.2	Röntgenstrahlung und Röntgenstreuungsmethoden . . . . .	18
2.2.1	Erzeugung und Charakterisierung kohärenter Röntgenstrahlung an Synchrotronstrahlungsquellen . . . . .	18
2.2.2	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) . . . . .	21
2.2.3	Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie (XPCS) . . . . .	40
2.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS) . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Probensystem und Messplätze</b>	<b>55</b>
3.1	Untersuchte Proteinlösungen . . . . .	55
3.1.1	Lysozym . . . . .	55
3.1.2	Gammakristallin D . . . . .	57
3.2	Messplätze . . . . .	57
3.2.1	Die Hochdruckzelle . . . . .	57
3.2.2	Kohärenzstrahllinie P10, PETRA III, DESY . . . . .	58
3.2.3	Aufbau und Parameter für druckabhängige USAXS/XPCS-Messungen . . . . .	60
3.2.4	Aufbau und Parameter für temperaturabhängige USAXS/XPCS-Messungen . . . . .	61
3.2.5	Aufbau für SAXS/XPCS-Messungen an homogenen Proteinlösungen . . . . .	62
3.2.6	Aufbau des DLS-Experiments . . . . .	63
3.3	Entwicklung von Messprotokollen und allgemeine Datenverarbeitung	64
3.3.1	Messprotokolle und Datenverarbeitung von USAXS/XPCS-Messungen an flüssig-flüssigphasenseparierten Proteinlösungen . . . . .	64
3.3.2	Messprotokolle und Datenverarbeitung von SAXS/XPCS-Messungen an homogenen Proteinlösungen . . . . .	68

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Kinetik und Dynamik von flüssig-flüssig Phasenübergängen in Proteinlösungen . . . . .	71
4.1.1	Allgemeiner Ablauf und Datenauswertung . . . . .	71
4.1.2	Druckinduzierte Phasenübergänge in konzentrierten Proteinlösungen . . . . .	72
4.1.3	Temperaturinduzierte Phasenübergänge in konzentrierten Lysozymbiosungen . . . . .	100
4.2	Diffusion von Proteinen in homogenen Lösungen . . . . .	108
4.2.1	Charakterisierung der Diffusion mittels XPCS . . . . .	109
4.2.2	Charakterisierung der Diffusion mittels DLS . . . . .	111
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>115</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>A</b>	<b>Parameter ausgewählter Synchrotronstrahlungsquellen</b>	<b>137</b>
<b>B</b>	<b>Zusätzliche SAXS-Daten</b>	<b>139</b>
<b>C</b>	<b>Zusätzliche Daten zur Dynamik</b>	<b>141</b>
C.1	Lysozym Quenchserie . . . . .	141
C.1.1	Zwei-Zeiten Korrelation für weitere Wellenvektorüberträge . . . . .	141
C.1.2	Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen . . . . .	146
C.2	HP-LLPS Lysozym . . . . .	152
C.2.1	TTCs und $g_2$ -Funktionen . . . . .	152
C.2.2	Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen . . . . .	154
C.3	$\gamma$ D-Kristallin . . . . .	154
C.3.1	Zwei-Zeiten Korrelation und $g_2$ -Funktionen . . . . .	154
C.3.2	Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen . . . . .	159
C.4	Lysozym und PEG . . . . .	161
C.4.1	TTCs und $g_2$ -Funktionen . . . . .	161
C.4.2	Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen . . . . .	161
C.5	Temperaturinduzierte Phasenübergänge in Lysozymbiosungen . . . . .	165
C.5.1	SAXS-Daten . . . . .	165
C.5.2	TTCs und $g_2$ -Funktionen . . . . .	165
C.5.3	Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen . . . . .	169
C.6	Diffusion in homogenen Lösungen . . . . .	171
C.6.1	DLS-Daten . . . . .	171
	<b>Danksagung</b>	<b>172</b>

# Kapitel 1

## Einleitung und Motivation

Proteine sind biologische Makromoleküle, die in jedem lebenden Organismus vorkommen und dort essentielle Funktionen übernehmen. Proteine sind vor allem Bestandteil von Zellen und nehmen dort bis zu 35% des verfügbaren Raumes ein. Die Funktion der Proteine ist nur in ihrem nativen Zustand gegeben, der durch thermodynamische Parameter, wie dem hydrostatischen Druck oder der Temperatur beeinflusst werden kann. Führt eine Änderung dieser Parameter zur Entfaltung der Proteine können sogenannte Protein-Kondensationskrankheiten, wie beispielsweise Katarakt oder Alzheimer, auftreten. Umso erstaunlicher ist es, unter welchen unwirtlichen Bedingungen Leben entsteht und sich flexibel an die Umgebung anpassen kann. Bezugnehmend auf den hydrostatischen Druck, existieren, trotz des Einflusses auf die Proteinstruktur und intermolekulare Wechselwirkung, Tiefseelebewesen bei Drücken von bis zu 1100 bar im Marianengraben. Die Anpassungsmechanismen von biologischen Systemen an diese extremen Bedingungen sind bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt. Eine tragende Rolle scheint in diesem Zusammenhang der Einfluss von Osmolyten zu spielen, die die Protein-Protein Wechselwirkung maßgeblich beeinflussen. Neben dem hydrostatischen Druck spielt ebenfalls die Temperatur und weitere Faktoren, wie Kosolventien und der pH-Wert eine wichtige Rolle.

Der Einfluss des hydrostatischen Drucks auf Proteinlösungen reicht so weit, dass unter variierenden Druckbedingungen Phasenübergänge, bei sonst unveränderten Parametern, induziert werden können. Von fundamentaler Bedeutung der Phasenübergänge in biologischen Systemen ist die flüssig-flüssig Phasenseparation (engl.: *liquid-liquid phase separation*, kurz: LLPS). Bei der LLPS kommt es aufgrund kurzreichweitiger attraktiver Wechselwirkungen zwischen den Molekülen zur Ausbildung einer konzentrierten Phase, in der die Proteine in Tröpfchen vorliegen, und einer verdünnten Phase mit einer deutlich geringeren Konzentration. Die LLPS ist maßgeblich an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel, der Bildung von membranlosen Organellen, dem Transport und der Speicherung von Biomolekülen oder der Übertragung von Nervensignalen. Weitere Anwendungsbereiche der LLPS finden sich in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, in denen Phasenübergänge in Proteinsystemen zur Erzeugung von Gelen (Joghurt, Käse, Cremes) dienen, wobei ebenfalls die Anwendung von hydrostatischem Druck zum Tragen kommt. Erneut wird ersichtlich, warum es von großem Interesse ist die zugrundeliegenden Mechanismen der druckinduzierten

LLPS zu entschlüsseln. Zu diesem Zweck wurden in der Vergangenheit viele Untersuchungen der Protein-Protein Wechselwirkungen in konzentrierten Proteinlösungen unter variablen Umgebungsbedingungen, unter anderem mittels Trübungsmessungen und Röntgenkleinwinkelstreuungs-Messungen (engl.: *small-angle X-ray scattering*, kurz: SAXS), durchgeführt. Dabei wurde häufig das zu untersuchende Modellsystem im äquilibrierten Zustand charakterisiert, wodurch keine Informationen über die Kinetik und Dynamik zugänglich waren. Gerade die Kinetik und die Dynamik sind von hoher Relevanz zum vollständigen Verständnis von biologischen Selbstorganisationsprozessen.

Durch die andauernden (Weiter-) Entwicklungen von Synchrotronstrahlungsquellen und Detektoren ist es heutzutage möglich die zuvor genannten Mechanismen mittels kohärenter Röntgenstreuung auf kurzen Zeitskalen zu untersuchen.

Ein intensiv untersuchtes Modellsystem sind konzentrierte Lysozymbiosungen. Lysozym ist ein Enzym, das hauptsächlich an dem Abbau von Bakterien beteiligt ist und leicht aus diversen Sekreten gewonnen werden kann. In dieser Arbeit wird das Lysozym aus Hühnereiweiß verwendet, das aufgrund seiner Struktur stabil gegen die druckinduzierte Entfaltung ist und sich deshalb gut zur Untersuchung der druckinduzierten LLPS eignet.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung der Wachstumskinetik und der Dynamik von druckinduzierten Phasenübergängen in konzentrierten Lysozymbiosungen in Abhängigkeit der Quenchtiefe. Zu diesem Zweck wurden Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie-Messungen (engl.: *X-ray photon correlation spectroscopy*, kurz: XPCS) durchgeführt. XPCS ist eine Methode, die auf der Streuung kohärenter Röntgenstrahlung beruht und somit, neben den zeitaufgelösten SAXS-Daten, durch Betrachtung der Autokorrelation der Intensitätsfluktuationen, Informationen über die Dynamik des Systems liefert. Aufgrund der Wellenlänge der verwendeten Strahlung sind Längenskalen im Bereich von Nanometern und Zeitskalen im sub-Millisekunden Bereich, abhängig vom verwendeten Detektor, zugänglich. Weitere Messungen beschäftigten sich mit der druckinduzierten LLPS des Augenlinsenproteins  $\gamma$ D-Kristallin, der Quenchtiefenabhängigkeit der temperaturinduzierten LLPS in Lysozymbiosungen, dem Einfluss von Crowdern auf die Kinetik und Dynamik der druckinduzierten LLPS und der Dynamik in homogenen Lysozymbiosungen, die ergänzend mittels dynamischer Lichtstreuung (engl.: *dynamic light scattering*, kurz: DLS) untersucht wurden.

Für die flüssig-flüssig Phasenseparation konnte durch die Betrachtung der Wachstumskinetik der kondensierten Phase und der Dynamik während der LLPS gezeigt werden, dass konzentrierte Lysozymbiosungen ein Gelnetzwerk ausbilden.

Durch die Untersuchung der homogenen Phase in konzentrierten Lysozymbiosungen mittels DLS und XPCS konnte die Existenz von mesoskopischen Clustern nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, dass die Diffusion von Monomeren schneller ist, als die Zeitauflösung aktueller Röntgendetektoren.

Die Gliederungen der Arbeit lautet wie folgt:

- Im zweiten Kapitel wird ein allgemeiner Überblick über Proteine und deren Phasenverhalten gegeben, sowie die theoretischen Grundlagen, der zur Charakterisierung der Probensysteme verwendeten Messmethoden erläutert.
- Das dritte Kapitel liefert einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Probensysteme und über den Aufbau der Messplätze. Außerdem wird der allgemeine Ablauf zur Erstellung von Messprotokollen an den verschiedenen Messplätzen vorgestellt.
- Die Resultate der XPCS und DLS Messungen werden im vierten Kapitel präsentiert und diskutiert. Der Fokus liegt dabei auf der Untersuchung der Kinetik und Dynamik der druck- und temperaturinduzierten LLPS in Abhängigkeit der jeweiligen Quenchtiefen ( $\Delta p$ ,  $\Delta T$ ). Zusätzlich werden weitere Einflussfaktoren, wie Crowder und Unterschiede zwischen der Niederdruck und Hochdruck LLPS aufgezeigt.
- Abschließend werden im fünften Kapitel die wesentlichen Resultate zusammengefasst und Vorschläge für weiterführende Messungen geliefert.

# Kapitel 2

## Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für das Verständnis der in dieser Arbeit angewendeten Messmethoden vorgestellt. Außerdem wird ein Überblick über den Aufbau und das Vorkommen von Proteinen, sowie grundlegende thermodynamische Aspekte über deren Phasenverhalten in konzentrierten Lösungen gegeben.

### 2.1 Aufbau und Eigenschaften von Proteinen

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Aspekte über den Aufbau und die Eigenschaften von Proteinen orientieren sich im Wesentlichen an [Voet u. a., 2008; Berg u. a., 2018; Brändén und Tooze, 1999]. Proteine sind biologische Makromoleküle, die in jedem lebenden Organismus vorkommen. Sie übernehmen entscheidende Funktionen in nahezu allen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Speicherung von Molekülen (Sauerstofftransport), der Katalyse von Reaktionen oder auch bei der Übertragung von Nervensignalen [Berg u. a., 2018]. Die Grundbausteine eines Proteins sind die 20 sogenannten proteinogenen Aminosäuren (vgl. Abbildung 2.1). Die proteinogenen Aminosäuren bestehen aus einem zentralen C-Atom  $C_\alpha$  an das ein Wasserstoffatom H, eine Carboxylgruppe COOH, eine Aminogruppe  $NH_3$  und ein Rest R bindet. Die R-Gruppe, auch Seitenkette der Aminosäure, ist verantwortlich für die Ladung und Polarität der Aminosäure und spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung. Da das zentrale  $C_\alpha$ -Atom für jede Aminosäure vier Bindungspartner besitzt, haben alle Aminosäuren eine tetraedrische Form und sind chiral (bis auf Glycin), wobei die spiegelbildlichen Paare als *L*- und *D*-Isomere bezeichnet werden. Bei dem Zusammenschluss von Aminosäuren zu Proteinen kommen ausschließlich *L*-Isomere vor, was eventuell durch eine geringfügig höhere Wasserlöslichkeit gegenüber den *D*-Isomeren und der daraus resultierenden Selektion über viele Jahre begründet werden kann [Berg u. a., 2018]. In einem Protein sind die Aminosäuren über Peptidbindungen zu verzweigten Polymeren verknüpft, weswegen Proteine häufig auch als Biopolymere bezeichnet werden. Die Abfolge der verknüpften Aminosäuren heißt Primärstruktur. Ein Polypeptid besteht aus regelmäßigen sich wiederholenden Einheiten, die das Rückgrat des Proteins bilden. Der variable Anteil der Polypeptidkette sind die Seitenketten. Konventionsgemäß wird die Abfolge der Aminosäuren eines Polypeptids beginnend mit dem aminoterminalen (N-terminalen) und abschließend mit dem carboxyterminalen (C-terminalen) Rest angegeben. Durch die (zwar eingeschränkte) Flexibilität der Peptidkette können komplexere Strukturen, wie das

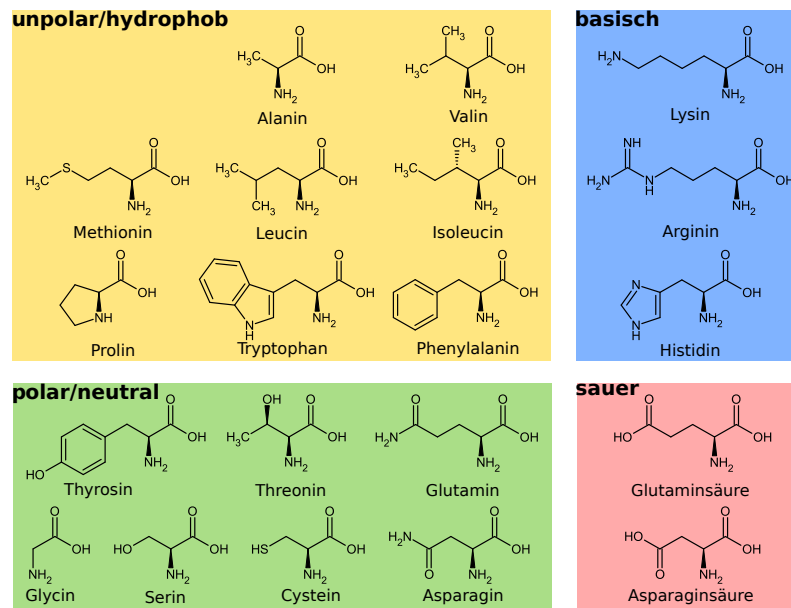


Abbildung 2.1: Auflistung der proteinogenen Aminosäuren gruppiert nach ihren chemischen Eigenschaften [Wikimedia, 2022].

$\beta$ -Faltblatt oder die  $\alpha$ -Helix geformt werden. Diese Strukturen sind Beispiele für die Sekundärstruktur des Proteins. Die Stabilisierung der Sekundärstrukturen erfolgt im Wesentlichen über Wasserstoffbrückenbindungen oder auch über kovalente Disulfidbrücken. In einem Protein sind in der Regel mehrere Sekundärstrukturen vorhanden, die die Tertiärstruktur des Proteins bilden. Die räumliche Anordnung der Polypeptidketten ist ein komplexer Vorgang, der keiner Symmetrie folgt [Berg u. a., 2018] und wird auch als Proteinfaltung bezeichnet. Die spezifische Funktion eines Proteins ist durch den Faltungszustand, der wiederum durch die Aminosäuresequenz sowie der Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten bestimmt wird, gegeben. Weitere Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten sind:

- van der Waals Wechselwirkung
- hydrophobe Wechselwirkung
- Coulomb Wechselwirkung

In Abbildung 2.1 sind die Strukturen der proteinogenen Aminosäuren, eingeteilt nach den Eigenschaften unpolar/hydrophob, basisch, polar/neutral und sauer in Lösung, gezeigt. Diese Eigenschaften haben direkten Einfluss auf die Lokalisation der jeweiligen Aminosäure im gefalteten Protein. In der Regel besteht ein Protein zu etwa 40% aus unpolaren Aminosäuren, die sich in Lösung zum größten Teil im inneren des gefalteten Proteins anreichern. Die polaren Seitenketten sind im Gegensatz dazu häufig an der Oberfläche des gelösten Proteins vorzufinden. Zum einen sorgen

die geladenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche für eine dichte Hydratationsschale mit einer um 10 % bis 15 % erhöhten Dichte im Vergleich zum Wasser [Svergun, Richard u. a., 1998]. Zum anderen hat die resultierende Oberflächenladung des Proteins direkten Einfluss auf intermolekulare Protein-Protein Wechselwirkungen. Die genannten Wechselwirkungen sorgen für eine sehr kompakte Form des Proteins im gefalteten Zustand. Änderungen der Eigenschaften des Lösungsmittels (z.B. pH Wert, Salzkonzentration, Temperatur oder Druck) können gelöste Proteine stabilisieren oder destabilisieren. Neben den genannten intramolekularen Wechselwirkungen, treten in Proteinlösungen oberhalb einer bestimmten Konzentration (typischerweise:  $c_{\text{prot}} > 5 \text{ mg/mL}$ ) auch intermolekulare Wechselwirkungen auf, die wiederum Einfluss auf die Faltung des Proteins, sowie des Phasenverhaltens der Proteinlösung haben. Quantitativ wird die intermolekulare Protein-Protein Wechselwirkung häufig durch die DLVO-Theorie [Derjaguin und Landau, 1993; Verwey, 1947] (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie) beschrieben. Die DLVO-Theorie beschreibt die Stabilität von geladenen Kolloiden in Lösungen, indem die intermolekularen Wechselwirkungen der Kolloide modelliert werden. Das verwendete Wechselwirkungspotential berücksichtigt dabei elektrostatische Coulomb-Wechselwirkungen, sowie einen van-der-Waals (vdW) Anteil und das Potential harter Kugeln (vgl. Abschnitt 2.2.2):

$$V_{\text{DLVO}}(r) = V_{\text{SC}}(r) + V_{\text{Y}}(r) + V_{\text{HS}}(r). \quad (2.1)$$

Der (abgeschirmte) Coulomb-Anteil wird dabei durch  $V_{\text{SC}}(r)$ , der vdW-Anteil durch ein Yukawa Potential  $V_{\text{Y}}(r)$  und das Potential der harten Kugeln durch  $V_{\text{HS}}(r)$  berücksichtigt. Der Abstand der Kolloidzentren zueinander wird mit  $r$  bezeichnet. In der DLVO-Theorie werden die Kolloide als Kugeln mit Durchmesser  $\sigma$  betrachtet, deren Oberflächenladung gleichmäßig verteilt und als effektive Ladung  $Z_{\text{eff}}$  angegeben wird. Dadurch werden Einflüsse der Anisotropie der Kolloidform und der Oberflächenladung auf die Kolloid-Kolloid Wechselwirkung vernachlässigt. Weiterhin werden die im Lösungsmittel vorhandenen Ionen als Punktladungen behandelt und schirmen teilweise die Oberflächenladung der Kolloide ab, wodurch die Abstoßung verringert wird. Trotz der Vielzahl an vereinfachenden Annahmen, konnte die DLVO-Theorie erfolgreich zur Beschreibung der Protein-Protein Wechselwirkung in Lysozymlösungen, sowie zur Charakterisierung der flüssig-flüssig Phasenseparation mittels Röntgenstreuexperimenten verwendet werden [Möller, Schroer u. a., 2012; Schulze u. a., 2016; Julius, Weine, Gao u. a., 2019; Julius, Weine, Berghaus u. a., 2018; Schroer, Markgraf u. a., 2011].

### 2.1.1 Auswirkung von hydrostatischem Druck auf Proteine

Hydrostatischer Druck beschreibt einen der vielen thermodynamischen Parameter, der die Wechselwirkungen in Proteinlösungen, sowie deren Phasenverhalten beeinflussen kann. Ein wichtiger Punkt, der ebenfalls im nächsten Abschnitt im Rahmen der Auswirkungen von Röntgenstrahlung diskutiert wird, ist die Änderung des Faltungszustandes bis hin zur vollständigen Entfaltung des Proteins.

Der Faltungszustand eines Proteins wird in der Literatur durch einen sogenannten



Faltungstrichter beschrieben [Bryngelson u. a., 1995]. Der Faltungstrichter repräsentiert die freie Energie des Proteins in Abhängigkeit von dessen Faltungszustand (vgl. Abbildung 2.2a)). Im nativen Zustand ist der Konfigurationsraum des Proteins stark eingeschränkt, was mit einer Minimierung der freien Energie einhergeht. Abhängig von der Komplexität des Proteins, existieren lokale Minima im Verlauf der freien Energie, die mögliche Zwischenzustände widerspiegeln. Diese lokalen Minima kön-

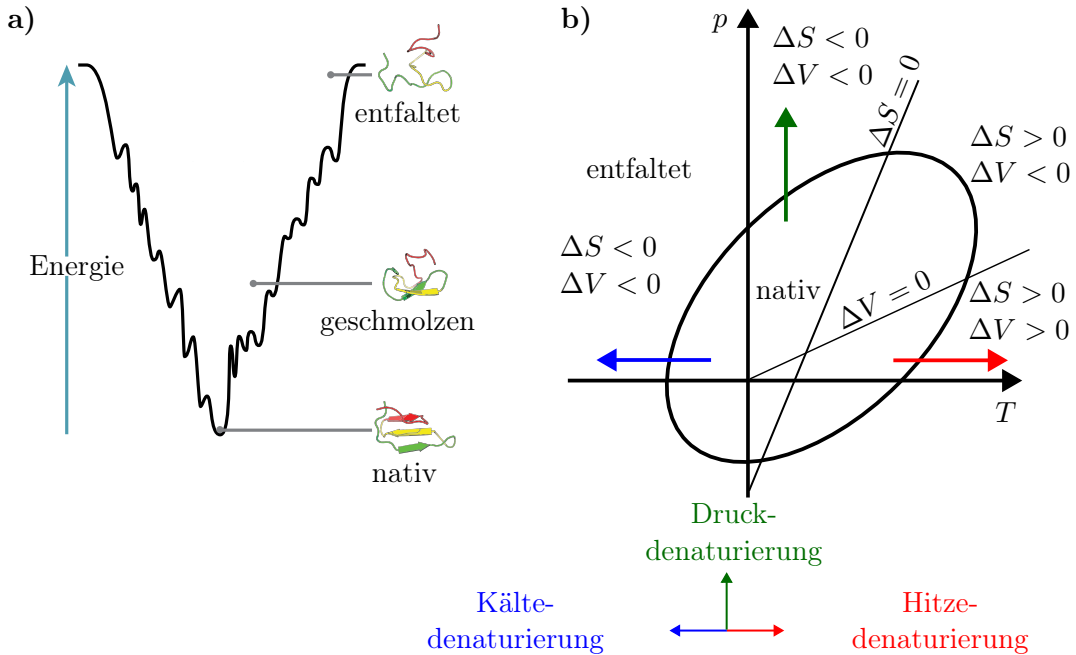


Abbildung 2.2: a) Schematische Darstellung des Faltungstrichters. Die Abbildung wurde von [Wikimedia, 2022] übernommen. b) Druck-Temperatur Stabilitätsdiagramm eines Proteins. Innerhalb der Ellipse ist das Protein in seiner nativen Konformation. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [Schroer, 2011] erstellt.

nen während des (Ent-) Faltungsprozesses durchlaufen werden. Folglich hängt die Kinetik der Proteinfaltung mit der Rauigkeit des Faltungstrichters zusammen [Dill und Chan, 1997]. Die möglichen Zustände, die das Protein einnehmen kann, werden häufig vereinfacht in die Kategorien Zufallskette (s. Abschnitt 2.2.2), *molten globule* (aufgequollen) und dem nativen Zustand eingeteilt. Die Beschreibung als Zufallskette kommt für vollständig entfaltete Proteine zur Anwendung. Bei einem entfaltetem Protein existiert weder eine Tertiärstruktur, noch sind Sekundärstrukturelemente vorhanden. Lediglich die Peptidbindung des Rückgrats halten das Protein zusammen. Im Vergleich dazu sind bei dem aufgequollenen Zustand noch Sekundärstrukturelemente vorhanden, allerdings keine Tertiärstruktur. Dies führt ebenfalls dazu, dass das Protein eine höhere Flexibilität als im nativen Zustand aufweist. Es gibt viele Einflussfaktoren die dazu führen können, dass eine Änderung der Kon-

formation herbeigeführt wird. In Abbildung 2.2b) ist ein Stabilitätsdiagramm für die in dieser Arbeit relevanten Parameter, dem hydrostatischen Druck und der Temperatur, gezeigt. Innerhalb der Ellipse befindet sich das Protein in seinem nativen Zustand. Die Entfaltung des Proteins kann durch Änderung des Druckes (Druckdenaturierung) oder der Temperatur (Hitze- und Kältedenaturierung) herbeigeführt werden. Im Fall der Hitzedenaturierung führt die Erhöhung der Temperatur dazu, dass Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden [Koizumi u. a., 2007], wodurch ein Verlust der Tertiärstruktur und der Sekundärstrukturelemente herbeigeführt werden kann. Im Gegensatz zu einer Temperaturerhöhung, die mit einer Änderung der Dichte und der inneren Energie eines Systems einhergeht, führt ein erhöhter hydrostatischer Druck im Kilobar-Bereich ausschließlich zu einer Erhöhung der Dichte [Silva u. a., 2001]. Allgemein werden unter Druck die Zustände bevorzugt, die das kleinste Volumen aufweisen. Dies wird auch als das Prinzip von Le Chatelier bezeichnet. Weiterhin führt der hydrostatische Druck in dem in dieser Arbeit betrachteten Druckbereich zwischen 1 bar bis 4 kbar nicht zur Entfaltung des verwendeten Lysozyms und  $\gamma$ D-Kristallins. Für Drücke oberhalb dieses Bereichs ist eine druckinduzierte Entfaltung abhängig vom betrachteten Protein möglich, jedoch für eine Vielzahl an Proteinen reversibel [Silva u. a., 2001; Perrett und Zhou, 2002; Heremans und Smeller, 1998]. Die druckinduzierte Entfaltung wird hauptsächlich durch den Kollaps von Hohlräumen im Inneren des Proteins und Packungsdefekten verursacht [Roche u. a., 2013; Royer, 2002]. Zusätzlich führt der hydrostatische Druck häufig zum Eindringen von Wasser ins Innere des Proteins, wodurch teilweise entfaltete Konformationen eingenommen werden [Meersman u. a., 2006]. Zur quantitativen Beschreibung der Proteinentfaltung und unter der Vernachlässigung von Zwischenzuständen, wird die Hawley Gleichung verwendet [Hawley, 1971]. Die Hawley Gleichung gibt die Differenz der freien Energie  $\Delta G(p, T)$  zwischen dem entfalteten und dem nativen Zustand an:

$$\begin{aligned} \Delta G(p, T) = \Delta G_0 - \Delta S_0 (T - T_0) - \Delta C_p \left[ (T - T_0) - T \ln \left( \frac{T}{T_0} \right) \right] \\ + \Delta V_0 (p - p_0) + \frac{\Delta \tilde{\kappa}}{2} (p - p_0)^2 + \Delta \tilde{\alpha} (p - p_0) (T - T_0) , \end{aligned} \quad (2.2)$$

mit der Entropie  $S$ , der Wärmekapazität  $C_p$ , dem Kompressibilitätskoeffizienten  $\tilde{\kappa} = (\partial V / \partial p)_T$  und dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten  $\tilde{\alpha} = (\partial V / \partial T)_p$ . Das Gleichgewicht zwischen dem gefalteten und nativen Zustand ergibt sich für  $\Delta G(p, T) = 0$  und ist durch die Ellipse im Druck-Temperatur Stabilitätsdiagramm (Abbildung 2.2b)) dargestellt<sup>1</sup>. Anhand von Abbildung 2.2b) ist zu erkennen, dass Temperatur und hydrostatischer Druck antagonistische Effekte auf die Stabilität des Proteins haben. Beispielsweise hat eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks für Bedingungen nahe der Hitzedenaturierung einen stabilisierenden Einfluss.

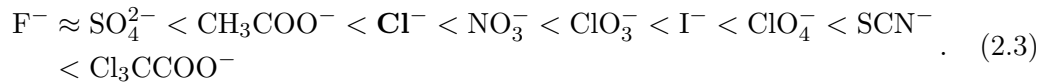
Hydrostatischer Druck hat nicht nur Einfluss auf die Proteinstruktur, sondern ebenfalls auf intermolekulare Wechselwirkungen und wurde in der Vergangenheit intensiv

---

<sup>1</sup>Die elliptische Form ergibt sich aus der Entwicklung des Terms in eckigen Klammern in Gleichung 2.2.

mittels Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht [Möller, Schroer u. a., 2012; Schroer, Markgraf u. a., 2011; Julius, Al-Ayoubi u. a., 2018; Julius, Weine, Gao u. a., 2019]. Das Wechselwirkungspotential wurde bei diesen Untersuchungen im Rahmen der oben beschriebenen DLVO-Theorie modelliert. Für das Protein Lysozym wurde ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen der Amplitude des attraktiven Anteils des Wechselwirkungspotentials  $J$  und dem hydrostatischen Druck gefunden. Dabei sinkt  $J$  zunächst bis zu einem Druck von  $p_{\min,J} \approx 1,6$  kbar, was durch Änderungen der Wasserstruktur, sowie der Hydratation der Proteine erklärt wurde [Schroer, Markgraf u. a., 2011; Weck u. a., 2009; Okhulkov u. a., 1994]. Eine weitere Erhöhung des hydrostatischen Drucks führt zu einer erneuten Zunahme der attraktiven Wechselwirkung. Der Ursprung des Anstiegs der attraktiven Wechselwirkung mit Erhöhung des hydrostatischen Drucks wurde in der Literatur in einem Kollaps der zweiten Hydratationsschale des Wassers vermutet [Schroer, Markgraf u. a., 2011; Möller, Schroer u. a., 2012; Weck u. a., 2009; Katayama u. a., 2010]. Diese Vermutung wurde allerdings durch Simulationen widerlegt [Kumar und Marx, 2019; Pattni und Heyden, 2019]. Zusätzlich zum hydrostatischen Druck können weitere Faktoren die druckabhängigen intermolekularen Wechselwirkungen beeinflussen. Die Hinzugabe von organischen Osmolyten zu Proteinlösungen können sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte hervorrufen. Ein prominenter Vertreter der organischen Osmolyte stellt das Trimethylamin-N-oxid (TMAO) dar, das vor allem in Zellen von Tiefseelebewesen vorkommt. Dort übernimmt es eine stabilisierende Rolle und wirkt der Komprimierung durch hydrostatischen Druck entgegen [Cinar und Winter, 2020; Julius, Weine, Berghaus u. a., 2018; Schroer, Zhai u. a., 2011; Al-Ayoubi u. a., 2019]. Dies geschieht über eine durch TMAO hervorgerufene Erhöhung der starken H-Bindungen [Bennion und Daggett, 2004; Panuszko u. a., 2009]. Der zuvor beschriebene nicht-lineare Zusammenhang zwischen der Stärke der attraktiven Protein-Protein Wechselwirkung  $J$  und dem hydrostatischen Druck  $p$  wird ebenfalls von TMAO moduliert, indem mit steigender Konzentration des Osmolyts das Minimum von  $J$  zu höheren Drücken verschoben wird [Schroer, Zhai u. a., 2011], was ebenfalls für eine Stabilisierung des Wassernetzwerks spricht.

Ein weiterer Faktor der Einfluss auf die intermolekulare Wechselwirkung hat ist die Hinzugabe von Salz. Die unterschiedlichen Salze können, wie auch andere Kosolventien, nach ihren chaotropen und kosmotropen Eigenschaften kategorisiert werden. Für Salze geschieht dies über die Hofmeister-Reihe [Hofmeister, 1888; Kunz u. a., 2004]:



Gleichung 2.3 zeigt die Hofmeister-Reihe für Anionen geordnet von kosmotrop nach chaotrop. Kosmotrope Ionen (links von  $\mathbf{Cl}^-$ ) sind in Lösung stark hydriert und begünstigen die Proteinfaltung, wohingegen chaotrope Ionen (rechts von  $\mathbf{Cl}^-$ ) schwach hydriert sind und die Lösung von nicht-polaren Komponenten, wie z.B. Aminosäuren, und somit die Proteinfaltung begünstigen. Zusätzlich zeigen spezifische Ionen Auswirkung auf physikalisch-chemische Prozesse wie der Selbstorganisation, der

Kristallbildung und der enzymatischen Aktivität [Jungwirth und Winter, 2008; Collins u. a., 2007; Tobias und Hemminger, 2008; Collins, 2006], wobei der Einfluss von Anionen stärker ist als von Kationen. Eine frühere Untersuchung ergab, dass die Lokalisierung von spezifischen Anionen innerhalb der Hofmeister-Reihe ebenfalls Einfluss auf druckabhängige intermolekulare Wechselwirkungen in Lysozymlösungen hat [Möller, Grobelny, Schulze, Steffen u. a., 2014]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Modulation der Protein-Protein Wechselwirkung in Abhängigkeit des hydrostatischen Drucks für das Salz NaCl am schwächsten ist und sich der Einfluss von NaCl auf die Abschirmung der Oberflächenladung der Proteine beschränkt [Zhang, Skoda u. a., 2007; Zhang, Roosen-Runge u. a., 2012; Tardieu u. a., 1999].

Abschließend sei erwähnt, dass die Proteinkonzentration sowie die Temperatur zu keiner Verschiebung von  $J$  auf der Druckachse führen, sondern lediglich zu einer Zunahme ( $\downarrow$  Konzentration,  $\downarrow$  Temperatur) der Attraktivität [Möller, Schroer u. a., 2012; Schroer, Markgraf u. a., 2011].

### 2.1.2 Der Einfluss ionisierender Strahlung auf Proteine

Im vorherigen Abschnitt wurde unter anderem der Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Stabilität von Proteinen beschrieben. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist durch Röntgenstrahlung hervorgerufene Änderungen in strahlensensitiven Proben. Dies wird vor allem bei der Untersuchung von Proteinlösungen an Synchrotronstrahlungsquellen mit hohem Photonenfluss relevant (s. Abschnitt 3.3.1). Durch Röntgenstrahlung induzierte Änderungen beziehungsweise Schäden werden hauptsächlich über das Lösungsmittel, in diesem Fall Wasser, vermittelt. Dabei kommt es im Wasser zur Bildung von Hydroxyl oder Hydroperoxyl Radikalen, die auf sehr kurzen Zeitskalen an die Seitenketten und/oder an das Rückgrat des Proteins binden [Kuwamoto u. a., 2004; Garrison, 1987]. Die durch die Radikale aktivierten Proteine aggregieren über kovalente und nicht-kovalente Bindungen. Es existieren verschiedene Ansätze um strahleninduzierte Schäden zu minimieren. Einerseits kann, wenn der experimentelle Aufbau es zulässt, eine Zelle mit konstantem Probenfluss (engl.: *flow cell*) verwendet werden. Dadurch wird sichergestellt, dass vor dem Eintreten von strahleninduzierten Schäden frisches Probenvolumen belichtet wird. Dieser Ansatz kann in dieser Arbeit aufgrund der Verwendung einer Hochdruckzelle (s. Abschnitt 3.2.1) nicht verfolgt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Minimierung von Strahlenschäden liefert die Verwendung von Kosolventien, wie zum Beispiel Gefrierschutzmittel (engl.: *cryoprotectants*) [O'Neill u. a., 2002] oder Reduktionsmittel (engl.: *reducing agents*) [Maleknia u. a., 2001]. Allerdings können diese Kosolventien Einfluss auf die Stabilität der Proteine, auf die Viskosität der Lösung, auf intermolekulare Wechselwirkungen und auf den Streukontrast haben [Kuwamoto u. a., 2004], weshalb in dieser Arbeit auch keine Kosolventien zum Schutz vor Strahlenschäden verwendet werden<sup>2</sup>. Zuletzt sei erwähnt, dass bei dem Auftreten von strahleninduzierten Schäden in Proteinlösungen ein Verdünnungseffekt auftritt. Dies liegt an dem bereits

---

<sup>2</sup>Bis auf die Proben in denen Kosolventien, wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG), zur Untersuchung des Einflusses auf die Dynamik verwendet wurden.

erwähnten Mechanismus, dass Strahlenschäden durch sekundäre chemische Prozesse (Bindung von Radikalen) verursacht werden. Somit führt eine Reduktion der Wasserkonzentration beziehungsweise eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu weniger freien Radikalen in der Probe und folglich zu einer Erhöhung des Dosislimits.

### 2.1.3 Flüssig-flüssig Phasenseparation in Proteinlösungen

Die Untersuchung der flüssig-flüssig Phasenseparation (engl.: *liquid-liquid phase separation*, kurz: LLPS) von Proteinlösungen gewann in den vergangenen Jahren stark an Aufmerksamkeit, da es zum einen für viele Anwendungsbereiche von großer Bedeutung ist [Da Vela, Exner u. a., 2017], wie zum Beispiel in der Herstellung von Biopharmazeutika [Raut und Kalonia, 2016], bei der Proteinkristallisation [Sauter, Roosen-Runge, Zhang, Lotze, Feoktystov u. a., 2015; Sauter, Roosen-Runge, Zhang, Lotze, Jacobs u. a., 2015] oder bei der Lebensmittelverarbeitung [Gibaud, Mahmoudi u. a., 2012]. Zum anderen ist die flüssig-flüssig Phasenseparation an vielen physiologischen und pathogenen Prozessen beteiligt. Zu den physiologischen Prozessen zählen beispielsweise die Bildung von membranlosen Organellen [Brangwynne, 2013; Bannani u. a., 2017], die Übertragung von Nervensignalen [Wu u. a., 2020; Chong und Forman-Kay, 2016] oder der Speicherung und Transport von Biomolekülen [Wang u. a., 2021] und zu den pathogenen Prozessen gehören neurodegenerative Erkrankungen wie die amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Alzheimer oder Parkinson [Li, King u. a., 2013; Wang u. a., 2021; Ambadipudi u. a., 2017; Zbinden u. a., 2020]. Bei der LLPS kommt es zu einer spontanen Aufspaltung einer homogenen flüssigen Phase in zwei koexistierende flüssige Phasen unterschiedlich hoher Konzentration aufgrund kurzreichweitiger attraktiver Wechselwirkungen. Diese attraktiven Wechselwirkungen können unterschiedlichen Ursprungs sein:

- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Van der Waals Wechselwirkungen
- Hydrophobe Wechselwirkungen
- Entropische Kräfte

Die quantitative Bestimmung der intermolekularen Protein-Protein Wechselwirkung erfolgt experimentell über den zweiten Virialkoeffizienten  $B_{22}$  [Curtis und Lue, 2006], der sich aus der osmotischen Virialgleichung realer Gase ergibt [Eisenberg, 1976]:

$$\frac{\Pi}{c_p RT} = \frac{1}{M_w} + B_{22}(p, T, c_s) \cdot c_p + \dots, \quad (2.4)$$

mit dem osmotischen Druck  $\Pi$ , der Gaskonstanten  $R$ , dem Molekulargewicht  $M_w$ , der Salzkonzentration  $c_s$  und der Proteinkonzentration  $c_p$ . Der zweite Virialkoeffizient kann mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung, Neutronenkleinwinkelstreuung oder Röntgenkleinwinkelstreuung bestimmt werden und ist wie folgt mit dem

Wechselwirkungspotential  $V(r)$  verknüpft:

$$B_{22} = 2\pi \frac{N_A}{M_w^2} \int_0^\infty \left(1 - e^{-V(r)/(k_B T)}\right) r^2 dr, \quad (2.5)$$

mit der Avogadrokonstanten  $N_A$ . Die Normierung des zweiten Virialkoeffizienten auf den Beitrag resultierend aus der harten Schale (vgl. Abschnitt 2.2.2) liefert einen allgemeineren Ansatz zur Charakterisierung der Protein-Protein Wechselwirkung unabhängig von der Art und Größe des Proteins. Damit ein System in die LLPS Phase übergehen kann, sind Werte des reduzierten zweiten Virialkoeffizienten  $b_2$  unterhalb von  $-1,5$  notwendig [Vliegthart und Lekkerkerker, 2000].

Das Auftreten einer LLPS Phase wurde in der Vergangenheit für viele Proteine beobachtet, wie zum Beispiel für Lysozym [Ishimoto und Tanaka, 1977; Muschol und Rosenberger, 1997; Cardinaux, Gibaud u. a., 2007; Möller, Grobelny, Schulze, Bieder u. a., 2014], für BSA [Zhang, Zocher u. a., 2011; Da Vela, Braun u. a., 2016], für  $\gamma$ -Kristallin [Thomson u. a., 1987; Cinar, Cinar u. a., 2019] oder Hämoglobin [Galikin u. a., 2002; Chen u. a., 2004]. Dabei wurde die Ausbildung einer LLPS Phase in Abhängigkeit diverser Parameter wie dem pH Wert, der Temperatur, der Salzkonzentration, der Salzart, dem hydrostatischen Druck und Kosolventien untersucht. Die meisten Proteine zeigen eine obere kritische Lösungstemperatur (engl.: upper critical solution temperature, kurz: UCST), wohingegen LCST-Verhalten (engl.: lower critical solution temperature) seltener zu beobachten ist. Das bedeutet, dass oberhalb (UCST) einer kritischen Temperatur  $T_c$  das System in der homogenen Phase ist und durch Kühlen der Probe ein Übergang in die LLPS Phase induziert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten durch Änderung der Salzkonzentration umkehrbar ist [Begam, Matsarskaia u. a., 2020]. In Abbildung 2.3a) ist ein schematisches Phasendiagramm dargestellt für ein System, das UCST Verhalten zeigt. In Abbildung 2.3b) ist die Spinodale, die von der Binodalen eingehüllt wird dargestellt. Die Binodale und Spinodale schneiden sich im kritischen Punkt  $(c_{p,c}, T_c)$ . In der Region zwischen der Binodalen und Spinodalen ist ein metastabiler Bereich, in dem die Phasentrennung über Nukleation stattfindet (Abbildung 2.3 unten links). Im Gegensatz dazu führt ein Quench (plötzliche Änderung eines Umgebungsparameter, wie z.B. der Temperatur oder dem hydrostatischen Druck) in die innere Region der Spinodalen zu einer Phasentrennung über die spinodale Entmischung [Alberti u. a., 2019; Gibaud und Schurtenberger, 2009]. Der Hauptunterschied zwischen der spinodalen Entmischung und der Ausbildung eines Zweiphasensystems über Nukleation ist das Vorhandensein einer Energiebarriere für die Bildung mikroskopischer Cluster. Aus diesem Grund ist die spinodale Entmischung im Vergleich zur Nukleation deutlich schneller. Die spinodale Entmischung wird quantitativ über die Cahn-Hilliard-Gleichung beschrieben [Cahn und Hilliard, 1958; Cahn, 1965].

Die folgenden Ausführungen über die Cahn-Hilliard-Gleichung orientieren sich an [Papon u. a., 2002; Cahn und Hilliard, 1958; Cahn, 1965]. In der Cahn-Hilliard-Gleichung wird von einem binären System, bestehend aus den Komponenten A und B, ausgegangen, deren Konzentrationen in einem Volumen  $V$  über den dimensionslosen Ordnungsparameter  $\phi(r, t)$  gegeben sind.  $\phi(r, t)$  kann in diesem Fall als lokale

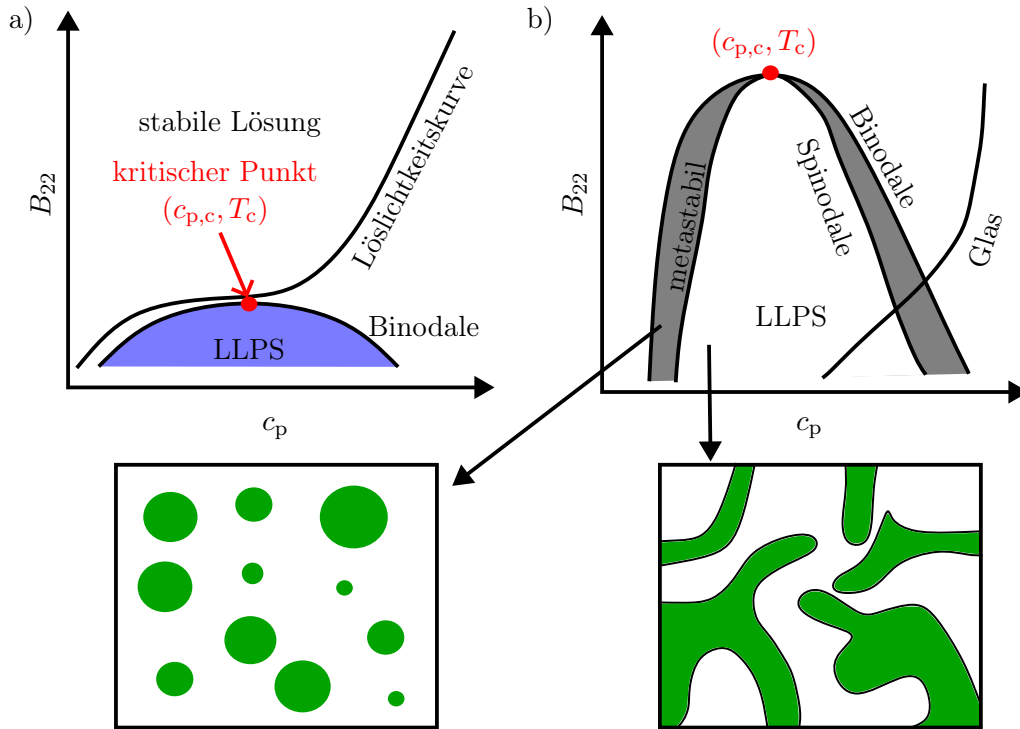


Abbildung 2.3: a) Schematisches Phasendiagramm einer Proteinlösung mit UCST Verhalten. In b) ist eine vergrößerte Darstellung der Binodalen gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist schematisch die Topologie für die Nukleation (links) und die spinodale Entmischung (rechts) dargestellt.

Konzentration einer Komponente betrachtet werden, wobei diese vom Ort  $r$  und von der Zeit  $t$  abhängt. Das Funktional der freien Energie  $F$  für solch ein System ist gegeben durch [Cahn und Hilliard, 1958; Papon u. a., 2002]:

$$F(\phi(r,t)) = \int_V \underbrace{f(\phi(r,t))}_{\text{homogen}} + \underbrace{\frac{1}{2}K|\nabla\phi(r,t)|^2}_{\text{inhomogen}} dV, \quad (2.6)$$

mit lokalen Beiträgen zur freien Energie  $f(\phi)$ , einer positiven Konstante  $K$  und dem Nabla-Operator  $\nabla$ . Die freie Energie setzt sich nach Gleichung 2.6 aus einem Beitrag, den ein homogenes System liefern würde und einem Beitrag der die Inhomogenitäten des Systems berücksichtigt zusammen. Durch Betrachtung der Energiedifferenz  $\Delta F$  zwischen einer homogenen und inhomogenen Lösung, ergibt sich nach Entwicklung von  $f(\phi)$  um eine mittlere Konzentration  $\phi_0$ , die freie Energie zur Bildung der neuen Phase:

$$\Delta F = \int_V \frac{1}{2}(\phi - \phi_0)^2 \cdot \left( \frac{\partial^2 f}{\partial \phi^2} \right)_{\phi=\phi_0} + \frac{1}{2}K|\nabla\phi|^2 dV. \quad (2.7)$$

Gleichung 2.7 zeigt, dass die spinodale Phasentrennung nur unter der Bedingung  $(\partial^2 f / \partial \phi^2) < 0$  stattfinden kann, da ansonsten  $\Delta F > 0$  ist. Zusätzlich ist es zur spinodalen Entmischung erforderlich, dass die Amplituden der Konzentrationsfluktuationen groß genug sind, damit  $\Delta F < 0$  wird. Durch Integration von Gleichung 2.7 und unter Verwendung der Fouriertransformierten der Konzentrationsfluktuationen

$$\delta\phi(r, t) = \int \delta\phi(k, t) e^{-ikr} dk \quad \text{mit} \quad \delta\phi(r, t) = \phi(r, t) - \phi_0 \quad (2.8)$$

ergibt sich die Bedingung zur spinodalen Entmischung:

$$\left( \frac{\partial^2 f}{\partial \phi^2} \right)_{\phi=\phi_0} + Kk^2 < 0, \quad (2.9)$$

woraus ein kritischer Wellenvektor  $k_c$  abgeleitet werden kann:

$$k_c^2 = -\frac{1}{K} \left( \frac{\partial^2 f}{\partial \phi^2} \right)_{\phi=\phi_0}. \quad (2.10)$$

Unter Verwendung der Beziehung  $\lambda_c = 2\pi/k_c$  kann somit eine untere Wellenlänge der Konzentrationsfluktuationen angegeben werden. Dabei wurden für die obigen Betrachtungen die Konzentrationsfluktuationen als periodisch angenommen. Wird das chemische Potential  $\mu = (\partial F / \partial \phi)$  betrachtet, lässt sich die Kinetik der spinodalen Entmischung aus der Relation für den Konzentrationsfluss  $\vec{J}$

$$\vec{J} = M_0 \nabla \Delta \mu \quad (2.11)$$

und der Bedingung der Massenerhaltung<sup>3</sup>

$$\frac{\partial \phi(r, t)}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{J} = 0 \quad (2.12)$$

über die Cahn-Hilliard-Gleichung beschreiben:

$$\boxed{\frac{\partial \delta\phi(r, t)}{\partial t} = M \nabla^2 \left( \frac{\partial f}{\partial \phi(r, t)} - K \nabla^2 \phi(r, t) \right)}. \quad (2.13)$$

$M = M_0/N$  bezeichnet dabei einen (auf die Teilchenzahl normierten) Transportkoeffizienten. Die linearisierte Form der Cahn-Hilliard-Gleichung ergibt sich aus der Entwicklung von  $f(\phi)$  zu:

$$\frac{\partial \delta\phi(r, t)}{\partial t} = M \nabla^2 \left[ \left( \frac{\partial^2 f}{\partial \phi^2} \right)_{\phi=\phi_0} - K \nabla^2 \right] \delta\phi(r, t) \quad (2.14)$$

und hängt nur noch von den Konzentrationsfluktuationen ab. Über die linearisierte Cahn-Hilliard-Gleichung kann beispielsweise die zeitliche Entwicklung der Streuintensität eines Röntgenstreuexperimentes (siehe Abschnitt 2.2.2) modelliert [Papon u. a., 2002] oder auch Zwei-Zeiten Korrelationen (Abschnitt 2.2.3) simuliert werden [Ragulskaya u. a., 2021].

---

<sup>3</sup>Die Massenerhaltung gilt, solange keine chemischen Reaktionen stattfinden.



## 2.2 Röntgenstrahlung und Röntgenstremethoden

Die Entdeckung der Röntgenstrahlung im Jahr 1895 durch Wilhelm Conrad Röntgen hatte weitreichende Konsequenzen in vielen Bereichen, wie zum Beispiel in der Forschung und der Medizin. Dabei wurde zunächst die Entstehung von Röntgenstrahlung in einer abgeschirmten Kathodenstrahlröhre beobachtet, die in der Nähe befindliche fluoreszierende Gegenstände zum Leuchten anregte. Außerdem entdeckte er, dass die neue Art von Strahlung in der Lage ist Gegenstände und Gewebe (unterschiedlich stark) zu durchdringen. Durch diese Entdeckung wurde der Grundstein für die heute etablierten experimentellen Methoden, wie z.B. Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS), Röntgenreflektometrie (XRR), Röntgenphotonenkorrelationspektroskopie (XPCS) oder Röntgendiffraktion (XRD) gelegt. Ein weiterer großer Fortschritt für die Forschung erfolgte durch die Entdeckung der Entstehung von Röntgenstrahlung in Synchrotrons für Teilchenphysikexperimente. Es wurde erkannt, dass Röntgenstrahlung von Synchrotrons der Röntgenstrahlung von einer Röntgenröhre im Hinblick auf die Brillanz, der Kohärenz und dem verfügbaren Energiebereich weit überlegen ist. Im folgenden Abschnitt wird eine Beschreibung der wichtigsten Eigenschaften von Röntgenstrahlung geliefert, sowie dessen Erzeugung an Synchrotronstrahlungsquellen beschrieben.

### 2.2.1 Erzeugung und Charakterisierung kohärenter Röntgenstrahlung an Synchrotronstrahlungsquellen

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Aspekte sind im Wesentlichen aus [Als-Nielsen und McMorro, 2011; Jaeschke u. a., 2020; Talman, 2006] entnommen. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit einer Wellenlänge  $\lambda$  im Ångström Bereich ( $1 \text{ \AA} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ ). Die elektromagnetische Welle kann mathematisch durch ihr elektrisches Feld  $\vec{E}$  beschrieben werden:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 \vec{\epsilon} e^{i(\vec{k}_0 \vec{r} - \omega t)}, \quad (2.15)$$

wobei  $E_0$  die Amplitude des elektrischen Feldes,  $\vec{k}_0$  den Wellenvektor der einfallenden Strahlung mit  $|\vec{k}_0| = 2\pi/\lambda$ ,  $\omega$  die Kreisfrequenz und  $\vec{r}$  einen Ortsvektor beschreibt. Im Fall einer linear polarisierten Welle, ist der Richtungsvektor  $\vec{\epsilon}$ , auch Polarisation genannt, des elektrischen Feldes zeitlich konstant und das elektrische sowie magnetische Feld sind senkrecht zueinander und zur Ausbreitungsrichtung orientiert. Die Erzeugung von Röntgenstrahlung, kann wie eingangs erwähnt durch Röntgenröhren, oder an Synchrotronstrahlungsquellen erfolgen. Im Fall einer Synchrotronstrahlungsquelle werden geladene Teilchen, meistens Elektronen, auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt und durch Magnetstrukturen auf einer geschlossenen Kreisbahn (Speicherring) gehalten. An bestimmten Stellen des Rings werden die Elektronenpakete durch einen Undulator oder Wiggler (allgemein: *insertion device*) zu periodischen Schwingungen angeregt und geben dabei Röntgenstrahlung ab. Die emittierte Röntgenstrahlung wird an den Strahllinien (*Beamlines*) für Experimente

verwendet. Eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung der Röntgenstrahlung ist die Brillanz  $B$ , die sich über

$$B = \frac{\Phi}{4\pi^2 \cdot (\epsilon_{\text{ph};r} * \epsilon_{e^-;x}) \cdot (\epsilon_{\text{ph};r} * \epsilon_{e^-;y})}, \quad (2.16)$$

berechnen lässt [Hettel, 2014]. Dabei bezeichnen  $\epsilon_{e^-;x,y} = \sigma_{e^-;x,y} \cdot \sigma'_{e^-;x,y}$  die Emittanz des Elektronenbündels in horizontaler und vertikaler Richtung, die sich aus dem Produkt der Ausdehnung der Quelle  $\sigma_{e^-;x,y}$  und der Divergenz des Strahls  $\sigma'_{e^-;x,y}$  ergibt. Analog beschreibt  $\epsilon_{\text{ph};r} = \sigma_{\text{ph};r} \cdot \sigma'_{\text{ph};r}$  die Emittanz des Photonenstrahls im Diffraktionslimit und  $*$  kennzeichnet den Faltungsoperator. Außerdem ist die Brillanz proportional zum spektralen Photonfluss  $\Phi$ , der üblicherweise in der Einheit

$$\text{Photonen s}^{-1} \text{ mm}^{-2} \text{ mrad}^{-2} (0,1\% \Delta\lambda/\lambda)$$

angegeben wird.  $\Delta\lambda/\lambda$  bezeichnet hierbei die spektrale Bandbreite  $BW$ . Für die in dieser Arbeit verwendete Methode, die Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie (engl.: *X-ray photon correlation spectroscopy*, XPCS; s. Abschnitt 2.2.3), ist vor allem ein hoher kohärenter Photonfluss  $\Phi_c$  von Bedeutung:

$$\Phi_c = B \left( \frac{\lambda}{2} \right)^2. \quad (2.17)$$

Gleichung 2.17 zeigt, dass der kohärente Fluss proportional zur Brillanz ist und mit dem Quadrat der Photonenenergie abnimmt. Die Kohärenz der Röntgenstrahlung unterteilt sich in zwei Komponenten:

- (i) Transversale (räumliche) Kohärenz
- (ii) Longitudinale (zeitliche) Kohärenz

Der Grad der Kohärenz wird dabei über die jeweiligen Kohärenzlängen  $L_L$  und  $L_T$  bestimmt. Im Fall der longitudinalen Kohärenz ist dessen Kohärenzlänge wie folgt definiert:

$$L_L = \frac{\lambda}{2 \Delta\lambda}. \quad (2.18)$$

Zur Veranschaulichung kann Abbildung 2.4b) (links) herangezogen werden, die die Wellenfronten zweier sich in gleicher Richtung ausbreitenden Wellen mit einer leicht unterschiedlichen Wellenlänge zeigt. Die Kohärenzlänge  $L_L$  beschreibt die zurückgelegte Strecke nach der der Gangunterschied einer halben Wellenlänge entspricht. Für die transversale Kohärenzlänge wird dahingegen von zwei Wellen mit gleicher Wellenlänge ausgegangen, die sich allerdings von zwei verschiedenen Punkten mit Abstand  $D$  in einem Winkel  $\Delta\theta$  zueinander ausbreiten (vgl. Abbildung 2.4b), rechts). Die beiden Wellen sind am Punkt P in Phase. Die transversale Kohärenzlänge bezeichnet

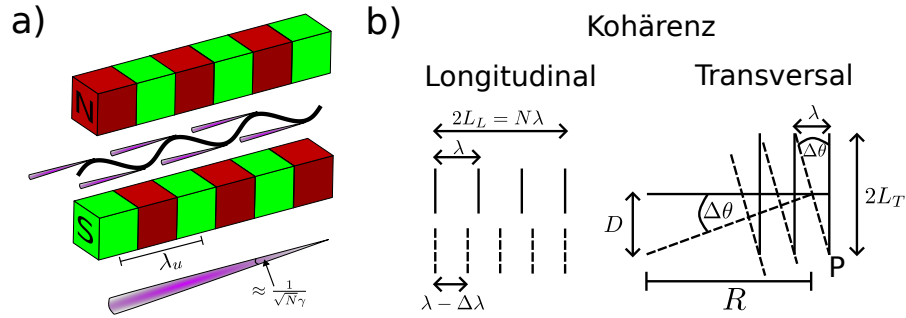


Abbildung 2.4: a) Schematische Darstellung eines Undulators. Gezeigt sind alternierend und äquidistant angeordnete Magnetsegmente durch die der Teilchenstrahl passiert und aufgrund des Magnetfeldes zur periodischen Schwingung angeregt wird. Die Länge einer Undulatorperiode wird als  $\lambda_u$  bezeichnet. Aufgrund der Beschleunigung des Teilchenstrahls wird Strahlung emittiert, die durch geeignete Wahl der Magnetfeldstärke  $B_0$  in der Wellenlänge variiert werden kann. b) Schematische Darstellung zur Definition der longitudinalen und transversalen Kohärenzlänge. Die Kohärenzlänge ist im Allgemeinen als die Strecke definiert, die zwei Wellen propagieren bis sie vollständig außer Phase sind. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [Als-Nielsen und McMorrow, 2011, S. 26] erstellt.

die Strecke entlang der Wellenfront, die zurückgelegt werden muss, bis beide Wellen außer Phase sind und ergibt sich zu:

$$L_T = \frac{\lambda R}{2 D}, \quad (2.19)$$

wobei  $R$  den Abstand zur Quelle bezeichnet. Weiterhin unterteilt sich die transversale Kohärenzlänge in eine horizontale und vertikale Komponente. An Synchrotronstrahlungsquellen der dritten Generation kommen häufig Undulatoren zur Erzeugung brillanter Röntgenstrahlung zum Einsatz. Ein Undulator besteht aus einer periodischen Anordnung von alternierend gepolten Dipolmagneten (vgl. Abbildung 2.4a)). Passiert ein Elektronenbündel den Undulator, wird das Bündel zu periodischen Schwingungen angeregt und emittiert dabei Röntgenstrahlung. Aufgrund der hohen Elektronenenergie im Speicherring (s. Tabelle A.1) kommt es bei der Emission der Röntgenstrahlung zur kegelförmigen Abstrahlung in Flugrichtung. Der Kegel weist dabei einen Öffnungswinkel von näherungsweise  $1/\sqrt{N}\gamma$  auf. Hierbei ist  $N$  die Anzahl der Undulatorperioden und  $\gamma = (1 - v^2/c^2)^{-1/2}$  der Lorentzfaktor, mit der Geschwindigkeit  $v$  und der Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c$ . Undulatoren sind so konstruiert, dass die abgestrahlte Röntgenstrahlung konstruktiv interferiert und liefern somit eine sehr hohe Brillanz im Bereich von  $10^{21}$  Photonen/(s mm<sup>2</sup> mrad<sup>2</sup>)(0,1 % BW)<sup>-1</sup>. Die Wellenlänge (auch fundamentale Wellenlänge genannt) der vom Undulator erzeugten Röntgenstrahlung kann über

$$\lambda = \frac{\lambda_u}{2\gamma^2} \left( 1 + \frac{K^2}{2} \right) \quad \text{mit} \quad K = \frac{eB_0\lambda_u}{2\pi m_e c}. \quad (2.20)$$

berechnet werden [Motz, 1979]. Um eine möglichst hohe Brillanz und einen damit einhergehenden hohen kohärenten Fluss zu erhalten gilt es nach Gleichung 2.16 die Emittanz zu minimieren. Die Emittanz der Undulatorstrahlung im Diffraktionslimit kann unter der Annahme eines Gauß'schen Strahlprofils über

$$\epsilon_{\text{ph};r} = \underbrace{\frac{\sqrt{L\lambda}}{4\pi}}_{\sigma_{\text{ph};r}} \cdot \underbrace{\sqrt{\frac{\lambda}{L}}}_{\sigma'_{\text{ph};r}} = \frac{\lambda}{4\pi} \quad (2.21)$$

berechnet werden [Jaeschke u. a., 2020, S. 40]. Dabei bezeichnet  $L = N\lambda_u$  die Länge des Undulators. Für die Realisierung eines im Diffraktionslimit arbeitenden Speicherrings muss die Emittanz des Teilchenstrahls kleiner sein als die Emittanz des Photonenstrahls:

$$\epsilon_{e^-;x,y} \leq \frac{\lambda}{4\pi}. \quad (2.22)$$

Eine Verringerung der Emittanz führt zu einer größeren transversalen Kohärenzlänge und im Diffraktionslimit zu einem vollständig kohärenten Strahl. Die technische Umsetzung von im Diffraktionslimit arbeitenden Speicherringen ist allerdings sehr aufwändig, da deutlich komplexere Magnetstrukturen verwendet werden müssen (für Details s. z.B. [Hettel, 2014; Einfeld u. a., 2014; Decker, 2014]) und befindet sich für die meisten Speicherringe noch in der Umsetzung. Erste Speicherringe, der vierten Generation, wie z.B. MAX IV, Sirius, oder ESRF-EBS sind bereits erfolgreich in Betrieb und liefern eine Emittanz im sub-nmrad Bereich.

## 2.2.2 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: *small-angle X-ray scattering*, kurz: SAXS) ist eine Methode zur Charakterisierung der Form, Größe und Wechselwirkung von Molekülen in Lösung. Durch die geeignete Wahl der Photonenenergie und der Winkel (typischerweise  $\leq 5^\circ$ ), lassen sich Strukturen im Bereich von (1 bis 100) nm und für ultra-kleine Winkel (USAXS) bis hin zu mehreren Mikrometern untersuchen. Durch die stetige Weiterentwicklung von Synchrotronstrahlungsquellen ist es heutzutage möglich zeitaufgelöste Untersuchungen an schwach streuenden Systemen, wie zum Beispiel Proteinlösungen, durchzuführen. Die hohe Brillanz an Synchrotronstrahlungsquellen der dritten und vierten Generation, sowie Röntgenlasern führt dazu, dass zur Charakterisierung von strahlensensitiven Proben die verfügbare Intensität durch Absorber verringert werden muss (vgl. Abschnitt 2.1.2). Die ersten theoretischen Beschreibungen der Röntgenkleinwinkelstreuung wurden in den 1930er Jahren von A. Guinier durchgeführt und trugen maßgeblich zu der schnellen Entwicklung dieser Methode bei [Seeck und Murphy, 2015; Guinier u. a., 1956]. Ein wesentlicher Unterschied zu den damals bekannten Röntgenstreuungsmethoden besteht darin, dass bei SAXS-Messungen der Analyt nicht in kristalliner Form vorliegen muss, sondern in Umgebungen ähnlich der natürlichen Umgebung (*in vivo*) untersucht werden kann.

Dies gilt z.B. für konzentrierte Proteinlösungen [Julius, Weine, Berghaus u. a., 2018]. Im Folgenden wird ein Überblick über die Röntgenkleinwinkelstreuung gegeben, indem zunächst die Streugeometrie vorgestellt wird, anschließend die Streuung von Röntgenstrahlung an verschiedenen Strukturen beschrieben wird, und zuletzt die wichtigsten experimentell zugänglichen Parameter erläutert werden.

Die Streugeometrie in einem SAXS-Experiment ist schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt. Im linken Teil der Abbildung ist der einfallende Röntgenstrahl durch die in blau dargestellten Wellenfronten mit seinem Wellenvektor  $\vec{k}_i$  gezeigt. Dieser trifft auf die Probe, die sich im Abstand  $L$  zum Detektor befindet und wird an dieser unter einem Streuwinkel von  $2\Theta$  elastisch gestreut. Die gestreute Strahlung kann durch den Wellenvektor  $\vec{k}_s$  beschrieben werden. Die in dunkelblau dargestellten Bereiche des Detektors sind ausmaskiert, da zum Schutz des Detektors ein Strahlstopper (engl.: *Beamstop*) verwendet wird, wodurch im Bereich sehr kleiner Winkel keine Streuintensität gemessen wird. Es kommt zusätzlich zu parasitären Streubeiträgen in horizontaler und vertikaler Richtung, die nicht von der Probe herrühren und somit auch nicht berücksichtigt werden dürfen. Handelt es sich bei der zu unter-

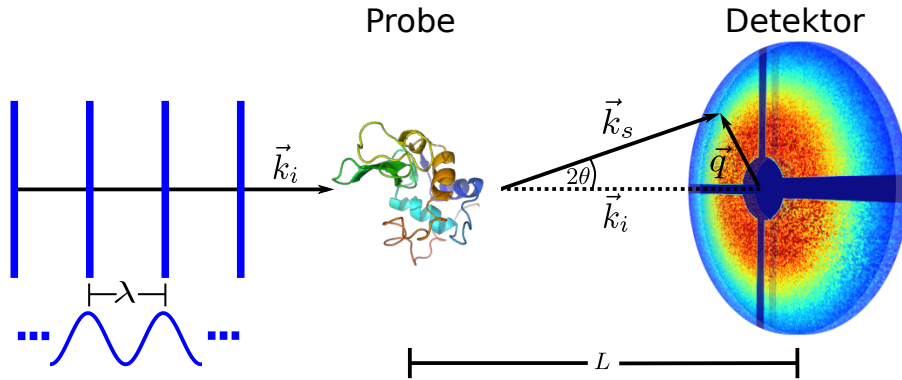


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines SAXS-Experiments. Die einfallende Welle  $\vec{k}_i$  trifft auf die Probe und wird von dieser unter einem Winkel von  $2\Theta$  gestreut. Das Streubild (exemplarisch durch  $\vec{k}_s$  dargestellt) wird im Abstand  $L$  zur Probe von einem 2D-Flächendetektor aufgenommen.

suchenden Probe um ein ergodisches System, d.h., dass alle möglichen Zustände des Systems in endlicher Zeit angenommen werden (was für gelöste Moleküle angenommen werden kann) und handelt es sich bei den streuenden Strukturen um Partikel mit geringer Anisotropie, erzeugt die Probe ein radialsymmetrisches Streubild [Feigin und Svergun, 1987]. In diesem Fall bietet es sich an das 2D-Detektorbild azimuthal zu integrieren und die Streuintensität in Abhängigkeit des Betrages des Wellenvektorübertrages  $|\vec{q}|$  darzustellen. Der Wellenvektorübertrag ist definiert als die Differenz der Wellenvektoren der gestreuten und einfallenden Strahlung (vgl. Abbildung 2.5):

$$\vec{q} := \vec{k}_s - \vec{k}_i. \quad (2.23)$$

Der Betrag von  $\vec{q}$  hängt über

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \Theta \quad (2.24)$$

mit dem Streuwinkel zusammen.

### Streuung an einem Elektron

Trifft Röntgenstrahlung auf ein (quasi-) freies Elektron, wird das Elektron durch die elektromagnetische Welle zu Schwingungen angeregt und emittiert bei einem elastischen Streuprozess Strahlung gleicher Wellenlänge [Als-Nielsen und McMorrow, 2011]. Eine wichtige Größe dieses Streuprozesses ist der differentielle Streuquerschnitt, der definiert ist als das Verhältnis der Anzahl von Teilchen pro Zeiteinheit die in ein Raumwinkelement  $\Delta\Omega$  gestreut werden zu dem einfallenden Photonfluss:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{I_{sc}}{\Phi\Delta\Omega} = \frac{I_{sc}}{I_0} L^2. \quad (2.25)$$

Es kann gezeigt werden (s. [Als-Nielsen und McMorrow, 2011, S. 5-9]), dass der differentielle Streuquerschnitt für die Streuung an einem Elektron durch den differentielle Thomson Streuquerschnitt gegeben ist:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 |\vec{\epsilon} \cdot \vec{\epsilon}^s|^2 = r_0^2 \Pi, \quad (2.26)$$

mit dem klassischen Elektronenradius  $r_0 = e^2/4\pi\epsilon_0 m_e c^2 \approx 2,82 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}$  und den Polarisationsvektoren der einfallenden und gestreuten Strahlung  $\vec{\epsilon}$  und  $\vec{\epsilon}^s$ . Da bei SAXS nur kleine Streuwinkel betrachtet werden, kann der Polarisationsfaktor vernachlässigt werden  $\Pi \approx 1$ .

### Streuung an einem Mehrelektronensystem

Ausgehend von einem System aus zwei Elektronen (vgl. Abbildung 2.6) kann die Streuamplitude  $A(\vec{q})$  über

$$A(\vec{q}) = -r_0 (1 + e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}}) \quad (2.27)$$

berechnet werden. Der differentielle Streuquerschnitt ergibt sich aus dem Betragsquadrat der Streuamplitude:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = A(\vec{q}) \cdot A^*(\vec{q}) = |A(\vec{q})|^2. \quad (2.28)$$

Bei der Streuung an einem Zwei-Elektronen-System wird der einfallende Röntgenstrahl an dem Elektron im Koordinatenursprung und an dem Elektron an der Position  $\vec{r}$  gestreut. Die Phasendifferenz zwischen der einfallenden und gestreuten Welle beträgt  $\Delta\phi = \vec{q} \cdot \vec{r}$ .

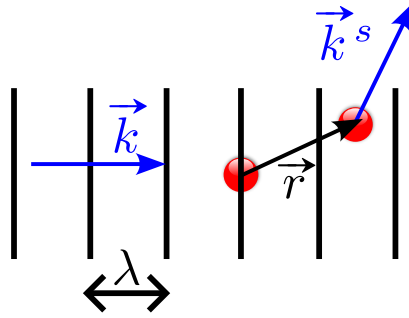


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Streuung von Röntgenstrahlung an einem Zwei-Elektronen-System. Die Wellenfronten der einfallenden Welle sind als vertikale schwarze Linien dargestellt und die einfallende Welle ist durch den Wellenvektor  $\vec{k}$  charakterisiert. Nach dem Streuprozess an dem Elektron im Koordinatenursprung, wird die einfallende Strahlung an dem Elektron an Position  $\vec{r}$  gestreut. Die gestreute Strahlung wird durch den Wellenvektor  $\vec{k}^s$  beschrieben. Die Phasendifferenz zwischen der einfallenden und der gestreuten Strahlung beträgt  $\vec{q} \cdot \vec{r}$ .

Die obigen Betrachtungen lassen sich nun auf Systeme mit mehr als zwei Elektronen erweitern, wobei sich die Streuamplitude aus der Summe der Streubeiträge aller Elektronen zusammensetzt die an den Positionen  $\vec{r}_j$  lokalisiert sind:

$$A(\vec{q}) = -r_0 \sum_j e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_j}. \quad (2.29)$$

Dabei ist zu beachten, dass dieser Zusammenhang nur gilt, wenn keine Mehrfachstreuung auftritt, was als Born-Näherung oder auch kinematische Näherung bezeichnet wird und für schwach streuende Probensysteme, wie z.B. Proteinlösungen, erfüllt ist [Landau und Lifshitz, 1975]. Durch Einführung der Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$  eines Systems, lässt sich die Streuamplitude umschreiben:

$$A(\vec{q}) = -r_0 \int_{\text{Vol}} \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r}. \quad (2.30)$$

Gleichung 2.30 zeigt, dass die Streuamplitude durch die Fouriertransformierte der Elektronendichte gegeben ist. Für den Spezialfall eines Atoms, beschreibt das Integral in Gleichung 2.30 den sogenannten Atomformfaktor  $f_0$ :

$$f_0(\vec{q}) = \int_{\text{Vol}} \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} = \begin{cases} Z, & q \rightarrow 0 \\ 0, & q \rightarrow \infty \end{cases}. \quad (2.31)$$

Für den Grenzfall  $\lim_{q \rightarrow 0} f_0 = Z$ , ist der Atomformfaktor identisch mit der Elementarladung  $Z$  des Atoms. Im anderen Grenzfall  $\lim_{q \rightarrow \infty} f_0 = 0$  fluktuieren die Beiträge der einzelnen Phasenfaktoren stark, sodass sie sich im Mittel aufheben.

Analog zu der Erweiterung eines Zwei-Elektronen-Systems auf ein Atom, lässt sich

der Formfaktor eines Moleküls  $F_{\text{Mol}}$  aus der Summe der Formfaktoren der zu dem Molekül gehörenden Atome bestimmen:

$$F_{\text{Mol}} = \sum_j f_j(\vec{q}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_j}, \quad (2.32)$$

wobei  $f_j(\vec{q})$  den Formfaktor des  $j$ -ten Atoms und  $\vec{r}_j$  die zugehörige Positionen angibt. Das nächst komplexere System ist ein Ensemble aus zufällig angeordneten Molekülen (vgl. Abbildung 2.7). Die Elektronendichte des Ensembles  $\rho(\vec{R})$  setzt sich zusammen

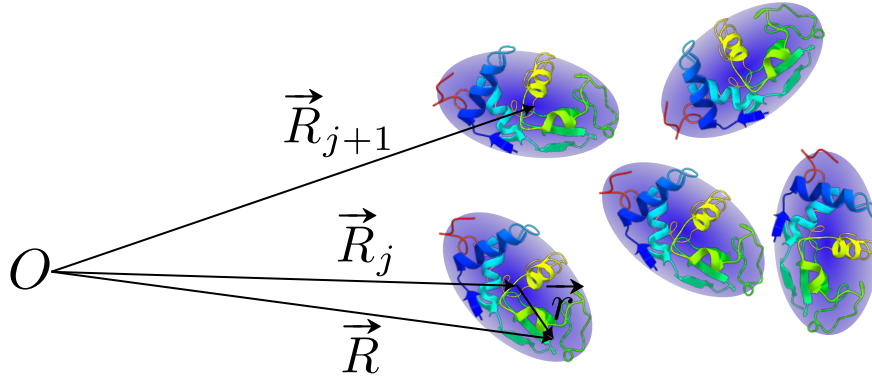


Abbildung 2.7: Darstellung der Elektronendichteverteilung eines Ensembles aus Molekülen. Der Koordinatenursprung befindet sich an Punkt  $O$ . Die Vektoren  $\vec{R}_j$  zeigen auf die Schwerpunkte der Moleküle.  $\vec{R}$  beschreibt einen Ortsvektor und  $\vec{r}$  gibt den Abstand des Vektors  $\vec{R}$  vom Schwerpunkt des Moleküls an mit  $\vec{r} = \vec{R} - \vec{R}_j$ .

aus der Summe der Elektronendichten  $\rho_j^{\text{Mol}}$  der einzelnen Moleküle [Glatter und Kratky, 1982]:

$$\rho(\vec{R}) = \sum_j \rho_j^{\text{Mol}}(\vec{R} - \vec{R}_j) \quad (2.33)$$

Unter Verwendung der Elektronendichte ergibt sich der differentielle Wirkungsquerschnitt zu:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \sum_j \sum_k e^{i\vec{q} \cdot (\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \int_{\text{Vol}} \int_{\text{Vol}} \rho_j^{\text{Mol}}(\vec{r}) \rho_k^{\text{Mol}}(\vec{r}') e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r} - \vec{r}')} d\vec{r} d\vec{r}' \quad (2.34)$$

Durch Aufteilung der Summation in Beiträge für  $j = k$  und  $j \neq k$  und unter Verwendung der Formamplitude sowie der Elektronendichte des Ensembles (vgl. Gleichungen 2.32 und 2.33) lässt sich der differentielle Wirkungsquerschnitt schreiben als:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \left( \sum_{j=k} |F_j^{\text{Mol}}|^2 + \sum_{j \neq k} F_j^{\text{Mol}} F_k^{*\text{Mol}} e^{i\vec{q} \cdot (\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right) \quad (2.35)$$



Die erste Summe des differentiellen Wirkungsquerschnitts berücksichtigt die Streubeiträge der einzelnen Moleküle, wohingegen die zweite Summe die Überlagerung der Streubeiträge unterschiedlicher Moleküle berücksichtigt. Außerdem hängt die zweite Summe vom Abstand der Moleküle ab und steht dadurch mit ihrer räumlichen Korrelation in Verbindung. Bisher wurde angenommen, dass die streuenden Strukturen statisch sind. Allerdings unterliegen die Teilchen in einem realen System der Brown'schen Molekularbewegung, sodass sich ihre Position und Orientierung zeitlich ändert. Als Konsequenz daraus wird in einem Experiment das zeitliche Mittel über verschiedene Zustände des Systems gemessen und die Annahme eines statischen Systems verliert ihre Gültigkeit. Handelt es sich bei dem betrachteten System um ein ergodisches System, d.h., dass alle Zustände gleich wahrscheinlich sind und in einem endlichen Zeitintervall eingenommen werden, kann das zeitliche Mittel, durch das Mittel über alle möglichen Zustände (Ensemble-Mittel) ersetzt werden [Spalla, 2002]:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle_T = \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle_\Omega \quad (2.36)$$

Zur weiteren Vereinfachung wird angenommen, dass es sich bei den Partikeln um  $N$  identische Moleküle handelt und dass ihre Formamplituden  $F_j(\vec{q})$  nicht vom Abstand der Moleküle zueinander abhängen. Diese Vereinfachung wird auch als *decoupling approximation* bezeichnet. Dadurch lässt sich der differentielle Wirkungsquerschnitt umschreiben [Kotlarchyk und Chen, 1983]:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle_\Omega = r_0^2 N \left( \left\langle |F^{\text{Mol}}|^2 \right\rangle_\Omega + \left| \left\langle F^{\text{Mol}} \right\rangle_\Omega \right|^2 \cdot \left\langle \sum_{j \neq k} e^{i\vec{q}(\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right\rangle_\Omega \right). \quad (2.37)$$

An dieser Stelle können zwei fundamentale Größen zur Charakterisierung weicher Materie definiert werden auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

### Verdünnte Lösungen - Der Formfaktor

Bei der ersten Größe handelt es sich um den sogenannten Formfaktor  $P(q)$ :

$$P(q) = \left\langle |F^{\text{Mol}}(\vec{q})|^2 \right\rangle_\Omega \quad (2.38)$$

Der Formfaktor enthält Informationen über die Form und Größe der streuenden Partikel und hängt nur noch vom Betrag des Wellenvektorübertrages ab, da durch die Mittelung über die möglichen Zustände und Bildung des Betragsquadrates die Phaseninformationen verloren gehen. Zur experimentellen Bestimmung des Formfaktors ist anhand von Gleichung 2.37 erkennbar, dass dieser direkt gemessen wird, wenn die Positionen der Streuobjekte unkorreliert sind. In diesem Fall ist die gemessene Intensität proportional zu  $P(q)$ :

$$I_{sc}(q) = I_0 \frac{r_0^2}{L^2} NP(q) \quad (2.39)$$

Diese Bedingung wird in einem realen System geschaffen, wenn die Konzentration  $c$  der Moleküle sehr gering ist ( $c \leq 1 \text{ wt } \%$ ) und die Wechselwirkung der gelösten Moleküle vernachlässigt werden kann.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der bisher noch nicht betrachtet wurde, ist, dass in SAXS-Experimenten die zu untersuchenden Strukturen in Lösung vorliegen. Der Einfluss des Lösungsmittels kann über Betrachtung der Streuamplitude evaluiert werden. Dazu wird das Lösungsmittel als Matrix mit einer mittleren Elektronendichte  $\rho^{\text{LM}}$  angenommen. Unter Vernachlässigung der Wechselwirkung der Moleküle mit dem Lösungsmittel, kann die Streuamplitude als Summe der einzelnen Streubeiträge geschrieben werden [Debye und Bueche, 1949; Glatter und Kratky, 1982]:

$$\begin{aligned}
 A(\vec{q}) &= -r_0 \left( \int_{V_{\text{Mol}}} \rho^{\text{Mol}}(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} + \int_{V-V_{\text{Mol}}} \rho^{\text{LM}} e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right) \\
 &= -r_0 \left( \int_{V_{\text{Mol}}} (\rho^{\text{Mol}}(\vec{r}) - \rho^{\text{LM}}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} + \int_V \rho^{\text{LM}} e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right) \quad (2.40) \\
 &= -r_0 \left( \int_{V_{\text{Mol}}} \Delta\rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} + \rho^{\text{LM}} \delta(\vec{q}) \right),
 \end{aligned}$$

mit dem Elektronendichtekontrast  $\Delta\rho$  zwischen Lösungsmittel und Molekül und der  $\delta$ -Distribution  $\delta(\vec{q})$ . Gleichung 2.40 zeigt, dass die Streuamplitude unter Berücksichtigung des Lösungsmittels als Fouriertransformierte des Elektronendichtekontrasts aufgefasst werden kann. Aus experimenteller Sicht ist die Vernachlässigung von  $\rho^{\text{LM}}\delta(\vec{q})$  unproblematisch, da für  $|\vec{q}| = 0$  durch die Verwendung eines Strahlstoppers keine Daten aufgenommen werden. Der Formfaktor ergibt sich damit zu:

$$\begin{aligned}
 P(q) &= \left\langle F^{\text{Mol}}(\vec{q}) F^{*\text{Mol}}(\vec{q}) \right\rangle_{\Omega} \\
 &= \left\langle \int \int_{V_{\text{Mol}}} \Delta\rho(\vec{r}_1) \Delta\rho(\vec{r}_2) e^{i\vec{q}(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \right\rangle_{\Omega} \quad (2.41) \\
 &= \left\langle \int \int_{V_{\text{Mol}}} \Delta\rho(\vec{r}_1) \Delta\rho(\vec{r}_1 - \vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r}_1 d\vec{r} \right\rangle_{\Omega},
 \end{aligned}$$

mit  $\vec{r} = \vec{r}_1 - \vec{r}_2$ . An dieser Stelle kann die räumliche Autokorrelationsfunktion des Elektronendichtekontrasts  $\gamma(\vec{r})$  definiert werden [Debye und Bueche, 1949]:

$$\gamma(\vec{r}) = \int_{V_{\text{Mol}}} \Delta\rho(\vec{r}_1) \Delta\rho(\vec{r}_1 - \vec{r}) d\vec{r}_1, \quad (2.42)$$

bzw. ihr Raummittel  $\gamma(r)$ :

$$\gamma(r) = \gamma_0(r) \cdot V_{\text{Mol}} = \langle \gamma(\vec{r}) \rangle_{\Omega}, \quad (2.43)$$

mit der normierten Autokorrelationsfunktion  $\gamma_0(r)$  und dem Volumen des streuenden Moleküls  $V_{\text{Mol}}$ . Auch hier führt die Mittelung über den Raum dazu, dass Informationen über das Streuobjekt verloren gehen. Im Fall der räumlichen Autokorrelation

hängt diese nur noch vom Betrag des Abstandsvektors  $r = |\vec{r}|$  ab. Anschaulich kann  $\gamma_0(r)$  als das relative Überlappungsvolumen eines Objektes mit einer Kopie des Objektes im Abstand  $r$  interpretiert werden. Der Formfaktor nimmt nach Mittelung über alle Orientierungen folgende Gestalt an [Glatter und Kratky, 1982]:

$$P(q) = 4\pi \int_0^\infty \gamma(r) r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr, \quad (2.44)$$

mit der radialen Paarabstandsverteilungsfunktion  $p(r) := \gamma(r)r^2$  (engl.: *pair distance distribution function*, kurz: PDDF) [Feigin und Svergun, 1987]. Dabei wurde für die Mittelung des Phasenfaktors<sup>1</sup> folgende Beziehung verwendet [Debye, 1915]:

$$\langle e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} \rangle_\Omega = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad (2.45)$$

Für einfache Strukturen, wie z.B. homogene Kugeln mit Radius  $R$ , können der Formfaktor, die räumliche Autokorrelation und die radiale Paarabstandsverteilungsfunktion analytisch bestimmt werden [Rayleigh, 1914; Guinier u. a., 1956]:

$$\begin{aligned} P(q) &= 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \\ &= (\Delta\rho)^2 V_{\text{Mol}}^2 \left( \frac{3(\sin(qR) - qR \cos(qR))}{(qR)^3} \right)^2, \end{aligned} \quad (2.46)$$

$$\gamma_0(r) = \left( 1 - \frac{3}{4} \frac{r}{R} + \frac{1}{16} \frac{r^3}{R^3} \right) \quad (2.47)$$

und

$$p(r) = \frac{3}{4\pi^2} \frac{r^2}{R^2} \left( 2 - \frac{3}{2} \frac{r}{R} + \frac{1}{8} \frac{r^3}{R^3} \right). \quad (2.48)$$

Für Rotationsellipsoiden mit den Halbachsen  $a$  und  $b$ , was eine gute Näherung für das in dieser Arbeit verwendete Protein Lysozym darstellt [Svergun, Richard u. a., 1998], ist der Formfaktor nur noch numerisch über [Mittelbach und Porod, 1962]

$$\begin{aligned} P(q) &= \int_0^1 P_0^2 \left( q\sqrt{a^2 + x^2(b^2 - a^2)} \right) dx \\ &= \int_0^1 \frac{J_1 \left( q\sqrt{a^2 + x^2(b^2 - a^2)} \right)}{\left( q\sqrt{a^2 + x^2(b^2 - a^2)} \right)^4} dx \end{aligned} \quad (2.49)$$

bestimmbar.  $J_1$  bezeichnet die Besselfunktion der ersten Ordnung.

Für Kugeln und ausgewählte andere Formen sind in Abbildung 2.8 der Formfaktor und die zugehörigen radialen Paarabstandsverteilungsfunktionen dargestellt. Die

---

<sup>1</sup>Bildung des Raummittels einer Funktion:  $\langle f(\vec{q}) \rangle_\Omega = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi f(\vec{q}, \theta, \varphi) \sin \theta d\theta d\varphi$

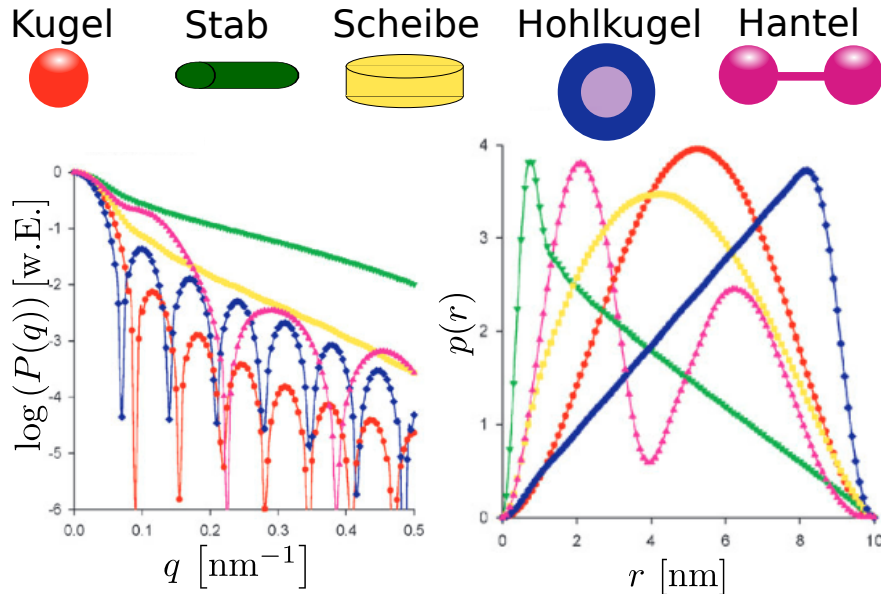


Abbildung 2.8: Logarithmierter Formfaktor  $\log(P(q))$  aufgetragen gegen  $q$  (links), sowie die zugehörigen radialen Paarabstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  in Abhängigkeit des Abstands  $r$  (rechts) für ausgewählte Strukturen. Die zugehörigen Strukturen sind im obigen Teil der Abbildung dargestellt. Die Abbildung wurde aus [Svergun und Koch, 2003] entnommen und abgeändert.

radiale Paarabstandsverteilungsfunktion kann für homogene Partikel als Abstandshistogramm aufgefasst werden. Die Höhe von  $p(r)$  ist dabei proportional zur Anzahl der Verbindungslinien zweier Punkte innerhalb eines Moleküls deren Abstand im Intervall  $[r, r + dr]$  liegt [Glatter, 2018]. Laut Gleichung 2.44 kann  $p(r)$  über die Fourier-Rücktransformation des Formfaktors bestimmt werden. In einem realen SAXS-Experiment wird allerdings durch die endliche Größe der Detektorpixel kein kontinuierliches Signal im zugänglichen  $q$ -Bereich aufgenommen und häufig ist der zugängliche  $q$ -Bereich nicht ausreichend groß um Aussagen über die streuende Struktur treffen zu können. Im Fall der endlichen Auflösung, kann  $p(r)$  dennoch aus dem gemessenen Formfaktor gewonnen werden, indem aus der diskreten Näherung  $p(r) = \sum_i c_i S_i(r)$  ein Formfaktor errechnet und anschließend über Variation der Koeffizienten  $c_i$  der Splines  $S_i(r)$  an den experimentell bestimmten Formfaktor angepasst wird [Glatter, 1977]. Dieses Vorgehen findet z.B. Anwendung in der häufig für SAXS-Experimente verwendeten Software GNOM [Svergun, 1992]. Im Fall des limitierten  $q$ -Bereiches ist allerdings meistens keine Bestimmung von  $p(r)$  möglich. Dennoch können strukturelle Informationen über die Betrachtung von Grenzbereichen gewonnen werden. Diese Grenzbereiche werden im Folgenden näher erläutert. Im Bereich kleiner Wellenvektorüberträge kann die sogenannte Guinier-Näherung angewendet werden [Guinier u. a., 1956]. Dazu wird der Term  $\frac{\sin(qr)}{qr}$  des Formfaktors

(s. Gleichung 2.44) durch die *Maclaurin Serie*<sup>4</sup> genähert und anschließend die Integration durchgeführt. Dadurch nimmt der Formfaktor im Guinier-Bereich folgende Gestalt an:

$$P(q) \approx P(0) \left( 1 - \frac{1}{3} q^2 R_G^2 \right), \quad (2.50)$$

mit

$$P(0) = \int_0^{D_{\max}} p(r) dr, \quad (2.51)$$

und dem Quadrat des Gyrationradius  $R_G$  [Feigin und Svergun, 1987]

$$R_G^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr}. \quad (2.52)$$

Unter Verwendung der *Maclaurin Serie*  $e^{-x} \approx 1 - x$  resultiert letztendlich:

$$P(q) = P(0) \cdot e^{-\frac{1}{3} q^2 R_G^2} \quad (2.53)$$

bzw. für homogene Streuobjekte:

$$P(q) = (\Delta\rho V_{\text{Mol}})^2 \cdot e^{-\frac{1}{3} q^2 R_G^2}. \quad (2.54)$$

Gleichung 2.54 zeigt, dass im Bereich kleiner  $q$  aus der Formfaktormessung  $R_G$  bestimmt werden kann. Dazu wird der natürliche Logarithmus des gemessenen Formfaktors gegen  $q^2$  aufgetragen. Im Guinier-Bereich ( $q \cdot R_G \leq 1,3$  [Putnam u. a., 2007; Svergun und Koch, 2003]) resultiert ein linearer Zusammenhang, wobei die Gerade eine Steigung von  $-1/3 R_G^2$  aufweist (vgl. Abbildung 2.9). Der Gyrationradius kann, bei bekannter Form der streuenden Moleküle, in deren reale Dimensionen umgerechnet werden. Die Beziehung für homogene Kugeln lautet zum Beispiel [Kratky und Laggner, 2001]:

$$R_G = \sqrt{\frac{3}{5}} R \quad (2.55)$$

oder für einen Rotationsellipsoiden mit den Halbachsen  $a$  und  $b$  [Kratky und Laggner, 2001]:

$$R_G = \sqrt{\frac{2a^2 + b^2}{5}}. \quad (2.56)$$

---

<sup>4</sup> *Maclaurin Serie* von  $\frac{\sin(qr)}{qr}$ :

$$\frac{\sin(qr)}{qr} \approx 1 - \frac{1}{6} q^2 r^2$$

Der zweite Grenzbereich ist der Bereich großer Wellenvektorüberträge, der sogenannte Porod-Bereich. Das Porod-Gesetz besagt, dass im Bereich großer  $q$  die Streuintensität proportional zum Verhältnis  $S/V_{\text{Mol}}$  der Oberfläche zum Volumen der Streupartikel und invers proportional zu  $q^4$  ist [Porod, 1951]:

$$\boxed{\lim_{q \rightarrow \infty} q^4 I(q) = 2\pi(\Delta\rho)^2 \frac{S}{V_{\text{Mol}}}}. \quad (2.57)$$

Dieser Zusammenhang ist gültig, wenn es sich um kompakte und homogene Streuobjekte handelt. Auch bei diesem Grenzfall ist zu erkennen, dass durch das Verhalten der Streuintensität im Bereich großer  $q$  keine Informationen über die Form der Streupartikel gewonnen werden kann. In Abbildung 2.10a) sind Formfaktoren für ausgewählte Objekte in der Porod-Debye Darstellung gezeigt. Es ist zu erkennen, dass für kompakte, homogene Strukturen, wie z.B. Kugeln oder Ellipsoide, der mit  $q^4$  skalierte Formfaktor für große  $q$  einen konstanten Wert annimmt bzw. um diesen oszilliert. Dieses Verhalten ist bereits in Abbildung 2.9 für Kugeln gezeigt. Ein weiterer Fall ist eine Gaußkette, ein Modell, das häufig zur Beschreibung von Polymeren herangezogen wird. In diesem Fall fällt die Streuintensität für große  $q$  nicht mit  $q^{-4}$ , sondern mit  $I(q) \propto q^{-\alpha} = q^{-2}$ , wodurch der Anstieg im Porod-Debye Plot erklärt werden kann. Der Formfaktor einer Gaußkette kann über

$$P_{\text{GK}} = \frac{2\pi}{q^4 R_{\text{G}}^4} \left( e^{-q^2 R_{\text{G}}^2} - 1 + q^2 R_{\text{G}}^2 \right) \quad (2.58)$$

berechnet werden [Debye, 1947]. Der Formfaktor einer Kugel wurde mit Hilfe von Gleichung 2.46 und der Formfaktor des Rotationsellipsoiden mit dem Programm Jscatter Vers. 1.4.0 [Biehl, 2019] bestimmt. Im Allgemeinen variiert der Exponent des Wellenvektorübertrages  $\alpha$  ( $I(q) \propto q^{-\alpha}$ ) in Abhängigkeit der fraktalen Dimension  $D_i$  der Struktur [Schmidt u. a., 1991]. Im Gegensatz zur euklidischen Dimension  $d$  kann  $D_i$  nicht-ganzzahlige Werte annehmen, wodurch diese Strukturen auch den Namen Fraktale erhalten haben [Mandelbrot, 1967]. Vereinfacht ausgedrückt ist ein Fraktal ein Objekt, das auf verschiedenen Größenskalen gleich bzw. ähnlich aussieht. Dies wird auch als Selbstähnlichkeit bezeichnet. Dabei wird zwischen Oberflächenfraktalen ( $D_s$ ) und Massenfraktalen ( $D_m$ ) unterschieden. Oberflächenfraktale bestehen aus einem homogenen Kern und einer rauen Oberfläche, die auf bestimmten Größenskalen ein hohes Maß an Selbstähnlichkeit aufweist. Im Gegensatz dazu besitzen Massenfraktale keinen homogenen Kern, da die selbstähnliche Struktur das gesamte Volumen durchsetzt. Die Streuintensität fällt für die beiden Arten von Fraktalen mit [Seeck und Murphy, 2015]:

$$I(q) \propto \begin{cases} q^{-D_m} & \text{für Massenfraktale} \\ q^{-(2d-D_s)} & \text{für Oberflächenfraktale} \end{cases}. \quad (2.59)$$

Tabelle 2.1 zeigt die jeweiligen Exponenten und fraktale Dimensionen für ausgewählte Objekte.

Objektart	$D_m$	$D_s$	$\alpha$
Dünner Stab	1	1	1
Dünnes Blatt	2	2	2
homogene Kugel	3	2	4
Massenfraktal	$D_m < 3$	$D_s < 3$	$0 < \alpha < 3$
Oberflächenfraktal	3	$D_s < 2$	$3 < \alpha < 4$

Tabelle 2.1: Fraktale Dimensionen  $D_m$  und  $D_s$ , sowie der Exponent  $\alpha$  des Intensitätsabfalls für unterschiedliche fraktale Strukturen. Die Tabelle wurde aus [Seeck und Murphy, 2015] übernommen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Betrachtung des Formfaktors in Grenzbereichen des Wellenvektorübertrags Informationen über die Größe der Streuobjekte in Form des Gyrationradius (Guinier-Bereich) und über die fraktale Dimension (Porod-Bereich) gewonnen werden können, auch wenn der zugängliche  $q$ -Bereich nicht ausreichend groß ist um eine radiale Paarabstandsverteilungsfunktion zu bestimmen. Abbildung 2.9 zeigt beispielhaft den Guinier- und Porod-Bereich für einen berechneten Formfaktor einer Kugel (vgl. Gleichung 2.46) mit einem Radius von  $R = 5$  nm.

Eine weitere wichtige Größe, die in einem SAXS-Experiment bestimmt werden kann, ist die Streuinvariante  $Q$ , auch Porod-Invariante genannt (nicht zu verwechseln mit der Porod-Konstanten). Die Streuinvariante ist definiert als [Porod, 1951]:

$$Q = \int_0^\infty I(q)q^2 dq . \quad (2.60)$$

In einem Experiment ist, wie bereits erwähnt, der zugängliche  $q$ -Bereich endlich, sodass sich die experimentell bestimmbare Streuinvariante  $Q^*$  über

$$Q^* = \int_{q_{\min}}^{q_{\max}} I(q)q^2 dq \quad (2.61)$$

berechnen lässt. Dabei bezeichnen  $q_{\min, \max}$  den jeweils unteren und oberen Wellenvektorübertrag der durch das Experiment abgedeckt wird. Durch die Verwendung der Autokorrelation des Elektronendichtekontrastes  $\gamma(\vec{r})$  (vgl. Gleichung 2.42) kann  $Q$  geschrieben werden als:

$$Q = \int_0^\infty I(q)q^2 dq = 2\pi^2\gamma(0) = 2\pi^2 \int_{V_{\text{Mol}}} \Delta\rho^2(\vec{r}) d\vec{r} , \quad (2.62)$$

was im Fall eines homogenen Streuobjektes zu der einfachen Beziehung

$$Q = 2\pi^2 V_{\text{Mol}} \Delta\rho^2 \quad (2.63)$$

führt [Feigin und Svergun, 1987; Glatter und Kratky, 1982]. Anhand von Gleichung 2.62 ist ersichtlich, dass die Streuinvariante aus dem Integral des Kratky-Plots [Glatter und Kratky, 1982] bestimmt werden kann. In einem Kratky-Plot wird  $q^2 I(q)$  gegen  $q$  aufgetragen. Diese Darstellung wird häufig herangezogen um beispielsweise den

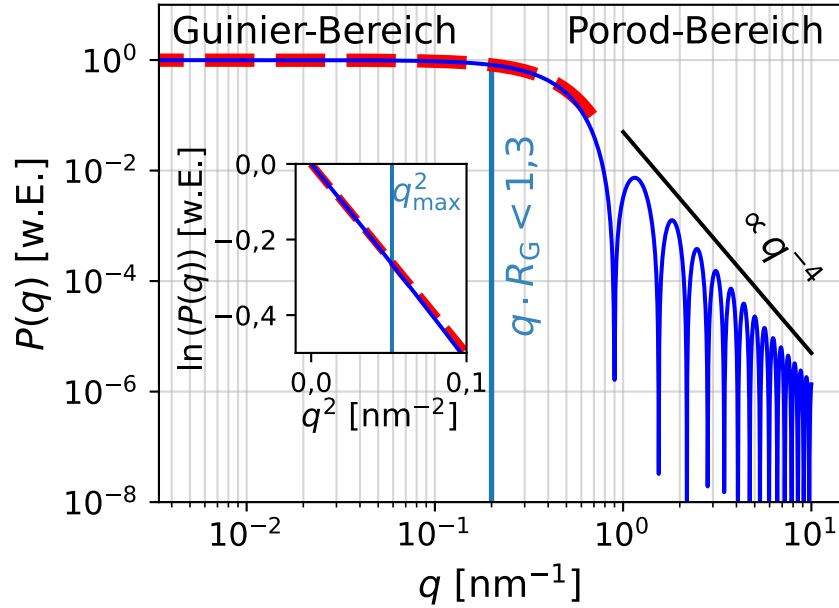


Abbildung 2.9: Guinier- und Porod-Bereich eines berechneten Formfaktors (blau) einer Kugel mit  $R = 5 \text{ nm}$ . In rot gestrichelt ist der nach Gleichung 2.54 genährte Formfaktor gezeigt. Im Einschub ist der Guinier-plot, sowie der Gültigkeitsbereich der Guinier-Näherung dargestellt. Der Intensitätsabfall nach dem Porod-Gesetz wird durch die schwarze Gerade im rechten Teil der Abbildung verdeutlicht.

Faltungszustand eines Proteins oder die Konformation von Polymeren zu bestimmen [Kataoka u. a., 1995]. Der Kratky-Plot ist für die Formfaktoren ausgewählter Strukturen in Abbildung 2.10b) gezeigt.

Es wurde bisher für die betrachteten Systeme angenommen, dass sie aus einer Matrix mit konstanter Elektronendichte, dem Lösungsmittel, und den streuenden Partikeln zusammengesetzt sind. Diese Annahme ist allerdings für viele Systeme nicht hinreichend. Wird beispielsweise ein Zweiphasensystem betrachtet, wird das Streusignal durch Elektronendichtefluktuationen der beiden Phasen verursacht. Eine schematische Darstellung eines Zweiphasensystem ist in Abbildung 2.11 gegeben. Innerhalb der einzelnen Phasen wird die Elektronendichte als konstant angenommen mit den Elektronendichten  $\rho_{1,2}$ . Die mittlere Elektronendichte des Systems kann geschrieben werden als [Glatter und Kratky, 1982; Melnichenko, 2016]:

$$\bar{\rho} = \phi_1 \rho_1 + \phi_2 \rho_2, \quad (2.64)$$

mit den zugehörigen Volumenanteilen  $\phi_{1,2}$  für die  $\phi_1 + \phi_2 = 1$  gilt. Analog kann die mittlere quadratische Elektronendichte  $\bar{\rho}^2$  über

$$\bar{\rho}^2 = \phi_1 \rho_1^2 + \phi_2 \rho_2^2 \quad (2.65)$$



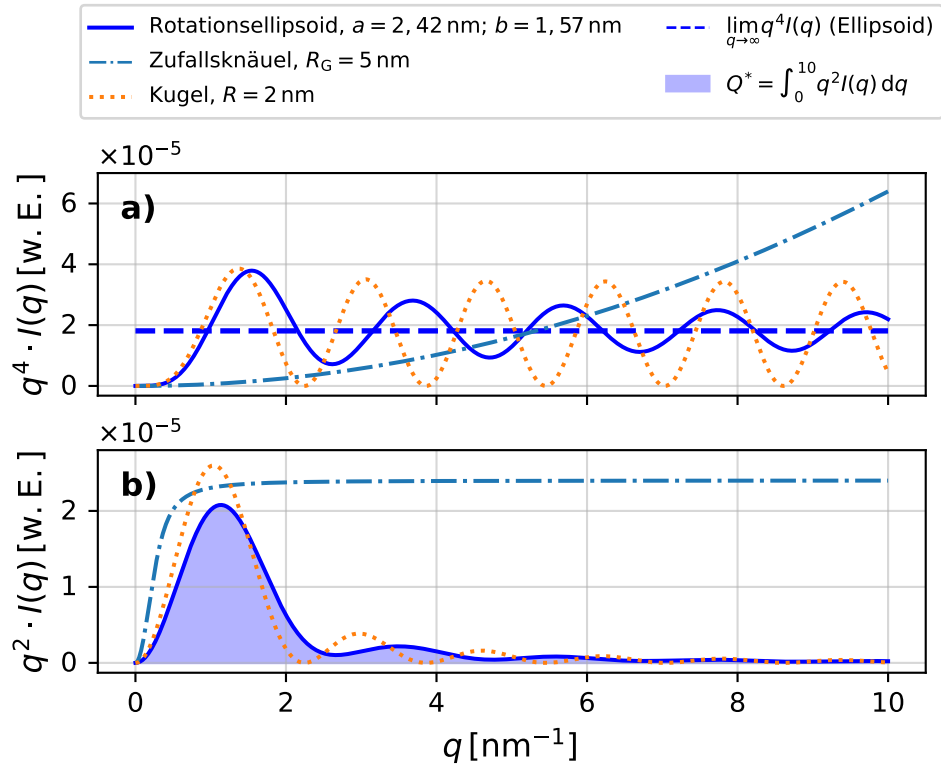


Abbildung 2.10: Formfaktoren ausgewählter Strukturen in der a) Porod- und b) Kratky-Darstellung. Die eingefärbte Fläche in b) beschreibt das Integral unter der Kratky-Kurve und repräsentiert somit die Streuinvariante  $Q^*$ .

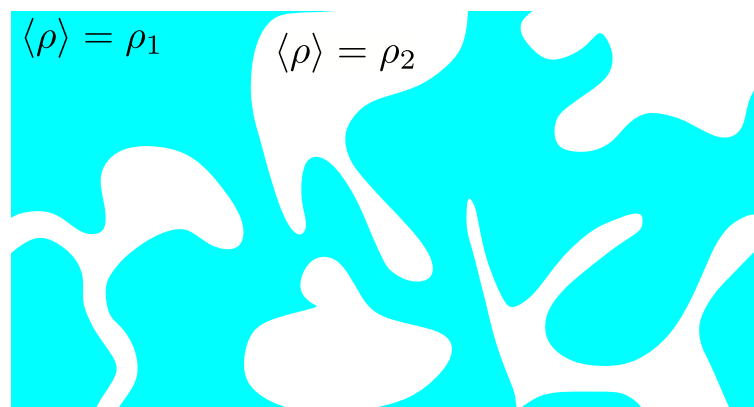


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung eines Zweiphasensystems. Die Elektronendichten der einzelnen Phasen sind konstant. Abbildung in Anlehnung an [Melnichenko, 2016, S. 113]

definiert werden. Die Elektronendichtefluktuationen  $\eta_{1,2}$  der einzelnen Phasen ist gegeben durch:

$$\eta_{1,2} = \rho_{1,2} - \bar{\rho} = \phi_{2,1} (\rho_{1,2} - \rho_{2,1}) , \quad (2.66)$$

woraus sich die quadratische Elektronendichtefluktuation  $\bar{\eta}^2$  ergibt:

$$\bar{\eta}^2 = \phi_1 \eta_1^2 + \phi_2 \eta_2^2 = \phi_1 \phi_2 (\rho_1 - \rho_2)^2 = \phi_1 \phi_2 \Delta \rho^2 . \quad (2.67)$$

Letztlich ist die Streuinvariante eines Zweiphasensystems:

$$Q = 2\pi^2 \phi_1 \phi_2 (\Delta \rho^2) V_0 , \quad (2.68)$$

mit dem belichteten Probenvolumen  $V_0$ . Die Streuinvariante liefert auch für das Zweiphasensystem keine Informationen über die Form der einzelnen Phasen. Der zeitliche Verlauf von  $Q$  kann allerdings als Indikator herangezogen werden, ob das System in einer stabilen Komposition vorliegt (s. Abschnitt 4.1.2). Auch an dieser Stelle gilt das Porod-Gesetz, wodurch im Bereich großer  $q$  Informationen über das Verhältnis  $S/V_0$  gewonnen werden können:

$$\frac{S}{V_0} = \frac{\pi \phi_1 \phi_2}{Q} \lim_{q \rightarrow \infty} (q^4 I(q)) . \quad (2.69)$$

Ein großer Vorteil, der sich aus der Verwendung von  $Q$  ergibt ist, dass das spezifische Volumen ohne die Verwendung einer absoluten Intensitätsskala bestimmt werden kann, da die dabei auftretenden Skalierungsfaktoren sowohl im Nenner, als auch im Zähler vorkommen. Dies kann beispielhaft anhand des Formfaktors einer Kugel gezeigt werden. Das spezifische Volumen einer Kugel mit Radius  $R$  beträgt  $(S/V)_K = 3/R$ . In Abbildung 2.10 ist der Formfaktor für eine Kugel mit Radius  $R = 2$  nm in der Porod-Debye Darstellung und in der Kratky-Darstellung gezeigt. Die Streuinvariante beträgt in diesem Fall:

$$Q_K^* = \int_0^{10} q^2 P_K(q) dq \approx 4,2616 \cdot 10^{-5} ,$$

wobei das Integral numerisch nach der Trapezregel berechnet wurde. Die Porodkonstante  $K_P = \lim_{q \rightarrow \infty} (q^4 I(q))$  wurde näherungsweise als der halbe Wert eines Maximums im Porod-Debye Plot zu  $K_P \approx 2,141 \cdot 10^{-5}$  bestimmt. Daraus ergibt sich das spezifische Volumen zu:

$$\left( \frac{S}{V} \right)_K = \frac{\pi K_P}{Q^*} \approx 1,578 .$$

Da bekannt ist, dass es sich bei dem betrachteten Objekt um eine Kugel handelt, kann aus dem spezifischen Volumen der Radius berechnet werden. Dieser beträgt, unter Verwendung der oben angegebenen Werte,  $R = 1,90$  nm, was einer Abweichung von 5 % entspricht, die im Wesentlichen durch die Ungenauigkeit der Streuinvariante verursacht wird, da die Integration nur über einen limitierten  $q$ -Bereich möglich ist. Im Folgenden wird nun auf den zweiten Teil des differentiellen Wirkungsquerschnitts eingegangen der Informationen über die Wechselwirkungen von Teilchen in Lösung enthält.

### Konzentrierte Lösungen - Der Strukturfaktor

Im Fall konzentrierter Lösungen ist die räumliche Korrelation der unterschiedlichen Partikel nicht vernachlässigbar. Der differentielle Wirkungsquerschnitt ist in diesem Fall gegeben durch:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle_{\Omega} = r_0^2 N P(q) \cdot \left( \overbrace{1 + \beta(q) \left\langle \sum_{j \neq k} e^{i\vec{q}(\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right\rangle_{\Omega}}^{S_{\text{eff}}(q)} \right), \quad (2.70)$$

$N(S(q)-1)$

wobei

$$\beta(q) = \frac{\left\langle |F^{\text{Mol}}(\vec{q})|^2 \right\rangle_{\Omega}}{\left| \left\langle F^{\text{Mol}}(\vec{q}) \right\rangle_{\Omega} \right|^2} \quad (2.71)$$

die Anisotropie der Streupartikel berücksichtigt. Für den Fall einer Kugel gilt z.B.  $\beta(q) = 1$ , wodurch das Streusignal direkt proportional zum Strukturfaktor  $S(q)$  und zum Formfaktor  $P(q)$  ist. Für anisotrope Strukturen wird dahingegen der effektive Strukturfaktor  $S_{\text{eff}}$  gemessen. Aus Gleichung 2.70 geht folgende Beziehung hervor [Kotlarchyk und Chen, 1983]:

$$S(q) = 1 + \frac{1}{N} \left\langle \sum_{j \neq k} e^{i\vec{q}(\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right\rangle_{\Omega}. \quad (2.72)$$

An dieser Stelle fällt die Ähnlichkeit zu dem Ausgangspunkt des Formfaktors auf, bei dem nach Einführung der Elektronendichte und anschließender Integration über das Volumen des Streupartikels die Autokorrelation der Elektronendichte gebildet werden konnte (vgl. Gleichungen 2.41, 2.42, 2.44). Aufgrund der Ähnlichkeit der Herangehensweise wird an dieser Stelle auf eine ausführliche Rechnung verzichtet und stattdessen auf die Literatur verwiesen [Glatter, 2018, S. 75-78]. Als Resultat ergibt sich für den Strukturfaktor folgende Beziehung [Zernike und Prins, 1927]:

$$S(q) = 1 + 4\pi \frac{N}{V} \int_0^{\infty} (g(r) - 1) r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr, \quad (2.73)$$

mit der sogenannten radialen Verteilungsfunktion  $g(r)$  bzw. der Paarkorrelationsfunktion  $h(r) = g(r) - 1$ . Dabei wurde angenommen, dass das System homogen und isotrop ist. Die radiale Verteilungsfunktion kann somit durch Fourier-Rücktransformation des Strukturfaktors gewonnen werden. Anschaulich ist  $g(r)$  proportional zu der Wahrscheinlichkeit Partikelzentren im Abstand  $r$  zu einem beliebigen Partikelzentrum im Ursprung ( $r = 0$ ) vorzufinden [Als-Nielsen und McMorrow, 2011, S. 125-127]. Im Fall von gelösten kugelförmigen Partikeln weist  $g(r)$  somit Maxima in der Nähe von vielfachen des Partikeldurchmessers auf, die

mit steigendem Abstand, aufgrund der fehlenden langreichweitigen Ordnung, sinken. Es gilt:

$$\lim_{r \rightarrow \infty} g(r) = 1. \quad (2.74)$$

In Abbildung 2.12 sind der Strukturfaktor, die radiale Verteilungsfunktion und die daraus resultierende Streukurve für wechselwirkungsfreie harte Kugeln mit Radius  $R = 2,5 \text{ nm}$  gezeigt. Wechselwirkungsfrei meint in diesem Fall, dass das Wechselwirkungspotential folgende Gestalt hat [Hansen und McDonald, 2013]:

$$V_{\text{HS}}(r) = \begin{cases} \infty, & r < 2R \\ 0, & r \geq 2R \end{cases}. \quad (2.75)$$

$V_{\text{HS}}$  wird auch als das Potential der harten Kugeln (HK) (engl.: *hard sphere*, kurz: HS) bezeichnet und beschreibt, dass die Kugeln nicht ineinander eindringen können. Für Abstände die größer als der Partikeldurchmesser sind, nimmt das Potential den Wert 0 an.

Um die radiale Verteilungsfunktion für ein gegebenes Interaktionspotenzial  $V(r)$  zu bestimmen, wird die sogenannte Ornstein-Zernike-Gleichung verwendet [Ornstein und Zernike, 1914]:

$$h(r_{12}) = c(r_{12}) + \frac{N}{V} \int c(r_{13}) h(r_{23}) d\vec{r}_3, \quad (2.76)$$

mit der direkten Korrelationsfunktion  $c(r_{12}) = c(r)$ . Die Ornstein-Zernike Gleichung spaltet somit die totale Korrelation zweier Partikel in einen direkten Anteil  $c(r)$  und einen indirekten Anteil. Der indirekte Anteil enthält die direkte Korrelation zwischen Teilchen 1 und einem dritten Teilchen, sowie die totale Korrelation zwischen Teilchen 2 und Teilchen 3. Durch iteratives Einsetzen der Definition von  $h(r_{ij})$  ist schnell ersichtlich, dass die Korrelationen zwischen allen Teilchen berücksichtigt werden. Durch Substitution von  $\vec{r}_{12} = \vec{r}$ ,  $\vec{r}_{23} = \vec{r}'$  und  $|\vec{r}_{13}| = |\vec{r} - \vec{r}'|$  kann die OZ-Gleichung geschrieben werden als:

$$h(r) = c(r) + \frac{N}{V} \int c(|\vec{r} - \vec{r}'|) h(r') d\vec{r}' \quad (2.77)$$

Nach einer Fouriertransformation und der Anwendung des Faltungstheorems<sup>5</sup> ergibt sich für den Strukturfaktor folgender Zusammenhang:

$$S(q) = \frac{1}{1 - N/V C(q)}, \quad (2.78)$$

---

<sup>5</sup>Fouriertransformation der Faltung zweier Funktionen  $f(r)$  und  $g(r)$ :

$$\mathcal{F}(f(r) * g(r)) = \mathcal{F}f(r) \cdot \mathcal{F}g(r) = F(q) \cdot G(q)$$

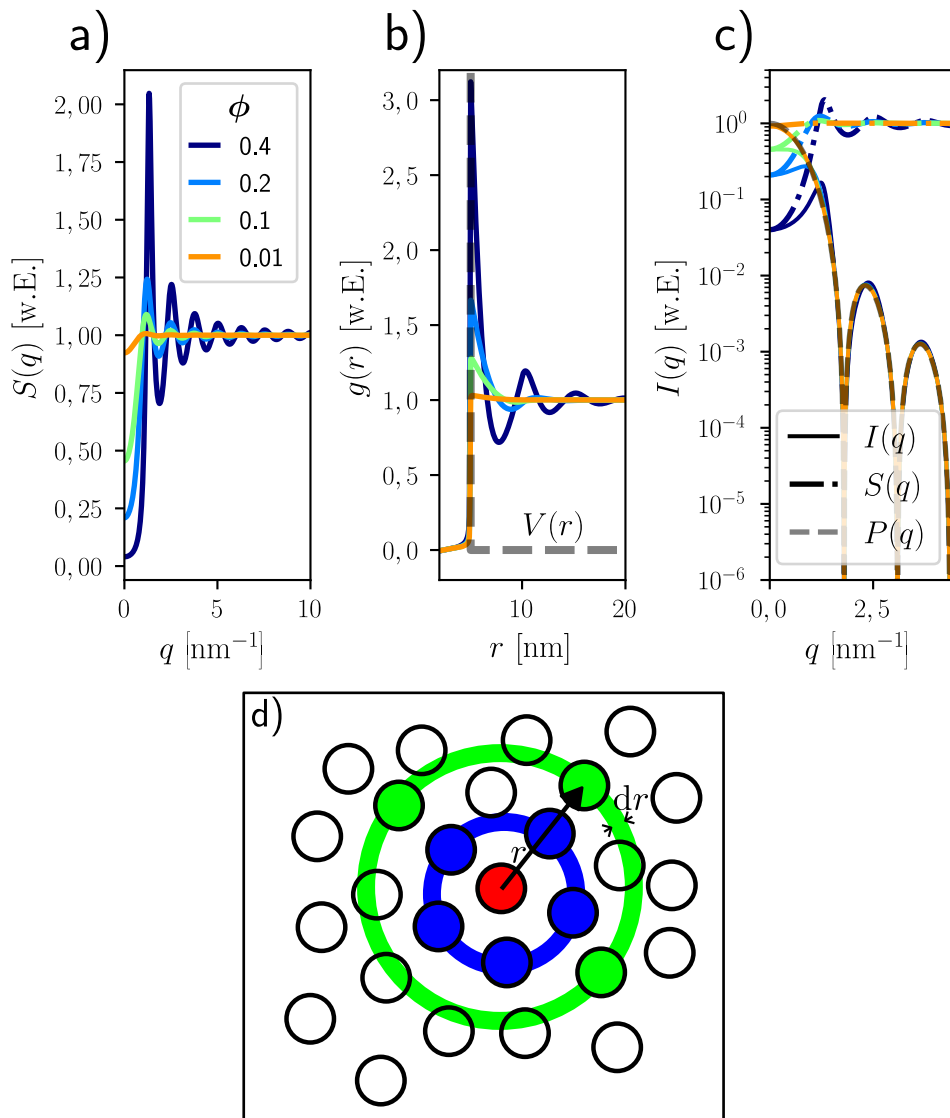


Abbildung 2.12: Strukturfaktor  $S(q)$  (a)), radiale Verteilungsfunktion  $g(r)$  (b)) und Streuintensität  $I(q)$  (c)) für wechselwirkungsfreie Kugeln mit dem Radius  $R = 2,5$  nm berechnet unter Verwendung der PY-Näherung. In d) ist die geometrische Interpretation der radialen Verteilungsfunktion gezeigt.

wobei  $C(q)$  für die Fouriertransformation von  $c(r)$  steht. Um an dieser Stelle den Strukturfaktor für ein gegebenes Potential  $V(r)$  aus der direkten Korrelation  $c(r)$  zu bestimmen werden Näherungen, sogenannte *closure relations*, verwendet. Beispielsweise kann der Strukturfaktor für ein System aus harten Kugeln (vgl. Gleichung 2.75) über die Percus-Yevick Näherung (PY-Näherung) analytisch bestimmt werden [Wertheim, 1963]. Die PY-Näherung lautet [Percus und Yevick, 1958]:

$$c_{\text{PY}} = \left(1 - e^{V(r)/(k_{\text{B}}T)}\right) g(r). \quad (2.79)$$

Die in Abbildung 2.12 gezeigten Strukturfaktoren und radiale Verteilungsfunktionen wurden unter Verwendung von 2.79 für harte Kugeln mit dem Radius  $R = 2,5$  nm für verschiedene Volumenanteile  $\phi$  berechnet. Es ist zu erkennen, dass sowohl  $S(q)$  als auch  $g(r)$  Extrema aufweisen, die für steigende  $q$  bzw. steigende  $r$  abnehmen und letztendlich in den Grenzfällen  $\lim_{q,r \rightarrow \infty}$  gegen 1 konvergieren. Dieses Verhalten ist durch die fehlende langreichweitige Ordnung zu erklären. Des Weiteren fällt auf, dass sich die Extrema von  $g(r)$  mit steigender Konzentration zu kleineren Abständen verschieben. Es existiert eine Vielzahl an Näherungen zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen  $c(r)$  und  $V(r)$  und die Genauigkeit der jeweiligen Näherung hängt stark von der Konzentration des Systems und der Art der Wechselwirkung ab. Da in dieser Arbeit aufgrund des limitierten  $q$ -Bereiches keine Strukturfaktoren bestimmt werden, wird an dieser Stelle auf eine Beschreibung weiterer Näherungen verzichtet und stattdessen auf [Dhont und Jülich, 2008] verwiesen.

Eine weitere wichtige Größe, die über den Strukturfaktor im Grenzfall  $q \rightarrow 0$  bestimmt werden kann, ist die isotherme Kompressibilität  $\kappa_T$  [Hansen und McDonald, 2013]:

$$\lim_{q \rightarrow 0} S(q) = 1 + 4\pi \frac{N}{V} \int (g(r) - 1) r^2 dr = nk_{\text{B}}T\kappa_T, \quad (2.80)$$

mit der Teilchendichte  $n = N/V$ . Die isotherme Kompressibilität gibt die Volumenänderung eines Systems als Reaktion auf einen veränderten Druck  $p$  bei konstanter Temperatur an:

$$\kappa_T = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial p} \right)_T. \quad (2.81)$$

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass durch die Kombination von SAXS-Messungen an verdünnten und konzentrierten Lösungen eine Vielzahl an Informationen über die Form und Größe der streuenden Partikel, sowie deren Wechselwirkungen in Lösung gewonnen werden können. Die gemessene SAXS-Intensität  $I(q)$  für konzentrierte Probensysteme lässt sich unter Verwendung der Gleichungen 2.70, 2.71 und 2.73 schreiben als:

$$\boxed{I(q) \propto P(q) [1 + \beta(q) (S(q) - 1)] = P(q) \cdot S_{\text{eff}}(q)} \quad (2.82)$$

und ist somit direkt proportional zum Formfaktor und zum effektiven Strukturfaktor. Der effektive Strukturfaktor weicht für anisotrope Streuobjekte von dem Strukturfaktor ab. Für einfache geometrische Strukturen kann  $\beta(q)$  bestimmt werden, sodass aus dem gemessenen effektiven Strukturfaktor  $S(q)$  bestimmt werden kann. Um die Streuintensität in einem SAXS-Experiment absolut angeben zu können, muss zusätzlich auch die Transmission  $T = \exp(-\mu d)$  berücksichtigt werden. Hierbei bezeichnet  $d$  die Dicke der Probe und  $\mu(E)$  den energieabhängigen Absorptionskoeffizienten. Für Proteinsysteme wird dabei häufig der Absorptionskoeffizient von Wasser verwendet. Die gemessene Intensität kann nach Berücksichtigung dieses Effekts über folgende Beziehung bestimmt werden:

$$I(q) = \frac{I_0}{L^2} \cdot T \cdot A \cdot d \cdot \Delta\rho^2 \cdot n \cdot V_P^2 \cdot P(q) \cdot S_{\text{eff}}(q), \quad (2.83)$$

wobei  $A$  den Strahlquerschnitt,  $V_P$  das Volumen eines streuenden Partikels,  $\Delta\rho$  die Streulängendichte (1/m) und  $d$  die Probendicke bezeichnen.

Im nächsten Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen für die Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie (XPCS) erläutert, bei der die zuvor aufgeführten Größen und deren Entwicklung aus dem zeitabhängigen SAXS-Signal gewonnen werden können. Zusätzlich kann die Dynamik eines Systems in einem XPCS-Experiment charakterisiert werden.

### 2.2.3 Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie (XPCS)

Die Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie (engl.: *X-ray photon correlation spectroscopy*, kurz: XPCS) ist eine Methode zur Messung der Dynamik in weicher und harter Materie auf Längenskalen zwischen Mikrometern und Nanometern und Zeitskalen zwischen Millisekunden bis hin zu Stunden. Sie gewann durch die rapide Entwicklung von Synchrotronstrahlungsquellen stark an Aufmerksamkeit, da durch den hohen kohärenten Fluss eine Vielzahl an Prozessen untersucht werden kann.

XPCS ist das Pendant zur dynamischen Lichtstreuung (DLS), mit dem Unterschied, dass Röntgenstrahlung anstelle von sichtbarem Licht verwendet wird. Beide Methoden basieren auf der Streuung kohärenter Strahlung an vielen Streuzentren, wobei die gestreuten Anteile hinter der Probe miteinander interferieren. Durch die Kohärenz der einfallenden Strahlung können in dem Intensitätsmuster Fluktuationen beobachtet werden, sogenannte Specklemuster oder auch Speckles. Die ersten Beobachtungen von Speckles gehen zurück bis in Jahr 1877, in dem Karl Exner die Fraunhofer Ringe eines Systems aus zufällig angeordneten Partikeln mit kohärentem Licht untersuchte [Exner, 1878; Hariharan, 1972]. Die dynamische Lichtstreuung erfuhr erst einige Zeit später ein rapides Wachstum durch die Verwendung von Lasern und diente unter anderem als Methode zur Untersuchung der Brownschen Molekularbewegung [Pusey, 1979]. Die erste Beobachtung von kohärenter Röntgenstreuung an einem  $\text{Cu}_3\text{Au}$  Kristall wurde im Jahr 1991 getätigt [Sutton, Mochrie u. a., 1991] und legte somit den Grundstein der Photonkorrelationsspektroskopie mit Röntgenstrahlung. Die Verwendung von Röntgenstrahlung anstelle von sichtbarem Licht

bietet vielerlei Vorteile, wie z.B., dass auch trübe Proben (flüssig-flüssig phasenseparierte Proteinlösungen) oder Festkörper untersucht werden können. Außerdem ist bei XPCS aufgrund der deutlich kleineren Wellenlängen ( $\lambda_{\text{DLS}} \approx (600 \text{ bis } 700) \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{XPCS}} \approx (0,04 \text{ bis } 0,15) \text{ nm}$ ) die Dynamik auf kleineren Längenskalen zugänglich. In einem XPCS-Experiment werden in der Regel 2D-Flächendetektoren verwendet, wodurch zum einen die Dynamik über den gesamten zugänglichen  $q$ -Bereich simultan gemessen wird und zusätzlich zeitabhängige SAXS-Daten aufgenommen werden. Der Ablauf eines Hochdruck XPCS-Experiments ist in Abbildung 2.13 schematisch dargestellt. Der kohärente Röntgenstrahl trifft auf die Hochdruckzelle und wird von der darin befindlichen Probe gestreut. Der gestreute Röntgenstrahl wird von einem hinter der Zelle befindlichen 2D-Flächendetektor zeitabhängig gemessen. Dabei werden die Streubilder in äquidistanten Zeitabständen  $\Delta t$  aufgenommen (Abbildung 2.13, oben). Aus den zeitaufgelösten Detektorbildern können zum einen durch radiale Integration zeitaufgelöste SAXS-Kurven bestimmt werden, aus denen dann wiederum die in Abschnitt 2.2.2 diskutierten Größen gewonnen werden können (Abbildung 2.13, links). Des Weiteren werden Informationen über die Dynamik aus den Intensitätsfluktuationen der Streubilder extrahiert (Abbildung 2.13, rechts). Dadurch können Korrelationsfunktionen (Zwei-Zeiten-Korrelationsfunktionen und Autokorrelationsfunktionen) bestimmt werden. Im Folgenden werden zunächst die Grundlagen der kohärenten Röntgenstreuung diskutiert und im Anschluss daran auf die wichtigsten bestimmbareren Größen in einem XPCS-Experiment eingegangen.

### Kohärente Röntgenstreuung und Speckles

Die Grundlagen zur Erzeugung und Beschreibung kohärenter Röntgenstrahlung an Synchrotronstrahlungsquellen wurden bereits in Abschnitt 2.2.1 erläutert. Nun werden die auftretenden Phänomene bei Streuprozessen von kohärenter Strahlung beschrieben.

Trifft ein kohärenter Photonenstrahl auf eine Probe, regt dieser die Elektronen der Streuobjekte zu Schwingungen an, welche Röntgenstrahlung der gleichen Wellenlänge emittieren. Das elektrische Feld der Strahlung kann durch Gleichung 2.15 beschrieben werden. Wie bereits erwähnt, werden Streubilder in einem zeitlichen Abstand von  $\Delta t$  aufgenommen. Die Anzahl der aufgenommenen Bilder für eine Messung beträgt  $N_{\text{fr}}$ , wodurch sich die gesamte Messdauer zu  $T_{\text{m}} = N_{\text{fr}} \Delta t$  ergibt. Die Kohärenz der Strahlung in einem Streuexperiment wird durch die gegenseitige Kohärenzfunktion  $\vec{\Gamma}(P_1, P_2, \Delta t)$  (engl.: *mutual coherence function*, kurz: MCF) charakterisiert. Die MCF kann anhand eines einfachen Beugungsexperiments, dem Young'schen Doppelspaltversuch veranschaulicht werden (vgl. Abbildung 2.14). Die nachfolgenden Ausführungen über den Young'schen Doppelspaltversuch orientieren sich an [Goodman, 2015, S. 175-177]. Im Young'schen Doppelspaltexperiment trifft monochromatisches, kohärentes Licht von der Quelle  $S$  auf einen Doppelspalt mit den Spaltpositionen  $P_1$  und  $P_2$  und wird an diesem gebeugt, wodurch sich auf dem Beobachtungsschirm ein Interferenzmuster ergibt. Unter der Annahme, dass die Weglängendifferenz der beiden betrachteten Strahlen deutlich kleiner ist als die longitudinale Kohärenzlänge,



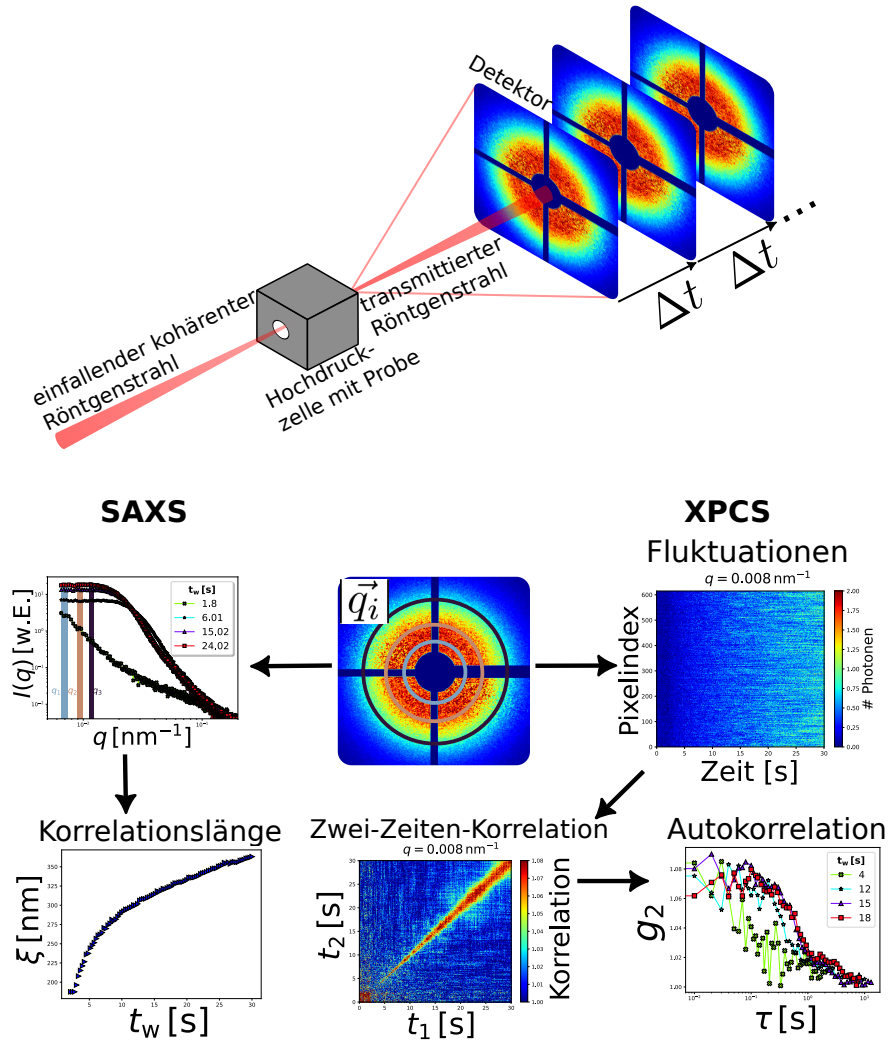


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung eines XPCS-Experiments. Der einfallende Röntgenstrahl wird von der in der Hochdruckzelle befindlichen Probe gestreut. Das Streubild wird von einem 2D-Flächendetektor in äquidistanten Zeitabständen  $\Delta t$  aufgenommen. Durch radiale Integration der Detektorbilder können zeitabhängige SAXS-Kurven bestimmt werden, aus denen wiederum charakteristische Größen, wie Korrelationslängen, extrahiert werden können. Durch die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Intensitätsfluktuationen können Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen und Autokorrelationsfunktionen bestimmt werden. Diese Größen enthalten Informationen über die Dynamik eines Systems.

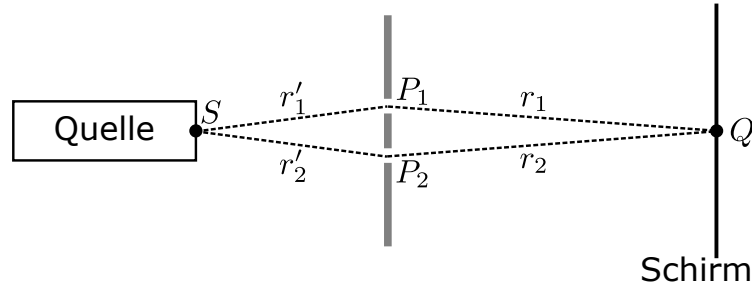


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des Young'schen Doppelspaltversuchs. Das von der Quelle ausgesandte kohärente Licht wird am Doppelspalt gebeugt und die an den Spalten gebeugte Wellen interferieren hinter dem Doppelspalt miteinander. Das Interferenzmuster wird auf dem Schirm aufgefangen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [Goodman, 2015, S. 173] erstellt.

wird auf dem Schirm ein streifenförmiges Beugungsmuster beobachtet mit alternierenden Bereichen hoher und niedriger Intensität. Die Intensität am Observationspunkt  $Q$  ergibt sich aus dem Betragsquadrat des gestreuten elektrischen Feldes, welches als Superposition der einzelnen Felder an den Punkten  $P_1$  und  $P_2$  geschrieben werden kann:

$$\vec{E}(Q, t) = \vec{K}_1 \vec{E}\left(P_1, t - \frac{r_1}{c}\right) + \vec{K}_2 \vec{E}\left(P_2, t - \frac{r_2}{c}\right), \quad (2.84)$$

mit den komplexen Konstanten  $\vec{K}_{1,2}$ . Dadurch ergibt sich die Intensität  $I(Q)$  zu:

$$\begin{aligned} I(Q) &= \left\langle \vec{E}(Q, t) \vec{E}^*(Q, t) \right\rangle_T \\ &= I_1(Q) + I_2(Q) + K_1 K_2 \vec{\Gamma}\left(P_1, P_2, \frac{r_2 - r_1}{c}\right) \\ &\quad + K_1 K_2 \vec{\Gamma}^*\left(P_1, P_2, \frac{r_2 - r_1}{c}\right), \end{aligned} \quad (2.85)$$

wobei  $\langle \dots \rangle_T$  das Zeitmittel,  $\vec{\Gamma}$  die MCF,  $K_{1,2} = |\vec{K}_{1,2}|$  die Beträge der Konstanten, und  $I_{1,2}$  die Intensitäten, die jeweils von  $P_{1,2}$  bei  $Q$  einzeln erzeugt werden, bezeichnen. Die MCF ist definiert als:

$$\vec{\Gamma}(P_1, P_2, \Delta t) := \left\langle \vec{E}(P_1, t + \Delta t) \vec{E}^*(P_2, t) \right\rangle_T. \quad (2.86)$$

Nach Gleichung 2.85 ergibt sich demnach die Intensität am Observationspunkt aus der Summe der einzelnen Intensitäten und einem weiteren Interferenzterm, der von der MCF abhängt. Durch die Normierung der MCF lässt sich der komplexe Grad der Kohärenz  $\vec{\gamma}$  (engl.: *complex degree of coherence*) einführen:

$$\vec{\gamma}(P_1, P_2, \Delta t) = \frac{\vec{\Gamma}(P_1, P_2, \Delta t)}{\sqrt{I(P_1)I(P_2)}}, \quad (2.87)$$

mit den einfallenden Intensitäten  $I(P_{1,2})$  an  $P_{1,2}$ . Dadurch vereinfacht sich Gleichung 2.85 zu:

$$I(Q) = I_1(Q) + I_2(Q) + 2\sqrt{I_1(Q)I_2(Q)} \operatorname{Re}\left\{\left[\vec{\gamma}\left(P_1, P_2, \frac{r_2 - r_1}{c}\right)\right]\right\}. \quad (2.88)$$

Der Normierungsfaktor in Gleichung 2.87 folgt direkt aus der Schwarzschen Ungleichung. Weiterhin folgt aus der Schwarzschen Ungleichung:

$$0 \leq |\vec{\gamma}(P_1, P_2, \Delta t)| \leq 1. \quad (2.89)$$

Für den Fall, dass  $I_1(Q) = I_2(Q)$  und  $\Delta t = 0$  beschreibt der komplexe Grad der Kohärenz den Kontrast  $\beta_0$ :

$$\beta_0 = \vec{\gamma}(P_1, P_2, 0) = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}, \quad (2.90)$$

mit der maximalen bzw. minimalen Intensität des Interferenzmusters  $I_{\max, \min}$ . Die Erweiterung des Young'schen Doppelspaltversuchs auf ein reales Probensystem führt zu den eingangs erwähnten Specklemustern. Speckles entstehen, wenn kohärente Strahlung in unterschiedlichen Volumenelementen der Probe gestreut wird und zufällig verteilte Phasenverschiebungen stattfinden. Die phasenverschobenen Anteile interferieren miteinander und erzeugen am Beobachtungsschirm (Detektor) ein Specklemuster (vgl. Abbildung 2.15) mit Bereichen hoher und niedriger Intensität. Die Probe kann somit vereinfacht als eine Vielzahl von Doppelspalten aufgefasst werden, unter der Bedingung, dass das Probenvolumen viel größer ist als das von der longitudinalen Kohärenzlänge und den transversalen Kohärenzlängen aufgespannte Kohärenzvolumen. Der Kontrast  $\beta_0$  kann in diesem Fall über [Cummins und Pike, 1977; Sutton, 2019]:

$$\beta_0 = \int_V \int_V e^{-(\Delta x/L_{T,h})^2} e^{-(\Delta y/L_{T,v})^2} e^{-(|t|/\tau_c)^2} dV_1 dV_2 \quad (2.91)$$

berechnet werden. In Gleichung 2.91 bezeichnet  $V$  das Probenvolumen,  $\tau_c = L_L/c$  die Kohärenzzeit und  $\Delta x, \Delta y$  den horizontalen bzw. vertikalen Abstand in der Observationsebene. Die Zeit wird hierbei als

$$t = \frac{\vec{q} \cdot (\vec{r}_2 - \vec{r}_1)}{ck} \quad (2.92)$$

ausgedrückt [Lee u. a., 2013; Sutton, 2019], mit den Ortsvektoren  $\vec{r}_{1,2}$  die auf die Zentren der Volumenelemente  $dV_{1,2}$  zeigen. Eine erneute Betrachtung von Abbildung 2.15 legt nahe, dass der Kontrast im Zusammenhang mit der Photonenstatistik steht. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P(I)$  der Intensität kann für unabhängige (wechselwirkungsfreie) Streuer als Exponentialverteilung

$$P(I) = \frac{e^{-I/\langle I \rangle}}{\langle I \rangle} \quad (2.93)$$

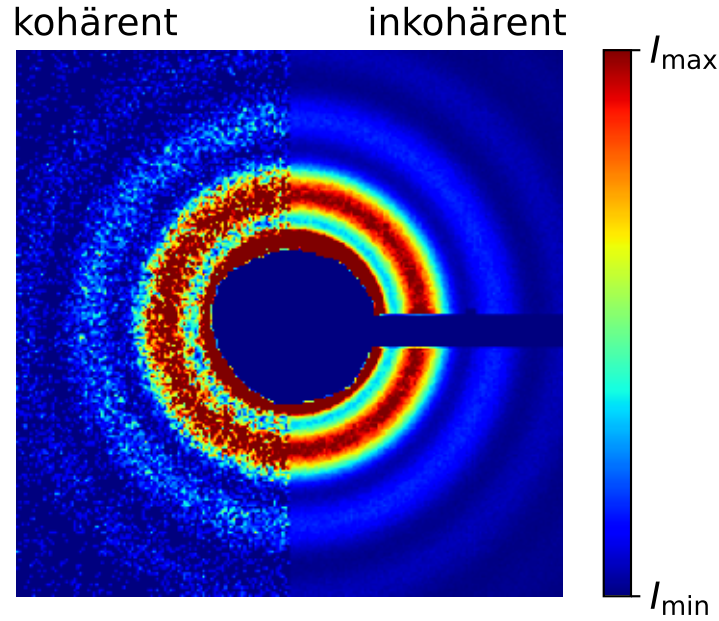


Abbildung 2.15: Detektorbild einer Probe bestehend aus in Wasser gelösten Siliziumdioxid Nanopartikeln. Im linken Teil der Abbildung ist die Summe aus 10 Bildern gezeigt und im rechten Teil die Summe aus 1000 Bildern. Das Mittel weniger Detektorbilder ergibt ein Specklemuster, da die Zeitskala der Teilchenbewegung im Bereich der Belichtungszeit liegt. Bei der Mittelung über 1000 Bilder verschmiert das Specklemuster und es wird nur noch ein Streubild aufgenommen, welches dem Ensemble-Mittel entspricht. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [Lee u. a., 2013] erstellt.

angegeben werden [Goodman, 2015]. Dabei bezeichnet  $\langle I \rangle$  die mittlere Intensität mit der Standardabweichung  $\sigma = \left( \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 \right)^{1/2}$ . Hierbei wurde außerdem angenommen, dass das Probenvolumen genau dem Kohärenzvolumen entspricht. Dies ist in der Regel nicht der Fall und die Wahrscheinlichkeitsdichte nimmt die Form einer Gammaverteilung an [Mandel, 1959]:

$$P_M^\Gamma(I) = \left( \frac{M}{\langle I \rangle} \right)^M \frac{e^{-MI/\langle I \rangle} I^{M-1}}{\Gamma(M)}, \quad (2.94)$$

mit der Anzahl der unabhängigen Speckles  $M$  und der Gammafunktion<sup>6</sup>  $\Gamma(M)$ . Diese Verteilung weist eine Standardabweichung von  $\sigma^2 = \langle I \rangle^2/M$  auf und somit beträgt der

<sup>6</sup>Definition der Gammafunktion:

$$\Gamma(x) = \int_0^\infty t^{x-1} e^{-t} dt \xrightarrow{x \in \mathbb{N}} \Gamma(x) = (x-1)!$$

Kontrast  $\beta_0 = 1/M$ . Der Kontrast sinkt demnach mit steigender Anzahl der Speckles. Ein weiterer Spezialfall ergibt sich bei schwachen Specklemustern, bei denen die Zählstatistik dominant ist. Dazu wird die Gammaverteilung mit einer Poisson-Verteilung gefaltet und es ergibt sich die Poisson-Gamma-Verteilung [Goodman, 2015]:

$$P_M^{P-\Gamma}(k) = \frac{\Gamma(k+M)}{\Gamma(M)\Gamma(k+1)} \left(1 + \frac{M}{\langle k \rangle}\right)^{-k} \left(1 + \frac{\langle k \rangle}{M}\right)^{-M}, \quad (2.95)$$

dabei bezeichnet  $k$  ( $\langle k \rangle$ ) die (mittlere) Anzahl an Photonen pro Pixel. Diese Verteilung findet häufig Anwendung in XSVS-Experimenten (engl.: *X-ray speckle visibility*), die zur Messung der dynamischen Eigenschaften strahlensensitiver Proben, wie z.B. Proteinlösungen, durchgeführt werden. Dabei wird durch Variation der Belichtungszeit  $\tau$  und gleichzeitiger Betrachtung der Photonenstatistik der Kontrast  $\beta_0(q, \tau)$  bestimmt, woraus wiederum, im Fall von rein diffusiver Dynamik, Zerfallsraten bestimmt werden können [Möller, Reiser u. a., 2021; Verwohlt u. a., 2018]. In Abbildung 2.16a) sind die zuvor eingeführten Verteilungen  $P(I)$  gezeigt. Außerdem sind in Abbildung 2.16b) experimentell bestimmten Photonverteilungen und die nach Gleichung 2.95 angepassten Verteilungen für unterschiedliche Belichtungszeiten einer 1 wt % Lösung aus Siliziumdioxid Nanopartikeln dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Wahrscheinlichkeitsdichte sehr gut durch die Poisson-Gamma-Verteilung beschrieben wird.

Neben dem Kontrast spielt auch das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal to noise ratio*, kurz: *SNR*) eine wichtige Rolle. Das *SNR* lässt sich über

$$SNR = \beta \langle I \rangle \sqrt{N_{\text{fr}}} \sqrt{N_{\text{pix}}} \sqrt{N_{\text{rep}}}, \quad (2.96)$$

mit der gesamten Anzahl an Bildern  $N_{\text{fr}} = T/\tau$ , der Anzahl der Pixel im betrachteten  $q$ -Ring  $N_{\text{pix}}$  und der Anzahl der Bildserien  $N_{\text{rep}}$ , berechnen [Lumma u. a., 2000; Falus u. a., 2006]. Unter Verwendung von  $\langle I \rangle = I_0 \tau (P/L)^2$ , wobei  $P$  die Pixelgröße und  $L$  der Probe-Detektor Abstand ist, lässt sich das *SNR* schreiben als:

$$SNR = \beta I_0 \left(\frac{P}{L}\right)^2 \sqrt{T \tau N_{\text{pix}} N_{\text{rep}}}, \quad (2.97)$$

mit der totalen Streuintensität  $I_0$ , die unter anderem vom einfallenden kohärenten Fluss  $\Phi_c$  abhängt ( $I_0 \propto \Phi_c$ ). Gleichung 2.97 zeigt, dass eine Erhöhung des Flusses um eine Größenordnung, zwei Größenordnungen schnellere Zeitskalen zugänglich macht, bei gleichem *SNR* [Madsen, 2011; Möller, Sprung u. a., 2019]. Der optische Kontrast  $\beta$  kann bei einem XPCS-Experiment als Produkt aus den Anteilen  $\beta_{\text{cl}}$  und  $\beta_{\text{res}}$  geschrieben werden. Die Reduktion des Kontrastes aufgrund der longitudinalen und transversalen Kohärenzlänge wird durch  $\beta_{\text{cl}}$  berücksichtigt und die Reduktion durch den experimentellen Aufbau durch  $\beta_{\text{res}}$  [Möller, Sprung u. a., 2019]:

$$\beta(a, d, q, \lambda, L) = \beta_{\text{cl}}(a, d, q, \lambda) \cdot \beta_{\text{res}}(a, L, \lambda). \quad (2.98)$$

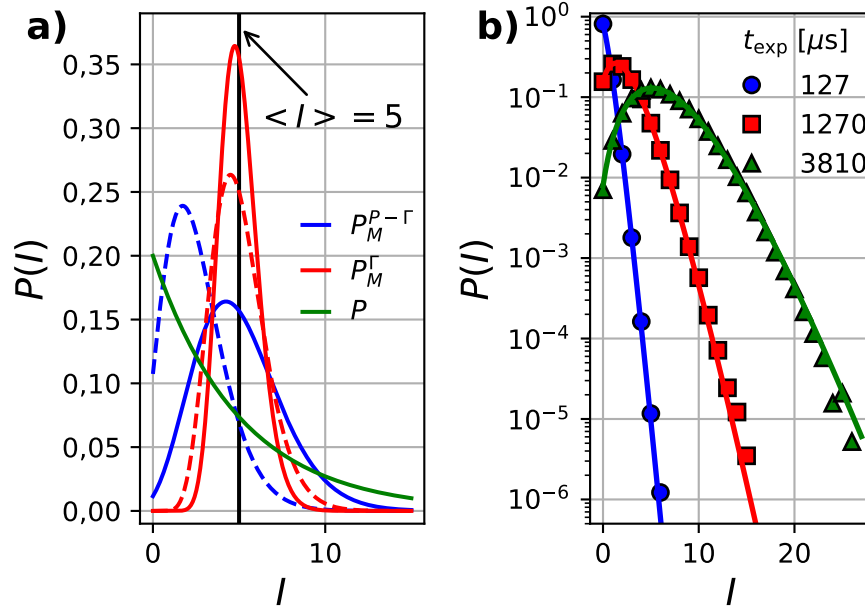


Abbildung 2.16: a) Wahrscheinlichkeitsverteilungen  $P(I)$   $I$  Photonen pro Pixel zu detektieren, bei einer mittleren Intensität von  $\langle I \rangle = 5$ . Gezeigt sind die Exponentialverteilung (grün), die Gammaverteilung (rot) und die Poisson-Gamma-Verteilung (blau). Für die beiden zuletzt genannten Verteilungen beträgt die Anzahl der Speckles  $M = 20$  (durchgezogene Linien) und  $M = 10$  (gestrichelte Linien). In b) ist die experimentell bestimmte Wahrscheinlichkeitsverteilung eines Systems aus Siliziumdioxid Nanopartikeln ( $c = 1 \text{ wt } \%$ ) für unterschiedliche Belichtungszeiten  $t_{\text{exp}}$  zwischen (127 und 3810)  $\mu\text{s}$  gezeigt. Die unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden durch Aufsummieren der entsprechenden Anzahl an Einzelbildern erzeugt.

Es gilt  $\beta_{\text{cl}} \equiv \beta_0$  (vgl. Gleichung 2.91). Der Anteil  $\beta_{\text{res}}$  kann über

$$\beta_{\text{res}}(a, L, \lambda) = \left( \frac{2}{w^2} \int_0^w (w-v) \left[ \frac{\sin(v/2)}{v/2} \right]^2 dv \right)^2 \quad (2.99)$$

berechnet werden. Dabei ist  $w = 2\pi Pa/(L\lambda) = 2\pi P/S$ , mit der Strahlgröße  $a$  und der Ausdehnung des Speckles  $S \simeq \lambda L/a$ . Es konnte gezeigt werden, dass das  $SNR$  maximiert wird, wenn die Ausdehnung des Speckles der Pixelgröße entspricht ( $S = P$ ) [Madsen, 2011; Möller, Sprung u. a., 2019].

Im Folgenden werden die wichtigsten Größen eines XPCS-Experiments eingeführt und erläutert, die sich aus der Betrachtung der zeitlichen Entwicklung der Speckles ergeben.

### Charakteristische Größen eines XPCS-Experiments

Ein wesentlicher Unterschied von XPCS zu Streuexperimenten mit inkohärenter Strahlung ist, dass bei XPCS das erzeugte Specklemuster mit der exakten Anordnung der Moleküle im bestrahlten Volumen zusammenhängt. Die Intensität ergibt sich in diesem Fall zu: [Grübel u. a., 2008; Madsen, Fluerasu u. a., 2018]:

$$I(\vec{q}, t) = \left| \sum_n f_n(\vec{q}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_n(t)} \right|^2, \quad (2.100)$$

mit der Streuamplitude  $f_n$  des  $n$ -ten Partikels, und den zugehörigen zeitabhängigen Ortsvektor  $\vec{r}_n(t)$ . Durch die Bewegung der Moleküle in Lösung, ändert sich auch das Specklemuster mit der Zeit. Aufgrund dessen können Informationen über die Dynamik des Systems über Betrachtung der zeitlichen Entwicklung des Speckles gewonnen werden, wenn die charakteristische Zeitkonstante des Systems unterhalb des zeitlichen Abstandes der Belichtungen  $\Delta t$  liegt. Die messbare Größe ist in diesem Fall die Intensitäts-Intensitäts Autokorrelationsfunktion  $G_2(q, \Delta t)$  [Cummins und Pike, 1977; Lumma u. a., 2000]:

$$G_2(q, \Delta t) = \left\langle \langle I(q, t) I(q, t + \Delta t) \rangle_p \right\rangle_t \quad (2.101)$$

bzw. die normierte Intensitäts-Intensitäts Autokorrelationsfunktion:

$$g_2(q, \Delta t) = \frac{\left\langle \langle I(q, t) I(q, t + \Delta t) \rangle_p \right\rangle_t}{\left\langle \langle I(q, t) \rangle_p \right\rangle_t}, \quad (2.102)$$

wobei  $\langle \dots \rangle_p$  für die Mittelung über Pixel, die einem Bereich  $q \pm \Delta q$  zugehörig sind, und  $\langle \dots \rangle_t$  für die Mittelung über die Zeit steht. Der Index 2 verdeutlicht, dass es sich um eine Korrelationsfunktion zweiter Ordnung handelt.  $g_2$  kann über die Siegert Relation [Siegert und Laboratory, 1943], mit der zeitlichen Korrelationsfunktion erster Ordnung  $g_1(\Delta t)$  verknüpft werden:

$$g_2(q, \Delta t) = 1 + \beta_0 \cdot |g_1(q, \Delta t)|^2, \quad (2.103)$$

wobei  $g_1(q, \Delta t)$  auch als *intermediate scattering function* (kurz: ISF) bezeichnet wird, die über das Verhältnis des dynamischen und statischen Strukturfaktors bestimmt werden kann [Madsen, Fluerasu u. a., 2018]:

$$g_1(q, \Delta t) = \frac{S(q, \Delta t)}{S(q, 0)} = \frac{1}{S(q, 0)} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left\langle e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i(0) - \vec{r}_j(\Delta t))} \right\rangle. \quad (2.104)$$

$\langle \dots \rangle$  repräsentiert das Mittel über das Streuvolumen. Für ein System aus wechselwirkungsfreien Partikeln die frei diffundieren nimmt die ISF eine exponentielle Form an [Segrè und Pusey, 1997]:

$$g_1(q, \Delta t) = e^{-\Delta t \Gamma(q)} = e^{-\langle \Delta r^2(\Delta t) \rangle q^2 / 6}, \quad (2.105)$$

mit der Zerfallsrate  $\Gamma(q)$  und der mittleren quadratischen Verschiebung  $\langle \Delta r^2 \rangle$ . Die Zerfallsrate wird häufig auch invers als Dekorrelationszeit  $\tau(q) = 1/\Gamma(q)$  ausgedrückt und hängt über

$$\Gamma(q) = D_0 q^2 \quad (2.106)$$

mit der Diffusionskonstante  $D_0$  zusammen, die wiederum über die Stokes-Einstein Beziehung wichtige Informationen über das System liefern kann:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}. \quad (2.107)$$

Durch Kombination der Gleichungen 2.106 und 2.107 kann bei bekannter Viskosität  $\eta$  der Probe aus der gemessenen Zerfallsrate der hydrodynamische Radius  $R_h$  bestimmt werden (und andersherum). Somit können z.B. rheologische Eigenschaften eines Systems auf mikroskopischer Ebene mittels XPCS untersucht werden [Madsen, Fluerasu u. a., 2018; Papagiannopoulos u. a., 2005]. Abbildung 2.17a) zeigt eine vereinfachte Interpretation der Autokorrelationsfunktion  $g_2$  für ein System aus frei diffundierenden Partikeln. In Abbildung 2.17b) sind nach Gleichung 2.103 berechnete  $q$ -abhängige Autokorrelationsfunktionen dargestellt. Dabei wurde für die ISF ein exponentieller Zerfall angenommen. Bei konzentrierten Probensystemen ist die Annahme eines einfachen exponentiellen Zerfalls für die ISF nicht erfüllt und es müssen andere Modelle herangezogen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Modelle für die ISF werden in den entsprechenden Kapiteln eingeführt. In [Madsen, Leheny u. a., 2010] (und darin angegeben Quellen) findet sich eine Übersicht über verschiedene Systeme und zugehörigen ISF. Die bisherigen Betrachtungen gelten nur im Fall von äquilibrierten Systemen. Ziel dieser Arbeit ist es allerdings die Änderung der Dynamik während eines druckinduzierten flüssig-flüssig Phasenübergangs in konzentrierten Proteinlösungen zu untersuchen. Die Autokorrelationsfunktion aus Gleichung 2.102 eignet sich dazu nicht, da ein zeitliches Mittel über die gesamte Messdauer gebildet wird und somit die Informationen über die Änderungen der Dynamik verloren gehen. Um Die Änderungen der Dynamik analysieren zu können wird die Zwei-Zeiten Korrelationsfunktion verwendet, die wie folgt definiert werden kann [Bikondoa, 2017; Brown u. a., 1997; Sutton, Laaziri u. a., 2003]:

$$\text{Corr}(q, t_1, t_2) = \frac{\langle I(q, t_1)I(q, t_2) \rangle_p - \langle I(q, t_1) \rangle_p \langle I(q, t_2) \rangle_p}{\left( \langle I^2(q, t_1) \rangle_p - \langle I(q, t_1) \rangle_p^2 \right)^{1/2} \left( \langle I^2(q, t_2) \rangle_p - \langle I(q, t_2) \rangle_p^2 \right)^{1/2}} \quad (2.108)$$

$$G(q, t_1, t_2) = \frac{\langle I(q, t_1)I(q, t_2) \rangle_p}{\langle I(q, t_1) \rangle_p \langle I(q, t_2) \rangle_p} \quad (2.109)$$

$$C(q, t_1, t_2) = \langle D(q, t_1)D(q, t_2) \rangle_p, \quad (2.110)$$

mit

$$D(q, t) = \frac{I(q, t) - \langle I(q, t) \rangle_p}{\langle I(q, t) \rangle_p}. \quad (2.111)$$



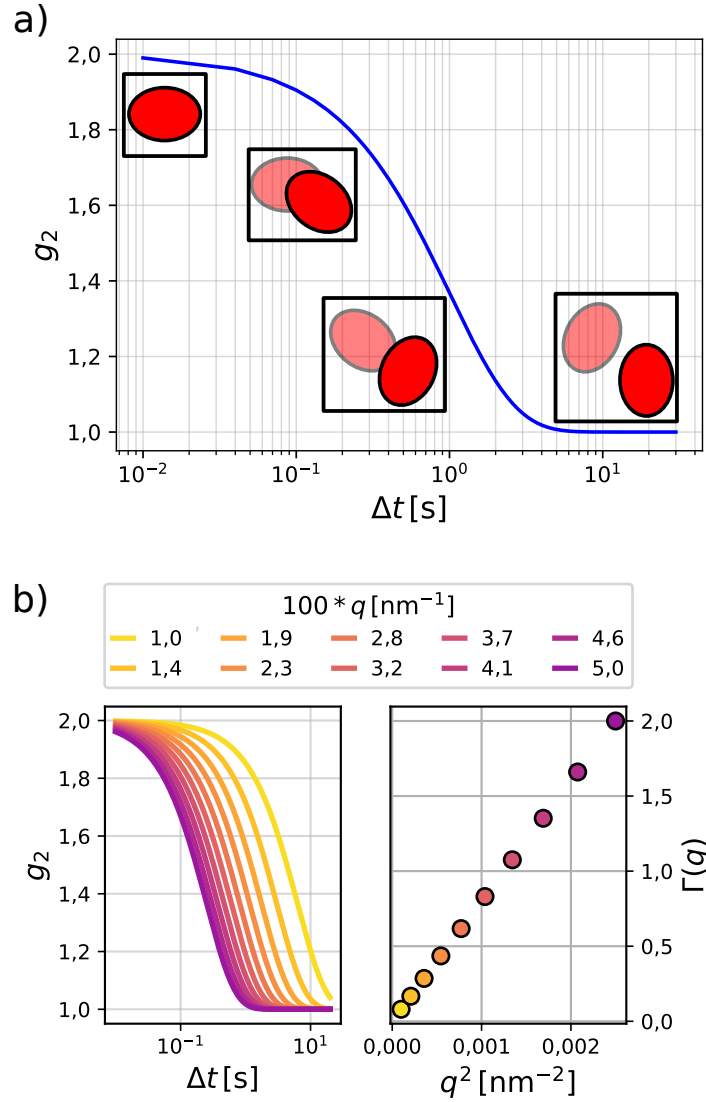


Abbildung 2.17: a) Modellierter Autokorrelationsfunktion  $g_2$  für  $\beta = 1$  und einer Zerfallsrate von  $\Gamma = 2 \text{ s}^{-1}$ . In den schwarz umrandeten Kacheln ist eine schematische Interpretation für die Verschiebung eines einzelnen Teilchens an den jeweiligen Positionen der Autokorrelationsfunktion gezeigt. b) Autokorrelationsfunktionen für verschiedene Wellenvektorüberträge  $q$  eines Gleichgewichtssystems (links). Die Kurven wurden nach Gleichungen 2.103 und 2.105 für  $D_0 = 800 \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$  berechnet. Rechts sind die nach Gleichung 2.106 berechneten Zerfallsraten in Abhängigkeit des Wellenvektorübertrages gezeigt.

Die Intensitäten  $I(q, t_i)$  beinhalten dabei die Anzahl an Photonen die zum Zeitpunkt  $t_i$  in allen Pixeln, die zu einem Bereich  $q \pm \Delta q$  gehören, gemessen wurde. Handelt es sich bei den Fluktuationen um eine zufällige gaußverteilte Variable, sind die drei gezeigten Definitionen äquivalent [Bikondoa, 2017]. In dieser Arbeit wird die Zwei-Zeiten Korrelation in der Form von  $G(q, t_1, t_2)$  verwendet. Der Vorteil der Verwendung von von Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen bei Nicht-Gleichgewichts Systemen liegt darin, dass Autokorrelationsfunktionen in Abhängigkeit des Probenalters  $t_w$  (in Bezug auf den Beginn der Messung) extrahiert werden können. Die zeitabhängigen Funktionen  $g_2(q, t_w, \Delta t)$  werden auch als Schnitte der Zwei-Zeiten Korrelationsfunktion bezeichnet. Die Extraktion von zeitabhängigen  $g_2$ -Funktionen ist beispielhaft für die flüssig-flüssig Phasenseparation einer konzentrierten Lysozylmösung in Abbildung 2.18 veranschaulicht. Die Zwei-Zeiten Korrelationsfunktion

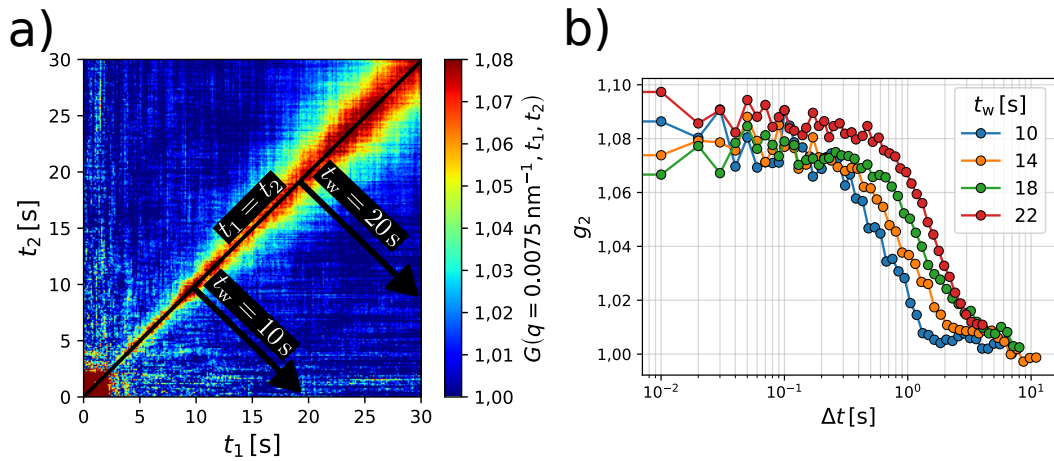


Abbildung 2.18: a) Zwei-Zeiten Korrelationsfunktion aufgenommen während der druckinduzierten Phasenseparation einer konzentrierten Lysozylmösung. Die Pfeile senkrecht zur Diagonalen veranschaulichen die Extraktion der Ein-Zeiten Korrelationsfunktionen in Abhängigkeit des Probenalters  $t_w$ . Die extrahierten Schnitte  $g_2(q, t_w, \Delta t)$  aus a) sind für ausgewählte Zeiten in b) dargestellt.

weist folgende Eigenschaften auf:

- Die Diagonale entspricht einer Zeitdifferenz von  $\Delta t = |t_1 - t_2| = 0$  s und ihr Wert entspricht dem Kontrast  $\beta$ .
- Die Zwei-Zeiten Korrelationsfunktion ist symmetrisch.
- Änderungen der Dynamik können leicht anhand der Breite des Bereichs um der Diagonalen abgelesen werden. Eine Verbreiterung dieses Bereiches mit steigendem Probenalter entspricht einer Verlangsamung der Dynamik.

Die Verlangsamung des Systems wird ebenfalls bei Betrachtung der Schnitte deutlich, da mit steigendem  $t_w$  die Dekorrelation ( $g_2 \rightarrow 1$ ) für größere  $\Delta t$  beobachtet wird.

Für ein Gleichgewichtssystem wäre keine Verbreiterung von  $G$  zu beobachten und die Autokorrelationsfunktion aus Gleichung 2.102 kann durch Mittelung von  $G$  gewonnen werden:

$$g_2(q, \Delta t) = \langle G(q, t_1, \Delta t) \rangle_{t_1} . \quad (2.112)$$

Zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass durch Betrachtung der normalisierten Varianz

$$\chi(q, \Delta t) = \frac{\langle G^2(q, t_1, \Delta t) \rangle_{t_1} - \langle G(q, t_1, \Delta t) \rangle_{t_1}^2}{\langle G(q, t_1, \Delta t = 0) \rangle_{t_1}^2} \quad (2.113)$$

oder der Korrelationsfunktion 4. Ordnung

$$g_4(q, t_w, \Delta t) = \langle G(q, t_1, t_1 + t_w)G(q, t_1 + \Delta t, t_1 + \Delta t + t_w) \rangle_{t_1} \quad (2.114)$$

Informationen über die Heterogenität der Dynamik gewonnen werden können [Madsen, Leheny u. a., 2010; Orsi u. a., 2012].

## 2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (kurz: DLS) ist eine Methode zur Charakterisierung der Größe und Dynamik von gelösten Partikeln im Bereich von 3 nm bis 3  $\mu$ m auf Zeitskalen zwischen Nanosekunden und Sekunden. DLS wurde bereits in dem Kapitel zur Röntgenphotonenkorrelationsspektroskopie angesprochen, da es auf den gleichen theoretischen Grundlagen wie XPCS basiert - der kohärenten Lichtstreuung. Analog zu XPCS werden auch bei DLS Intensitätsfluktuationen des gestreuten Lichts gemessen, mit dem Unterschied, dass sichtbares Licht anstelle von Röntgenstrahlung verwendet wird. Durch die unterschiedliche Wellenlänge der Strahlung kommt es zu Limitierungen des zugänglichen  $q$ -Bereiches bei den beiden Techniken. Für DLS sind nur Wellenvektorüberträge unterhalb von  $q_{\text{DLS}} < 1 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$  zugänglich, wohingegen bei XPCS der Bereich zwischen  $1 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1} \leq q_{\text{XPCS}} \lesssim 1 \text{ nm}^{-1}$  liegt [Zhang, Allen u. a., 2012]. Kleinere Wellenvektorüberträge können im Fall von XPCS durch die Betrachtung ultra-kleiner Streuwinkel (USAXS-XPCS) erreicht werden, wie es auch in dieser Arbeit Anwendung findet. Ein weiterer Punkt der sich bei DLS häufig nicht vermeiden lässt ist das Auftreten von Mehrfachstreuung. Wie bereits in den theoretischen Beschreibungen zur Röntgenkleinwinkelstreuung (vgl. Abschnitt 2.2.2) erwähnt wurde, wird zur Berechnung des Streufeldes die Gültigkeit der Born-Näherung angenommen. Aufgrund dessen limitieren sich die zu untersuchenden Proben für DLS meist auf optisch transparente, verdünnte Lösungen. Außerdem kommen zur Detektion des Streufeldes häufig Photodioden zum Einsatz, sodass keine zweidimensionalen Streubilder aufgenommen werden. Die Streuintensität wird somit in diskreten Zeitabständen für jeden Winkel einzeln gemessen und zur Berechnung der normierten Autokorrelationsfunktion  $g_2$  entfällt die Mittelung über Pixel (vgl. Gleichung 2.102). Auch für die dynamische Lichtstreuung gilt, dass das einfallende elektrische Feld an vielen Volumenelementen  $dV_n$  der Probe gestreut wird und dass

sich das Streufeld  $E^S$  aus der Superposition der Einzelbeiträge  $E_n^S$  ergibt, wobei diese statistisch unabhängig voneinander sind. Ist diese Voraussetzung erfüllt und handelt es sich bei dem eingestrahlten elektrischen Feld um eine gaußverteilte Variable, ist das Streufeld ebenfalls eine gaußverteilte Variable (zentraler Grenzwertsatz). Bei der Betrachtung der Diffusion eines verdünnten monodispersen Systems können die im vorherigen Abschnitt eingeführten Größen, wie z.B. der hydrodynamische Radius bestimmt werden.

Ein wichtiger Faktor, der bisher noch nicht diskutiert wurde, ist die Polydispersität. Die Intensitäts-Intensitäts Autokorrelationsfunktion ergibt sich, auch für ein polydisperses System, aus der Siegert-Relation:

$$g_2(\Delta t) = 1 + \beta |g_1(\Delta t)|^2 . \quad (2.115)$$

Der Unterschied zu einem monodispersen System besteht darin, dass sich die ISF aus der Überlagerung von exponentiellen Zerfällen mit unterschiedlichen Zerfallsraten ergibt, was für eine kontinuierliche Verteilung  $g(\Gamma)$  als Integralgleichung ausgedrückt werden kann [Glatter, 2018]:

$$g_1(\Delta t) = \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} g(\Gamma) e^{-\Gamma \Delta t} d\Gamma . \quad (2.116)$$

$\Gamma_{\min, \max}$  bezeichnet dabei die minimale bzw. maximale in dem System auftretende Zerfallsrate. Für sphärische Partikel kann die Autokorrelationsfunktion als gewichtetes Integral über eine (Intensitäts-, Volumen-, Massen- oder Anzahl-) Verteilung  $D(\tau)$  ausgedrückt werden:

$$g_1(\Delta t) = \int_{\tau_{\min}}^{\tau_{\max}} D(\tau) W(\tau) e^{\Delta t/\tau} \tau^2 d\tau , \quad (2.117)$$

mit den Wichtungsfaktoren  $W(\tau)$ , die abhängig von der betrachteten Verteilung sind. Die Bestimmung der ISF für ein polydisperses System kann über numerische Berechnungen, wie sie z.B. bei dem Softwarepaket CONTIN Anwendung finden [Provencher, 1982] oder über die sogenannte Kumulantenmethode [Koppel, 1972] bestimmt werden. Bei der Kumulantenmethode wird die Feldautokorrelationsfunktion entwickelt:

$$\ln(G_1(\Delta t)) = K_0 - K_1 \Delta t + K_2 \Delta t^2 / 2! - K_3 \Delta t^3 / 3! + \dots , \quad (2.118)$$

wobei  $G_1$  die unnormierte Feldautokorrelationsfunktion ist. Für ein monodisperses System entspricht  $\exp(K_0)$  der Amplitude von  $G_1$  und  $K_1$  der Zerfallsrate  $\Gamma$ . Durch die Polydispersität weicht  $G_1$  von der reinen exponentiellen Form ab, was in der Kumulantenmethode durch nicht verschwindende Terme ab der 2. Ordnung berücksichtigt wird. In diesem Fall entspricht  $K_1$  der mittleren Zerfallsrate und  $K_2$  der Varianz von  $\Gamma$ . Bei der Charakterisierung von polydispersen Systemen wird häufig der Polydispersitätsindex (PDI) herangezogen, der wie folgt definiert ist:

$$\text{PDI} = \frac{K_2}{K_1^2} . \quad (2.119)$$

Bis zu einem PDI von 4 % wird ein System noch als monodispers angesehen [Glatter, 2018]. Dies demonstriert die geringe Auflösung eines DLS-Experiments. Als Faustregel gilt, dass zur Auflösung unterschiedlich großer Strukturen, sich ihr Radius um einen Faktor von mindestens 3 unterscheiden sollte [Bhattacharjee, 2016].

# Kapitel 3

## Probensystem und Messplätze

In diesem Kapitel werden die verwendeten Probensysteme sowie der zugehörige Präparationsprozess und im Anschluss daran die verwendete Hochdruckzelle und die Messplätze vorgestellt.

### 3.1 Untersuchte Proteinlösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind das Lysozym aus Hühnereiweiß und das Gammakristallin D. Beide Proteine stellen sehr gut untersuchte Modellsysteme dar, deren Phasenverhalten und Wechselwirkungen in Lösung in Abhängigkeit einer Vielzahl von Parametern, wie z.B. hydrostatischer Druck, Temperatur, Salzart, Salzkonzentration, Proteinkonzentration, pH Wert und unterschiedlicher Kosolventien untersucht wurden [Schroer, Markgraf u. a., 2011; Möller, Schroer u. a., 2012; Julius, Weine, Berghaus u. a., 2018; Julius, Weine, Gao u. a., 2019; Möller, Grobelny, Schulze, Bieder u. a., 2014; Schulze u. a., 2016; Schroer, 2011; Winter, 2019; Cinar, Fetahaj u. a., 2019; Cinar, Cinar u. a., 2019; Cinar und Winter, 2020]. Aufgrund ihrer hohen Stabilität eignen sie sich vor allem zur Untersuchung mittels Röntgenstreuungsmethoden.

#### 3.1.1 Lysozym

Lysozym (auch Muramidase genannt) ist ein Enzym, das sowohl im menschlichen Körper, als auch bei Säugetieren, Pflanzen oder Pilzen vorkommt und hauptsächlich am Abbau von Bakterien beteiligt ist. Lysozym gehört somit zum angeborenen Immunsystem und ist häufig in Sekreten, wie z.B. Speichel, Tränenflüssigkeit, Fruchtwasser oder auch in Milch vorzufinden. Im Fall des in dieser Arbeit verwendeten Lysozyms handelt es sich um aus Hühner Eiklar gewonnenes Lysozym (im Folgenden HEW-Lysozym oder nur Lysozym). Das Lysozym verleiht dem Eiklar seine antibakterielle Wirkung, die erstmals im Jahr 1909 beobachtet wurde [Laschtschenko, 1909] und ist dort in hohen Konzentrationen vorhanden. Abbildung 3.1a) zeigt die Tertiärstruktur (PDB: 1DPX [Weiss u. a., 2000]) von Lysozym. Lysozym besteht aus vier  $\alpha$ -Helices und drei  $\beta$ -Faltblatt Strukturen und aus insgesamt 129 Aminosäuren mit einem resultierenden Molekulargewicht von 14,3 kDa. Die besonders hohe Stabilität von Lysozym folgt zum einen aus seiner globulären nativen Struktur und zum anderen aus den vier im Protein auftretenden kovalenten Disulfidbrücken [Winter und Noll, 1998; Möller, 2014]. Die in dieser Arbeit verwendeten Lysozymlösungen

weisen alle die selbe Zusammensetzung auf und unterscheiden sich lediglich in der Proteinkonzentration. Die Komposition der Lösungen lautet wie folgt:

- Lysozym aus Hühnereiweiß in veränderlichen Konzentrationen (Sigma Aldrich: 10837059001)
- 25 mM BisTris (Sigma Aldrich: B9754)
- 500 mM Natriumchlorid (Sigma Aldrich: S7653).

BisTris wird verwendet, um auch bei hohen hydrostatischen Drücken den pH Wert (pH 7) konstant zu halten [Neuman u. a., 1973]. Natriumchlorid (NaCl) schirmt die Oberflächenladung des Proteins ab und unterdrückt somit zum Teil die Coulomb-Abstoßung, wodurch die flüssig-flüssig Phasenseparation ermöglicht wird. Um die in dieser Arbeit verwendeten hohen Proteinkonzentrationen zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Im Fall der XPCS und SAXS Messungen wurden die Proben dialysiert. Da dieses Verfahren in vielen Arbeiten erfolgreich Anwendung fand (z.B. [Schulze u. a., 2016; Julius, 2019; Möller, 2014]), wird im Folgenden nur ein kurzer Überblick über den Ablauf des Verfahrens geliefert. Für eine detaillierte Beschreibung der Dialyse sei auf die zuvor angegebene Literatur verwiesen.

Für die Dialyse wird das Lysozym zu einer Konzentration von 13 wt % in einer Pufferlösung aus 25 mM BisTris bei pH 7 gelöst. Die daraus erhaltene Lösung wird in eine Dialyse Kassette (Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes, 2K MWCO, 15 mL, Thermo Fisher Scientific: 87719) gefüllt, welche unter konstantem Rühren in einer konzentrierten Polyethylenglykol-Lösung (PEG-Lösung) für 12 bis 15 Stunden bei Raumtemperatur platziert wird. Die PEG-Lösung besteht aus 250 g/L PEG 35000 ( $M_w = 35\,000$  g/mol, Sigma Aldrich: 94646) gelöst in einer 25 mM BisTris Pufferlösung bei pH 7. Durch den identischen pH-Wert und identischer BisTris-Konzentration in der Proteinlösung und Dialyselösung wird sichergestellt, dass diese Parameter in der konzentrierten Lösung erhalten bleiben. Die finale Proteinkonzentration wurde mittels UV-Vis Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 280 nm unter der Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 2,64$  mL/(mg cm) bestimmt [Sophianopoulos u. a., 1962]. Als letzter Schritt wurde die konzentrierte Proteinlösung mit einer Salzlösung bestehend aus 3 M NaCl, 25 mM BisTris, pH 7 im Verhältnis von 5 : 1 gemischt, wodurch sich die finale Salzkonzentration von 500 mM ergibt. Die Vermischung der Proteinlösung mit der Salzlösung wurde unmittelbar vor jedem Experiment durchgeführt, da das Salz die Stabilität der Lösung verringert.

Bei der Probenpräparation für die DLS-Messungen wurde die Proteinlösung unter Verwendung einer Zentrifuge (Sigma 2-16KL) mit Zentrifugenfiltern (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, Sigma Aldrich: UFC901008) aufkonzentriert. Dazu wurde ebenfalls eine wie oben beschriebene Stammlösung erstellt und in die Filtereinheit gefüllt. Anschließend wurde die mit der Probe befüllte Filtereinheit in die Zentrifuge gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3068 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach diesem Vorgang wurde die konzentrierte Lösung mit einer

Spritze aus der Filtereinheit extrahiert und dessen Konzentration mit einem UV-Vis Spektrometer bestimmt. Beide Methoden haben gegenübergestellt Vor- und Nachteile. Die Dialyse ist sehr zeitaufwändig, liefert aber im Vergleich zur Zentrifugation ein deutlich größeres Probenvolumen.

### 3.1.2 Gammakristallin D

(Gamma) Kristalline sind Proteine, die in Augenlinsen von Wirbeltieren und Tintenfischen vorzufinden sind und dort im Wesentlichen für die Brechkraft und Transparenz der Linse verantwortlich sind. Veränderungen in der Wechselwirkung von Gammakristallin, die z.B. zur Kristallisation oder flüssig-flüssig Phasenseparation führen, gehen mit einer Trübung der Augenlinse einher, was Krankheiten wie Katarakt auslöst, die zu einer deutlich verminderten Sehkraft bis hin zur Erblindung führen [Gunton u. a., 2007]. Das in dieser Arbeit untersuchte Gammakristallin ist das humane Gammakristallin D (auch: CRYGD oder  $\gamma$ D-Kristallin genannt, PDB: 1HK0 [Basak u. a., 2003]). CRYGD besteht aus 173 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 20,63 kDa. Die Tertiärstruktur von CRYGD ist in Abbildung 3.1b) dargestellt und zeigt den globulären Charakter von CRYGD. Die in dieser Arbeit untersuchten Gammakristallinlösungen wurden von der Gruppe von Prof. Roland Winter (Technische Universität Dortmund, Fakultät für Chemie und chemische Biologie, Otto-Hahn-Straße 4a, 44227 Dortmund) zur Verfügung gestellt. Das Protein ist in verschiedenen Konzentrationen in einer Pufferlösung bestehend aus 50 mM Tris und 150 mM NaCl bei pH 7,4 gelöst.

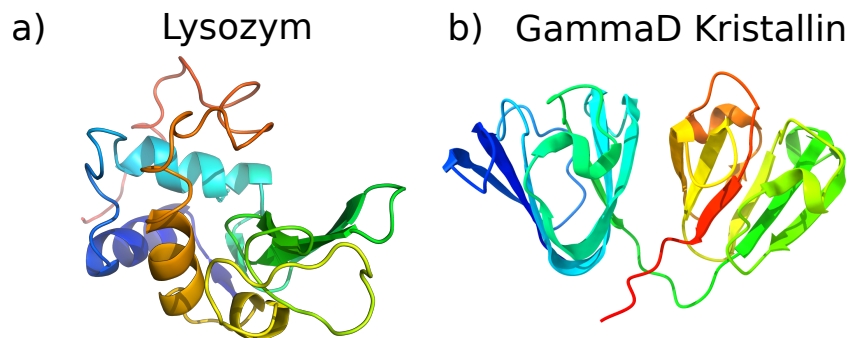


Abbildung 3.1: Tertiärstrukturen für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine Lysozym (a) und GammaD Kristallin (b).

## 3.2 Messplätze

### 3.2.1 Die Hochdruckzelle

Die druckabhängigen Experimente wurden in einer von C. Krywka konstruierten Hochdruckzelle [Krywka u. a., 2008] durchgeführt. Der schematische Aufbau der



Hochdruckzelle ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Hochdruckzelle besteht aus einem massiven Metallblock der Bohrungen zur Einführung des Probenhalters, zur Versiegelung der Zelle mittels Diamantfenster, zum Anschluss einer Hochdruckpumpe und Heizkanäle zur Temperierung der Probe enthält. Die Bohrungen mit einer direkten Verbindung zum Probenvolumen werden über die in Abbildung 3.2 gezeigten Stempel und mittels O-Ringen abgedichtet. Eine weitere Öffnung befindet sich unterhalb eines Diamantfensters und ragt bis in die unmittelbare Nähe des Probenvolumens, sodass mit einem Temperatursensor die Temperatur in der Probenumgebung überwacht werden kann. Die Diamantfenster ermöglichen die Transmission von Röntgenstrahlung und sichtbarem Licht durch die Zelle und den darin befindlichen Probenhalter. Zur Vermeidung der Beschädigung der Diamantfenster beschränken sich die Messungen auf Drücke von bis zu 4 kbar. Außerdem ist in Abbildung 3.2 (unten) der Probenhalter gezeigt. Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze über den Befüllkanal in den Probenhalter gefüllt. Um eine hohe Transmission von Röntgenstrahlung durch den Probenhalter zu gewährleisten, werden die Sichtfenster des Probenhalters mit Kaptonfolie beklebt. Nach der Befüllung des Probenhalters, wird der Befüllkanal mit einer Kunststoffschraube verschlossen.

Die Hochdruckzelle wurde bereits erfolgreich für eine Vielzahl druckabhängiger Untersuchungen diverser Probensysteme mittels Röntgenstrahlung und Absorptionsmessungen von sichtbarem Licht (Trübungsmessungen) verwendet [Schulze u. a., 2016; Julius, Al-Ayoubi u. a., 2018; Schroer, Markgraf u. a., 2011; Krywka u. a., 2008], weshalb an dieser Stelle auf eine ausführlichere Beschreibung der Hochdruckzelle verzichtet wird.

### 3.2.2 Kohärenzstrahllinie P10, PETRA III, DESY

Die XPCS-Messungen wurden an der Kohärenzstrahllinie P10 des Speicherrings PETRA III am Deutsches Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt. PETRA III ist eine Elektronenspeicherringanlage der dritten Generation in der Elektronen mit einer Energie von 6 GeV auf einer Kreisbahn mit einem Umfang von 2304 m gehalten werden. Die Strahllinie P10 ist in drei Abschnitte, sogenannte *hutches*, aufgeteilt, dessen wesentlichen Komponenten in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt sind. Die *hutches* unterteilen sich in eine für die Röntgenoptik (OH) und zwei für den Experimentierbetrieb (EH1, EH2). An der Strahllinie P10 wird ein U29 Undulator mit einer Länge von 5 m verwendet. Hinter dem Undulator befinden sich zwei Blenden (PS1, PS2) zur ersten Kollimation des Strahls. Der kollimierte Strahl trifft auf einen Si(111) Monochromator (HHM), der es erlaubt die Energie in einem Bereich von (5 bis 20) keV zu wählen. Dadurch verringert sich die relative Bandbreite der Strahlung auf  $\Delta\lambda/\lambda = 10^{-4}$ , was nach Gleichung 2.18 mit einer Erhöhung der longitudinalen Kohärenzlänge einhergeht. Im Anschluss an den Monochromator wird der Strahl von zwei Spiegeln (M1, M2) reflektiert, die die höheren Harmonischen des Undulatorstrahls herausfiltern. Zur Vermeidung der Detektion von parasitären Streubeiträgen und zur Definition der Strahlgröße an der Probenposition dienen die Blenden G1 und G2, die in EH1 bzw. EH2 lokalisiert sind. Außerdem kommen re-

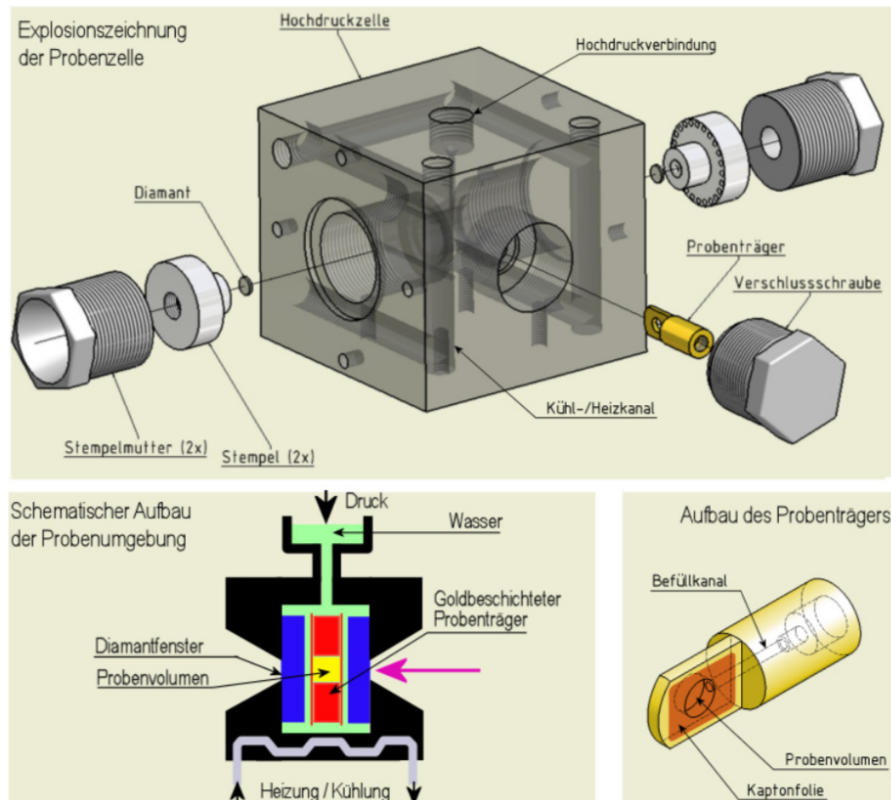


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Hochdruckzelle. Die Abbildung wurde aus [Krywka, 2008] entnommen.

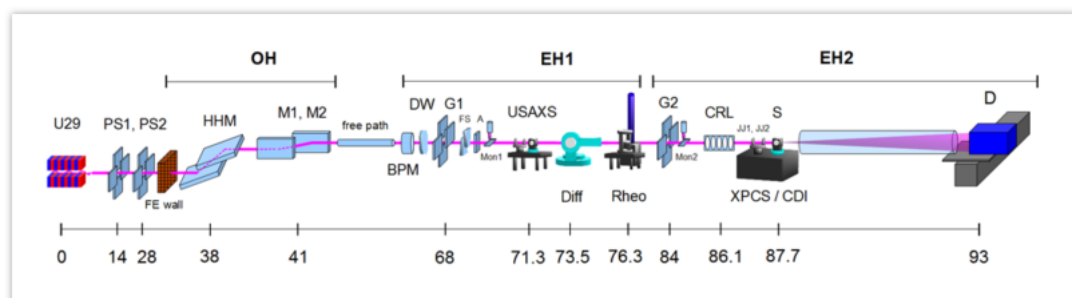


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau der Kohärenzstrahllinie P10 an PETRA III, DESY. Die Gerade unterhalb der gezeigten Strukturen gibt den Abstand der jeweiligen Komponente zum Undulator (U29) in Metern an. Die Abbildungen wurde aus [DESY, 2022b] entnommen.

fraktive Röntgenlinsen (engl.: *Compound Refractive Lenses*, kurz: CRLs) zur Fokussierung des Röntgenstrahls zum Einsatz. Dadurch lassen sich Strahlprofile mit einer Größe von Mikrometern am Probenort realisieren. Für den USAXS/XPCS-Betrieb wird die Probe in EH1 platziert und die Streustrahlung von einem Detektor in einem Abstand von 21,2 m in EH2 detektiert, wohingegen sich die Probe für SAXS/XPCS-Messungen in EH2 in einem Abstand von 5,1 m zum Detektor befindet. In den folgenden Abschnitten werden die Aufbauten für die unterschiedlichen Probenumgebungen vorgestellt.

### 3.2.3 Aufbau und Parameter für druckabhängige USAXS/XPCS-Messungen

An der Strahllinie P10 wurde für die USAXS/XPCS-Messungen die in Abschnitt 3.2.1 vorgestellte Hochdruckzelle verwendet. Der experimentelle Aufbau für die druckabhängigen USAXS/XPCS-Messungen ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Der

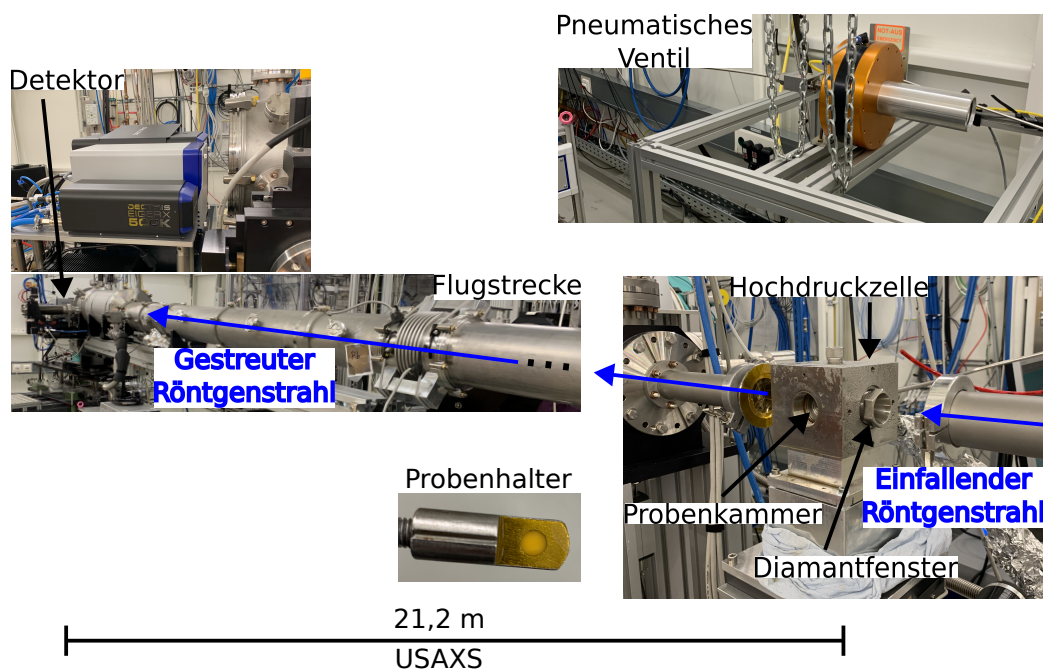


Abbildung 3.4: Experimenteller Aufbau an der Strahllinie P10 für die druckabhängigen USAXS/XPCS-Messungen.

einfallende Röntgenstrahl (von rechts in Abbildung 3.4) passiert das erste Diamantfenster der Hochdruckzelle und trifft anschließend auf die Probe von welcher er gestreut wird. Die gestreute Strahlung verlässt über das zweite Diamantfenster (nicht sichtbar in der Abbildung) die Hochdruckzelle und gelangt über eine vakuumierte Flugstrecke auf den in 21,2 m entfernten Detektor. In Abbildung 3.4 ist oben rechts das verwendete pneumatische Hochdruckventil von

der Firma Sitec gezeigt. Die pneumatischen Ventile sind für Drücke bis 10 000 bar ausgelegt und können über einen Luftdruckluftanschluss gesteuert werden. Diese Konstellation ermöglicht es Drucksprünge auch während der Belichtung der Probe auszuführen und somit auch frühe druckinduzierte Änderungen in der Probe zu untersuchen. Zur Untersuchung der LLPS in konzentrierten Proteinlösungen wurde eine Strahlgröße von  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  und eine Photonenenergie von  $E_{\text{ph}} = 13\ \text{keV}$  gewählt. Die Wahl eines vergleichsweise großen Strahlprofils hat den Vorteil, dass sich die in der Probe deponierte Dosis pro Volumenelement (vgl. Gleichung 3.2) verringert. Andererseits reduziert sich dadurch die Ausdehnung des Speckles und somit der Kontrast. Um den Kontrast möglichst zu erhalten, muss deshalb der Probe-zu-Detektor Abstand groß gewählt werden. Eine weitere Reduktion der Dosis wurde durch die Verwendung von Absorbern erzielt. Dadurch wurde der initiale Photonenfluss von  $4 \cdot 10^{10}$  Photonen/(s  $\mu\text{m}^2$ ) auf maximal  $10^7$  Photonen/(s  $\mu\text{m}^2$ ) reduziert. Zur Detektion der gestreuten Strahlung kam im Rahmen der USAXS/XPCS-Messungen ein Eiger X 4M Hybrid-Photonenzähl-Detektor (engl.: hybrid photon counting detector, kurz: HPCD) mit einer Auflösung von  $2070\ \text{Pixel} \times 2167\ \text{Pixel}$ , einer Pixelgröße von  $75\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$  und einer maximalen Bildrate von 750 Bildern pro Sekunde zum Einsatz. Die maximale Zählrate des Detektors liegt bei  $10^6$  Photonen/s/Pixel. Aufgrund der hohen Intensität des Primärstrahls wird ein Strahlstopper (engl.: *Beamstop*) verwendet, wodurch die Beschädigung des Detektors verhindert wird und dennoch hohe Zählraten des Streufeldes messbar sind. Der aus dieser Konfiguration resultierende  $q$ -Bereich liegt zwischen

$$0,007\ \text{nm}^{-1} < q < 0,5\ \text{nm}^{-1} .$$

Die Probenzelle wurde über einen Wärmetauscher temperiert und die Temperatur in der Probenumgebung mittels eines in der Hochdruckzelle befindlichen Temperatursensors gemessen.

### 3.2.4 Aufbau und Parameter für temperaturabhängige USAXS/XPCS-Messungen

Außerdem wurden temperaturabhängige USAXS/XPCS-Messungen durchgeführt, mit denen die Dynamik der temperaturinduzierten flüssig-flüssig Phasenseparation in Lysozymlösungen untersucht wurde. Konzeptionell unterscheidet sich der Aufbau für temperaturabhängige USAXS-Experimente vom Druckaufbau nur in der am Probenort vorhandenen Zelle. Zur Temperatursteuerung wurde eine Linkam-Stage verwendet (s. Abbildung 3.5c)), mit welcher Heizraten von 150 K/min und Kühlraten von 100 K/min erzielt werden können. Die Kühlung der Linkam-Stage erfolgt über Kanäle die mit flüssigem Stickstoff gespült werden. Bei der Verwendung der Linkam-Stage werden die Proben in Quarzkapillaren gefüllt und anschließend durch Schmelzen der Öffnung oder Verdichtung mittels Klebstoff versiegelt. Die Kapillare wird anschließend über einen Kanal im Sichtfenster der Linkam-Stage positioniert. Auch für die

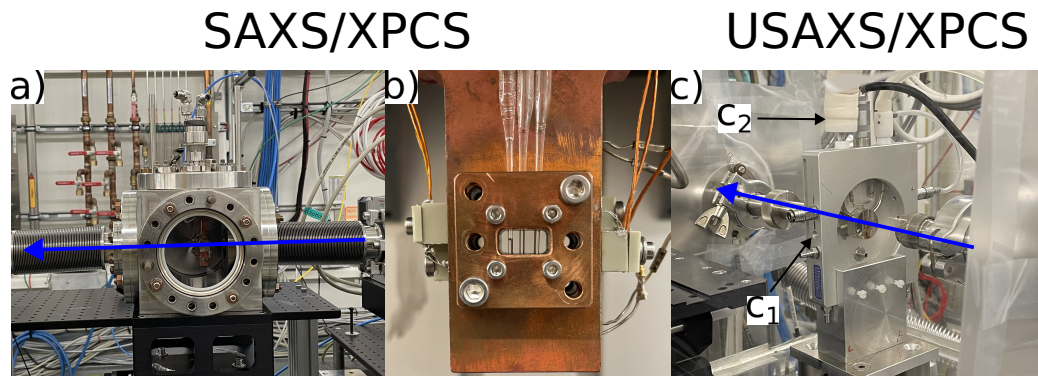


Abbildung 3.5: a)-b) Aufbau des SAXS/XPCS-Experiments zur Charakterisierung der Dynamik in homogenen Lysozymbiosungen. In a) ist die Probenkammer und in b) die Halterung für die Kapillaren gezeigt. In c) ist die für temperaturabhängige USAXS/XPCS-Messungen gezeigte Linkam-Stage abgebildet.  $c_1$  zeigt den Kanal über den, die Kapillare in das Sichtfenster geführt wird und  $c_2$  markiert den Anschluss für Flüssigstickstoff zur Kühlung der Probe. Der blaue Pfeil gibt jeweils die Richtung des propagierenden Röntgenstrahls an.

temperaturabhängigen Messungen wurde zur Reduktion der deponierten Dosis eine Strahlgröße von  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  gewählt, allerdings bei einer Photonenenergie von  $E_{\text{ph}} = 8,54\ \text{keV}$ , wodurch sich ein zugänglicher  $q$ -Bereich von

$$0,004\ \text{nm}^{-1} < q < 0,2\ \text{nm}^{-1}$$

ergibt. Für die Untersuchung der temperaturinduzierten LLPS wurde ebenfalls der im vorherigen Abschnitt vorgestellte Eiger X 4M Detektor verwendet.

### 3.2.5 Aufbau für SAXS/XPCS-Messungen an homogenen Proteinlösungen

Bei der Untersuchung der Dynamik in homogenen Proteinlösungen wurde die SAXS-Geometrie verwendet. Bei diesem Aufbau kam eine von der Strahllinie P10 zur Verfügung gestellte Probenkammer zum Einsatz, die in Abbildung 3.5a) und b) gezeigt ist. In die Kammer wurde eine Halterung befestigt, die Platz für drei Kapillaren bietet. Die SAXS/XPCS-Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Da sich in der homogenen Phase die betrachteten Strukturen deutlich schneller bewegen, ist auch ein schnellerer Detektor notwendig. Deshalb wurde zur Charakterisierung der Dynamik in der homogenen Phase der Eiger X 500k Detektor verwendet mit einer Auflösung von  $1030\ \text{Pixel} \times 514\ \text{Pixel}$ , einer Pixelgröße von  $75\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$  und einer maximalen Bildrate von 7000 Bildern pro Sekunde. Da für Messungen in der homogenen Phase ein deutlich geringerer Kontrast zu erwarten ist, wurde ein Strahlprofil von  $12,3\ \mu\text{m} \times 14,1\ \mu\text{m}$  verwendet bei einer Photonenenergie von  $E_{\text{ph}} = 8,76\ \text{keV}$ .

Der  $q$ -Bereich liegt in diesem Fall zwischen

$$0,013 \text{ nm}^{-1} < q < 0,47 \text{ nm}^{-1}.$$

Zur besseren Übersicht sind in der nachfolgenden Tabelle die wesentlichen Parameter für sämtliche XPCS-Messungen noch ein mal zusammengefasst.

	<b>Druckinduzierte</b>	<b>Temperaturinduzierte</b>	<b>Homogene</b>
	<b>LLPS</b>	<b>LLPS</b>	<b>Lösung</b>
Detektor	Eiger X 4M	Eiger X 4M	Eiger X 500k
Geometrie	USAXS (21,2 m)	USAXS (21,2 m)	SAXS (5,1 m)
$E_{\text{ph}}$ [keV]	13	8,54	8,76
Strahlprofil [ $\mu\text{m}^2$ ]	100 x 100	100 x 100	12,3 x 14,1
$q$ -Bereich [ $\text{nm}^{-1}$ ]	$0,007 < q < 0,5$	$0,004 < q < 0,2$	$0,013 < q < 0,47$

Tabelle 3.1: Übersicht der experimentellen Parameter für die XPCS-Messungen.

### 3.2.6 Aufbau des DLS-Experiments

Zum Vergleich der SAXS/XPCS-Messungen an homogenen Lysozymbiosungen wurden DLS-Messungen am Institut für angewandte Physik von Prof. Dr. Frank Schreiber der Universität Tübingen durchgeführt. Der Aufbau ist in Abbildung 3.6b) gezeigt und besteht im Wesentlichen aus einem He-Ne Laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) zur Belichtung der Probe, einem von Toluol umgebenen Probenhalter zur Vermeidung unerwünschter Reflektionen und zur besseren Temperaturkontrolle, einem Goniometer zur Änderung des Winkels zwischen Probe und Detektor, dem Detektor (Avalanche-Photodiode) zur Detektion der gestreuten Photonen und einem Multi-Tau-Autokorrelator zur Berechnung der Autokorrelationsfunktion. Bei dem verwendeten Aufbau können Intensitätsfluktuationen in Zeitintervallen zwischen 100 ns bis 3430 s aufgenommen werden [Schreiber, 2022].

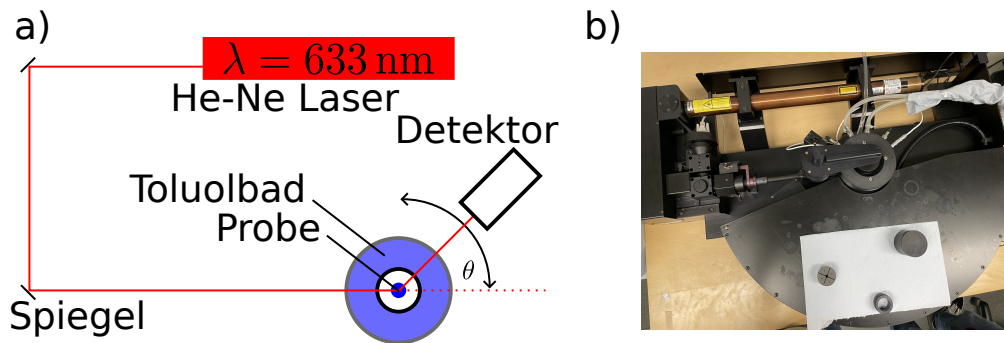


Abbildung 3.6: a) Schematische Darstellung des DLS-Aufbaus. Das Licht des He-Ne Lasers wird über zwei Spiegel auf die Probe reflektiert. Die in der Probenkammer befindliche Küvette ist zur besseren Temperaturkontrolle und zur Vermeidung unerwünschter Reflektionen von einem Toluolbad umgeben. Der Detektor befindet sich im Winkel  $\theta$  zur Probe und kann die Streustrahlung in einem Winkelbereich von (17 bis  $150^\circ$ ) detektieren. b) Foto des DLS-Aufbaus des Instituts für angewandte Physik in Tübingen.

### 3.3 Entwicklung von Messprotokollen und allgemeine Datenverarbeitung

In diesem Abschnitt wird die Vorgehensweise zur Erstellung des, an das jeweilige Probensystem angepasste, Messprotokolls vorgestellt und ein genereller Überblick über die Verarbeitung der erhaltenen Daten geliefert. Begonnen wird dabei mit den USAXS/XPCS-Messungen der druck- und temperaturinduzierten flüssig-flüssig Phasenseparation. Im Anschluss daran wird die Entwicklung von Messprotokollen für SAXS/XPCS-Messungen an homogenen Proteinlösungen vorgestellt.

#### 3.3.1 Messprotokolle und Datenverarbeitung von USAXS/XPCS-Messungen an flüssig-flüssig phasenseparierten Proteinlösungen

In einem XPCS-Experiment wird zur Charakterisierung der Dynamik die Korrelation von aufeinanderfolgenden Streubildern bestimmt. Im Fall von strahlensensitiven Proteinlösungen ist es daher notwendig die Dosis so gering wie möglich zu halten und dabei einen ausreichend hohen Kontrast zu erzielen. Die charakteristischen Zeitskalen ändern sich bei phasenseparierenden Proteinlösungen während der Messung, weshalb eine geeignete Wahl der Belichtungszeit  $t_{\text{exp}}$  und Gesamtanzahl der aufgenommenen Bilder  $N_{\text{fr}}$ , woraus sich die Gesamtmessdauer  $T_{\text{m}}$  ergibt, stattfinden muss. Die Dauer einer Messung kann über

$$T_{\text{m}} = N_{\text{fr}} * \Delta t_0, \quad (3.1)$$

berechnet werden.  $\Delta t_0$  beinhaltet dabei zusätzlich zur Belichtungszeit  $t_{\text{exp}}$  die Auslesezeit des Detektors  $t_{\text{read}}$ , Latenzzeiten  $t_{\text{lat}}$  und eine eventuell gewählte Verzögerung.



rungszeit zwischen zwei Aufnahmen  $t_{\text{delay}}$ . Da die Zeitskala der LLPS im Vergleich zur Auslesezeit des Detektors und den Latenzzeiten groß ist, werden diese im Folgenden vernachlässigt und es gilt  $\Delta t_0 \approx t_{\text{exp}} + t_{\text{delay}}$ . Die während einer Messung in der Probe deponierte Strahlendosis steht im direkten Zusammenhang mit der Messdauer  $T_m$  und kann über

$$\mathcal{D} = \frac{\Phi E_{\text{ph}} A T_m}{z^2 d_s \rho} \quad (3.2)$$

abgeschätzt werden [Perakis und Gutt, 2020]. Dabei bezeichnen  $\Phi$  den Photonenfluss (unter Berücksichtigung des gewählten Absorbers),  $E_{\text{ph}}$  die Photonenenergie,  $A = 1 - T$  die Absorption,  $z^2$  die Strahlgröße am Probenort,  $d_s$  die Probendicke in Strahlrichtung und  $\rho$  die Dichte der Lösung. Die Absorption bzw. Transmission wird über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt und die entsprechenden Absorptionslängen  $\lambda_{\text{abs}}$  aus Tabellenwerken (z.B.: [Henke u. a., 1993]) entnommen. Dabei wird für die Proteinlösung näherungsweise die Absorptionslänge und Dichte von Wasser verwendet. Zur Berechnung der Absorption müssen die Komponenten der Probenumgebung berücksichtigt werden, die wiederum abhängig von der verwendeten Zelle sind. Für die Hochdruckzelle wird somit die Absorption des ersten Diamantfensters und für die Linkam-Stage die Absorption von Borosilikatglas zur Berechnung der Dosis mit einbezogen. Die Absorption der Kaptonfolie wird für die Berechnung der Dosis vernachlässigt, da sie im gewählten Energiebereich unter einem Prozent beträgt. Zur Entwicklung eines geeigneten Messprotokolls, muss einerseits eine ausreichend große Messzeit gewählt werden, um die charakteristischen Zeitskalen des Systems abzudecken und andererseits Parameter wie Strahlgröße, Absorber und Belichtungszeit so gewählt werden, dass ein möglichst hohes SNR erzielt wird und keine strahleninduzierten Änderungen im System auftreten. Um die kritische Dosis  $\mathcal{D}_c$  abschätzen zu können wird ein Test auf Strahlenschäden durchgeführt. Zum Test auf durch Röntgenstrahlung hervorgerufene Änderungen des Systems wird eine konzentrierte homogene Proteinlösung verwendet und diese unter Variation der Belichtungszeit, Anzahl der Absorberfolien und Anzahl der aufgenommenen Bilder beleuchtet, bis im zeitabhängigen SAXS-Signal Veränderungen aufgrund von Aggregatbildung beobachtet werden können.

Zur Berechnung der SAXS-Intensität muss das zweidimensionale Detektorbild zunächst maskiert werden, damit Strukturen, wie z.B. der Strahlstopper, die Begrenzungen der Detektorelemente und parasitäre Streubeiträge von anderen Komponenten des Aufbaus bei der azimuthalen Integration nicht berücksichtigt werden. Die Erstellung von Masken, sowie die Integration der Detektorbilder erfolgte mit dem Python Paket pyFAI vers. 0.20.0 [Ashiotis u. a., 2015]. Das pyFAI Paket bietet die Möglichkeit die Integration auf einem Grafikprozessor (GPU) auszuführen, wodurch im Vergleich zur auf dem Hauptprozessor (CPU) durchgeführten Integration deutlich kürze Rechenzeiten erzielt werden. Dies ist vor allem für die im nächsten Abschnitt vorgestellten SAXS/XPCS-Messungen relevant. Abbildung 3.7 veranschaulicht das Vorgehen zur Erstellung einer Detektormaske. Die Erstellung der Detektormaske erfolgt, indem mehrere Einzelbilder einer Messung aufsummiert werden, und im An-



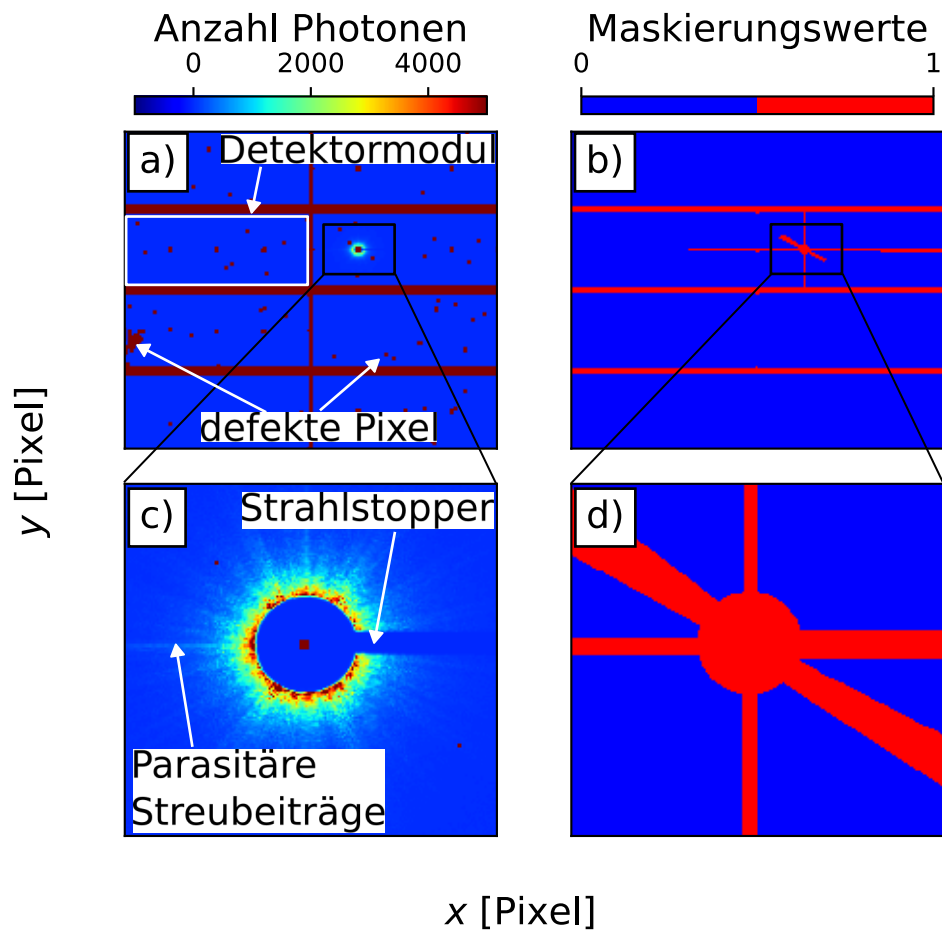


Abbildung 3.7: Vorgehensweise zur Erstellung einer Detektormaske. In a) und c) ist die Summe von 50 Detektorbildern aus der Messung an einer Lysozymbilung gezeigt. Die roten Geraden sind die Begrenzungen der einzelnen Detektormodule und die roten Quadrate stellen defekte Pixel dar. Die Modulbegrenzungen und die defekten Pixel weisen eine fälschlicherweise hohe Zählrate auf und dürfen daher bei der Integration nicht berücksichtigt werden. In b) und d) ist die auf der Grundlage der Messung aus a) erstellte Maske gezeigt. Die in rot dargestellten Bereiche (Wert 1) werden nicht integriert.

schluss daran Pixel mit sehr hohen Zählraten, sowie der Strahlstopper und sichtbare Artefakte ausmaskiert werden. Die erhaltene Maske ist ein Datenarray mit den gleichen Dimensionen wie die aktive Detektorfläche und beinhaltet die Werte 0 (unmaskiert) und 1 (maskiert). Nach der Erstellung der Maske können von weiteren Messungen die zweidimensionalen Bilder, wie oben beschrieben, integriert werden. Abbildung 3.8 zeigt eine Messung zur Kontrolle auf strahleninduzierte Änderungen des Systems. Für die gezeigten Messungen wurden die in Tabelle 3.2 aufgeführten

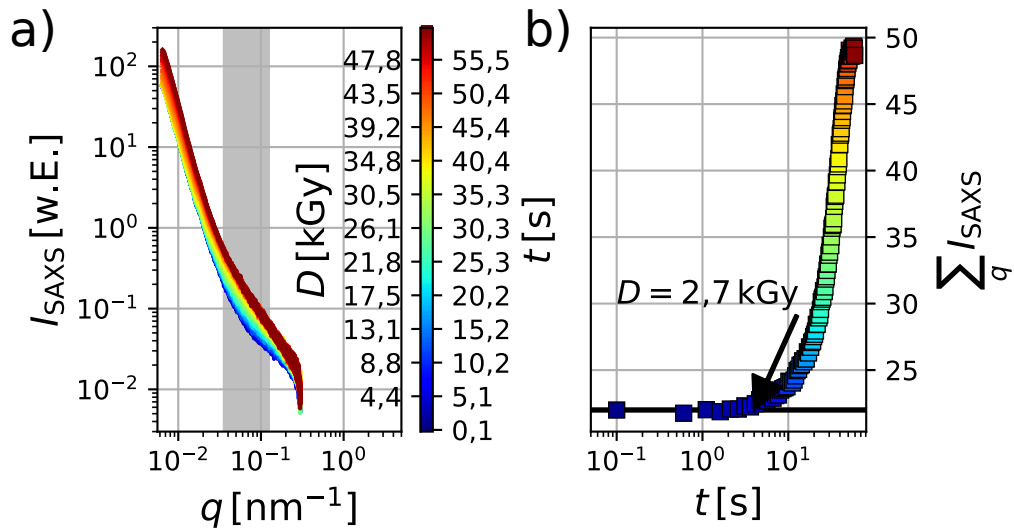


Abbildung 3.8: Messung zur Bestimmung der kritischen Dosis an einer konzentrierten Lysozymbelösung bei  $T = 12^\circ\text{C}$ . Die Messung wurde ohne Absorber mit einem Photonenfluss von  $\Phi_c = 2,5 \cdot 10^{10}$  Photonen/s, einer Belichtungszeit von  $t_{\text{exp}} = 0,1$  s und einer Gesamtanzahl von  $N_{\text{fr}} = 600$  Bildern durchgeführt. In a) ist das zeitabhängige SAXS-Signal dargestellt und in b) ist die Summe der Intensität im in a) grau dargestellten  $q$ -Bereich in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Ab einer gewissen Zeit (Dosis:  $\mathcal{D}_c$ ) ist ein deutlicher Anstieg der Intensität zu beobachten, der durch die Aggregation der Proteine begründet werden kann.

Parameter verwendet.

Der einfallende Strahl wurde für den Test auf Strahlenschäden nicht abgeschwächt. Die bei dieser Messung erhaltene kumulierte Dosis ist in Abbildung 3.8a) auf der linken Seite der farblichen Legende dargestellt und gegenüberliegend ist die verstrichene Zeit gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bereits nach wenigen Expositionen eine Änderungen der SAXS-Intensität beobachtet werden kann. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 3.8b) die summierte SAXS-Intensität ( $q$ -Bereich entspricht dem in a) grau dargestellten Bereich) abgebildet. Die kritische Dosis  $\mathcal{D}_c$  wurde an der Stelle gesetzt, an der die summierte Intensität erstmals mehr als 5% von der Intensität zum Zeitpunkt  $t = 0$  s abweicht und beträgt  $\mathcal{D}_c = 2,7$  kGy. Im Vergleich zum Literaturwert von  $\mathcal{D}_c = 1$  kGy [Möller, Sprung u. a., 2019] scheint die hier gefundene kritische Dosis plausibel zu sein, da bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen ein deutlich größerer Strahlquerschnitt verwendet wurde. Zur Erstellung von Messroutinen wurde darauf geachtet diesen Schwellwert nicht zu überschreiten.

Da für die USAXS/XPCS-Messungen die flüssig-flüssig Phasenseparation untersucht wird, ist es in einem letzten Schritt notwendig, für jede untersuchte Probe, in Abhängigkeit der Proteinkonzentration, dem hydrostatischen Druck und der Temperatur die Phasengrenze des Systems zu bestimmen. Dazu wird ein langer Scan mit hohem Absorber verwendet und der Druck bzw. die Temperatur variiert, während das Detektorbild auf einem Bildschirm beobachtet wird. Mit dem Beginn der Phasenseparation, kann aufgrund der größeren Strukturen in der Lösung, ein Anstieg der Streuintensität beobachtet werden. Durch Druckerhöhung und Verringerung um die Phasengrenze herum und der Beobachtung der Intensitätsab- bzw. Zunahme, kann der Druck (die Temperatur) des Phasenübergangs immer weiter eingegrenzt werden. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Nach der Bestimmung der Phasengrenze, können die Messungen unter Einhaltung der kritischen Dosis durchgeführt werden. Im nächsten Abschnitt wird die Entwicklung von Messprotokollen für SAXS/XPCS-Messungen an Lysozymbiosungen in der homogenen Phase vorgestellt.

### 3.3.2 Messprotokolle und Datenverarbeitung von SAXS/XPCS-Messungen an homogenen Proteinlösungen

Die Entwicklung von Messprotokollen für homogene Proteinlösungen unterscheidet sich wesentlich von der obig vorgestellten Vorgehensweise. Zum einen ist der Kontrast deutlich geringer, sodass diese Messungen ohne Absorber durchgeführt werden. Andererseits, da die Dynamik in homogenen Lösungen deutlich schneller ist, sind die Belichtungszeiten kürzer, wodurch die Gesamtdosis pro Messung im Rahmen gehalten wird. Bei den Messungen wurde der in Abbildung 3.5 a) und b)

Parameter	Wert
$t_{\text{exp}}$	0,1 s
$N_{\text{fr}}$	600
$\Phi$	$2,5 \cdot 10^{10}$ Photonen/s
$z^2$	$100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$
$\lambda_{\text{abs}}$	4365 $\mu\text{m}$
$d_s$	1000 $\mu\text{m}$
$E_{\text{ph}}$	13 keV
$A$	20,5 %
$\rho$	1000 kg/m <sup>3</sup>

Tabelle 3.2: Parameter zur Berechnung der Strahlungsdosis  $\mathcal{D}$ .

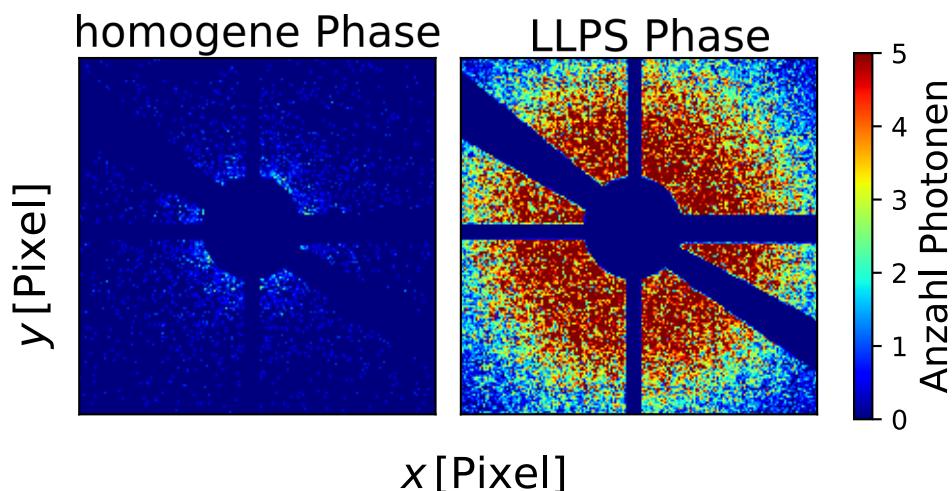


Abbildung 3.9: Rohes Streudaten für eine konzentrierte Lysozymbilösung in der homogenen Phase (links) und der LLPS Phase (rechts).

gezeigte Aufbau in Kombination mit dem Eiger X 500k Detektor verwendet. Die Belichtungszeit für eine Aufnahme wurde an die maximale Wiederholrate des Detektors angepasst und betrug  $t_{\text{exp}} = 127 \mu\text{s}$  ( $\approx 7,8 \text{ kHz}$ ). Aufgrund der kurzen Belichtungszeit ist das Streusignal sehr gering und es werden für eine Exposition wenige einzelne Photonen detektiert. Deshalb wurde zur Bestimmung einer mittleren Korrelationsfunktion die Kapillare gerastert und an jedem Punkt eine Bildserie mit  $N_{\text{fr}} = 4000$  Bildern aufgenommen. Die Unterteilung der Kapillare beinhaltet elf Stellen in horizontaler und 80 Stellen in vertikaler Richtung, wodurch sich eine Gesamtzahl von 880 Stellen bzw. 3,52 Millionen Bilder pro Kapillare ergibt. Es ist leicht ersichtlich, dass dies mit einer großen Datenmenge einhergeht und somit optimierte Auswertungsprogramme verwendet werden müssen, um in akzeptabler Zeit Korrelationsfunktionen bestimmen zu können. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor sind parasitäre Streubeiträge bei einzelnen Bildserien, die die resultierenden Korrelationsfunktionen verfälschen würden. Durch die Variation der Position dieser Beiträge können diese auch nicht ausmaskiert werden, da sonst der kleinste zugängliche Wellenvektor  $q_{\text{min}}$  zu größeren Werten verschoben wird. Weiterhin ist der Zeitaufwand, jede Bildserie einzeln zu betrachten und unbrauchbare Messungen auszusortieren zu groß, weswegen zur Filterung der Messungen mit parasitären Streubeiträgen ein anderer Ansatz gewählt wurde. Wird die Summe eines Streubildes betrachtet, weisen die Messungen mit unerwünschten Streubeiträgen eine deutlich höhere Intensität auf. Somit kann die Auftragung der summierten Intensität gegen die Position auf der Kapillare dabei helfen unbrauchbare Messungen herauszufiltern. Dies ist in Abbildung 3.10 gezeigt. Die in dieser Arbeit durchgeführten DLS-Messungen dienen dem Vergleich der SAXS/XPCS-Messungen, weshalb sich die Erstellung des Messprotokolls an diesen

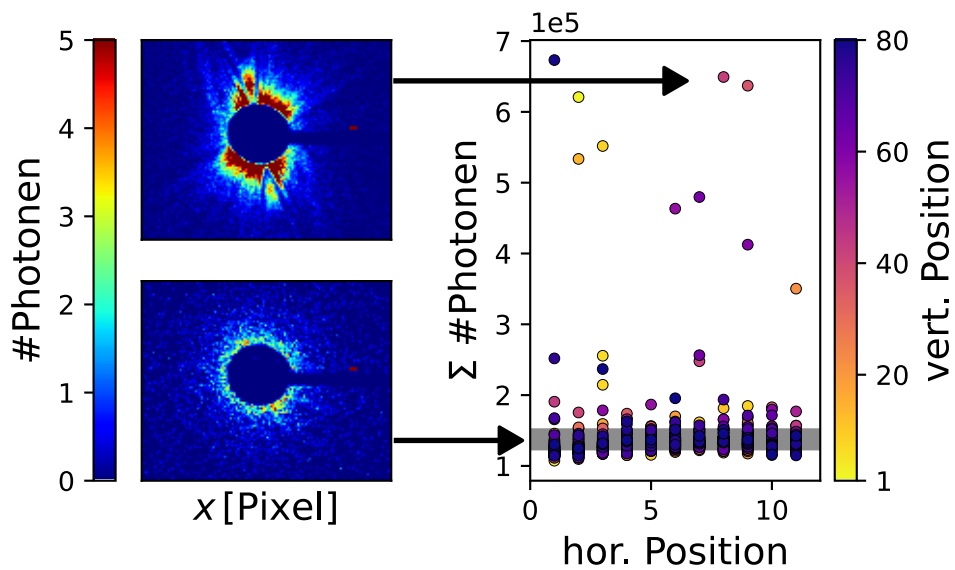


Abbildung 3.10: Im linken Teil der Abbildung sind zwei Detektorbilder mit (oben) und ohne (unten) parasitären Streubeiträgen gezeigt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die summierte Intensität für 880 Messungen an verschiedenen Positionen auf der Kapillare. Die Pfeile weisen auf den Bereich der summierten Intensität, aus dem die Detektorbilder stammen. Im grauen Rechteck befinden sich die Datenpunkte (summierte Intensität und Kapillarenposition), die zur Analyse verwendet wurden.

orientiert. Somit wird nach Möglichkeit die gleiche Probenzusammensetzung gewählt und die Messungen bei gleicher Umgebungstemperatur durchgeführt. Die betrachteten Proben werden in den jeweiligen Abschnitten des vierten Kapitels vorgestellt, weshalb an dieser Stelle auf eine separate Ausführung zur Erstellung von Messprotokollen für DLS-Messungen verzichtet wird.

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Kinetik und Dynamik von flüssig-flüssig Phasenübergängen in Proteinlösungen

In diesem Abschnitt werden die gewonnenen Erkenntnisse über die Kinetik und Dynamik der flüssig-flüssig Phasenseparation in konzentrierten Proteinlösungen aus den USAXS/XPCS-Messungen vorgestellt. Ein allgemeiner Überblick über die flüssig-flüssig Phasenseparation wurde in Abschnitt 2.1.3 gegeben.

In der Vergangenheit wurden bereits viele Untersuchungen der LLPS an konzentrierten Proteinlösungen durchgeführt. Die meisten Studien befassten sich mit dem Einfluss diverser Parameter, wie zum Beispiel dem pH Wert, der Temperatur, Salze und Salzkonzentration, Proteinkonzentration und hydrostatischen Druck auf die intermolekulare Wechselwirkung und das Phasenverhalten von Proteinlösungen. Das Vorgehen zur Untersuchung des Phasenverhaltens bestand in den meisten Fällen darin, dass die oben genannten Parameter eingestellt wurden und anschließend das untersuchte Probensystem vor der Messung äquilibrierte. Dadurch sind zeitabhängige Änderungen des Systems nicht mehr beobachtbar. Um die Mechanismen und Einflüsse der thermodynamischen Parameter auf das Phasenverhalten und die intermolekularen Wechselwirkungen vollständig verstehen zu können, ist es unabdingbar auch die zeitliche Entwicklung des Systems zu betrachten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Druck- und Temperatursprünge durchgeführt und das System währenddessen mittels USAXS/XPCS charakterisiert.

#### 4.1.1 Allgemeiner Ablauf und Datenauswertung

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Behandlung der Rohdaten geliefert. Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben wird zunächst eine Detektormaske erstellt und anschließend werden die maskierten Detektorbilder integriert. Aufgrund des limitierten  $q$ -Bereichs in der USAXS-Geometrie werden die integrierten Daten ohne Abzug eines Hintergrundsignals verarbeitet. Dies stellte sich bei der Auswertung der SAXS-Kurven als unproblematisch dar, da sich durch die Subtraktion eines Hintergrundsignals die Lage der Maxima in den SAXS-Kurven nicht ändert. In Abbildung 4.1 ist exemplarisch das integrierte SAXS-Signal für ausgewählte Zeiten während der

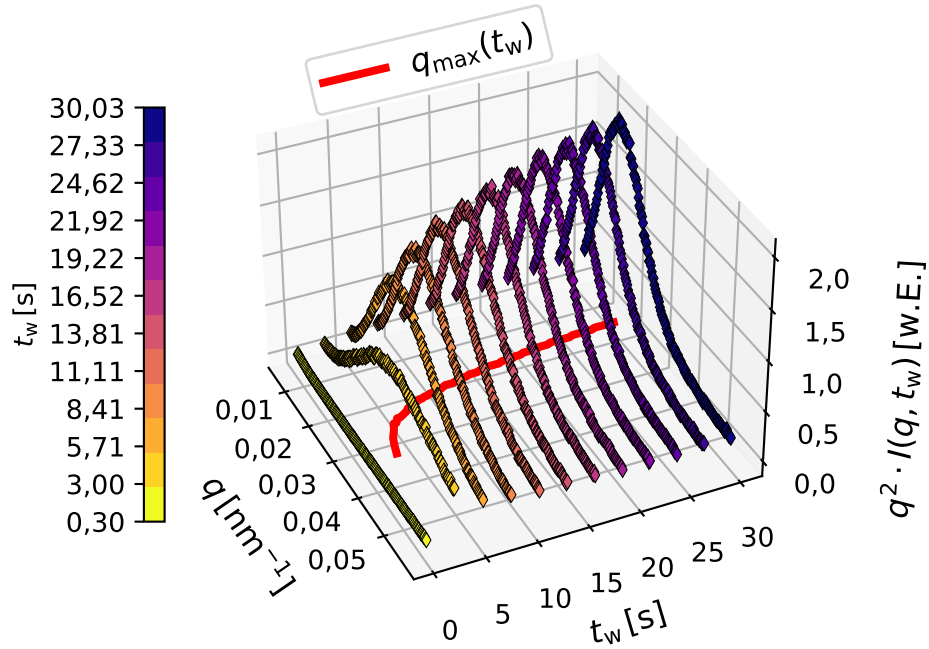


Abbildung 4.1: SAXS-Kurven aufgenommen während der druckinduzierten LLPS einer Lysozymlösung für ausgewählte Zeiten.

LLPS einer konzentrierten Lysozymlösung in der Kratky-Darstellung gezeigt. Der Drucksprung, der die LLPS induziert, wurde zwei Sekunden nach Beginn der Messung ausgelöst. Kurze Zeit später lässt sich im SAXS-Signal die Ausbildung eines Maximums beobachten, das mit fortschreitender Zeit an Intensität zunimmt und sich zu kleineren  $q$ -Werten verschiebt. Zur Extraktion der Position des Maximums  $q_{\max}$  wurden die Kratky-Kurven mit einem Polynom 6. Grades modelliert. Der zeitliche Verlauf von  $q_{\max}$  ist in Abbildung 4.1 in rot dargestellt. Aus der Position des Maximums lassen sich anschließend Korrelationslängen über

$$\xi(t) = \frac{2\pi}{q_{\max}(t)} \quad (4.1)$$

bestimmen. Zur Charakterisierung der Dynamik wurden Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen nach Gleichung 2.110 für verschiedene  $q$ -Werte bestimmt. Von den Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen können über Schnitte Ein-Zeiten Autokorrelationsfunktionen in Abhängigkeit des Probenalters gewonnen werden.

#### 4.1.2 Druckinduzierte Phasenübergänge in konzentrierten Proteinlösungen

In dieser Arbeit wurde die Kinetik und Dynamik der druckinduzierten Phasenseparation für die Proteine  $\gamma$ D-Kristallin und Lysozym für verschiedene

Temperaturen, Quenchtiefen, Proteinkonzentrationen und für Proteinlösungen mit Crowdern (PEG) unterschiedlicher Kettenlänge untersucht. Im nachfolgenden Abschnitt werden die Resultate der Kinetik und Dynamik der druckinduzierten LLPS in Abhängigkeit der Quenchtiefe für konzentrierte Lysozymlösungen vorgestellt. Die Ergebnisse wurden bereits in [Moron u. a., 2022] publiziert.

### **Einfluss der Quenchtiefe auf die Kinetik und Dynamik**

Vor jeder Messung wurde, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, der Übergangsdruck bestimmt. Dieser liegt für die betrachtete Lysozymlösung ( $c_p = 238 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 500 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7$ ,  $T = 7,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ) bei  $p_t = 700 \text{ bar}$ . Im Anschluss daran wurde der Druck vor der Messung auf  $p_t + 300 \text{ bar} = 1000 \text{ bar}$  eingestellt. Das pneumatische Ventil wurde danach geschlossen und ein Unterdruck zwischen der Pumpe und dem pneumatischen Ventil erzeugt. Zwei Sekunden nach Beginn der Messung wurde das pneumatische Ventil geöffnet, sodass ein Druckausgleich stattfand, der die LLPS induzierte, während die Probe belichtet wurde. Die Quenchtiefe  $\Delta p$  ist in dieser Arbeit definiert als die Differenz zwischen Übergangsdruck und dem Druck am Ende der Messung  $p_{\text{end}}$ :

$$\Delta p = |p_t - p_{\text{end}}|. \quad (4.2)$$

In Abbildung 4.2 sind für verschiedene Quenchtiefen SAXS-Kurven in der Kratky-Darstellung für ausgewählte Zeiten gezeigt. Für die übrigen Quenchtiefen sind die SAXS-Kurven im Anhang in Abbildung B.1 dargestellt. Die Ausbildung eines Maximums in den SAXS-Kurven mit fortschreitender Zeit ist für alle gezeigten Quenchtiefen deutlich zu erkennen. Zusätzlich ist ersichtlich, dass die Maxima für kleine Quenchtiefen bei niedrigeren  $q$ -Werten liegen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für kleine Quenchtiefen größere Strukturen in der konzentrierten LLPS Phase entstehen. Dieser Sachverhalt wird deutlicher, wenn die aus den Maxima extrahierten Korrelationslängen in Abhängigkeit der Quenchtiefe und der Zeit dargestellt werden. Dies ist in Abbildung 4.3a) veranschaulicht. Unmittelbar nach dem Drucksprung ( $t_w = 2 \text{ s}$ ) ist ein starker Anstieg der Korrelationslänge  $\xi$  beobachtbar. Die Korrelationslängen liegen für große Quenchtiefen ( $\Delta p = 509 \text{ bar}$ ) im Bereich von  $150 \text{ nm}$  bis  $350 \text{ nm}$  und für kleine  $\Delta p$  ( $\Delta p = 0 \text{ bar}$ ) zwischen  $200 \text{ nm}$  und  $950 \text{ nm}$ . Nach ungefähr 10 Sekunden folgt das Wachstum der Korrelationslänge einem Potenzgesetz:

$$\xi(t) = A \cdot t^{1/n}, \quad (4.3)$$

mit einem Vorfaktor  $A$  und einem Wachstumsexponenten  $1/n$ . Der inverse Wachstumsexponent ist in Abbildung 4.3b) in Abhängigkeit der Quenchtiefe gezeigt.  $n$  zeigt einen deutlichen Anstieg mit steigender Quenchtiefe und ein Plateau für  $\Delta p > 400 \text{ bar}$ . Dies entspricht einer Verlangsamung des Wachstums mit steigender Quenchtiefe. Für das Wachstum basierend auf Diffusion und Koaleszenz werden inverse Wachstumsexponenten von  $n \approx 3$  berichtet [Siggia, 1979; Lifshitz und Slyozov, 1961;



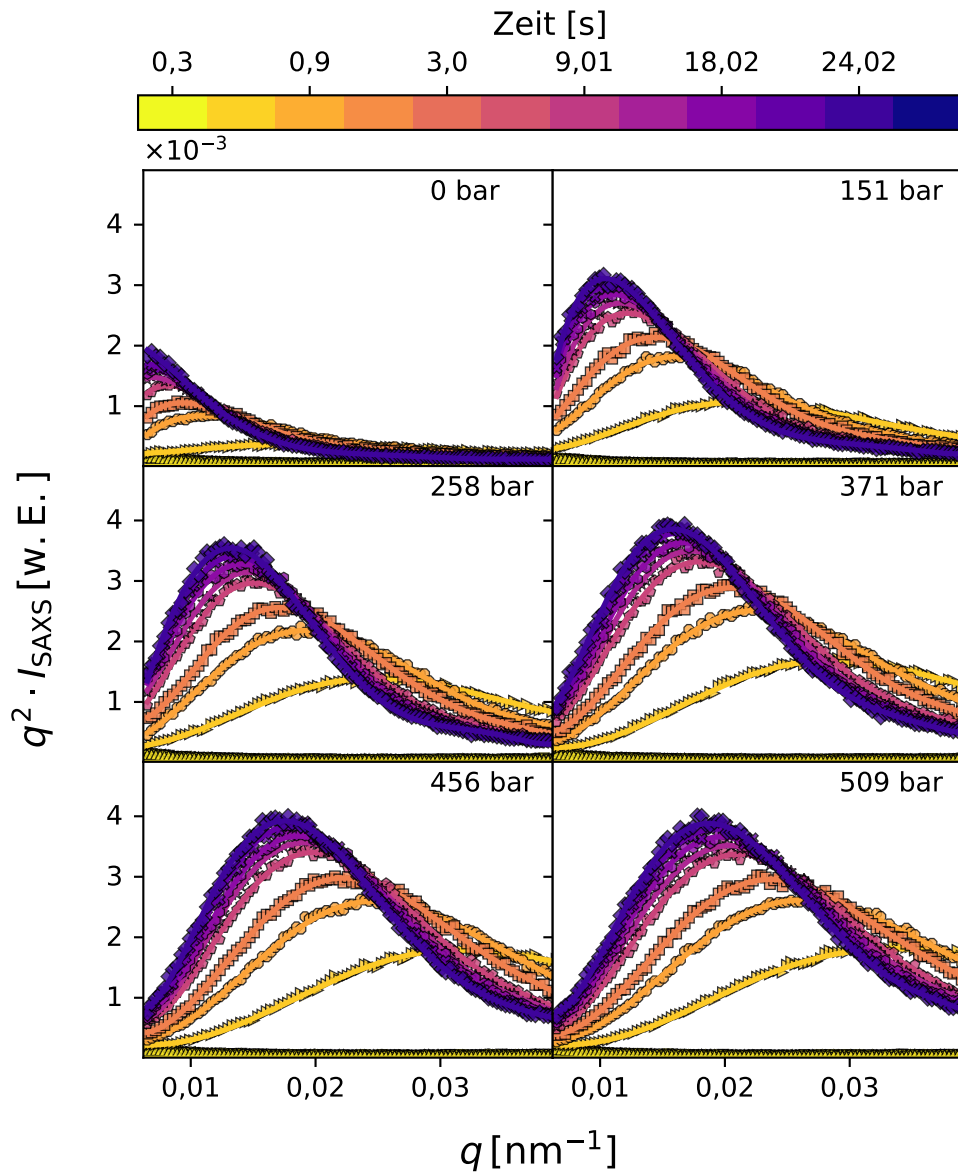


Abbildung 4.2: SAXS-Kurven in der Kratky-Darstellung für die druckinduzierte LL-PS einer Lysozymlösung mit  $c_p = 238 \text{ mg/mL}$  und einer NaCl-Konzentration von  $c_{\text{NaCl}} = 500 \text{ mM}$  bei  $T = 7,6 \text{ }^\circ\text{C}$  für ausgewählte Quenchtiefen und Zeiten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Modellierung der Kratky-Kurven mit einem Polynom 6. Grades.

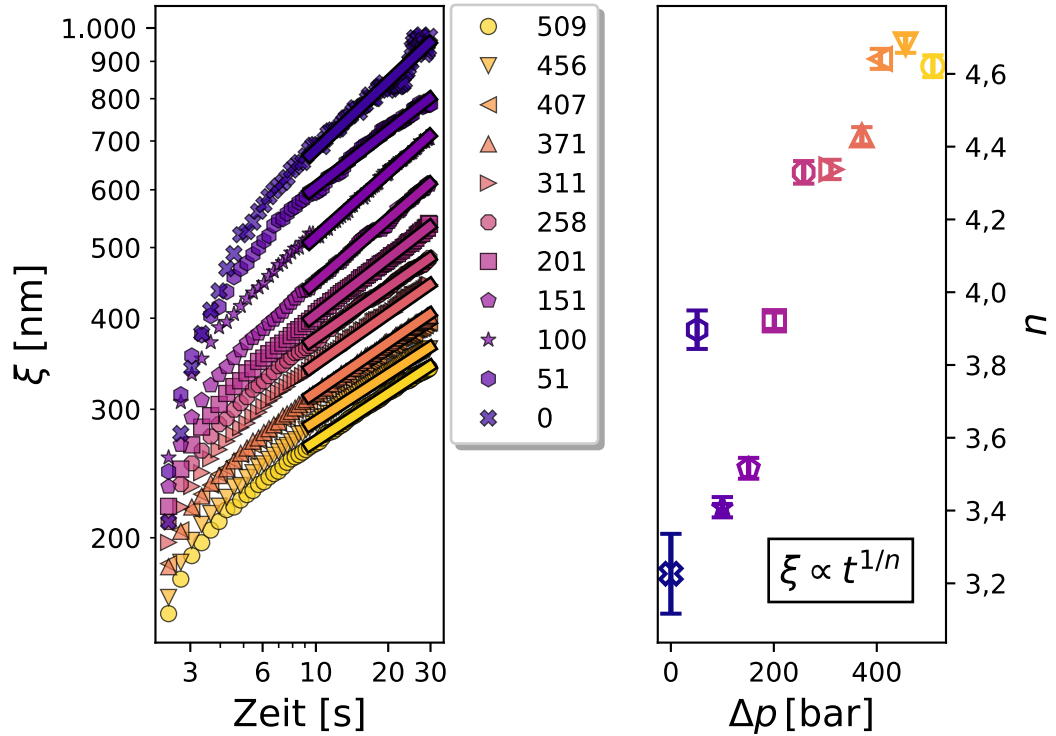


Abbildung 4.3: a) Zeitliche Entwicklung der Korrelationslänge  $\xi$  für alle in dieser Arbeit betrachteten Quenchtiefen  $\Delta p$ . Die Balken veranschaulichen die Modellierung des späten Wachstums mit einem Potenzgesetz. b) Aus dem Potenzgesetz (a)) resultierende Wachstumsexponenten in Abhängigkeit der Quenchtiefe.

Da Vela, Exner u. a., 2017], was bei der hier vorgestellten druckinduzierten LLPS nur für die kleinste Quenchtiefe von  $\Delta p = 0$  bar der Fall ist. Mit steigender Quenchtiefe wird das Wachstum langsamer ( $n \approx 4,6$ ) und die resultierenden Strukturen sind kleiner. Die Verlangsamung des Wachstums mit steigender Quenchtiefe wurde ebenfalls für die temperaturinduzierte LLPS eines  $\gamma$ -Globulin-PEG Systems [Da Vela, Exner u. a., 2017], eines BSA-YCl<sub>3</sub> Systems [Da Vela, Braun u. a., 2016; Da Vela, Begam u. a., 2020], eines BSA-HoCl<sub>3</sub>/LaCl<sub>3</sub> Systems [Matsarskaia u. a., 2019] und für wässrige Glutenlösungen [Banc u. a., 2019] berichtet. Außerdem wurde der Anstieg von  $n$  in Simulationen eines Gelierungsprozesses mit einer verringerten Mobilität der kondensierten Phase für große Quenchtiefen beobachtet [Testard u. a., 2011]. In den zuvor erwähnten Studien konnte gezeigt werden, dass die Proteinlösungen mit steigender Quenchtiefe in einen kinetisch “gefrorenen“ Zustand übergehen, was sich in einem Plateau der Korrelationslänge für große Zeiten äußert. Dieses Verhalten konnte ebenfalls für Lysozymlösungen bei Temperatursprüngen beobachtet werden [Gibaud und Schurtenberger, 2009], was durch die Ausbildung einer glas- bzw. gelartigen Phase, bevor die LLPS abgeschlossen ist, begründet wird [Dumetz u. a., 2008]. Die resul-

tierenden Phasendiagramme weisen eine Glasübergangslinie in der  $\phi$ - $T$ -Ebene auf, die sich bis in die innere Region der Spinodalen erstreckt (vgl. Abbildung 2.3b)). Das Einfrieren der Kinetik ohne die Ausbildung einer Glasphase wird durch eine sogenannte *arrest tie line* [Gibaud und Schurtenberger, 2009] im Phasendiagramm berücksichtigt, die sich ebenfalls innerhalb der Spinodalen befindet.

Im Gegensatz zu der temperaturinduzierten LLPS, konnte für die hier vorgestellten druckabhängigen LLPS-Messungen kein kinetischer Stillstand beobachtet werden. Diese Beobachtung kann dadurch begründet werden, dass eine Druckänderung das Interaktionspotential nur geringfügig ändert ( $1 \text{ kbar} \cong 1k_{\text{B}}T$  [Schroer, Markgraf u. a., 2011]) und somit in dem hier vorgestellten Experiment nur der obere Teil der Spinodalen untersucht wird, in dem weder eine Glasübergang noch eine *arrest tie line* liegen. Zur Überprüfung, ob die Phasenseparation für alle Quenchtiefen vollständig abläuft, kann der zeitliche Verlauf der Streuinvariante  $Q^*$  aus Gleichung 2.60 verwendet werden, der in Abbildung 4.4a) gezeigt ist. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Streuinvariante nach einem schnellen initialen Anstieg (unmittelbar nach dem Drucksprung), einen Plateauwert  $Q_{\text{p}}^*$  annimmt.  $Q_{\text{p}}^*$  wurde über das Zeitmittel von  $Q^*$  für Zeiten  $t_{\text{w}} > 10 \text{ s}$  (vgl. grauer Bereich in Abbildung 4.4a)) gebildet. Für ein Zweiphasensystem hängt die Streuinvariante nach Gleichung 2.68 von den Volumenanteilen der beiden Phasen und dem Elektronendichtekontrast zwischen den beiden Phasen ab. Unter der Annahme, dass beide Phasen homogen sind, hat die Topologie der einzelnen Phasen keinen Einfluss auf die Streuinvariante, wodurch diese als Indikator herangezogen werden kann, ob das System äquilibriert ist. Diese Herangehensweise wurde ebenfalls in [Da Vela, Begam u. a., 2020] verfolgt, um temperaturinduzierte Phasenübergänge in konzentrierten BSA-YCl<sub>3</sub> und  $\gamma$ -Globulin-PEG Lösungen zu untersuchen. Da Vela *et al.* bestätigen, dass zwei Szenarien, die zuvor in der Literatur stark diskutiert wurden [Zaccarelli, 2007; Cardinaux, Gibaud u. a., 2007] abhängig vom Probensystem realisierbar sind. Bei den Szenarien handelt es sich um den Verlauf der Glaslinie im Bezug auf die Binodale. Im ersten Fall verläuft die Glaslinie entlang der Binodalen (Szenario (f): *follow*) und im zweiten Fall schneidet die Glaslinie die Binodale (Szenario (i): *intersect*). Sie begründen ihre Ergebnisse mit dem Ursprung der intermolekularen attraktiven Wechselwirkung. Für das Szenario (i) resultiert die attraktive Wechselwirkung aus gerichteten Ladungswechselwirkungen (BSA-YCl<sub>3</sub>), wohingegen für das Szenario (f) isotrope Verarmungswechselwirkungen (engl.: *depletion interaction*) den Ursprung der attraktiven Wechselwirkung darstellen. Übertragen auf das in diesem Abschnitt diskutierte Lysozym-NaCl System ist somit, falls ein kinetischer Stillstand eintritt, Szenario (i) zu erwarten. Für dieses Szenario wurde ebenfalls  $Q_{\text{p}}^*$  in Kombination mit der Korrelationslänge herangezogen, um zu beurteilen, ob das System in einen kinetischen gefrorenen Zustand übergeht und folglich, ob die Phasenseparation vollständig abläuft. Dabei wurde beobachtet, dass bei einer ausreichend großen Quenchtiefe der zeitliche Verlauf der Korrelationslänge ein Plateau nach ungefähr 15 s aufweist und dass  $Q_{\text{p}}^*$  kleinere Werte annimmt als für Quenchtiefen unterhalb des gefundenen glasartigen Zustand. In Abbildung 4.4b) kann lediglich eine leichte Abweichung des linearen Anstiegs von  $Q^*$  für die höchsten in dieser Arbeit betrachteten Quenchtiefen beobachtet werden

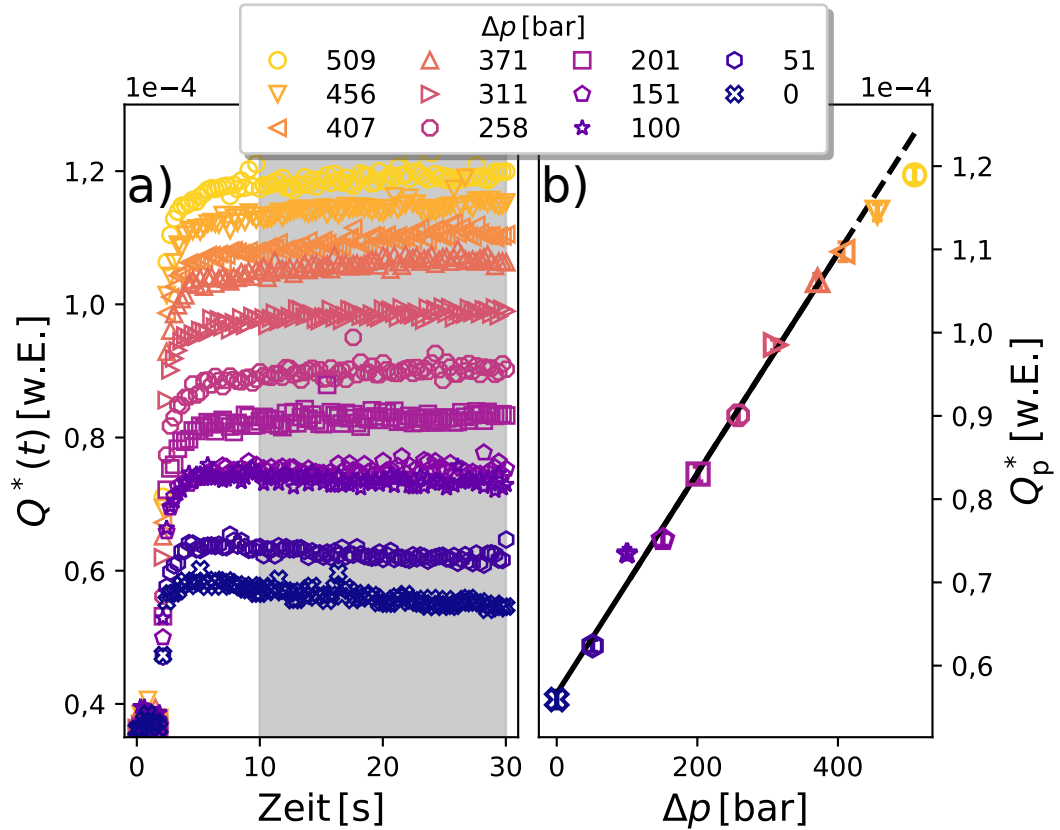


Abbildung 4.4: a) Streuinvariante  $Q^*$  in Abhängigkeit der Zeit für alle betrachteten  $\Delta p$ . Der graue Bereich markiert das Intervall in dem  $Q^*$  gemittelt wurde, um den in b) gezeigten Plateauwert  $Q_p^*$  zu berechnen. Die Linie in b) zeigt die lineare Regression von  $Q_p^*(\Delta p)$ , wobei die letzten beiden Punkte für die Ausgleichsrechnung nicht mit berücksichtigt wurden.

( $\Delta p = 456$  bar und  $\Delta p = 509$  bar). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für die betrachteten Quenchtiefen kein glasartiger Zustand eingenommen wird. Aufgrund des verwendeten Aufbaus und der Komposition der Probe, sind deutlich größere Quenchtiefen, die solch einen Übergang induzieren könnten, nicht zugänglich, da der kleinste erreichbare Druck ( $\hat{=}$  maximale Quenchtiefe) durch den Umgebungsdruck und den Übergangsdruck des Systems limitiert ist.

Für eine grobe Abschätzung der Konzentration in der kondensierten Phase, können ausgehend von einem exponentiellen Anstieg der Streuintensität in der frühen Phase der Phasentrennung [Binder und Stauffer, 1974; Liao u. a., 1999]

$$\ln I(q, t) \propto 2R(q, \Delta p) \cdot t, \quad (4.4)$$

mit einer Wachstumsrate  $R(q, \Delta p)$ , und unter Verwendung von Diffusionskonstanten  $D_0$  aus der linearisierten Cahn-Hilliard Gleichung [Liao u. a., 1999]

$$R(q, \Delta p) = D_0 q^2 \left( 1 - \left( \frac{q}{q_c} \right)^2 \right), \quad (4.5)$$

mit einem kritischen Wellenvektorübertrag  $q_c$ , relative Konzentrationen in Bezug auf die Glasphase  $\phi/\phi_G$  über

$$\eta = \eta_{\text{H}_2\text{O}} \left( 1 - \frac{\phi}{\phi_G} \right)^{-2,1} \quad (4.6)$$

berechnet werden [Cardinaux, Zaccarelli u. a., 2011; Bergman u. a., 2019]. Die Viskosität kann dabei über die Stokes-Einstein Beziehung aus Gleichung 2.107 mit der mittleren Korrelationslänge  $\xi(\Delta p)$  über das Zeitintervall zwischen 2,4 s und 5 s abgeschätzt werden. Die resultierenden Parameter sind in Abbildung 4.5 abgebildet. Die Gültigkeit der linearisierten Cahn-Hilliard Gleichung ist für alle Quenchtiefen anhand von Abbildung 4.5a) zu erkennen. Die aus den Wachstumsraten bestimmten Diffusionskonstanten  $D_0$  sind in Abhängigkeit der Quenchtiefe in b) gezeigt und weisen einen stetigen Abfall mit steigender Quenchtiefe auf. Folglich steigt die Viskosität mit steigendem  $\Delta p$  (c)). Die mittleren Korrelationslängen zur Berechnung der Viskosität reichten dabei von 200 nm ( $\Delta p = 509$  bar) bis 390 nm ( $\Delta p = 0$  bar). Zur Berechnung des relativen Volumenanteils der konzentrierten Phase  $\phi/\phi_G$  wurde für den Volumenanteil der Glasphase ein Wert von  $\phi_G = 0,34$  gewählt [Bergman u. a., 2019]. Außerdem steigt der Volumenanteil mit steigender Quenchtiefe stetig an, was darauf hindeutet, dass sich das System für große  $\Delta p$  einem gefrorenen Zustand nähert, ihn jedoch nicht erreicht. Die relativen Volumenanteile reichen dabei von ungefähr 88 % bis 94 %. Auf der Grundlage dieser Resultate kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die Phasenseparation vollständig abläuft.

Eine Betrachtung der Dynamik kann zusätzlich dabei helfen, einen gefrorenen Zustand zu identifizieren. Dazu wurden zunächst Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen (TTCs) für verschiedene  $q$ -Werte und Quenchtiefen nach Gleichung 2.110 berechnet. Für die betrachteten  $\Delta p$  sind TTCs bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$  in Abbildung 4.6 grafisch dargestellt (für weitere  $q$ -Werte s. Abbildungen C.1 - C.3). Alle TTCs zeigen unmittelbar nach dem Drucksprung die Ausbildung einer endlichen Korrelation. Vor dem Drucksprung ist eine vermeintlich hohe Korrelation zu erkennen, die durch die Normierung in Verbindung mit sehr niedrigen Zählraten (in der homogenen Phase) zustande kommt. Außerdem lässt sich anhand der Breite der TTCs eine Zunahme der Dekorrelationszeit  $\tau(\Delta p) = 1/\Gamma(\Delta p)$  mit voranschreitender Zeit erkennen. Dieses Verhalten ist typisch für Nicht-Gleichgewichts-Prozesse [Ragulskaya u. a., 2021; Begam, Ragulskaya u. a., 2021; Girelli u. a., 2021], wie die in dieser Arbeit untersuchte druckinduzierte LLPS und spiegelt die Alterung des Systems wieder. Im Gegensatz zu dem in [Girelli u. a., 2021] untersuchten IgG-PEG System, zeigen die Lysozym Proben auch keinen dynamischen Stillstand (vgl. Abbildung C.4). Dieses Verhalten ist konsistent mit der zuvor geschilderten Beobachtung, dass auch kein kinetischer

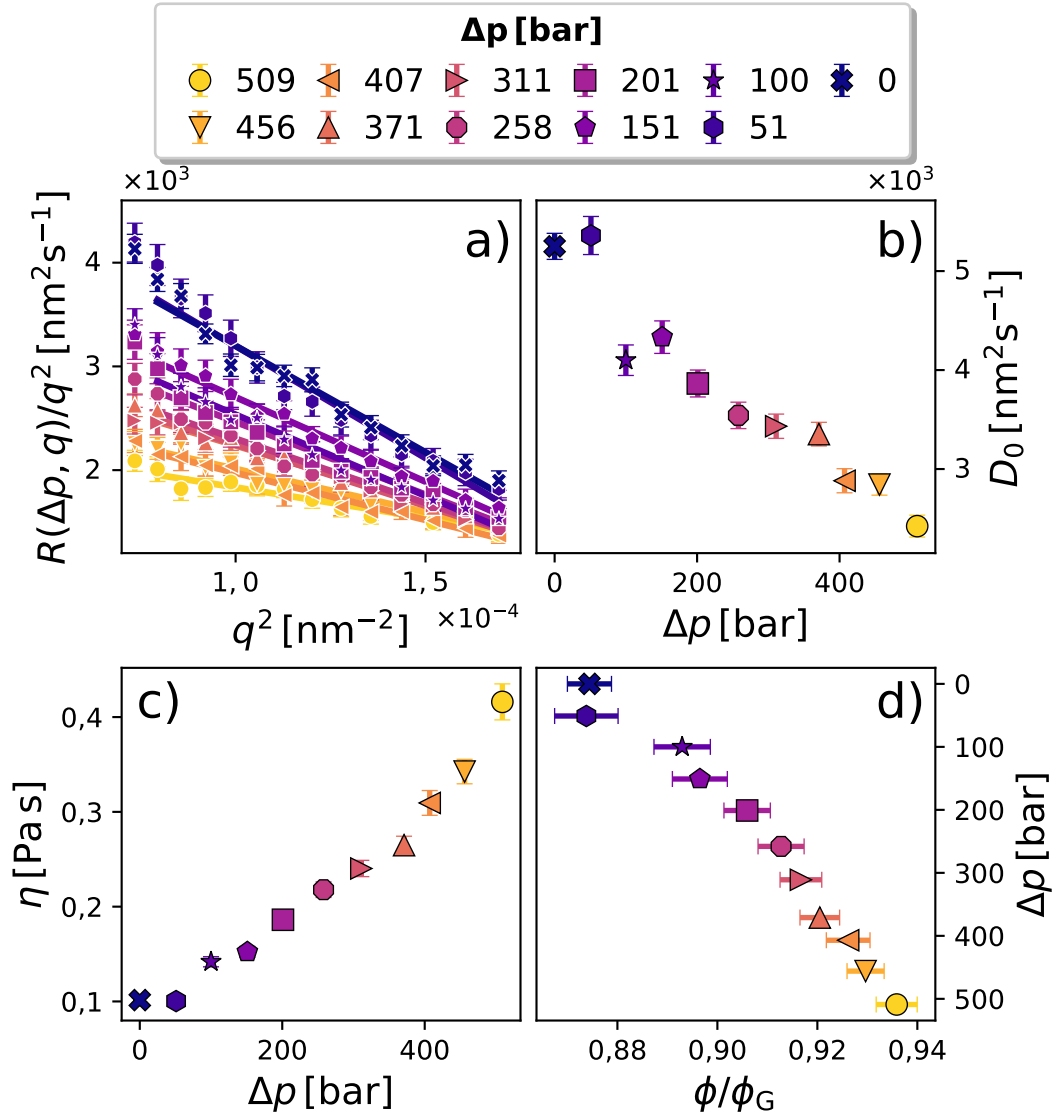


Abbildung 4.5: a) Wachstumsraten  $R(\Delta p, q)/q^2$  in Abhängigkeit von  $q^2$  berechnet aus dem zeitlichen exponentiellen Anstieg der Streuintensität  $I(q, t, \Delta p)$ . Die Linien stellen die Modellierung der Wachstumsrate nach der linearisierten Cahn-Hilliard Gleichung dar. Die aus der Modellierung gewonnenen Diffusionskonstanten  $D_0$  sind in Abhängigkeit der Quenchtiefe  $\Delta p$  in b) gezeigt. c) Berechnete Viskositäten aus der Stokes-Einstein Beziehung unter Verwendung der mittleren Korrelationslänge im Zeitintervall von 2,4 s bis 5 s in Abhängigkeit von  $\Delta p$ . In d) ist die Quenchtiefe in Abhängigkeit des Volumenanteils der konzentrierten Phase, normiert auf den Volumenanteil des Glasübergangs, dargestellt.

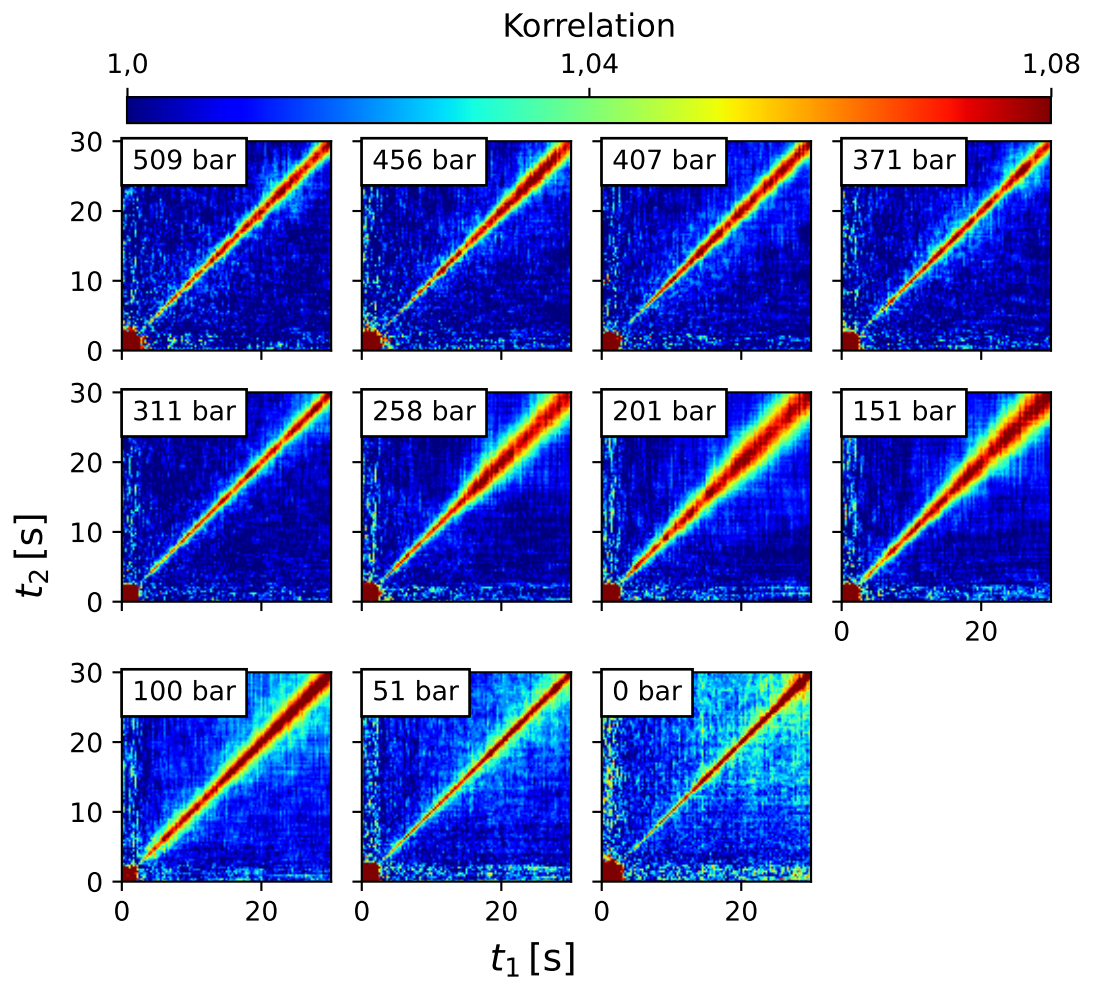


Abbildung 4.6: Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen für die druckinduzierte LLPS einer konzentrierten LysozymbLösung für verschiedene Quenchtiefen bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .

Stillstand eintritt. Zur quantitativen Analyse der Dynamik, werden, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, Schnitte der TTCs vorgenommen, um  $g_2$ -Funktionen abhängig vom Probenalter zu extrahieren. Die resultierenden  $g_2$ -Funktionen werden anschließend mit einer Modellfunktion angepasst, um Informationen über die Dynamik zu gewinnen. Das an dieser Stelle verwendete Modell für die  $g_2$  Funktionen beinhaltet zwei exponentielle Zerfälle in der Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) Form [Williams und Watts, 1970]:

$$g_2(q, \Delta p, \Delta t, \beta_{1,2}, \Gamma_{1,2}, \gamma_{1,2}) = 1 + \beta_1 \cdot e^{-2(\Gamma_1 \Delta t)^{\gamma_1}} + \beta_2 \cdot e^{-2(\Gamma_2 \Delta t)^{\gamma_2}}, \quad (4.7)$$

dabei bezeichnen  $\beta_{1,2}$  Kontrastfaktoren,  $\Gamma_{1,2}$  Zerfallsraten, und  $\gamma_{1,2}$  die KWW-Exponenten für den jeweils ersten (schnellen) und zweiten (langsamen) Zerfall.  $\Delta t$  ist der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgende Expositionen. Für ausgewählte Parameter sind aus TTCs gewonnene Korrelationsfunktionen in Abbildung 4.7 gezeigt. In Abhängigkeit des Probenalters  $t_w$  ist eine deutliche Zunahme der Zerfallszeit  $\tau$  zu beobachten, die sich dadurch manifestiert, dass sich der Abfall der Korrelationsfunktionen zu späteren Zeiten verschiebt (Abbildung 4.7a)). Weiterhin lässt sich anhand von Abbildung 4.7c) eine Abnahme der Zerfallszeiten in Abhängigkeit von  $q$  beobachten. Dieses Verhalten ist zu erwarten, da mit wachsendem  $q$  kleinere Längenskalen abgebildet werden, auf denen das System eine schnellere Dynamik aufweist. Zuletzt ist sowohl an den TTCs als auch anhand der  $g_2$ -Funktionen (Abbildungen 4.6 und 4.7b)) ein nicht-monotones Verhalten der Dekorrelationszeit in Abhängigkeit der Quenchtiefe sichtbar. Dieses nicht-monotone Verhalten, sowie weitere Abhängigkeiten  $(\Delta p, t_w, q)$  der Dynamik der druckinduzierten LLPS werden im Folgenden detailliert, auf der Grundlage der gewonnenen Parameter aus den modellierten  $g_2$ -Funktionen, diskutiert.

Beginnend mit der Dynamik in Abhängigkeit der Quenchtiefe, sind in Abbildung 4.8 die wichtigsten Parameter für ausgewählte  $t_w$  bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$  dargestellt (Für weitere  $q$ -Werte s. Abbildung C.5 - C.7). Für den schnellen Zerfall ( $\Gamma_1, \gamma_1$ ) zeigt die Zerfallsrate den zuvor angesprochenen nicht-monotonen Verlauf mit  $\Delta p$ , der in Abbildung 4.8a) dargestellt ist. Die Zerfallsraten sinken zunächst mit der Quenchtiefe von 0 bar bis 151 bar und steigen anschließend für  $\Delta p$  zwischen 201 bar und 371 bar an, bis sie letztlich einen Plateauwert erreichen für  $\Delta p \geq 371$  bar. Im Gegensatz zum schnellen Zerfall, ist beim langsamen Zerfall ( $\Gamma_2, \gamma_2$ ) eine Zunahme der Zerfallsrate mit  $\Delta p$  zu sehen, was mit schnelleren charakteristischen Zeiten einhergeht. Dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit den gewonnenen Erkenntnissen über die Kinetik, dass sich für große Quenchtiefen kleinere Strukturen ausbilden, die sich schneller in der Lösung bewegen können. Beide Zerfälle zeigen außerdem eine anomale Diffusion ( $\gamma_{1,2} \neq 1$ ) für alle  $\Delta p$ , was für den schnellen Zerfall stärker betont ist. Dabei ergibt sich über den gesamten betrachteten Druckbereich ein super-diffusiver, schneller Zerfall ( $\gamma_1 > 1$ , Abbildung 4.8c)) mit einem leicht zunehmenden Grad der Superdiffusivität mit steigendem  $\Delta p$



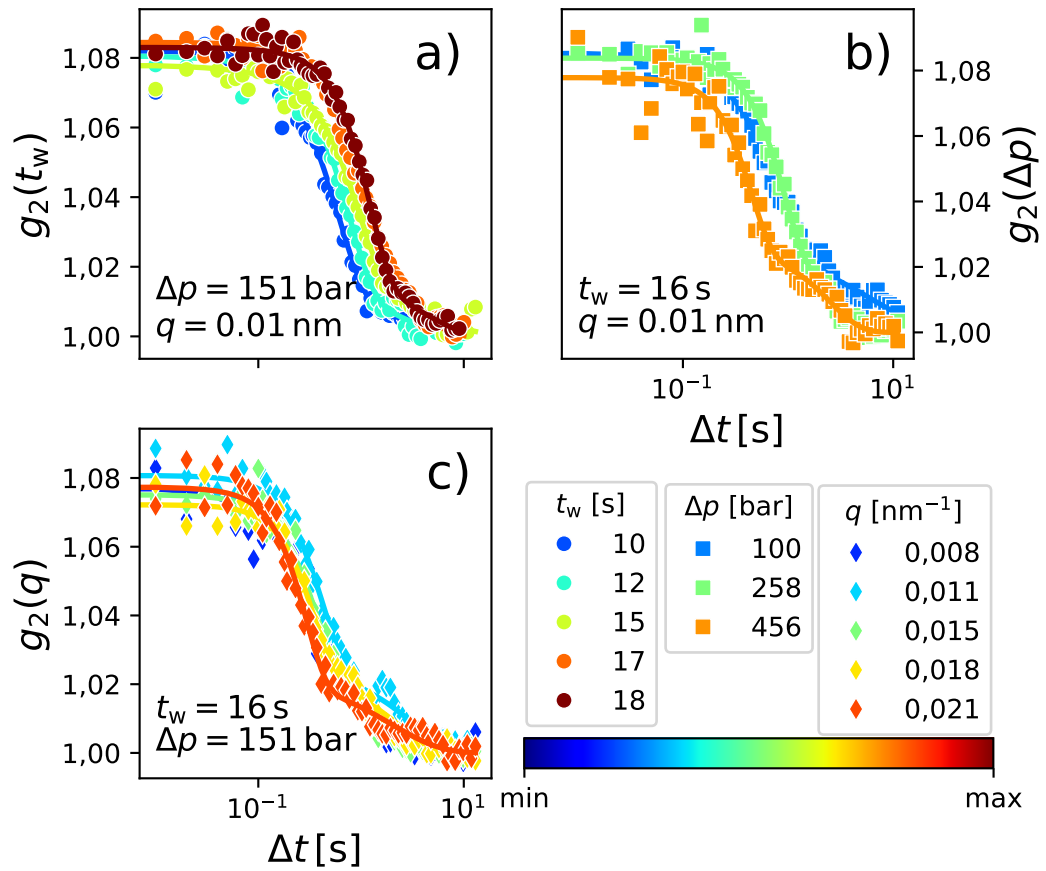


Abbildung 4.7:  $g_2$ -Funktionen extrahiert aus den in Abbildung 4.6 gezeigten TT-Cs (außer für die  $q$ -Abhängigkeit in c)) in Abhängigkeit des Probenalters (a)), der Quenchtiefe (b)) und von  $q$  (c)).

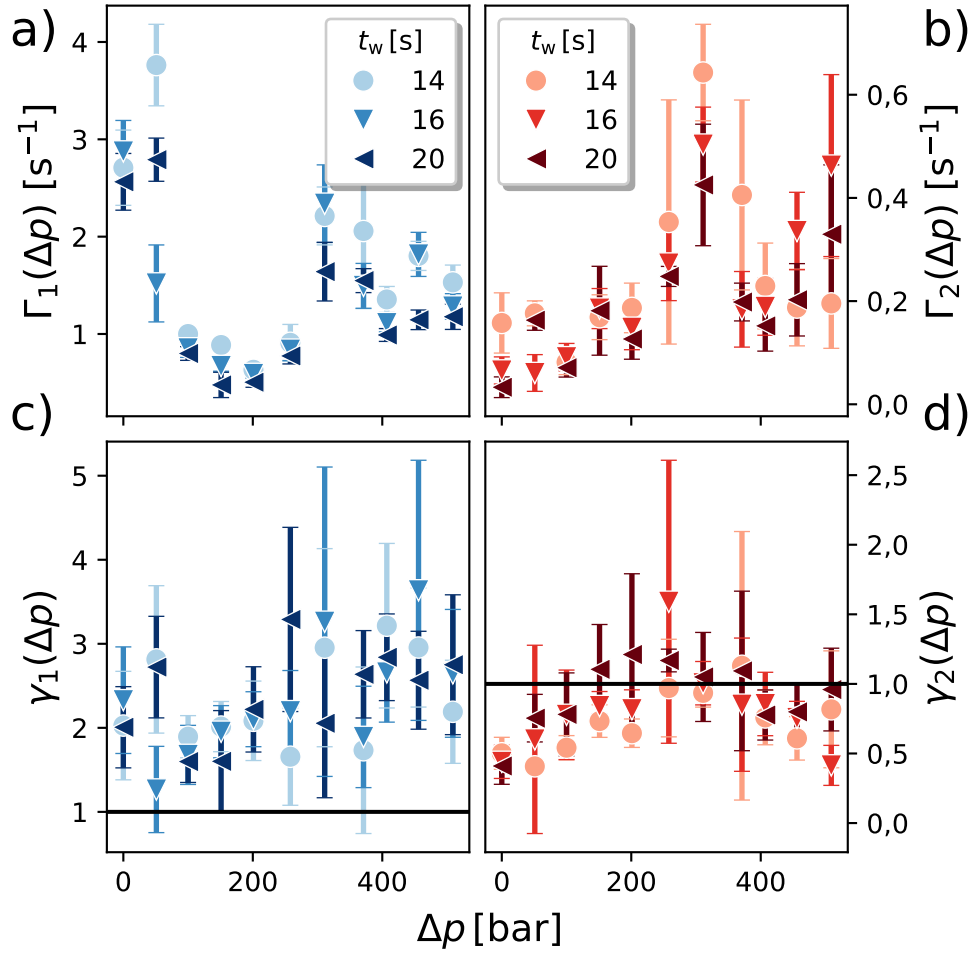


Abbildung 4.8: Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  (a)-b)) und KWW-Exponenten  $\gamma_{1,2}$  (c)-d)) für ausgewählte Zeiten bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$  von  $\Delta p$ . Die schwarze Linie in c) und d) entspricht  $\gamma_{1,2} = 1$ .

und ein sub-diffusiver bis diffusiver langsamer Zerfall ( $\gamma_2 \leq 1$ , Abbildung 4.8d)). An dieser Stelle sei erwähnt, dass der zweite Zerfall einen geringen Kontrast aufweist und zusätzlich nur wenige Datenpunkte der gemessenen Korrelation zum zweiten Zerfall beitragen, wodurch die Fehler der berechneten Parameter  $\Gamma_2$  und  $\gamma_2$  groß sind und vereinzelt Abweichungen des sub-diffusiven Verhaltens auftreten. Dennoch ist es notwendig einen zweiten Zerfall anzusetzen, da ansonsten die gemessenen Korrelationen für große  $\Delta t$  nicht adäquat modelliert werden können (vgl. Abbildung C.8).

Zur Untersuchung der  $q$ -Abhängigkeit sind in Abbildung 4.9 die Zerfallsraten und KWW-Exponenten gezeigt. Der schnelle Zerfall weist keine quadratische Abhängigkeit der Zerfallsrate von  $q$  auf, wie es bei einem rein diffusiven Prozess zu erwarten wäre (vgl. Abbildung 4.9a)), sondern einen ballistischen Zusammenhang ( $\Gamma_1 \propto q$ ). Die ballistische Bewegung zeigt sich vor allem für die späte Phase der

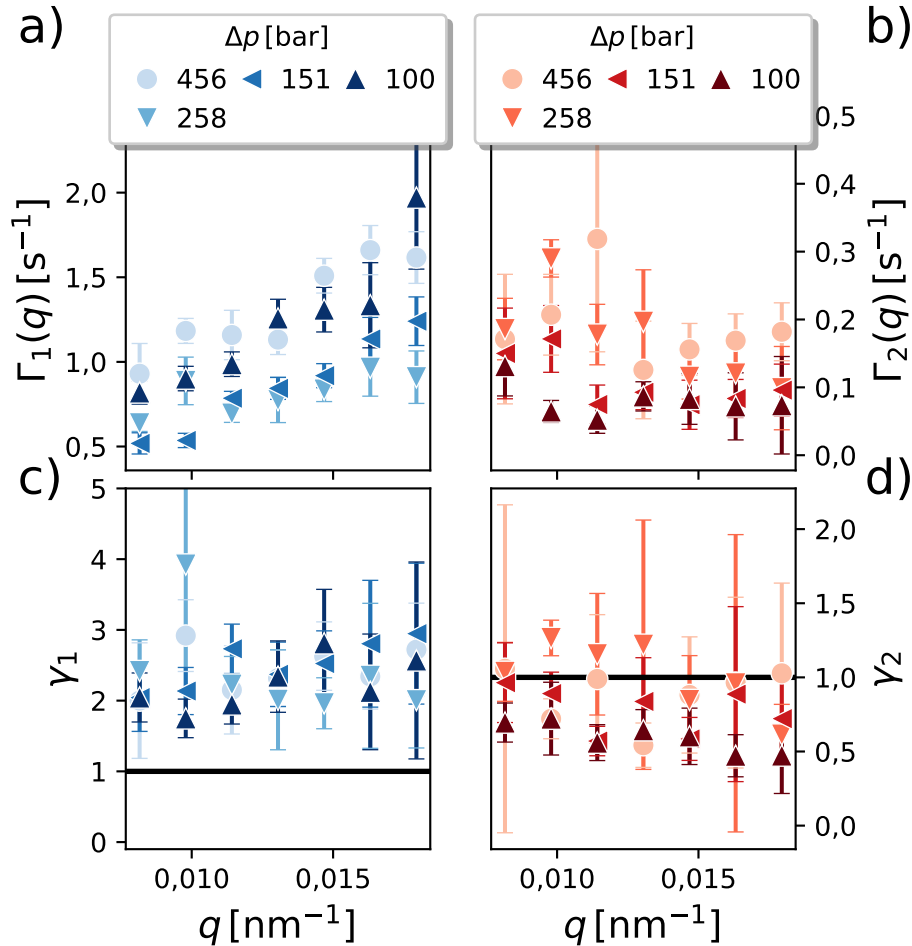


Abbildung 4.9:  $q$ -Abhängigkeit der Zerfallsraten und KWW-Exponenten für ausgewählte Quenchtiefen bei  $t_w = 19$  s

LLPS und ist für frühe Zeiten nur bei niedrigen Quenchtiefen erkennbar (vgl. Abbildungen C.9 und C.10). Eine ballistische Dispersion in Verbindung mit KWW-Exponenten  $\gamma_1$  zwischen 1,5 und 2,5 ergab sich ebenfalls bei der experimentellen Untersuchung der spinodalen Entmischung eines IgG-PEG Systems [Girelli u. a., 2021]. Die Werte der KWW-Exponenten konnten dabei zusätzlich aus der Simulation über die Cahn-Hilliard Gleichung bestätigt werden, die ballistische Dispersion allerdings nicht. Girelli *et al.* begründen die Abwesenheit des  $\Gamma_1 \propto q$  Verhaltens über die Vernachlässigung der Viskoelastizität in der Cahn-Hilliard Gleichung. Da die druckinduzierte LLPS für kleine Quenchtiefen initial schneller abläuft, könnte dies eine mögliche Erklärung für das spätere Einsetzen des ballistischen Verhaltens für große Quenchtiefen darstellen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem langsamen Zerfall um einen schwach sub-diffusiven ( $\gamma_2 < 1$ ) Zerfall, der keine erkennbare  $q$ -Abhängigkeit aufweist. Sub-diffusive Relaxationsprozesse können beispielsweise in kolloidalen Gelen beobachtet werden, resultierend aus internen elastischen Moden über eine Vielzahl von Längenskalen [Krall und Weitz, 1998].

Weitere Informationen über das System können aus dem sogenannten *non-ergodicity parameter* (kurz: NEP)  $f$  [Megen u. a., 1991] gewonnen werden. Der NEP kann für einen zweistufigen Zerfall über die jeweiligen Kontrastfaktoren  $\beta_{1,2}$  definiert werden [Girelli u. a., 2021]:

$$f = \frac{\beta_2}{\beta_1 + \beta_2}. \quad (4.8)$$

Für Korrelationsfunktionen mit einem exponentiellen Zerfall beschreibt der NEP den nicht zerfallenden Anteil einer Korrelationsfunktion und ist somit häufig in kolloidalen Gläsern [Megen u. a., 1991] und Gel-Systemen [Puertas u. a., 2003; Osaka u. a., 2008] vertreten. Bei einem zweistufigen Zerfall hingegen ist der NEP der Kontrastanteil der  $\beta$ -Relaxation (langsamer Zerfall) in Bezug auf den Gesamtkontrast. Für die in diesem Abschnitt vorgestellte Quenchserie ist der NEP in Abbildung 4.10 in Abhängigkeit von  $q$  (b)) und in Abhängigkeit von  $\Delta p$  (c)) dargestellt. In a) ist außerdem die zeitliche Entwicklung gemittelter Zerfallszeiten  $\bar{\tau}_{1,2}$  für große Quenchtiefen (gemittelt über  $\Delta p$  im Bereich zwischen 371 bar und 509 bar) in Abhängigkeit des Probenalters  $t_w$  gezeigt. Der zeitliche Verlauf von  $\bar{\tau}_{1,2}$  veranschaulicht deutlich die Alterung des Systems mit einem näherungsweise linearen Zusammenhang. Der NEP weist einen Abfall mit steigendem  $q$  auf, da auf kleineren Längenskalen die charakteristischen Zeiten kleiner werden, wodurch  $g_2$  dekorreliert. Zur Berechnung des NEP geht der Kontrast des zweiten Zerfalls  $\beta_2$  mit ein, weshalb die Fehler groß sind. Dennoch kann für große Quenchtiefen eine Zunahme von  $f$  beobachtet werden. Die Existenz eines NEP ( $f > 0$ ) in Verbindung mit der Alterung des Systems wurde ebenfalls für gelierende Proben beobachtet [Zaccarelli, 2007; Cipelletti u. a., 2003] und legt die Annahme nahe, dass für große  $\Delta p$  ein Gelübergang einsetzt. Bestärkt wird diese Annahme durch die ballistische Dispersion der Zerfallsrate in Verbindung mit super-diffusivem Verhalten, wie es auch für andere kolloidale Gele beobachtet wurde [Jain u. a., 2020; Ballesta u. a., 2008; Fluerasu u. a., 2007]. Der Anstieg von

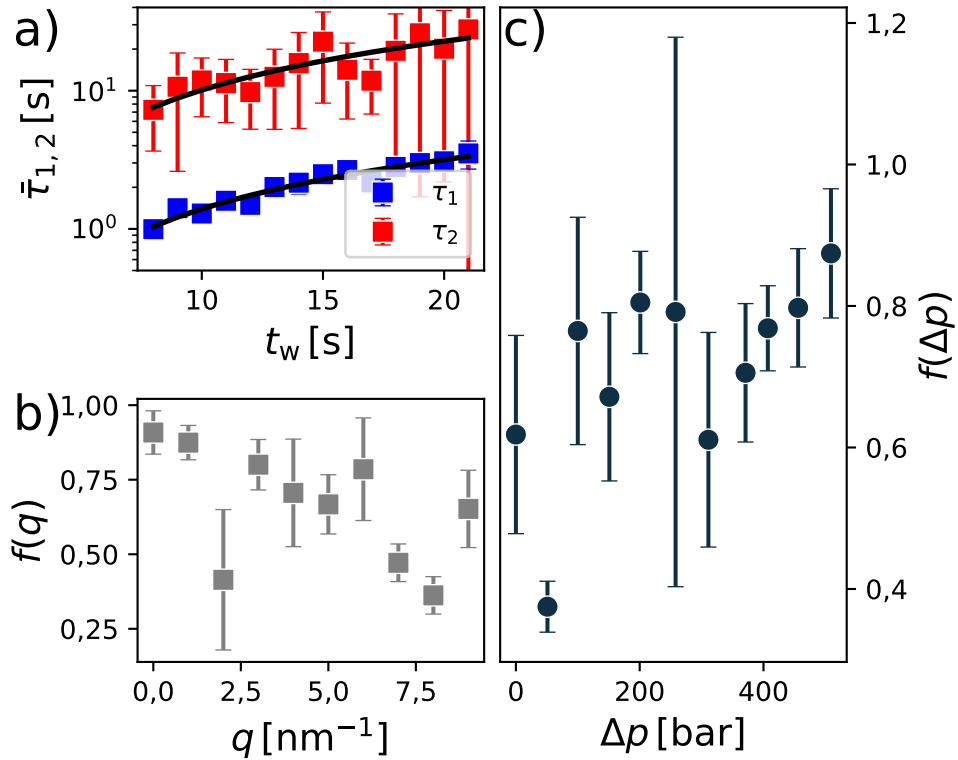


Abbildung 4.10: a) Zeitlicher Verlauf mittlerer Dekorrelationszeiten für große Quenchtiefen (371 bar bis 509 bar) bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ . Die schwarzen Linien repräsentieren lineare Ausgleichsgeraden zur Verdeutlichung der Alterung des Systems. Der *non-ergodicity parameter*  $f$  ist in Abhängigkeit von  $q$  für  $\Delta p = 509 \text{ bar}$  und  $t_w = 15 \text{ s}$  in b) und in Abhängigkeit der Quenchtiefe für  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$  und  $t_w = 15 \text{ s}$  in c) gezeigt.

$\gamma_1$  mit  $\Delta p$  kann durch die Zunahme der Viskoelastizität begründet werden, ebenfalls eine in Gel-Systemen anzutreffende Eigenschaft [Duri und Cipelletti, 2006; Cipelletti u. a., 2003]. Kombiniert mit den Erkenntnissen aus der Wachstumskinetik, nämlich der Verlangsamung des Wachstums mit steigender Quenchtiefe, und dem stetigen Anstieg der Viskosität mit  $\Delta p$  kann geschlussfolgert werden, dass konzentrierte Lysozymlösungen für große Quenchtiefen ein nanostrukturiertes Gel ausbilden.

### Kinetik und Dynamik der HP-LLPS von Lysozym

Im vorherigen Abschnitt wurde die Kinetik und Dynamik der druckinduzierten LLPS von konzentrierten Lysozymlösungen in Abhängigkeit der Quenchtiefe diskutiert. Die durchgeführten Drucksprünge dienten ausschließlich zum Quench in die LLPS-Phase bei niedrigen Drücken (LP-LLPS). Lysozym ist eines der wenigen Proteine, das in Abhängigkeit des hydrostatischen Drucks zwei Phasenübergänge zeigt. Im Fall von Lysozym wurde dieses Verhalten erstmals von Möller *et al.* beobachtet [Möller, Grobelny, Schulze, Bieder u. a., 2014]. Die Ursache des Phasenübergangs für hohe Drücke wurde dabei durch eine Änderung der Wasserstruktur begründet [Möller, Grobelny, Schulze, Bieder u. a., 2014; Schroer, Markgraf u. a., 2011; Möller, Schroer u. a., 2012; Schulze u. a., 2016]. Eine kombinierte theoretische und experimentelle Studie über die HP- und LP-LLPS eines RNA bindenden Proteins (FUS), erklärt das Auftreten der HP-LLPS Phase mit der Destabilisierung von elektrostatischen Wechselwirkungen begleitet von der Stabilisierung hydrophober, Kationen- $\pi$  und  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen, die zu einer Reduktion des partiellen molaren Volumens führen [Li, Yoshizawa u. a., 2021]. Viele weitere Arbeiten befassten sich mit der Erkundung des Phasenraums [Schulze u. a., 2016] und der Untersuchung der druckabhängigen Protein-Protein Wechselwirkung (siehe z.B. [Julius, Weine, Gao u. a., 2019; Julius, Al-Ayoubi u. a., 2018] und enthaltene Quellen). Zur Erweiterung des Verständnisses dieses Effekts, ist es hilfreich die Kinetik und Dynamik der HP-LLPS zu untersuchen. Im Folgenden werden zunächst die gewonnenen Informationen aus den SAXS-Daten vorgestellt und im Anschluss daran die Dynamik in der HP-LLPS-Phase diskutiert. In Abbildung 4.11a) ist die Streuintensität für die HP- (rot) und LP-LLPS (blau) in der Krakty-Darstellung für ausgewählte Zeiten gezeigt. Für beide Proben lag die Quenchtiefe bei  $\Delta p = 250$  bar und der Übergangsdruck der HP-LLPS wurde zu  $p_{\text{trans}}^{\text{HP}} = 2300$  bar bestimmt. Die zeitliche Entwicklung des Streusignals in der HP-LLPS Phase weist einen ähnlichen Verlauf wie bei der LP-LLPS auf, nämlich die Ausbildung eines Maximums und eine Verschiebung zu niedrigeren  $q$  mit steigendem Probenalter. Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Korrelationslängen (Abbildung 4.11b)) fallen jedoch zwei wesentliche Unterschiede auf:

1. In der frühen Phase der LLPS bilden sich in der HP-LLPS, unmittelbar nach dem Drucksprung, größere Strukturen aus als in der LP-LLPS.
2. In der späten Phase der LLPS ist das Wachstum der Korrelationslängen in der HP-LLPS langsamer.

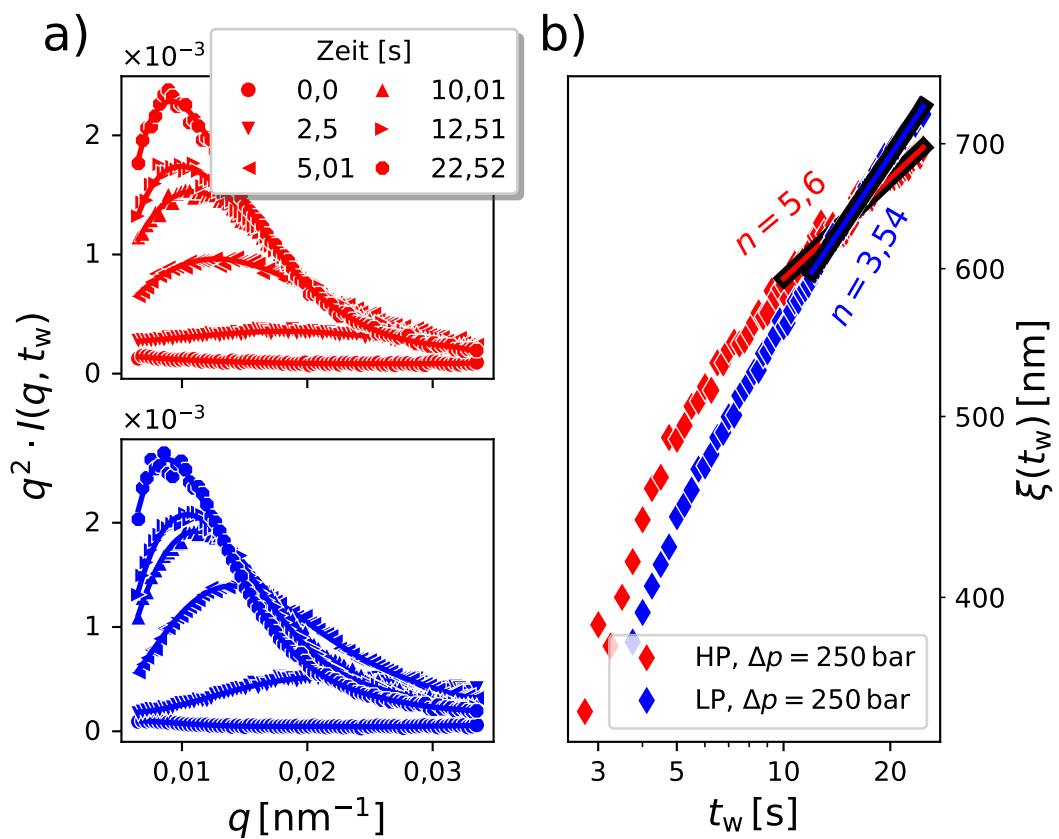


Abbildung 4.11: a) Streuintensität in der Kratky-Darstellung während der HP- (oben) und LP-LLPS (unten) für ausgewählte Zeiten. Die Legende der HP-LLPS gilt auch für die darunter dargestellte LP-LLPS. b) Zeitliche Entwicklung der Korrelationslängen.

Dabei wird für die HP-LLPS ein inverser Wachstumsexponenten von  $n = 5,6$  im Zeitintervall  $t_w = (10 - 25)$  s beobachtet, wohingegen für die LP-LLPS ein Wert von  $n = 3,54$  erreicht wird. Das Wachstum der Korrelationslänge in der LP-LLPS Phase ist konsistent mit den gefundenen Exponenten aus der Quenchserie (s. Abschnitt 4.1.2). Der Vergleich des Wachstumsexponenten der HP-LLPS mit den Exponenten aus der LP-Quenchserie (s. Abschnitt 4.1.2) zeigt, dass das Wachstum in der HP-LLPS langsamer ist als für die größten untersuchten Quenchtiefen der LP-LLPS. In der Literatur existieren nur wenige Studien zur Kinetik der HP-LLPS. Kitahara *et al.* untersuchten die Kinetik der druckinduzierten HP-LLPS und LP-LLPS des FUS Proteins mittels zeitaufgelöster UV-Vis-Spektroskopie und berichten ebenfalls von einem deutlich langsamerem Wachstum der HP-LLPS Phase [Kitahara u. a., 2021]. Außerdem ergab sich für den Übergang in die homogene Phase eine langsamere Auflösung der kondensierten Phase für die HP-LLPS. Dieses Verhalten wurde mit stärkeren Wechselwirkungen in der HP-LLPS Phase begründet. Aufgrund der bereits nach 25 Sekunden entstandenen großen Strukturen ( $\xi > 700$  nm) liefern die daran anschließenden Messungen keine weiteren Informationen über die zeitliche Entwicklung der Korrelationslänge, da die Maxima außerhalb des zugänglichen  $q$ -Bereichs liegen.

Zusätzliche Informationen können über die Betrachtung der Dynamik in der HP- und LP-LLPS Phase gewonnen werden. Die TTCs und daraus erhaltenen Schnitte sind für  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$  in Abbildung C.11 gezeigt. Wie zuvor, werden die extrahierten  $g_2$ -Funktionen in der frühen Phase der LLPS ( $t_w \leq 30$  s) mit zwei exponentiellen Zerfällen modelliert. Die daraus resultierenden Parameter sind in Abbildung 4.12 dargestellt. Zu Beginn der Phasenseparation ist der erste Zerfall  $\Gamma_1$  für die HP-LLPS deutlich schneller als für die LP-LLPS. Mit fortschreitender Zeit nähert sich allerdings die Zerfallsrate der HP-LLPS der der LP-LLPS an, was in Abbildung 4.12a) zu erkennen ist. Dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit der Wachstumskinetik. Der erste Zerfall ist außerdem für beide Druckbereiche super-diffusiv mit KWW-Exponenten zwischen 1,2 und 2,2. Der langsame Zerfall bildet sich für beide Proben erst nach einigen Sekunden aus, wodurch die Fehler für  $\Gamma_2, \gamma_2$  bei  $t_w < 10$  s groß sind. Die erneute Zunahme der Fehler von  $\Gamma_2$  und  $\gamma_2$  für  $t_w > 18$  s kann durch die Abnahme der maximal zugänglichen Verzögerungszeiten  $\Delta t_{\text{max}}(t_w)$  mit steigendem Probenalter begründet werden, die aus der diagonalen Extraktion der  $g_2$ -Funktionen aus den TTCs resultiert. Dadurch wird für Probenalter  $t_w > T_m/2 = 15$  s der langsame Zerfall nicht vollständig abgebildet, was zu einer ungenauen Modellierung führt. Die Zerfallsraten  $\Gamma_2$  unterscheiden sich im HP- und LP-Bereich kaum voneinander. Der langsame Zerfall ist in dem Zeitintervall zwischen 10 s und 18 s sub-diffusiv, in Übereinstimmung mit der Dynamik aus der Lysozym-Quenchserie. Für die LP-LLPS kann außerdem eine ballistische Dispersion des schnellen Zerfalls beobachtet werden  $\Gamma_1 \propto q$ , die für die HP-LLPS ausbleibt (vgl. Abbildung C.13 a)). Der langsame Zerfall zeigt für beide Druckbereiche keine erkennbare  $q$ -Abhängigkeit, was in Abbildung C.13 b) zu erkennen ist. Die Abweichung vom diffusiven Verhalten bleibt für beide Zerfälle über den gesamten  $q$ -Bereich erhalten (s. Abbildung C.13 c-d)).

Die zeitliche Entwicklung in Abbildung 4.12a) legt nahe, dass für größere Zeiten



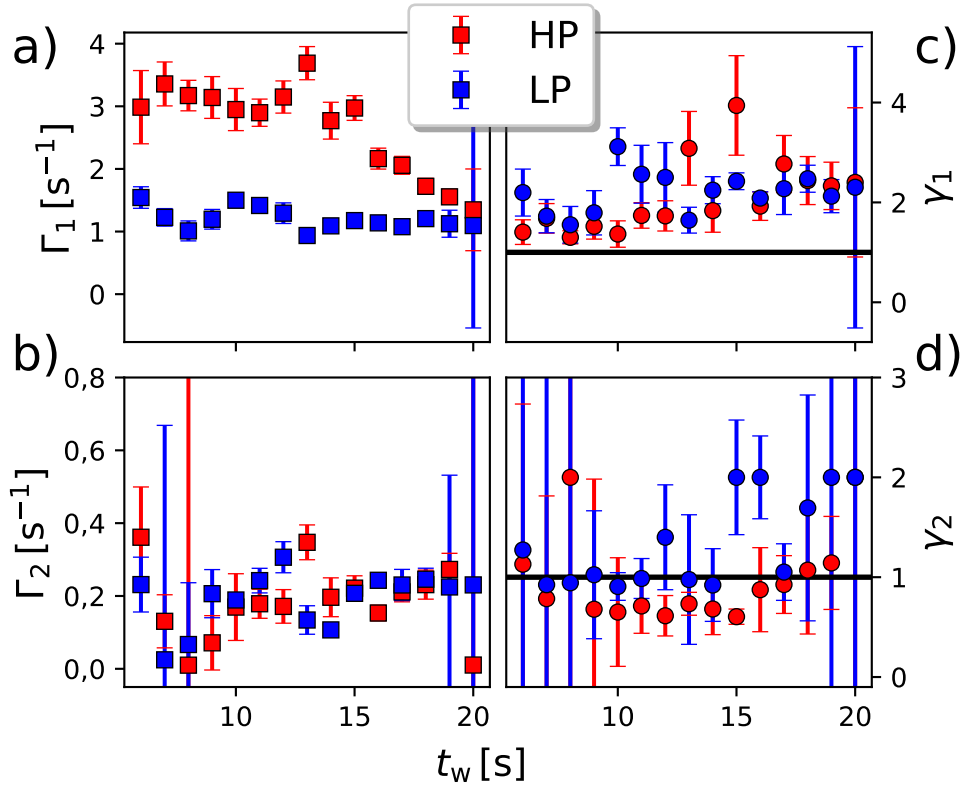


Abbildung 4.12: Zeitliche Entwicklung der Zerfallsraten und KWW-Exponenten der frühen Phase der HP- und LP-LLPS einer konzentrierten Lysozymlösung bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .

der erste Zerfall des HP-Systems langsamer wird als für das LP-System. Aus diesem Grund wurden TTCs und  $g_2$ -Funktionen für anschließende Messungen mit einer Gesamtdauer von 900 s berechnet (vgl. Abbildung C.12). Da für beide Systeme die Korrelation nicht vollständig zerfällt, können keine hinreichend genauen Parameter für den langsamen Zerfall bestimmt werden, weshalb in Abbildung 4.13 nur  $\Gamma_1$  und  $\gamma_1$  für Probenalter zwischen 30 s und 900 s betrachtet wird. Die zuvor getroffene Annahme des Verlaufs der Zerfallsraten ist anhand von Abbildung 4.13a) zu erkennen. Dabei liegt die Zerfallsrate des HP-Systems um zwei und die des LP-Systems um eine Größenordnung tiefer als für  $t_w = 18 \text{ s}$  und beide Zerfallsraten zeigen keine wesentlichen Änderungen mit voranschreitender Alterung des Systems (s. Abbildung 4.13a)). Die dabei sprunghaft erscheinende zeitliche Entwicklung von  $\Gamma_1$  kommt durch eine nicht quantifizierbare Verzögerung<sup>1</sup> zwischen den in Abbildungen 4.12 und 4.13 gezeigten Messungen zustande. Die Superdiffusivität bleibt auch für  $t_w > 30 \text{ s}$  erhalten

<sup>1</sup>Die Verzögerung kommt durch die Änderung des verwendeten Absorbers und Starten einer neuen Messung zustande.

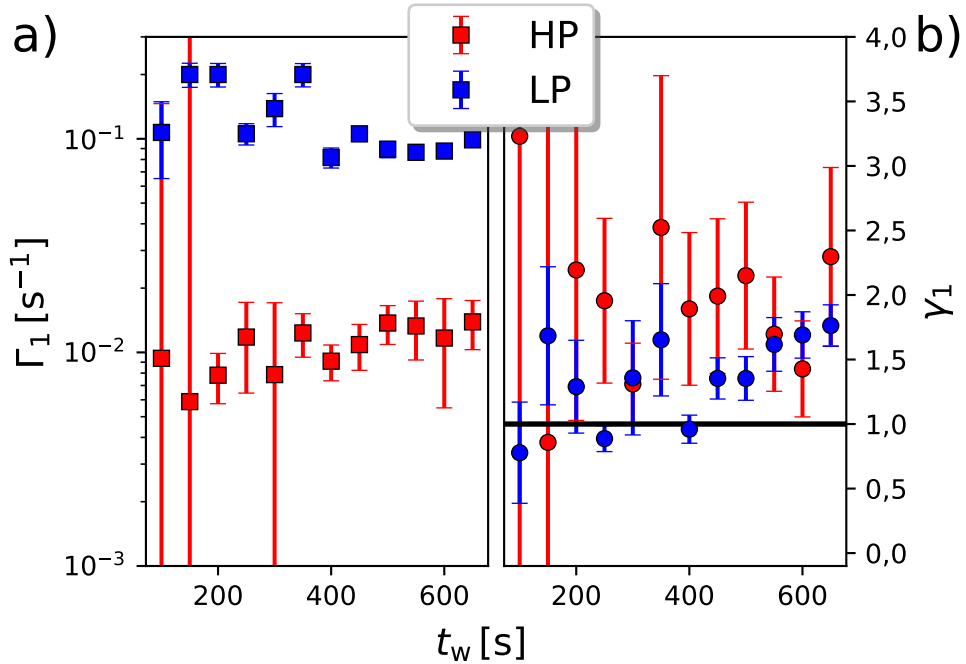


Abbildung 4.13: Zeitliche Entwicklung der a) Zerfallsraten und b) KWW-Exponenten der späten Phase der HP- und LP-LLPS bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .

(Abbildung 4.13b)). Da der Kontrast für die in Abbildung 4.13 dargestellte Messung für größere  $q$  stark abfällt und die Korrelationen stark fluktuieren, sind keine Aussagen über das  $q$ -abhängige Verhalten möglich.

Es lässt sich festhalten, dass sowohl die Informationen aus der Wachstumskinetik, als auch die Erkenntnisse aus der Dynamik der beiden Systeme ein deutlich schnelleres frühes Wachstum der kondensierten HP-LLPS Phase wiedergeben, mit einer daran anschließenden starken Verlangsamung des Wachstums und der Dynamik im Vergleich zur LP-LLPS Phase.

### Kinetik und Dynamik der LLPS in $\gamma$ D-Kristallin Lösungen

Ein weiteres in dieser Arbeit betrachtetes Probensystem stellen konzentrierte  $\gamma$ D-Kristallin Lösungen dar. Anders als Lysozym (vgl. vorheriger Abschnitt) zeigt  $\gamma$ D-Kristallin in dem betrachteten Druckbereich zwischen 1 bar und 3500 bar nur einen Phasenübergang im Niederdruckbereich [Cinar, Cinar u. a., 2019]. Das druckabhängige Phasenverhalten von  $\gamma$ D-Kristallin wurde in der Vergangenheit intensiv in Abhängigkeit der Proteinkonzentration, Osmolyte und Osmolytkonzentration und der Temperatur untersucht [Cinar, Cinar u. a., 2019; Cinar und Winter, 2020]. Zusätzlich wurde in [Cinar und Winter, 2020] auch die Wachstumskinetik der kondensierten Phase nach einem Drucksprung charakterisiert und keine Abhängigkeit von

der Proteinkonzentration oder der Quenchtiefe gefunden. In dieser Arbeit wurden keine quenchtiefenabhängigen Messungen durchgeführt, um die Unabhängigkeit der Wachstumskinetik von dieser zu verifizieren. Allerdings konnte in dieser Arbeit eine Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumskinetik festgestellt werden, wie es in Abbildung 4.14 dargestellt ist. In a) sind die Streuintensitäten für ausgewählte Zeiten zwischen 0 s und 25 s während der LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallinlösung bei  $T = 2,5^\circ\text{C}$  gezeigt. Beide Proben beinhalten 150 mM NaCl und werden durch die Verwendung von 20 mM Tris Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 stabilisiert. Die Proteinkonzentrationen betragen 182 mg/mL (links) und 211 mg/mL (rechts). Die Übergangsdrücke wurden nach der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise für beide Konzentrationen zu  $p_{\text{trans}} = 350$  bar bestimmt. Analog zu den Beobachtungen bei den zuvor vorgestellten Messungen an Lysozymlösungen, bildet sich mit fortschreitender Zeit ein Maximum in der Streuintensität aus, das sich zu kleineren  $q$  verschiebt. In b) ist die zeitliche Entwicklung der Streuintensität zu späteren Zeiten dargestellt. Für späte Zeiten ( $t_w \geq 30$  s) ist deutlich zu erkennen, dass sich das Maximum der Streuintensität aus dem zugänglichen  $q$ -Bereich verschiebt, weshalb keine Informationen in diesen Zeitintervallen zugänglich sind. Für eine Konzentration von 211 mg/mL wächst die in c) gezeigte Korrelationslänge deutlich schneller als für die Probe mit einer geringeren Konzentration. Für eine Proteinkonzentration von 182 mg/mL zeigt sich in der späten Phase der LLPS ein sehr langsames Wachstum mit  $n = 9,4$ , was auf einen kinetisch gefrorenen Zustand hindeutet. Dieser Zustand wird allerdings frühestens nach 30 s erreicht, wohingegen in [Cinar und Winter, 2020] die Phasenseparation nach weniger als zwei Sekunden als abgeschlossen gilt. Der Unterschied könnte zum einen aus der deutlich niedrigeren Proteinkonzentration von 50 mg/mL resultieren, oder zum anderen aus der Sensitivität der jeweiligen Messmethoden. Cinar *et al.* verwendeten Absorptionsmessungen und sahen die LLPS als abgeschlossen an, wenn keine Änderung mehr in der Absorption messbar war. Dies schließt allerdings nicht aus, dass keine strukturellen Änderungen mehr in der Probe stattfinden.

Die Dynamik der  $\gamma$ D-Kristallin-Systeme unterscheidet sich ebenfalls von den zuvor untersuchten Lysozymlösungen. Für die hier vorgestellten Resultate über die Dynamik wurden die TTCs nach der Definition von Brown [Brown u. a., 1997] berechnet. Wie bereits erläutert sind die unterschiedlichen Definitionen äquivalent [Bikondoa, 2017]. Die Modellfunktionen für die kurzen und langen Messungen lauten:

$$g_2(q, t_w, \Delta t) = \begin{cases} \beta_1 \cdot e^{-2(\Gamma_1 \Delta t)^{\gamma_1}} + \beta_2 \cdot e^{-2(\Gamma_2 \Delta t)^{\gamma_2}}, & t_w \leq 25 \text{ s} \\ f + \beta_1 \cdot e^{-2(\Gamma_1 \Delta t)^{\gamma_1}}, & t_w > 25 \text{ s} \end{cases}, \quad (4.9)$$

wobei  $f$  den bereits eingeführten *non-ergodicity parameter* bezeichnet. Die Modelle wurden gewählt, da für die frühe Phase der LLPS zwei Zerfälle sichtbar sind, die über die betrachtete Messdauer vollständig dekorrelieren. Im Gegensatz dazu klingt die Korrelation für die späte Phase der LLPS nicht vollständig ab, weshalb zur Modellierung der  $g_2$ -Funktionen der NEP  $f$  benötigt wird. Außerdem ist für die späte Phase der LLPS nur noch ein Zerfall erkennbar, wodurch in der Modellfunktion der zweite exponentielle Zerfall wegfällt. Dadurch reduziert sich die Anzahl der freien

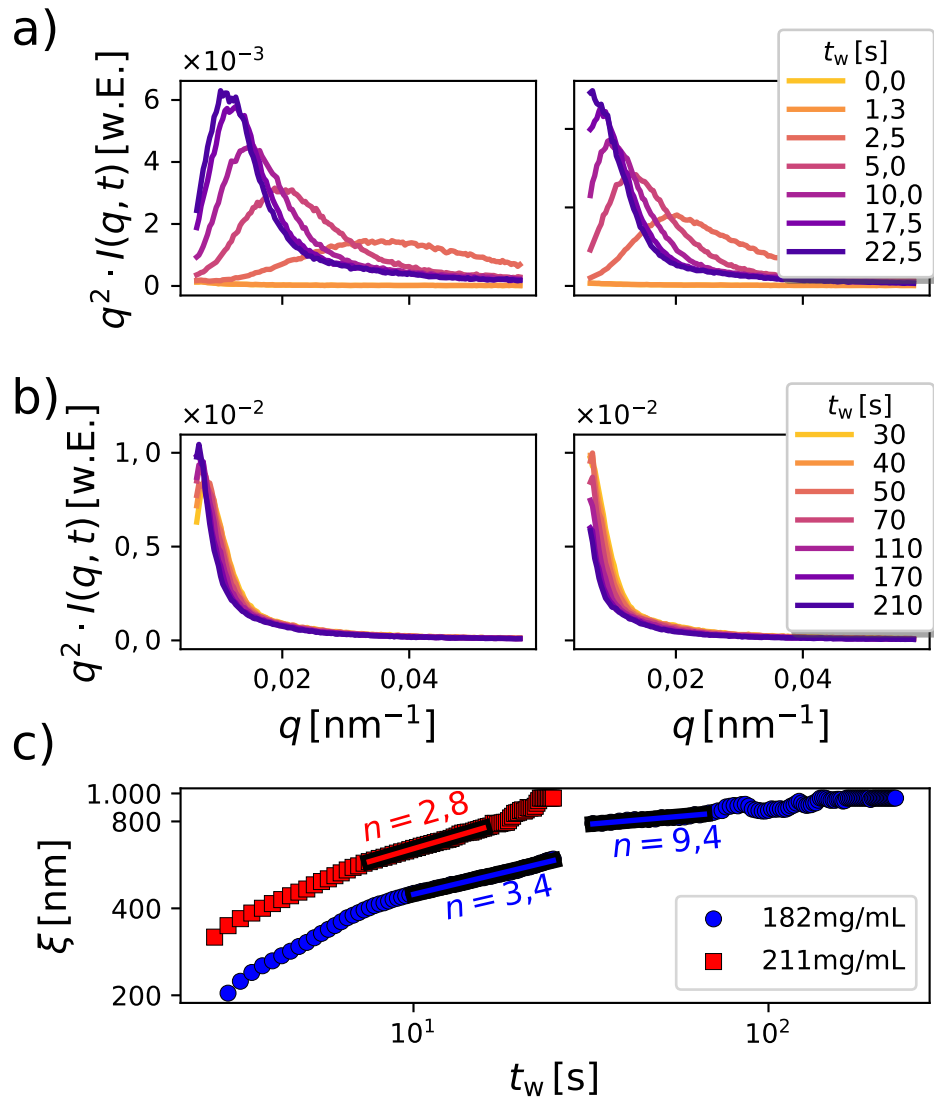


Abbildung 4.14: a) Streuintensität in der Kratky-Darstellung aufgenommen während der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit 182 mg/mL (links) und 211 mg/mL (rechts) in der frühen Phase der LLPS bei  $T = 2,5$  °C. In b) sind anschließende lange Scans mit niedrigerem Absorber für die jeweils darüber in a) gezeigte Probe dargestellt. c) Korrelationslängen in Abhängigkeit der Zeit, sowie zugehörige Wachstumsexponenten. Die Quenchtiefe lag für beide Proben bei  $\Delta p = 250$  bar.

Parameter für die späte Phase der LLPS von sechs auf vier.

TTCs der frühen Phase der druckinduzierten LLPS, sowie vom Probenalter abhängige  $g_2$ -Funktion für zwei ausgewählte  $q$ , sind zur Erhaltung der Leserlichkeit im Anhang in Abbildungen C.14 - C.17 gezeigt. Anschließende Messungen mit größeren Belichtungszeiten der selben Proben sind in den Abbildungen C.18 - C.21 zu finden. Es ergeben sich ebenfalls in der Dynamik deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.15 zunächst für die kurzen Messungen ( $t_w < 25$  s) die aus den Anpassungen der  $g_2$ -Funktionen gewonnenen Parameter dargestellt. Die Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  sind für beide betrachte-

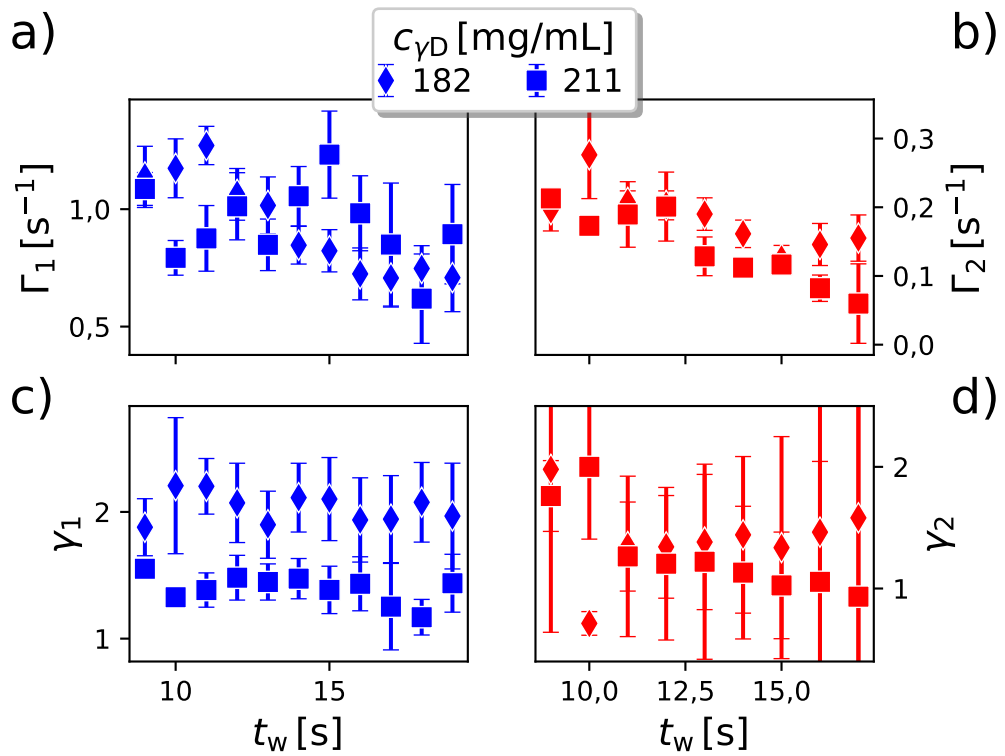


Abbildung 4.15: Parameter aus den Anpassungen der vom Probenalter abhängigen Korrelationsfunktionen für die frühe Phase der druckinduzierten LLPS bei  $q = 0,008 \text{ nm}^{-1}$ .

ten Proben ähnlich groß und sinken mit steigendem Probenalter, was aus der Verlangsamung der Dynamik aufgrund der fortschreitenden Phasenseparation resultiert (Abbildung 4.15 a) und b)). Der schnelle Zerfall ist zusätzlich über die gesamte Messdauer super-diffusiv (c)), wobei der Grad der Superdiffusivität für die Probe mit der geringeren Proteinkonzentration höher ist ( $\gamma_1 \approx 2$ ) als für die höher konzentrierte Probe ( $\gamma_1 \approx 1,4$ ). Das Verhalten des langsamen Zerfalls wechselt für hohe Proteinkonzentrationen von super-diffusiv zu normaler Diffusion (d)). Die anschließenden Messungen mit einer Gesamtmessdauer von 200 Sekunden verdeutlichen den

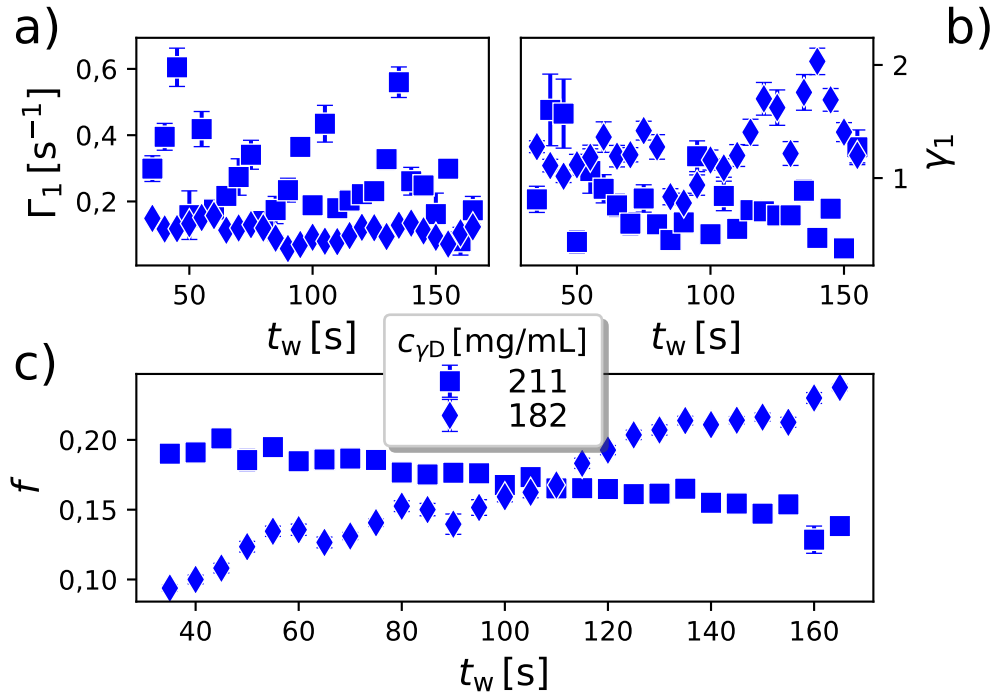


Abbildung 4.16: Parameter aus den Anpassungen der vom Probenalter abhängigen Korrelationsfunktionen für die späte Phase der druckinduzierten LLPS bei  $q = 0,008 \text{ nm}^{-1}$ .

weiteren Übergang zur Subdiffusion in der höher konzentrierten Lösung ( $\gamma_1 < 1$ , vgl. Abbildung 4.16b)). Für große Zeiten fluktuieren die Zerfallsraten  $\Gamma_1$  und die KWW-Exponenten  $\gamma_1$  beider Proben stark, wobei die hochkonzentrierte Lösung nun deutlich größere Zerfallsraten und stärkere Fluktuationen zeigt als zuvor. Dies ist in Abbildung 4.16a) dargestellt. In c) ist außerdem der NEP  $f$  abgebildet und weist für die beiden betrachteten Konzentrationen ein gegensätzliches Verhalten auf. Für das Probensystem mit  $182 \text{ mg/mL}$  steigt  $f$  mit der Zeit wohingegen  $f$  für  $211 \text{ mg/mL}$  sinkt.

Zusätzlich ist für die frühe Phase der LLPS ein ähnliches Verhalten der Dynamik, wie bei der LLPS von Lysozym, in Abhängigkeit von  $q$  beobachtbar, nämlich ein ballistischer schneller Zerfall ( $\Gamma_1 \propto q$ ) und ein langsamer Zerfall ohne erkennbare  $q$ -Abhängigkeit (vgl. Abbildung C.22 a) und b)). Der schnelle Zerfall ist über den gesamten betrachteten  $q$ -Bereich für beide Proben super-diffusiv (c) und für den langsamen Zerfall nimmt der Grad der Subdiffusivität mit steigendem  $q$  zu (d)). Die  $q$ -Abhängigkeit der langen Messungen ist schwer zu analysieren, da durch den sehr geringen Kontrast mit steigendem  $q$  nur für wenige  $q$ -Werte hinreichend genaue Modellierungen möglich sind. Die Resultate sind in Abbildung C.23 grafisch dargestellt. Der Parameter  $f$  sinkt mit steigendem  $q$  und nähert sich für die höchsten zugängli-

chen  $q$ -Werte dem Wert Null, was mit einer Wiederherstellung der Ergodizität auf kleineren Längenskalen einhergeht. Die Dynamik wird mit steigendem  $q$  schneller, was sich in leicht steigenden  $\Gamma_1$  äußert. Für die Probe mit niedrigerer Konzentration findet außerdem ein Übergang von Super- zu Subdiffusion statt, die für die höher konzentrierte Probe über den gesamten  $q$ -Bereich ausgeprägt ist.

Aus den getätigten Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass für die untersuchten  $\gamma$ D-Kristallin Proben ein Gelübergang über die druckinduzierte LLPS eintritt. Dies wird sowohl aus der Wachstumskinetik durch große  $n$  für die späte Phase der LLPS deutlich, als auch aus den gewonnenen Informationen über die Dynamik. Dabei tritt ebenfalls eine Verlangsamung des Systems mit steigendem Probenalter ein und in der frühen Phase der LLPS sind zwei super-diffusive Zerfälle vorhanden, wobei der erste Zerfall eine ballistische Dispersion aufweist. Für sehr große Zeiten ist außerdem eine nicht verschwindende Korrelation  $f$  und starke Fluktuationen der Zerfallsrate und KWW-Exponenten zu sehen, wie es bereits für kolloidale Gele beobachtet wurde [Duri und Cipelletti, 2006; Fluerasu u. a., 2007]. Die Abnahme des Parameters  $f$  mit dem Probenalter für die höher konzentrierte Probe kann über den Kollaps des Gelnetzwerks unter Einfluss der Gravitation begründet werden. Somit kann auch für konzentrierte  $\gamma$ D-Kristallin Lösungen geschlussfolgert werden, dass diese über die druckinduzierte LLPS ein Gel ausbilden.

### Der Einfluss von PEG auf die Kinetik und Dynamik

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von Polymeren (PEG) auf die Kinetik und Dynamik der druckinduzierten LLPS in konzentrierten Proteinlösungen diskutiert. Der Einfluss von PEG auf die intermolekulare Protein-Protein Wechselwirkung und das Phasenverhalten von Proteinlösungen wurde bereits ausgiebig untersucht [Julius, Weine, Gao u. a., 2019]. Dabei ergab sich, dass der Einfluss der Polymere auf das Interaktionspotenzial stark von dem Polymer zu Protein Größenverhältnis  $R_{G,PEG}/R_{G,Lys}$  und der Polymerkonzentration abhängt. In Bezug auf die Polymerkonzentration wird zwischen zwei verschiedenen Bereichen unterschieden:

1.  $c_{PEG} < c^*$
2.  $c_{PEG} \geq c^*$ ,

mit der sogenannten Überlappungskonzentration  $c^*$ . Im ersten Fall ist die Polymerkonzentration kleiner als die Überlappungskonzentration, wodurch die in der Lösung befindlichen Polymere individuell betrachtet und bei der experimentellen Charakterisierung als Zufallsknäuel modelliert werden können. In diesem Konzentrationsbereich wurde eine Abnahme der attraktiven Wechselwirkung beobachtet, wobei dieser Effekt für kleine Polymere am stärksten ausgeprägt war. Im zweiten Fall hingegen, wenn  $c_{PEG} \geq c^*$  ist, bilden die Polymere ein verzweigtes Netzwerk [Mao u. a., 1995] und interessanterweise ist die Stärke der Attraktivität im Bereich, wie sie in polymer-freien Lösungen gefunden wurde. Die Überlappungskonzentration kann in Abhängigkeit des

Molekulargewichts  $M_{w,PEG}$  und des Gyrationradius über

$$c^* [\text{mg/mL}] = \frac{M_{w,PEG}}{4/3\pi R_{G,PEG}^3 N_A} \quad (4.10)$$

berechnet werden [Gennes und Witten, 1980]. Der Gyrationradius in Abhängigkeit des Molekulargewichts folgt dabei einem Potenzgesetz:

$$R_{G,PEG} [\text{nm}^{-1}] = 0,215 M_{w,PEG}^{0,583} \cdot \quad (4.11)$$

Unter Verwendung der Gleichungen 4.10 und 4.11 ergeben sich für die in dieser Arbeit verwendeten Molekulargewichte von 2000 g/mol bis 4000 g/mol Überlappungskonzentrationen von 13,44 (w/v)% (PEG2k) und 8,00 (w/v)% (PEG4k). Es wurde keine Konzentrationsabhängigkeit der Polymere untersucht und die verwendete Konzentration lag mit 5 (w/v)% für beide Molekulargewichte unterhalb der Überlappungskonzentration.

Auch in diesem Abschnitt wird das gleiche Vorgehen zur Untersuchung der LLPS verfolgt, indem zunächst die Wachstumskinetik und daran anschließend die Dynamik diskutiert wird.

Beginnend mit der Wachstumskinetik sind in Abbildung 4.17 die Streuintensitäten in der Kratky-Darstellung für verschiedene Probenalter einer kurzen Messung (a)) mit  $T_m = 30$  s und einer langen Messung (b)) mit  $T_m = 600$  s während der LLPS einer konzentrierten Lysozymlösung mit PEG4k dargestellt. Die zeitliche Entwicklung der aus den Positionen der Maxima extrahierten Korrelationslängen ist für beide Messungen in c) gezeigt. Zum Vergleich ist zusätzlich die zeitliche Entwicklung der Korrelationslänge eines PEG-freien Systems dargestellt. Es fällt auf, dass die Korrelationslängen deutlich kleiner sind verglichen mit Proben die kein PEG enthalten. Der inverse Wachstumsexponent ist mit  $n = 5,8$  größer, als er für Proben ohne PEG beobachtet wird und liegt für  $t_w < 30$  s im Bereich der bereits diskutierten HP-LLPS. Für die späte Phase der LLPS ( $t_w > 50$  s) verlangsamt sich die Kinetik weiter und  $n$  steigt auf 8,3 an. Die erhaltenen Korrelationslängen für das PEG-freie, das PEG2k und das PEG4k System sind zusammengefasst in Abbildung 4.18 gezeigt. Der Vergleich zwischen der PEG4k, PEG2k und PEG-freien Probe zeigt, dass die Korrelationslängen mit steigendem PEG-Molekulargewicht sinken. Die Entstehung der kondensierten Phase scheint demnach durch die Hinzugabe von PEG gehindert zu sein, was sich mit steigendem  $M_{w,PEG}$  verstärkt. Das PEG2k System zeigt für  $t_w > 35$  s das langsamste Wachstum mit einem Wachstumsexponenten von  $n = 24,2$ , was als kinetischer Stillstand betrachtet werden kann. Dieser kinetische Arrest wurde ebenfalls für die temperaturinduzierte LLPS eines  $\gamma$ -Globulin-PEG Systems [Da Vela, Exner u. a., 2017] und eines IgG-PEG Systems [Girelli u. a., 2021] gefunden und konnte zum einen durch größere Quenchtiefen und zum anderen durch Erhöhung der Polymerkonzentration verstärkt werden. Außerdem wurden ähnlich hohe Wachstumsexponenten für die viskoelastische Phasenseparation in Polymerlösungen gefunden [Tanaka, 2000] und ebenfalls in gelierenden Kolloid-Polymer Mischungen [Zhang, Royall u. a., 2013].



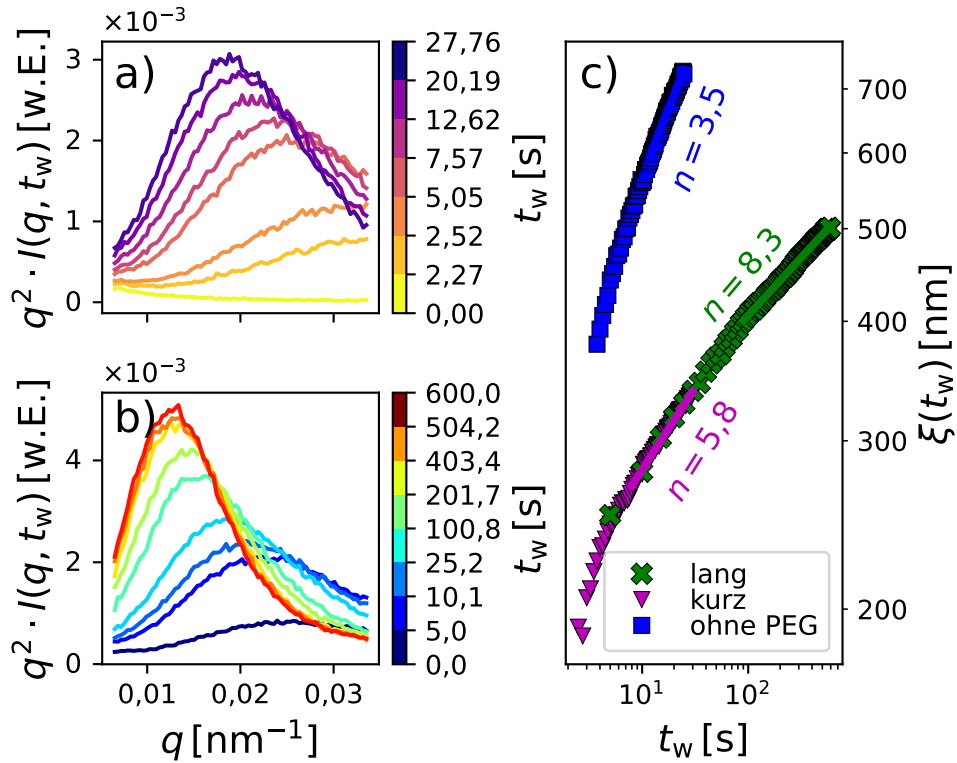


Abbildung 4.17: a)-b) Streuintensitäten aufgenommen während der LLPS einer Lysozym-PEG-Lösung mit  $c_p = 238 \text{ mg/mL}$  und einer PEG4k Konzentration von  $c_{\text{PEG}} = 5 \text{ (w/v)\%}$  bei  $T = 12^\circ\text{C}$ . Die Quenchtiefe betrug  $\Delta p = 250 \text{ bar}$ . In c) sind die erhaltenen Korrelationslängen für Messungen mit  $T_m = 600 \text{ s}$  (grüne Kreuze), mit  $T_m = 30 \text{ s}$  (magentafarbene Dreiecke) und zum Vergleich die eines PEG-freien Systems mit  $T_m = 30 \text{ s}$  dargestellt.

Zur Charakterisierung der Dynamik beider Systeme sind in Abbildung 4.19 die Zerfallsrate (a)) und der KWW-Exponent (b)) des schnellen Zerfalls für die Messungen mit einer Gesamtdauer von  $T_m = 30 \text{ s}$  gezeigt. Auf eine Analyse des zweiten Zerfalls wurde verzichtet, da aufgrund der langsamen Dynamik und der begrenzt zugänglichen Zeitabstände  $\Delta t$  keine ausreichend genauen Parameter berechnet werden konnten. Die TTCs und  $g_2$ -Funktionen, aus denen die gezeigten Parameter resultieren, sind in Abbildung C.24 abgebildet. Die Parameter des PEG4k Systems sind um drei Sekunden verschoben, da, wie an den TTCs ersichtlich, der Drucksprung für die PEG2k Messung drei Sekunden später durchgeführt wurde ( $t_{j,\text{PEG2k}} = 5 \text{ s}$  und  $t_{j,\text{PEG4k}} = 2 \text{ s}$ ). Für beide Proben ist ein linearer Abfall der Zerfallsrate  $\Gamma_1$  zu beobachten, wobei das System mit PEG4k über den gesamten betrachteten Zeitraum eine schnellere Dynamik aufweist. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Wachstumskinetik, bei der sich für PEG4k ein schnelleres Wachstum der Korrelationslänge ergab. Auch

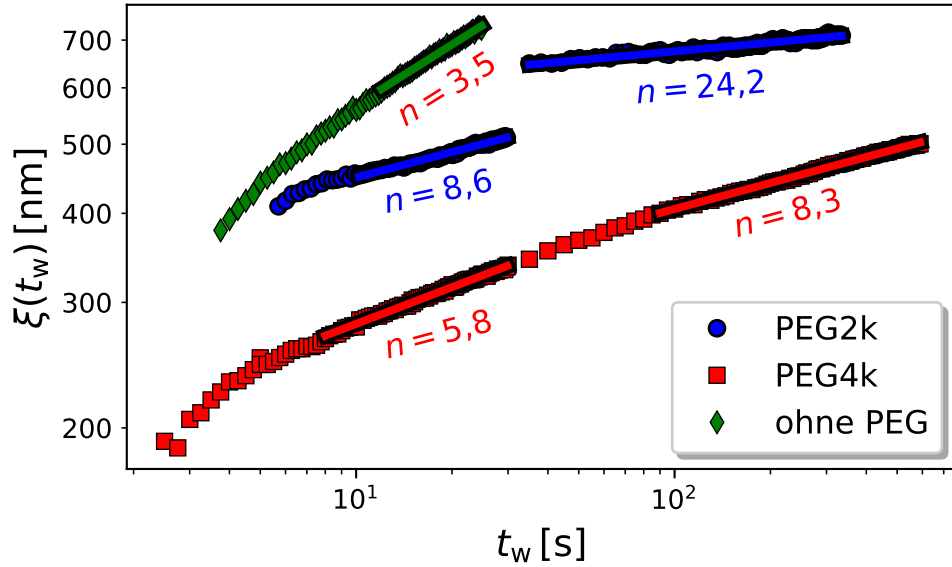


Abbildung 4.18: Zeitliche Entwicklung der Korrelationslängen während der druckinduzierten LLPS einer Lysozymlösung in Abhängigkeit des Molekulargewichts  $M_{w,PEG}$ .

bei den Proteinlösungen mit PEG ist die Bewegung super-diffusiv mit Werten für  $\gamma_1$  zwischen 1,2 und 1,8, was in Abbildung 4.19b) zu erkennen ist. Die  $q$ -Abhängigkeit der Zerfallsrate des PEG4k Systems ist für  $t_w = 14$  s nahezu quadratisch und zeigt für größere  $t_w$  ein monotonen Wachstum (vgl. Abbildung C.25). Aus dieser Relation lässt sich über  $\Gamma_1 \propto D_0 q^2$  eine Diffusionskonstante  $D_0$  zu  $D_0 = (540 \pm 53) \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$  bestimmen und ist somit um fast eine Größenordnung kleiner als der Diffusionskoeffizient für Lysozymlösungen ohne PEG (s. Abbildung 4.5b)). Die Dynamik für  $t_w > 30$  s zeigt starke Fluktuationen der Zerfallsraten und KWW-Exponenten, sodass lediglich eine weitere Verlangsamung des Systems erfasst werden kann, mit überwiegend super-diffusivem Verhalten. Durch die Notwendigkeit der Verwendung hoher Absorber bei Messungen mit  $T_m > 30$  s sinkt der Kontrast mit steigendem  $q$  stark, sodass keine Aussagen über die  $q$ -Abhängigkeit der Zerfallsraten und KWW-Exponenten möglich sind. Eine Zusammenfassung der Dynamik für hohe Probenalter bei  $q = 0,0054 \text{ nm}^{-1}$  ist im Anhang in den Abbildungen C.26 und C.27 zu finden.

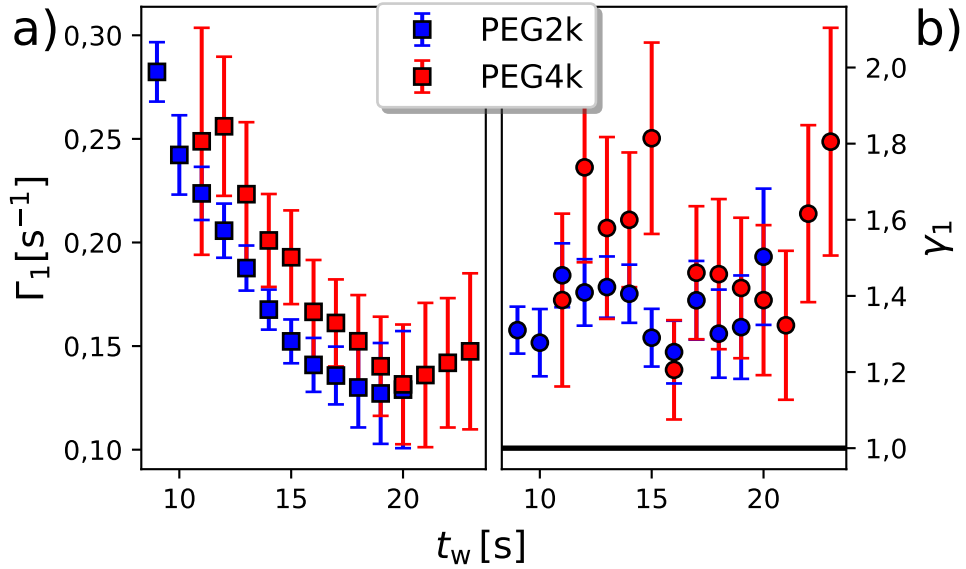


Abbildung 4.19: a) Zerfallsraten des ersten Zerfalls während der frühen Phase der LLPS eines Lysozym-PEG-Systems bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ . Die zugehörigen KWW-Exponenten sind in b) dargestellt.

#### 4.1.3 Temperaturinduzierte Phasenübergänge in konzentrierten Lysozymlösungen

Viele Untersuchungen haben sich bereits mit dem Einfluss der Temperatur auf das Phasenverhalten von Proteinlösungen beschäftigt und ergaben im Fall von Lysozym eine Abnahme der attraktiven Wechselwirkung mit steigender Temperatur [Schroer, Markgraf u. a., 2011], einhergehend mit einer Verbreiterung der Phasengrenzen [Möller, Grobely, Schulze, Bieder u. a., 2014; Schulze u. a., 2016]. Außerdem wurde für die temperaturinduzierte LLPS in den letzten Jahren die Wachstumskinetik und die Dynamik der LLPS mittels zeitaufgelöster Kleinwinkelstreuung charakterisiert (SAXS, USAXS/XPCS, VSANS: *very small-angle neutron scattering*) [Da Vela, Braun u. a., 2016; Da Vela, Exner u. a., 2017; Matsarskaia u. a., 2019; Begam, Matsarskaia u. a., 2020; Girelli u. a., 2021]. Für das in dieser Arbeit verwendete Protein Lysozym, sind bisher noch keine Informationen über die Dynamik der temperaturinduzierten LLPS bekannt, die wesentlich zum Verständnis dieses komplexen Phänomens beitragen können.

Im Folgenden werden die USAXS/XPCS Messungen für die temperaturinduzierte LLPS in konzentrierten Lysozymlösungen vorgestellt. Der prinzipielle Ablauf der Messungen, sowie die wesentlichen Parameter wurden bereits in Abschnitt 3.3.1 vorgestellt. Die Probenkomposition ähnelt den Proben aus den bereits vorgestellten Druckmessungen. Der einzige Unterschied besteht in der Proteinkonzentration, die im Fall der temperaturabhängigen Messungen bei  $c_p = 190 \text{ mg/mL}$  liegt. Die Über-

gangstemperatur  $T_{\text{trans}}$  lag für die untersuchten Proben bei  $10^\circ\text{C}$ .

Zu Beginn sei erwähnt, dass für die temperaturinduzierte LLPS keine Informationen über die zeitliche Entwicklung der Korrelationslänge zugänglich sind, da sich, wie in Abbildung C.28 gezeigt, kein erkennbares Maximum im USAXS-Signal ausbildet. Dennoch können, wie bereits für die Druckserie vorgestellt, Streuinvarianten und Wachstumsraten bestimmt werden. Die Streuinvariante  $Q^*$  ist in Abhängigkeit des Probenalters in Abbildung 4.20a) dargestellt. Im Vergleich zu den Drucksprüngen ist der Anstieg von  $Q^*$  deutlich langsamer. Die Ursache dafür liegt in der begrenzten Kühlrate der Linkam-Stage. Auch für die Temperaturserie ist die Ausbildung eines Plateaus für späte Zeiten, sowie eine lineare Abhängigkeit des Plateau-Wertes  $Q_p^*$  von der Quenchtiefe  $\Delta T$  erkennbar (s. Abbildung 4.20). Für die größten betrachteten

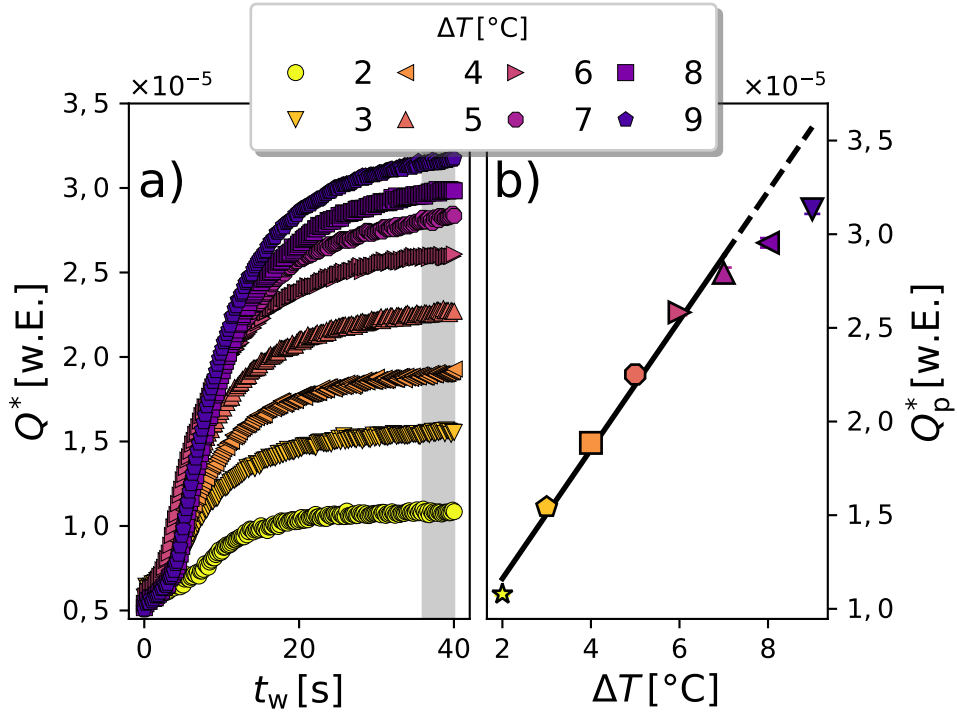


Abbildung 4.20: a) Zeitlicher Verlauf der Streuinvariante während der temperaturinduzierten Phasenseparation einer Lysozymlösung für verschiedene Quenchtiefen  $\Delta T$ . In dem Grau markierten Bereich liegen die Punkte, die zur Berechnung des in b) gezeigten Plateau-Wertes  $Q_p^*$  verwendet wurden.

Quenchtiefen weicht der die Abhängigkeit des Plateau-Wertes von  $\Delta T$  vom linearen Verhalten ab, was ein Indikator für einen kinetischen Stillstand sein könnte. Dieses Verhalten wurde bereits für die Druckserie diskutiert und auch für die temperaturinduzierte LLPS eines BSA-YCl<sub>3</sub> in [Da Vela, Begam u. a., 2020] gefunden. Unter der Anwendung des gleichen Schemas wie bei der Druckserie, zur Bestimmung von Wachstumsraten aus dem exponentiellen Anstieg der Streuintensität für Probenalter

zwischen 4 s und 10 s ergeben sich die in Abbildung 4.21 gezeigten Wachstumsraten und Diffusionskonstanten. Es fällt auf, dass für die temperaturinduzierte LLPS ein

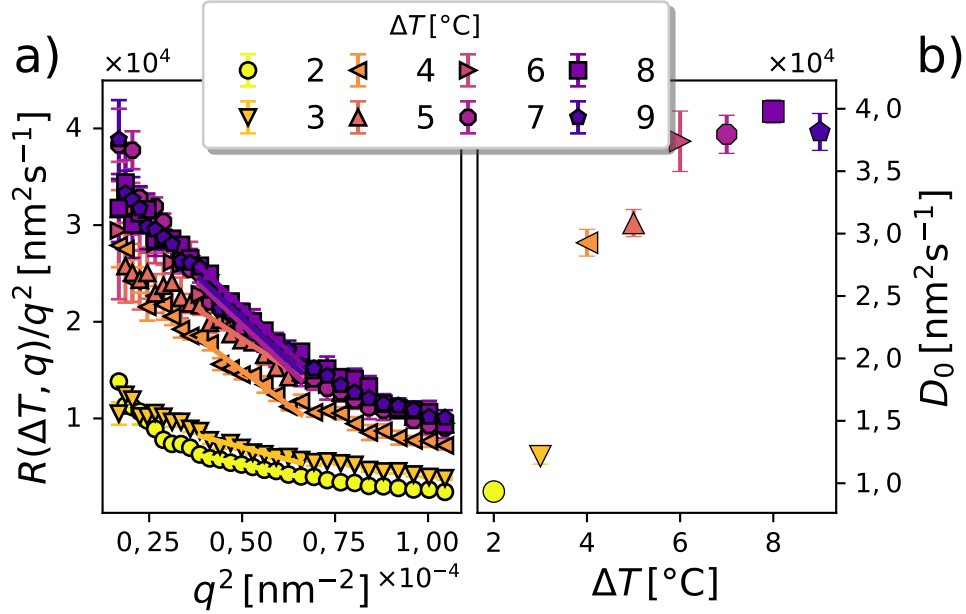


Abbildung 4.21: a) Wachstumsraten der SAXS-Intensität für verschiedene Quenchtiefen. In b) sind die aus den Wachstumsraten berechneten Diffusionskonstanten dargestellt.

schnelleres Wachstum der Streuintensität für große Quenchtiefen stattfindet, was sich in steigenden Wachstumsraten und Diffusionskonstanten mit  $\Delta T$  äußert. Eine mögliche Erklärung für dieses, im Vergleich zur druckinduzierten LLPS gegensätzliche Verhalten, ist die bei der Temperaturserie geringe Kühlrate der Linkam-Stage. Die begrenzte Kühlrate könnte dazu führen, dass in dem hier betrachteten Zeitraum zwischen  $t_w = (4 - 10)$  s die eingestellte Zieltemperatur noch nicht erreicht ist und das System sich somit noch außerhalb eines Gel-Bereiches im Phasendiagramm befindet (vgl. Abbildung 2.3b)). Es kann angenommen werden, dass die Temperatur am Probenort in dem betrachteten Zeitintervall bei den Messungen niedriger ist, die eine kleinere Zieltemperatur ( $\hat{=}$  größere Quenchtiefe) aufweisen. Deshalb könnte das Wachstum für größere Quenchtiefen in der frühen Phase der LLPS schneller sein [Girelli u. a., 2021], einhergehend mit größeren Diffusionskonstanten und Wachstumsraten.

Zur weiteren Untersuchung der LLPS wird die Dynamik in Form der Zwei-Zeiten-Korrelation und den daraus erhaltenen  $g_2$ -Funktionen betrachtet. Für den niedrigsten  $q$ -Wert von  $q = 0,0054 \text{ nm}^{-1}$  sind die TTCs in Abbildung C.29 gezeigt. Anhand der TTCs ist zu erkennen, dass die Phasenseparation für niedrigere Quenchtiefen später einsetzt, bedingt durch die begrenzte Kühlrate der Linkam-Stage. In der späten Pha-

se der LLPS verbreitern sich die TTCs stark, was einer deutlichen Verringerungen der Zerfallsraten entspricht. Außerdem nimmt der Kontrast mit steigender Quenchtiefe zu, was aufgrund des betrachteten  $q$ -Bereichs ein Indiz für die Ausbildung größerer Strukturen ist. Da die TTCs bereits in der frühen Phase der LLPS nicht de-korrelieren, wurden die extrahierten  $g_2$ -Funktionen mit einem exponentiellen Zerfall modelliert. Die erhaltenen Parameter sind in Abbildung 4.22 für  $q = 0,006 \text{ nm}^{-1}$  dargestellt. Die zeitliche Entwicklung der Zerfallsrate weist für alle Quenchtiefen einen exponentiellen Abfall auf (a)). In Abhängigkeit des Probenalters ist außerdem ein Übergang von sub-diffusivem zu super-diffusivem Verhalten zu beobachten (c)). Die starke Alterung des Systems und der Übergang des dynamischen Verhaltens deuten auf eine Zunahme der Viskoelastizität hin [Duri und Cipelletti, 2006; Cipelletti u. a., 2003]. Allerdings muss bei dem Vergleich der zeitlichen Entwicklung der Parameter für unterschiedliche Quenchtiefen möglicherweise eine Verschiebung auf der Zeitachse berücksichtigt werden, da aufgrund der Kühlrate eine nicht quantifizierbare zeitliche Verzögerung bis zum Erreichen der finalen Temperatur auftritt. Dennoch zeigt sich für alle Quenchtiefen einzeln betrachtet qualitativ das obig beschriebene Verhalten. Aus dem gleichen Grund beschränkt sich die Betrachtung der Dynamik in Abhängigkeit von  $\Delta T$  auf späte Zeiten ( $t_w > 15 \text{ s}$ ). Die Zerfallsrate zeigt, wie auch bei der druckinduzierten LLPS, einen nicht-monotonen Verlauf mit der Quenchtiefe  $\Delta T$  (s. Abbildung 4.22b)). Die Dynamik ist für die kleinsten betrachteten Quenchtiefen am schnellsten, erreicht ein Minimum bei  $\Delta T = 4^\circ\text{C}$  und wird mit weiter steigendem  $\Delta T$  wieder schneller. Dabei ist der Anstieg von  $\Gamma_1$  für frühe Zeiten ( $t_w < 20 \text{ s}$ ) deutlicher ausgeprägt und steigt mit  $\Delta T$  für  $t_w \geq 20 \text{ s}$  nur noch leicht an. Begleitet wird dieses Verhalten der Zerfallsrate von einer Zunahme der Superdiffusivität (vgl. Abbildung 4.22d)). Für  $t_w = 25 \text{ s}$  ist eine lineare Dispersion von  $\Gamma_1$  und keine erkennbare Abhängigkeit für  $\gamma_1$  von  $q$  zu erkennen (vgl. Abbildung C.33). Für  $t_w < 25 \text{ s}$  hingegen sinkt der Kontrast mit steigendem  $q$  stark, sodass keine Aussagen in diesem Zeitintervall getroffen werden können.

Die gefunden Erkenntnisse über die Dynamik sind in Übereinstimmung mit denen der temperaturinduzierten LLPS eines IgG-PEG Systems [Girelli u. a., 2021], bei dem, gestützt durch numerische Simulation, ebenfalls eine Zunahme der Viskoelastizität zu einer schnelleren Dynamik des Systems führt, die mit steigender Quenchtiefe weiter ansteigt. Zudem ist die quenchtiefenabhängige Dynamik für  $\Delta T > 4^\circ\text{C}$  im Einklang mit den Resultaten aus der Wachstumskinetik (s. Abbildung 4.21), da sowohl die Wachstumsrate  $R(\Delta T)$  als auch die Zerfallsrate  $\Gamma_1$  mit steigender Quenchtiefe zunehmen, wodurch geschlossen werden kann, dass der schnelle Zerfall die Bildung der kondensierten Phase widerspiegelt. Abschließend sei erwähnt, dass die gefundene Kopplung zwischen der kinetischen Wachstumsrate und der dynamischen Zerfallsrate (siehe Abbildung C.34) bisher nicht beobachtet wurde, sondern für beispielsweise ein BSA-YCl<sub>3</sub> System die Zerfallsraten  $\Gamma_1$  um einen Faktor 40 größer sind, als die Wachstumsrate [Ragulskaya u. a., 2021]. Allerdings wird für das genannte System eine Kopplung zwischen dem langsamen Zerfall und der Wachstumsrate gefunden. Der exponentielle Anstieg der Zerfallsrate in der frühen Phase der LLPS ist wiederum in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen in [Ragulskaya u. a., 2021].

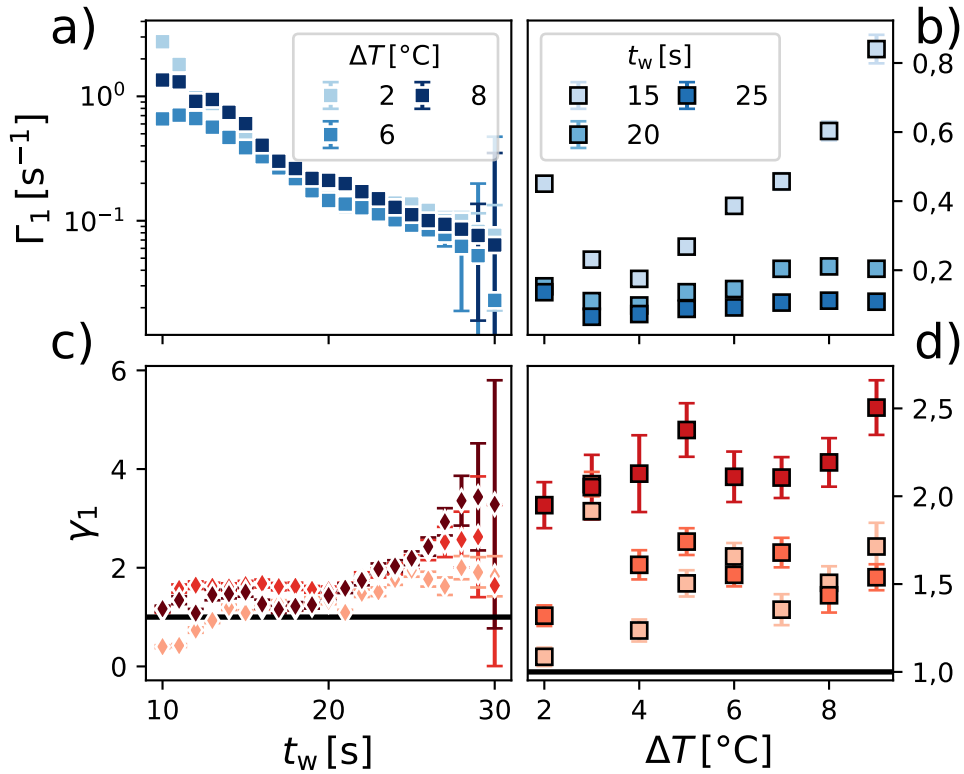


Abbildung 4.22: Zerfallsrate  $\Gamma_1$  und KWW-Exponent  $\gamma_1$  in Abhängigkeit des Probenalters (a) und c)) und in Abhängigkeit der Quenchtiefe (b) und d) für  $q = 0,006 \text{ nm}^{-1}$ . Die Farbsättigung der Legenden aus a) und b) ist auf die in c) und d) gezeigten Daten übertragbar.

Eine mögliche Ursache für das in dieser Arbeit gefundene abweichende Verhalten könnte in den unterschiedlichen Molekulargewichten der betrachteten Proteine Lysozym ( $M_{\text{Lys}} = 14,6 \text{ kDa}$ ) und BSA ( $M_{\text{BSA}} = 66,5 \text{ kDa}$ ) liegen. Das deutlich kleinere Molekulargewicht von Lysozym lässt die Vermutung zu, dass ein noch schnellerer Prozess, der aufgrund der limitierten Zeitauflösung nicht beobachtbar ist, dem in [Ragulskaya u. a., 2021] als schneller Zerfall identifizierte entspricht.

Zusätzlich zu den Messungen der frühen Phase der LLPS, wurden an einem System der gleichen Komposition lange Messungen mit einer Gesamtdauer von 440s durchgeführt. Für Probenalter  $t_w < 40 \text{ s}$  ergibt sich qualitativ das gleiche Verhalten, wie bei den zuvor vorgestellten Messungen, weshalb sich die nachfolgenden Ausführungen nur mit Zeiten  $t_w > 40 \text{ s}$  befassen. Die TTCs der langen Messungen sind in Abbildung C.30 für  $q = 0,0054 \text{ nm}^{-1}$  dargestellt. Anhand der TTCs ist zu erkennen, dass sich bereits unmittelbar nach Beginn der Phasenseparation die Korrelation stark verbreitert und in dem betrachteten Zeitbereich auch nicht vollständig dekorreliert. Dieses Verhalten entspricht einem dynamischen Stillstand. Der Stillstand kann in die-

sem Fall nicht durch die Wachstumskinetik bestätigt oder widerlegt werden, da sich die Größe der Strukturen außerhalb des zugänglichen  $q$ -Bereichs befinden. Werden aus den TTCs über Schnitte probenalterabhängige  $g_2$ -Funktionen extrahiert, ist der dynamische Stillstand deutlich zu erkennen (vgl. Abbildungen 4.23, C.31 und C.32). Bereits nach 100 Sekunden liegen die gemessenen Dekorrelationszeiten  $\tau = 1/\Gamma$  bei mehreren hundert Sekunden. Da die  $g_2$ -Funktionen nicht vollständig dekorrelieren

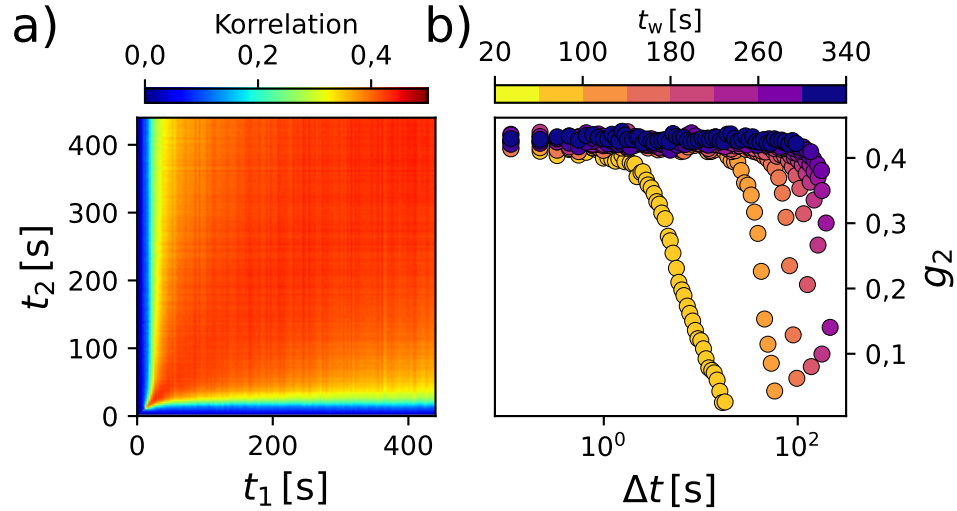


Abbildung 4.23: TTC und  $g_2$  Funktionen während der temperaturinduzierten LLPS mit einer Quenchtiefe von  $\Delta T = 9^\circ\text{C}$  bei  $q = 0,0054 \text{ nm}^{-1}$ .

und sich auch kein Plateau  $f$  für große  $\Delta T$  erkennen lässt, ist eine präzise Modellierung für große Zeiten nicht möglich. Wird jedoch eine vollständige Dekorrelation unterstellt, können aus den  $g_2$ -Funktionen, unter Verwendung eines exponentiellen Zerfalls, Zerfallsraten und KWW-Exponenten bestimmt werden. Die Resultate aus den Modellierungen sind in Abbildung 4.24 zusammengefasst. In Abhängigkeit des Probenalters ist eine leichte Abnahme der Superdiffusivität und ein exponentieller Abfall der Zerfallsrate zu beobachten (a) und d)). Die sehr hohen KWW-Exponenten für große Quenchtiefen resultieren aus der geringen Anzahl an Datenpunkten, die zur Dekorrelation der  $g_2$ -Funktionen beitragen, weshalb die Modellierung eine starke Stauchung des exponentiellen Abfalls ergibt. In Abhängigkeit der Quenchtiefe lässt sich außerdem eine leichte Zunahme der Zerfallsrate für  $t_w = 150 \text{ s}$  beobachten (Abbildung 4.24b)), wie es auch bereits in der frühen Phase der LLPS ( $t_w < 40 \text{ s}$ , vgl. Abbildung 4.22b)) der Fall war. Der Grad der Superdiffusivität zeigt einen linearen Anstieg (ausgenommen  $\Delta T > 7^\circ\text{C}$ ) mit  $\Delta T$ , was in Abbildung 4.24e) dargestellt ist. Die zuvor gefundene ballistische Dispersion für Zeiten  $t_w < 40 \text{ s}$  bleibt in der späten Phase der LLPS ( $t_w = 150 \text{ s}$ ) nicht erhalten. Stattdessen ist  $\Gamma_1$  für alle Quenchtiefen im betrachteten  $q$ -Bereich konstant (Abbildung 4.24c)). Zuletzt lässt anhand von Abbildung 4.24f) ein nahezu linearer Abfall der KWW-Exponenten mit  $q$  beob-



achten, wobei  $\gamma_1$  für die größten betrachteten  $q$  und kleine  $\Delta T$  in den Bereich der Subdiffusion übergeht.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus der Dynamik während der temperaturinduzierten LLPS gleichen in vielen Punkten der Dynamik, wie sie beispielsweise in kolloidalen Gelen auftritt [Jain u. a., 2020; Gao u. a., 2015; Duri und Cipelletti, 2006; Cipelletti u. a., 2003], weshalb auch bei der temperaturinduzierten LLPS von einem Gelübergang für große Zeiten ausgegangen werden kann.

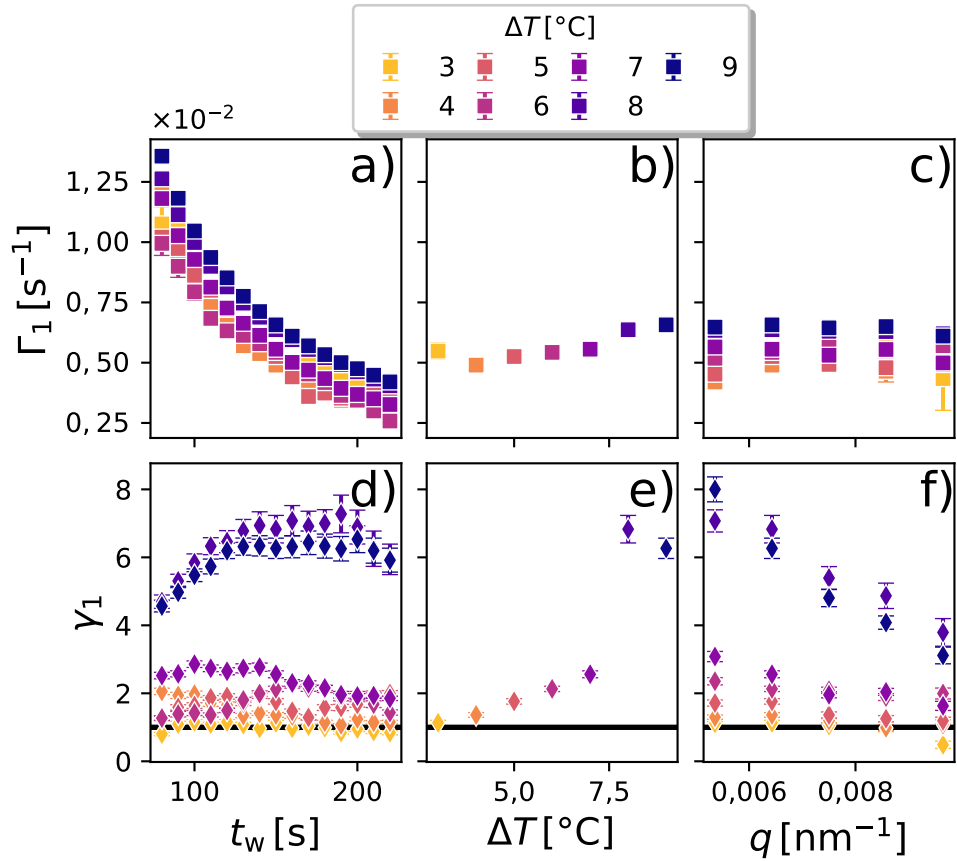


Abbildung 4.24: Parameter aus der Modellierung der  $g_2$ -Funktionen aus der späten Phase der LLPS für alle untersuchten Quenchtiefen. In a)-c) ist die Zerfallsrate in Abhängigkeit des Probenalters  $t_w$ , der Quenchtiefe  $\Delta T$  und des Wellenvektorübertrags  $q$  gezeigt. Die gleichen Abhängigkeiten sind für den KWW-Exponenten in d)-e) dargestellt. Die vom Probenalter abhängigen Daten wurden für  $q = 0,006 \text{ nm}^{-1}$ , die quenchtiefenabhängigen Daten für den selben  $q$ -Wert bei  $t_w = 150 \text{ s}$  und die  $q$ -abhängigen Daten ebenfalls für  $t_w = 150 \text{ s}$  bestimmt.

## 4.2 Diffusion von Proteinen in homogenen Lösungen

Die vorherigen Kapitel befassten sich mit der Charakterisierung von Proteinlösungen während eines Nicht-Gleichgewichts-Prozesses, nämlich der flüssig-flüssig Phasenseparation. Ein weiterer Aspekt, der helfen kann ein besseres Verständnis für die LLPS zu erhalten, ist die Untersuchung der Dynamik und intermolekularen Wechselwirkung von homogenen Proteinlösungen unter Bedingungen nahe der Phasengrenze. Für das Protein Lysozym wurde die intermolekulare Wechselwirkung bereits in Abhängigkeit von vielen Parametern mittels SAXS untersucht [Schroer, Markgraf u. a., 2011; Schulze u. a., 2016; Möller, Schroer u. a., 2012; Möller, Grobely, Schulze, Steffen u. a., 2014; Julius, Weine, Gao u. a., 2019]. Es existieren ebenfalls viele Studien, die sich zur Charakterisierung der Dynamik der dynamischen Lichtstreuung bedienen [Kuehner u. a., 1997; Muschol und Rosenberger, 1995; Parmar und Muschol, 2009; Li, Lubchenko u. a., 2011]. Gerade bei der Untersuchung von konzentrierten Lösungen, bringt die DLS-Technik Einschränkungen, wie die Mehrfachstreuung, mit sich. Durch Mehrfachstreuung werden kleinere hydrodynamische Radii detektiert, als sie tatsächlich in der Lösung vorliegen. Es existieren Ansätze um die Detektion von Mehrfachstreuung zu unterdrücken, wie beispielsweise die Verwendung von Rückstreuoptiken [Kaszuba u. a., 2007]. Es gibt jedoch weitere Gründe, warum die Untersuchung der Dynamik mittels Röntgenstreuung von großem Interesse ist. Im Vergleich zu SAXS/XPCS ist, aufgrund der Wellenlänge der verwendeten Strahlung, die Dynamik nur auf sehr großen Längenskalen mit DLS charakterisierbar. Zusätzlich können SAXS/XPCS-Messungen, an verdünnten Lösungen, auch Informationen über die Form der streuenden Partikel liefern, wohingegen DLS nur den hydrodynamischen Radius liefert. Dennoch bietet DLS auch abhängig vom betrachteten Probensystem Vorteile gegenüber SAXS/XPCS-Messungen, da die Durchführung eines DLS Experiments einen deutlich geringeren Aufwand erfordert, einen höheren Kontrast liefert, kleinere Zeitskalen zugänglich macht, und bei schwach streuenden Probensystemen keine strahleninduzierten Effekte hervorgerufen werden. Für homogene Proteinlösungen sind vor allem die beiden zuletzt genannten Punkte relevant.

In der Literatur gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von mesoskopischen Clustern in konzentrierten Lysozymlösungen im Größenbereich zwischen 30 nm und 100 nm, deren Existenz und Ursprung in der Vergangenheit stark diskutiert wurde [Stradner, Sedgwick u. a., 2004; Stradner, Cardinaux u. a., 2008; Shukla u. a., 2008]. Die Existenz der Cluster in konzentrierten Lysozymlösungen konnte einige Zeit später bestätigt und zusätzlich für weitere kolloidale Systeme beobachtet werden [Cardinaux, Zaccarelli u. a., 2011]. In einer aktuellen Studie wird die Ursache der Clusterbildung in Verunreinigungen und/oder der Existenz geringer Mengen partiell entfalteter Lysozymmonomere vermutet, die während der Reinigung oder Lyophilisierung in die Proben gelangen [Nikfarjam u. a., 2019], weshalb die Größe der Cluster sowohl hersteller- als auch chargenabhängig ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Monomeren in der Lösung mit steigender Proteinkonzentration sinkt [Kowalczyk u. a., 2011; Nikfarjam u. a., 2019], weshalb in stark verdünnten Lösungen (z.B.  $c_p \leq 5$  mg/mL bei Formfaktormessungen) keine Cluster zu sehen sind. Durch

Filterung der Lysozymbiosungen mit 20 nm Spritzenfiltern konnten die Cluster vollständig entfernt und auch nach mehreren Tagen keine Neubildung beobachtet werden [Nikfarjam u. a., 2019].

Die Existenz und der Einfluss von Lysozymclustern in konzentrierten Lösungen wird unter anderem in den nachfolgenden Ausführungen zu den XPCS- und DLS-Resultaten diskutiert.

#### 4.2.1 Charakterisierung der Diffusion mittels XPCS

Die hier vorgestellten Messungen dienen lediglich zur Demonstration der Durchführbarkeit von XPCS-Messungen an konzentrierten Lysozymbiosungen in der homogenen Phase und wurden deshalb nicht systematisch in Abhängigkeit weiterer Parameter untersucht. Das allgemeine Vorgehen und die experimentellen Parameter wurden bereits in Abschnitt 3.3.2 vorgestellt.

Die untersuchten Lysozymbiosungen haben eine Proteinkonzentration von  $c_p = 200 \text{ mg/mL}$ , einen pH Wert von 7 und die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Filterung von Messungen mit parasitären Streubeiträgen und der Berechnung der Korrelationsfunktionen jeder Bildserie, wurde aus den resultierenden  $g_2$ -Funktionen eine mittlere Korrelationsfunktion bestimmt. Aufgrund der niedrigen Zählraten pro Exposition, kommt es bei der Berechnung von Korrelationsfunktionen zu sehr kleinen Normierungsfaktoren, die einen unrealistisch hohen Kontrast liefern. Durch die Modellierung der gemittelten  $g_2$ -Funktionen können trotzdem Zerfallsraten und KWW-Exponenten bestimmt werden. Dazu wurden die in Abbildung 4.25 dargestellten Korrelationsfunktionen mit einem exponentiellen Zerfall und einer *baseline* modelliert. Der Ursprung der nicht verschwindenden Korrelation ( $\lim_{\Delta t \rightarrow \infty} g_2 \neq 1$ ) konnte nicht abschließend geklärt werden, kann jedoch ebenfalls mit den niedrigen Zählraten zusammenhängen. Da die Werte der  $g_2$ -Funktionen stark fluktuieren, wurde zur besseren Übersicht jede Korrelationsfunktion einzeln dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fluktuationen mit steigendem  $q$  zunehmen und sich für den größten gezeigten  $q$ -Wert nur noch geringfügig vom Rauschen unterscheiden. Die aus den Anpassungen gewonnenen Parameter sind in Abbildung 4.26 gezeigt. Die gefundenen KWW-Exponenten sind für alle betrachteten  $q$  kleiner als eins, sodass von einer sub-diffusiven Bewegung ausgegangen werden kann. Die Beurteilung der  $q$ -Abhängigkeit von  $\Gamma$  ist schwierig, da nur drei verwertbare Datenpunkte vorliegen. In diesem  $q$ -Bereich steigen die ersten drei Zerfallsraten stark an, wie es aufgrund kleinerer Längenskalen zu erwarten ist. Die Zerfallsrate steigt dabei von  $27 \text{ s}^{-1}$  für den kleinsten  $q$ -Wert auf ungefähr  $350 \text{ s}^{-1}$  für  $q = 0,025 \text{ nm}^{-1}$  an, was einer Dekorrelationszeit von 2,9 ms entspricht. Unter Verwendung der Zerfallsraten für die ersten drei  $q$ -Werte, kann über die Relation  $\Gamma = D_0 q^2$  und über die Stokes-Einstein Beziehung (Gleichung 2.107), nach einer Abschätzung der Viskosität, der hydrodynamische Radius bestimmt werden. Die Viskosität wurde unter Verwendung von [Monkos, 1997;

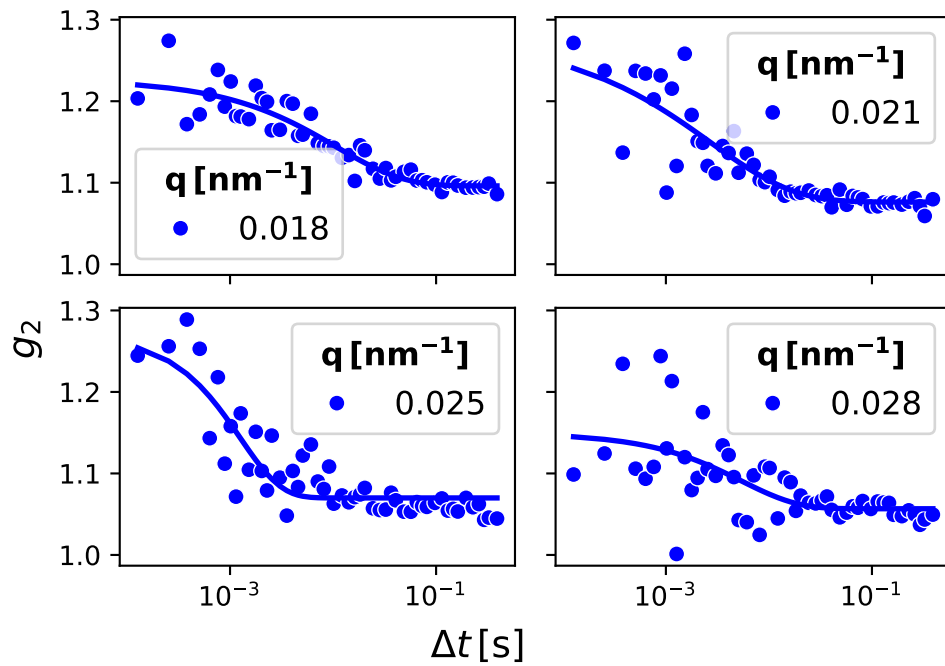


Abbildung 4.25: Gemittelte Autokorrelationsfunktionen für verschiedene  $q$ -Werte aus 710 Messungen mit jeweils 4000 Expositionen.

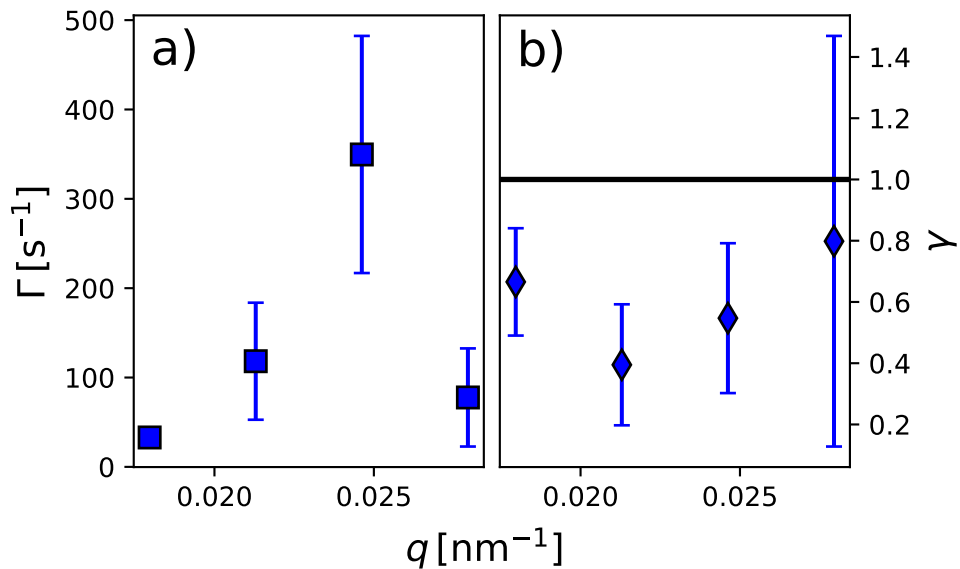


Abbildung 4.26: a) Zerfallsraten  $\Gamma$  und b) KWW-Exponenten  $\gamma$  in Abhängigkeit von  $q$  für die Dynamik einer homogenen Lysozymlösung bei Raumtemperatur.

Mooney, 1951]

$$\eta = \eta_{\text{H}_2\text{O}} e^{S\phi/(1-K\phi)} \quad (4.12)$$

berechnet. Dabei bezeichnen  $S$  und  $K$  zwei vom verwendeten Protein und vom Lösungsmittel abhängige Parameter. Die daraus erhaltene Viskosität ergibt sich für eine Lysozymlösung mit  $c_p = 200 \text{ mg/mL}$  bei einer Temperatur von  $293,15 \text{ K}$  zu  $\eta = 3,14 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ . Der resultierende hydrodynamische Radius beträgt  $R_h = 61 \pm 13 \text{ nm}$  und liegt somit im Größenbereich der in [Nikfarjam u. a., 2019] gefundenen Cluster. Zur Überprüfung dieser Resultate, wurden DLS-Messungen an gefilterten Lysozymlösungen durchgeführt, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

#### 4.2.2 Charakterisierung der Diffusion mittels DLS

Die in diesem Abschnitt vorgestellten DLS-Messungen wurden an Lysozymlösungen mit einer Proteinkonzentration von  $c_p = 170 \text{ mg/mL}$  bei pH 7 und ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Zusätzlich wurde bei den DLS-Messungen die Proteinlösung mit Whatman©Anotop©(Merck: WHA68091122) Spritzenfilter unterschiedlicher Porengröße gefiltert, um den Einfluss von Clustern im Größenbereich zwischen 30 nm und 100 nm zu untersuchen [Nikfarjam u. a., 2019]. Die Porengrößen der Filter betragen 20 nm, 100 nm und 200 nm. Außerdem wurden Messungen an ungefilterten Proben durchgeführt.

Die gemessenen  $g_2$ -Funktionen sind für alle verwendeten Filter in Abbildung 4.27 für  $q$ -Werte zwischen  $6,85 \mu\text{m}^{-1}$  und  $25,55 \mu\text{m}^{-1}$  abgebildet. Anhand der Korrelationsfunktion ist zu erkennen, dass die mit einem 100 und einem 200 Nanometer Filter gefilterten Proben zwei deutliche Zerfälle aufweisen (s. Abbildung 4.27b) und c)). Das Filtrieren der Lysozymlösung mit einem 20 Nanometer Filter führt dazu, dass nur noch ein Zerfall sichtbar ist und die Dekorrelationszeiten abnehmen. Für die ungefilterte Probe ist ebenfalls nur ein Zerfall sichtbar, der die Überlagerung einer Größenverteilung von Clustern widerspiegelt. Durch die Modellierung der  $g_2$ -Funktionen, analog zu den XPCS-Messungen, können Zerfallsraten und KWW-Exponenten extrahiert werden. Dabei werden für die ungefilterte und die 20 nm-gefilterte Proben ein exponentieller Zerfall und für die übrigen Proben zwei Zerfälle verwendet. Außerdem fällt auf, dass sich für alle betrachteten Proben die Dekorrelationszeiten mit steigendem  $q$  zu kleineren Werten verschieben, was im Folgenden genauer diskutiert wird.

Beginnend mit der ungefilterten Probe, zeigt die Zerfallsrate eine starke  $q$ -Abhängigkeit ( $\Gamma \propto q^4$ ) und sub-diffusives Verhalten (vgl. Abbildung C.35). Die Ursache liegt in der bereits erwähnten Polydispersität des Systems, weshalb auf eine ausführliche Analyse und Bestimmung einer Größenverteilung verzichtet wird. Im nächsten Schritt werden die gefilterten Proben miteinander verglichen. Für Porengrößen oberhalb von 20 nm sind die Parameter der beiden Zerfälle in Abbildung 4.28 grafisch dargestellt. Für den schnellen Zerfall ( $\Gamma_1, \gamma_1$ ) sind die beiden Parameter nahezu identisch und zeigen in jedem Fall eine quadratische Dispersion  $\Gamma_i \propto q^2$ . Für den schnellen Zerfall wird ein näherungsweise diffusives

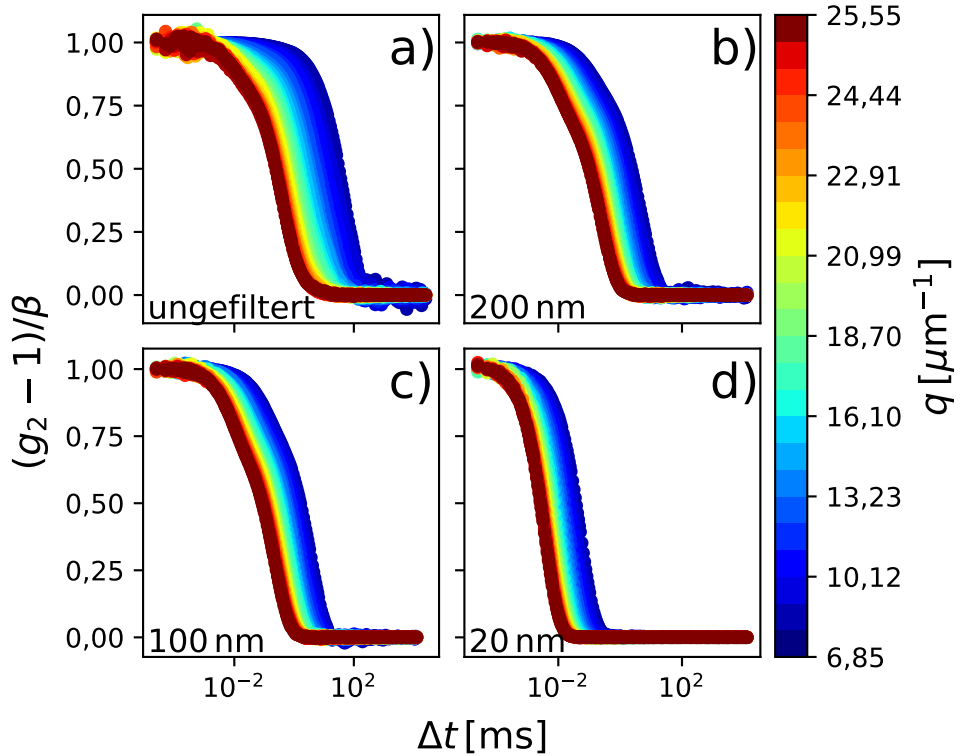


Abbildung 4.27: a) Gemessene Korrelationsfunktionen einer ungefilterten, konzentrierten Lysozymlösung. In b)-d) sind die  $g_2$ -Funktionen für gefilterte Proben gezeigt.

Verhalten beobachtet  $\gamma_1 \approx 1$ , wohingegen für den langsamen Zerfall ein sub-diffusives ( $\gamma_2 < 1$ ) Verhalten vorliegt. Die Zerfallsrate der 20 nm-gefilterten Lösung ist um ungefähr einen Faktor zwei kleiner, als die Zerfallsraten  $\Gamma_1$  der anderen gefilterten Proben. Die Parameter der 20 nm gefilterten Probe sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Auch für diese Probe zeigt sich eine quadratische Dispersionsrelation und die KWW-Exponenten deuten auf einen schwach sub-diffusives Verhalten hin. Die Abweichungen von ideal diffusivem Verhalten liegen bei maximal 7%. Analog zu den im vorherigen Abschnitt 4.2.1 vorgestellten XPCS-Messungen können nach Abschätzung der Viskosität (Gleichung 4.12) hydrodynamische Radii aus der Dispersion der Zerfallsrate bestimmt werden. In Tabelle 4.1 ist eine Zusammenfassung der ermittelten hydrodynamischen Radii gegeben. Für die mit 200 und 100 Nanometer Filtern gefilterten Proben liegt der hydrodynamische Radius aus dem schnellen Zerfall  $R_{h,1}$  im Bereich des Literaturwertes von  $R_h = (1,85 \pm 0,05) \text{ nm}$  [Parmar und Muschol, 2009; Nikfarjam u. a., 2019]. Da allerdings die Messungen an konzentrierten Proteinlösungen durchgeführt wurden, scheint dieses Ergebnis zufällig zu sein und eher aus interagierenden, kleineren (kleiner als die aus dem zweiten Zerfall

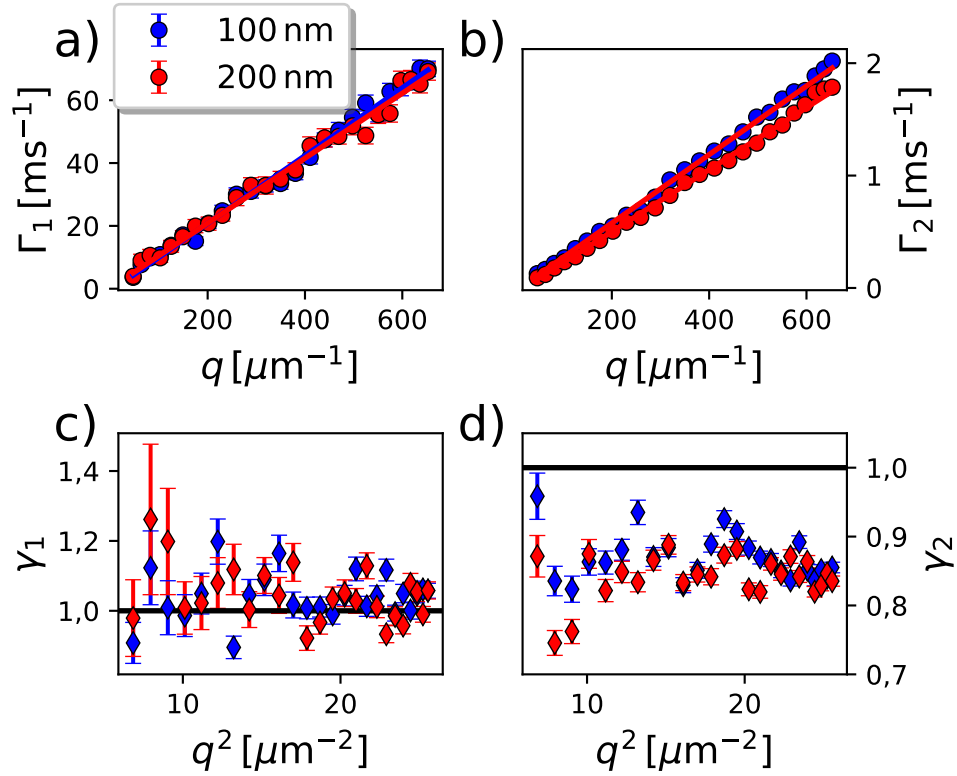


Abbildung 4.28: Zerfallsraten des schnellen (a)) und des langsamen (b)) Zerfalls in Abhängigkeit von  $q$  für gefilterte Lysozym-Lösungen mit Filtern unterschiedlicher Porengröße. In c)-d) sind die jeweiligen KWW-Exponenten gezeigt.

resultierenden) Clustern zu stammen. Denn aufgrund von nicht vernachlässigbaren Wechselwirkungen mit steigender Proteinkonzentration sollten signifikant kleinere  $R_h$  gemessen werden. Beispielsweise wird für eine Lysozymkonzentration von 60 mg/mL bereits von einem hydrodynamischen Radius von 1,2 nm berichtet [Nikfarjam u. a., 2019]. Die Größe der Cluster aus dem zweiten Zerfall liegen ebenfalls in dem in der Literatur angegebenen Bereich von 30 nm bis 100 nm. Bestätigt wird die Vermutung, dass es sich bei dem schnellen Zerfall nicht um Lysozym Monomere handeln kann, durch die Betrachtung der mit 20 nm Filtern gefilterte Probe. Die  $g_2$ -Funktionen und die Dispersion belegen eindeutig, dass es sich um ein monodisperses System handelt und der resultierende hydrodynamische Radius ist mit  $R_{h,1} = 0,92$  nm um einen Faktor zwei kleiner, als der in einer verdünnten Lösung gemessene  $R_h$ .

Bei den SAXS/XPCS-Messungen, die an einer 200 nm-gefilterten Probe durchgeführt wurden, kam bereits die Vermutung auf, dass nicht die Diffusion einzelner Proteine, sondern die der Cluster gemessen wurde. Belegt wird dies durch den Vergleich des hydrodynamischen Radius aus den XPCS- und DLS-Messungen



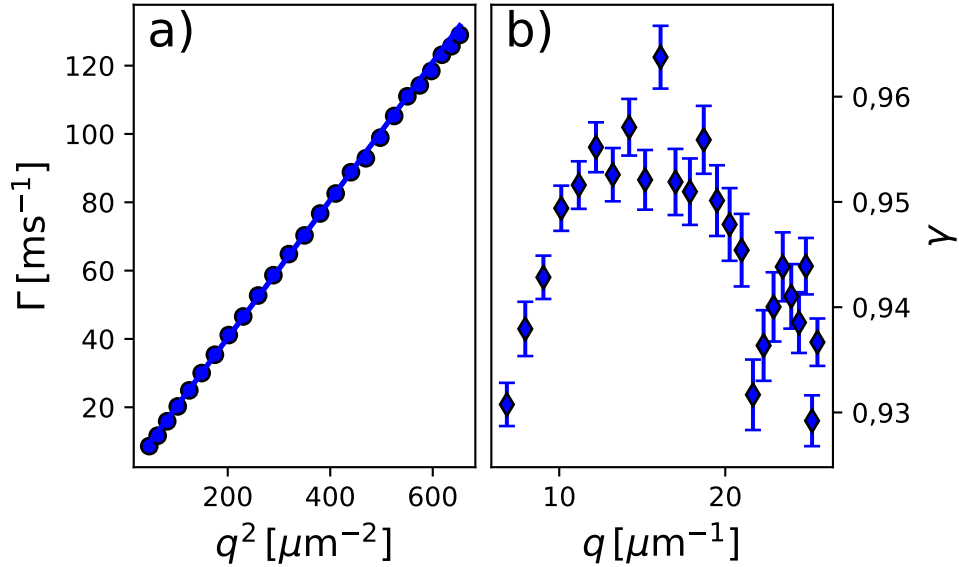


Abbildung 4.29: a) Zerfallsrate und b) KWW-Exponent in Abhängigkeit von  $q$  für eine gefilterte Lysozymbilösung mit einer Filtergröße 20 nm.

Filtergröße [nm]	$R_{h,1}$ [nm]	$R_{h,2}$ [nm]	$R_{h,2}^{\text{XPCS}}$ [nm]
200	$1,81 \pm 0,02$	$67,80 \pm 0,06$	$61 \pm 13$
100	$1,66 \pm 0,01$	$58,70 \pm 0,06$	-
20	$0,92 \pm 0,00$	-	-

Tabelle 4.1: Hydrodynamischer Radius berechnet aus der Steigung von  $\Gamma_i \propto q^2$  für gefilterte Lysozymbilösungen mit unterschiedlichen Filtergrößen.

(s. Tabelle 4.1). Der aus den XPCS-Messungen ermittelte hydrodynamische Radius stimmt, im Rahmen des Fehlers, mit dem hydrodynamischen Radius aus dem zweiten Zerfall der DLS-Messungen überein. Zusätzlich fällt beim Vergleich der Dekorrelationszeiten aus den XPCS- und DLS-Messungen bei  $q = 0,021 \text{ nm}^{-1}$  ( $\tau_{\text{DLS}} = 0,88 \text{ ms}$  und  $\tau_{\text{XPCS}} = 8,70 \text{ ms}$ ) auf, dass die Dekorrelationszeit aus den XPCS-Messungen um einen Faktor zehn über der aus dem langsamen Zerfall der DLS-Messungen liegt. Die Diskrepanz der beiden Dekorrelationszeiten kann durch die höhere Proteinkonzentration bei den XPCS-Messungen begründet werden. Zur Messung der Dynamik von Lysozymmonomeren mittels XPCS, geben die DLS-Daten eine Dekorrelationszeit von  $15 \mu\text{s}$  vor, was eine Größenordnung unter der maximalen Bildrate des verwendeten Detektors liegt.

## Kapitel 5

# Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Kinetik und Dynamik in konzentrierten Proteinlösungen mittels XPCS untersucht. Diese wurden während der temperatur- und druckinduzierten flüssig-flüssig Phasenseparation und unter dem Einfluss von Crowdern betrachtet. Zusätzlich wurde die Dynamik in homogenen Proteinlösungen untersucht. Ergänzend zu den XPCS-Messungen wurden DLS-Messungen an homogenen Lysozymlösungen durchgeführt.

Aus der zeitlichen Verschiebung der Position des Maximums im SAXS-Signal während der druckinduzierten LLPS konnte die Entwicklung der Korrelationslänge in Abhängigkeit der Quenchtiefe untersucht werden. Dabei ergab sich eine Verlangsamung des Wachstums und eine Ausbildung kleinerer Strukturen mit steigender Quenchtiefe. Außerdem konnten Wachstumsraten aus dem exponentiellen Anstieg der Streuintensität in der frühen Phase der druckinduzierten LLPS bestimmt werden, woraus wiederum relative Konzentrationen der kondensierten Phase in Bezug auf den Glasübergang bestimmt werden konnten. Die relativen Konzentrationen näherten sich mit steigender Quenchtiefe dem Glasübergang auf bis zu 94 % an. Informationen über die Dynamik konnten durch Betrachtung von TTCs und probenalterabhängigen Schnitten gewonnen werden. Die  $g_2$ -Funktionen zeigten zwei Zerfälle, wobei der langsame Zerfall in manchen Fällen einen geringen Kontrast aufweist. Aus der Modellierung der  $g_2$ -Funktionen wurden Zerfallsraten und KWW-Exponenten bestimmt, durch die Aussagen über die Art der Dynamik getroffen werden konnten. Dabei beschreibt der schnelle Zerfall eine super-diffusive ballistische und der langsame Zerfall eine sub-diffusive Bewegung ohne erkennbare Dispersion. Der erste Zerfall spiegelt die Bildungsdynamik der kondensierten Phase und der zweite Zerfall dessen Wachstum wieder. Aus der Betrachtung des NEP in Abhängigkeit der Quenchtiefe und in Verbindung mit der Alterung des Systems, konnte geschlussfolgert werden, dass die druckinduzierte LLPS in konzentrierten Lysozymlösungen die Ausbildung eines Gelnetzwerkes für große Drucksprünge begünstigt.

Zusätzlich zu der LP-LLPS, wurde die HP-LLPS in Lysozymlösungen untersucht und ergab ein schnelleres initiales Wachstum während der HP-LLPS, das jedoch in der späten Phase der LLPS verlangsamt war. Dieses Verhalten wurde ebenfalls in der Dynamik beobachtet, bei der zu Beginn der HP-LLPS größere und in der späten Phase kleine Zerfallsraten gefunden wurden.

Zur Untersuchung des Einflusses großer Quenchtiefen auf die Kinetik und Dynamik der LLPS, bietet es sich an die Probenkomposition und die Temperatur so zu anzu-

passen, dass größere  $\Delta p$  erreicht werden können. Für weiterführende Messungen und zu einem besseren Vergleich der HP- und LP-LLPS wären außerdem quenchtiefen-abhängige Messungen im Hochdruckbereich von großem Wert.

Ein weiterer untersuchter Einflussfaktor auf die Kinetik und Dynamik der druckinduzierten LLPS in Lysozymlösungen stellten in dieser Arbeit Crowder (PEG) unterschiedlicher Molekulargewichte dar. Dabei wurde die Konzentration der Crowder konstant unterhalb ihrer jeweiligen Überlappungskonzentrationen gehalten. Für beide betrachteten Crowder ergab sich eine deutlich langsamere Wachstumskinetik als in Lösungen ohne Crowder, die für das leichtere PEG (PEG2k) stärker betont war. Die erhaltenen Korrelationslängen waren ebenfalls kleiner als für die LLPS ohne Crowder. Ein kinetischer Stillstand, trat nur für späte Zeiten bei der PEG2k Probe auf mit einem inversen Wachstumsexponenten von  $n = 24,2$  und beide Proben zeigten im Bezug auf die Dynamik keinen Stillstand. In Übereinstimmung mit der Kinetik, ist die Dynamik in der frühen Phase der LLPS für die PEG2k Probe langsamer als in der PEG4k Probe. Die langsamere Dynamik für PEG2k in der frühen Phase der LLPS resultiert wahrscheinlich aus der Abnahme der kurzreichweitigen attraktiven Wechselwirkungen mit steigendem PEG-Molekulargewicht [Julius, 2019].

Eine systematische Untersuchung der Kinetik und Dynamik der druckinduzierten LLPS in Abhängigkeit des PEG-Molekulargewichts und dessen Konzentration, könnte dabei helfen den Einfluss des effektiven Größenverhältnisses zwischen PEG und Lysozym auf die LLPS besser zu verstehen. Vor allem interessant wären Betrachtungen der Dynamik nahe der Überlappungskonzentration der Polymere, da dort, durch die Verschränkung der Polymere, starke Änderungen zu erwarten sind.

Analog zu den Drucksprüngen, wurde die temperaturinduzierte LLPS in Lysozymlösungen in Abhängigkeit der Quenchtiefe untersucht. Dabei ergab sich eine deutlich schnellere, exponentielle Alterung des Systems in der frühen Phase der LLPS, im Vergleich zur linearen Alterung für die druckinduzierte LLPS. Aufgrund der schnellen Alterung, war die Modellierung der Autokorrelationsfunktionen nur mit einem exponentiellen Zerfall möglich. Bis auf die Alterung des Systems, konnte qualitativ die gleiche Dynamik, wie bei der druckinduzierten LLPS beobachtet werden, nämlich eine super-diffusive ballistische Bewegung. In der späten Phase der LLPS trat außerdem ein dynamischer Stillstand für große Quenchiefen auf. Im Fall der SAXS-Daten, war außerdem kein Maximum in der Streuintensität zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Strukturen makroskopisch groß sind und das Maximum unterhalb des kleinsten messbaren  $q$ -Wertes liegen. Dennoch konnten Streuinvarianten und Wachstumsraten der SAXS-Intensität bestimmt werden. Für hohe Quenchiefen ergab sich ebenfalls eine Abnahme des Wachstums der Streuinvarianten, was auf die Annäherung an einen kinetischen Stillstand hindeutet. Interessanterweise ist das Verhalten der Zerfallsrate aus den SAXS-Daten für die temperaturinduzierte LLPS genau gegensätzlich zu dem Verhalten der druckinduzierten LLPS und zeigt ein schnelleres Wachstum für große Quenchiefen. Eine mögliche Ursache dafür ist die begrenzte Kühlrate des experimentellen Aufbaus, wodurch, im Zeitintervall in dem die Wachstumsraten bestimmt wurden, die Proben noch nicht bis zur Gelierungstemperatur abgekühlt sind und somit die LLPS für große Quenchiefen schneller abläuft.

Zur Untersuchung der druckinduzierten LLPS in konzentrierten  $\gamma$ D-Kristallin Lösungen, wurde die LLPS für zwei unterschiedliche Konzentrationen betrachtet. Die Wachstumsexponenten aus dem zeitlichen Verlauf der Korrelationslängen zeigten ein schnelleres Wachstum in der höher konzentrierten Probe und im Vergleich zu Lysozym, die Ausbildung größerer Strukturen. In der späten Phase der LLPS verlangsamt sich das Wachstum weiter und nähert sich für die niedriger konzentrierte Probe einem kinetischen Stillstand. Aus der Dynamik ergaben sich zwei Zerfälle, ein schneller, super-diffusiver, ballistischer Zerfall und ein langsamer Zerfall ohne erkennbare Dispersion. In der späten Phase der LLPS treten starke Fluktuationen in den Dekorrelationszeiten und KWW-Exponenten auf, was ausgeprägter für die höher konzentrierte Lösung war. Zusätzlich wurde eine nicht verschwindende Korrelation in der späten Phase der LLPS gefunden, die für die höher konzentrierte Probe mit fortschreitender Zeit abnahm und für die geringere Konzentration zunahm. Die Zunahme des NEP mit der Zeit und der kinetische Stillstand deuten auf einen Gelübergang hin. Die Abnahme des NEP für die Probe mit höherer Konzentration hängt vielleicht mit dem Kollaps des Gelnetzwerkes zusammen [Fluerasu u. a., 2007]. Für weiterführende Messungen wäre es interessant die Quenchtiefenabhängigkeit der Kinetik und Dynamik, sowie den Einfluss von Crowdern mittels XPCS in  $\gamma$ D-Kristallin Lösungen zu untersuchen.

Zuletzt, konnte durch die Kombination aus DLS und XPCS-Messungen gezeigt werden, dass die Dynamik der einzelnen Proteine zu schnell ist, um sie mit den aktuell verwendeten Detektoren aufzulösen. Es wurde durch Filterung von Lysozymlösungen mit Filtern unterschiedlicher Porengröße belegt, dass in den XPCS-Messungen an homogenen Lösungen, Lysozymcluster mit einer Größe von 60 Nanometern vorliegen. Es konnte außerdem durch die DLS-Messungen gezeigt werden, dass durch Filtrieren der Lösung mit einem 20-Nanometer Spritzenfilter die Cluster vollständig entfernt werden können. Die Neubildung von Clustern konnte auch fünf Tage später nicht beobachtet werden. Um dennoch die Dynamik einzelner Proteine mittels XPCS zu charakterisieren, bietet es sich an die Messungen bei deutlich niedrigeren Temperaturen und eventuell in Präsenz von Crowdern, wie das in dieser Arbeit verwendete PEG, durchzuführen.

Durch das geplante PETRA IV Upgrade werden in Zukunft höhere kohärente Flüsse und größere Kohärenzlängen erzielt, die wiederum zu größeren SNR und Kontrastwerten führen, wodurch kleinere charakteristische Zeitskalen bei einer niedrigeren applizierten Dosis zugänglich werden [Möller, Reiser u. a., 2021]. Die für die P10 geplante Installation eines *fast shutters* wird es zukünftig erlauben Messungen mit logarithmisch verteilten Verzögerungszeiten durchzuführen, wodurch gerade für Nichtgleichgewichts-Prozesse, wie die LLPS, die Verzögerungszeiten an die Entwicklung der charakteristischen Zeiten des Probensystems angepasst werden können, was mit deutlich geringeren Strahlendosen einhergehen wird.

# Literaturverzeichnis

- [Alberti u. a. 2019]: Alberti, Simon, Amy Gladfelter und Tanja Mittag (2019). „Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates“. In: *Cell* 176.3, S. 419–434.
- [Als-Nielsen und McMorrow 2011]: Als-Nielsen, Jens und Des McMorrow (2011). *Elements of Modern X-ray Physics*. 1. Aufl. Wiley.
- [Ambadipudi u. a. 2017]: Ambadipudi, Susmitha, Jacek Biernat, Dietmar Riedel, Eckhard Mandelkow und Markus Zweckstetter (2017). „Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau“. In: *Nat Commun* 8.1, S. 275.
- [Ashiotis u. a. 2015]: Ashiotis, Giannis, Aurore Deschildre, Zubair Nawaz, Jonathan P Wright, Dimitrios Karkoulis und Frederic Emmanuel Picca (2015). „The fast azimuthal integration Python library: pyFAI“. In: S. 10.
- [Al-Ayoubi u. a. 2019]: Al-Ayoubi, Samy R., Paul Hendrik Schummel, Aline Cisse, Tilo Seydel, Judith Peters und Roland Winter (2019). „Osmolytes modify protein dynamics and function of tetrameric lactate dehydrogenase upon pressurization“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21.24, S. 12806–12817.
- [Ballesta u. a. 2008]: Ballesta, Pierre, Agnès Duri und Luca Cipelletti (2008). „Unexpected drop of dynamical heterogeneities in colloidal suspensions approaching the jamming transition“. In: *Nature Phys* 4.7, S. 550–554.
- [Banani u. a. 2017]: Banani, Salman F., Hyun O. Lee, Anthony A. Hyman und Michael K. Rosen (2017). „Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 18.5, S. 285–298.
- [Banc u. a. 2019]: Banc, Amélie, Justine Pincemaille, Salvatore Costanzo, Edouard Chauveau, Marie-Sousai Appavou, Marie-Hélène Morel, Paul Menut und Laurence Ramos (2019). „Phase separation dynamics of gluten protein mixtures“. In: *Soft Matter* 15.30, S. 6160–6170.
- [Basak u. a. 2003]: Basak, Ajit, Orval Bateman, Christine Slingsby, Ajay Pande, Neer Asherie, Olutayo Ogun, George B. Benedek und Jayanti Pande (2003). „High-resolution X-ray Crystal Structures of Human  $\gamma$ D Crystallin (1.25Å) and the R58H Mutant (1.15Å) Associated with Aculeiform Cataract“. In: *Journal of Molecular Biology* 328.5, S. 1137–1147.
- [Begam, Matsarskaia u. a. 2020]: Begam, Nafisa, Olga Matsarskaia, Michael Sztucki, Fajun Zhang und Frank Schreiber (2020). „Unification of lower and upper critical

- solution temperature phase behavior of globular protein solutions in the presence of multivalent cations“. In: *Soft Matter* 16.8, S. 2128–2134.
- [Begam, Ragulskaya u. a. 2021]: Begam, Nafisa, Anastasia Ragulskaya, Anita Girelli, Hendrik Rahmann, Sivasurender Chandran, Fabian Westermeier, Mario Reiser, Michael Sprung, Fajun Zhang, Christian Gutt und Frank Schreiber (2021). „Kinetics of Network Formation and Heterogeneous Dynamics of an Egg White Gel Revealed by Coherent X-Ray Scattering“. In: *Phys. Rev. Lett.* 126.9, S. 098001.
- [Bennion und Daggett 2004]: Bennion, Brian J. und Valerie Daggett (2004). „Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine *N*-oxide: A chemical chaperone at atomic resolution“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101.17, S. 6433–6438.
- [Berg u. a. 2018]: Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto und Lubert Stryer (2018). *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [Bergman u. a. 2019]: Bergman, Maxime J., Tommy Garting, Peter Schurtenberger und Anna Stradner (2019). „Experimental Evidence for a Cluster Glass Transition in Concentrated Lysozyme Solutions“. In: *J. Phys. Chem. B* 123.10, S. 2432–2438.
- [Bhattacharjee 2016]: Bhattacharjee, Sourav (2016). „DLS and zeta potential – What they are and what they are not?“ In: *Journal of Controlled Release* 235, S. 337–351.
- [Biehl 2019]: Biehl, Ralf (2019). „Jscatter, a program for evaluation and analysis of experimental data“. In: *PLoS ONE* 14.6. Hrsg. von Alejandro Fernandez-Martinez, e0218789.
- [Bikondoa 2017]: Bikondoa, Oier (2017). „On the use of two-time correlation functions for X-ray photon correlation spectroscopy data analysis“. In: *J Appl Crystallogr* 50.2, S. 357–368.
- [Binder und Stauffer 1974]: Binder, K. und D. Stauffer (1974). „Theory for the Slowing Down of the Relaxation and Spinodal Decomposition of Binary Mixtures“. In: *Phys. Rev. Lett.* 33.17, S. 1006–1009.
- [Brändén und Tooze 1999]: Brändén, Carl-Ivar und John Tooze (1999). *Introduction to protein structure*. 2nd ed. New York: Garland Pub. 410 S.
- [Brangwynne 2013]: Brangwynne, Clifford P. (2013). „Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles“. In: *Journal of Cell Biology* 203.6, S. 875–881.
- [Brown u. a. 1997]: Brown, Gregory, Per Arne Rikvold, Mark Sutton und Martin Grant (1997). „Speckle from phase-ordering systems“. In: *Phys. Rev. E* 56.6, S. 6601–6612.
- [Bryngelson u. a. 1995]: Bryngelson, Joseph D., José Nelson Onuchic, Nicholas D. Socci und Peter G. Wolynes (1995). „Funnel, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis“. In: *Proteins* 21.3, S. 167–195.

- [Cahn 1965]: Cahn, John W. (1965). „Phase Separation by Spinodal Decomposition in Isotropic Systems“. In: *The Journal of Chemical Physics* 42.1, S. 93–99.
- [Cahn und Hilliard 1958]: Cahn, John W. und John E. Hilliard (1958). „Free Energy of a Nonuniform System. I. Interfacial Free Energy“. In: *The Journal of Chemical Physics* 28.2, S. 258–267.
- [Cardinaux, Gibaud u. a. 2007]: Cardinaux, Frédéric, Thomas Gibaud, Anna Stradner und Peter Schurtenberger (2007). „Interplay between Spinodal Decomposition and Glass Formation in Proteins Exhibiting Short-Range Attractions“. In: *Phys. Rev. Lett.* 99.11, S. 118301.
- [Cardinaux, Zaccarelli u. a. 2011]: Cardinaux, Frédéric, Emanuela Zaccarelli, Anna Stradner, Saskia Bucciarelli, Bela Farago, Stefan U. Egelhaaf, Francesco Sciortino und Peter Schurtenberger (2011). „Cluster-Driven Dynamical Arrest in Concentrated Lysozyme Solutions“. In: *J. Phys. Chem. B* 115.22, S. 7227–7237.
- [Chen u. a. 2004]: Chen, Qiuying, Peter G. Vekilov, Ronald L. Nagel und Rhoda Alison Hirsch (2004). „Liquid-Liquid Phase Separation in Hemoglobins: Distinct Aggregation Mechanisms of the  $\beta 6$  Mutants“. In: *Biophysical Journal* 86.3, S. 1702–1712.
- [Chong und Forman-Kay 2016]: Chong, P Andrew und Julie D Forman-Kay (2016). „Liquid-liquid phase separation in cellular signaling systems“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 41, S. 180–186.
- [Cinar, Fetahaj u. a. 2019]: Cinar, Hasan, Zamira Fetahaj, Süleyman Cinar, Robert M. Vernon, Hue Sun Chan und Roland H. A. Winter (2019). „Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications“. In: *Chem. Eur. J.*, chem.201902210.
- [Cinar und Winter 2020]: Cinar, Hasan und Roland Winter (2020). „The effects of cosolutes and crowding on the kinetics of protein condensate formation based on liquid-liquid phase separation: a pressure-jump relaxation study“. In: *Sci Rep* 10.1, S. 17245.
- [Cinar, Cinar u. a. 2019]: Cinar, Süleyman, Hasan Cinar, Hue Sun Chan und Roland Winter (2019). „Pressure-Sensitive and Osmolyte-Modulated Liquid-Liquid Phase Separation of Eye-Lens  $\gamma$ -Crystallins“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 141.18, S. 7347–7354.
- [Cipelletti u. a. 2003]: Cipelletti, Luca, Laurence Ramos, S. Manley, E. Pitard, D. A. Weitz, Eugene E. Pashkovski und Marie Johansson (2003). „Universal non-diffusive slow dynamics in aging soft matter“. In: *Faraday Disc.* 123, S. 237–251.
- [Collins 2006]: Collins, Kim D. (2006). „Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization“. In: *Biophysical Chemistry* 119.3, S. 271–281.

- [Collins u. a. 2007]: Collins, Kim D., George W. Neilson und John E. Enderby (2007). „Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure“. In: *Biophysical Chemistry* 128.2, S. 95–104.
- [Cummins und Pike 1977]: Cummins, H. Z. und E. R. Pike, Hrsg. (1977). *Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry*. Boston, MA: Springer US.
- [Curtis und Lue 2006]: Curtis, R. A. und L. Lue (2006). „A molecular approach to bioseparations: Protein–protein and protein–salt interactions“. In: *Chemical Engineering Science* 61.3, S. 907–923.
- [Da Vela, Begam u. a. 2020]: Da Vela, Stefano, Nafisa Begam, Danylo Dyachok, Richard Santiago Schäufele, Olga Matsarskaia, Michal K. Braun, Anita Girelli, Anastasia Ragulskaya, Alessandro Mariani, Fajun Zhang und Frank Schreiber (2020). „Interplay between Glass Formation and Liquid–Liquid Phase Separation Revealed by the Scattering Invariant“. In: *J. Phys. Chem. Lett.* 11.17, S. 7273–7278.
- [Da Vela, Braun u. a. 2016]: Da Vela, Stefano, Michal K. Braun, Andreas Dörr, Alessandro Greco, Johannes Möller, Zhendong Fu, Fajun Zhang und Frank Schreiber (2016). „Kinetics of liquid–liquid phase separation in protein solutions exhibiting LCST phase behavior studied by time-resolved USAXS and VSANS“. In: *Soft Matter* 12.46, S. 9334–9341.
- [Da Vela, Exner u. a. 2017]: Da Vela, Stefano, Christian Exner, Richard Santiago Schäufele, Johannes Möller, Zhendong Fu, Fajun Zhang und Frank Schreiber (2017). „Arrested and temporarily arrested states in a protein–polymer mixture studied by USAXS and VSANS“. In: *Soft Matter* 13.46, S. 8756–8765.
- [Debye 1915]: Debye, P. (1915). „Zerstreuung von Röntgenstrahlen“. In: *Ann. Phys.* 351.6, S. 809–823.
- [Debye 1947]: Debye, P. (1947). „Molecular-weight Determination by Light Scattering“. In: *J. Phys. Chem.* 51.1, S. 18–32.
- [Debye und Bueche 1949]: Debye, P. und A. M. Bueche (1949). „Scattering by an Inhomogeneous Solid“. In: *Journal of Applied Physics* 20.6, S. 518–525.
- [Decker 2014]: Decker, Glenn (2014). „Design Study of an MBA Lattice for the Advanced Photon Source“. In: *Synchrotron Radiation News* 27.6, S. 13–17.
- [Derjaguin und Landau 1993]: Derjaguin, B und L Landau (1993). „Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes“. In: *Progress in Surface Science* 43.1, S. 30–59.
- [DESY 2022a]: DESY (2022a). *Machine Parameters PETRA III (Design Values)*. URL: [https://photon-science.desy.de/facilities/petra\\_iii/machine/parameters/index\\_eng.html](https://photon-science.desy.de/facilities/petra_iii/machine/parameters/index_eng.html) (besucht am 19.08.2022).



- [DESY 2022b]: DESY (2022b). *P10 Documentation*. URL: [https://photon-science.desy.de/sites/site\\_photon-science/content/e58/e176720/e177229/e178737/e179091/e179098/e269721/P10\\_User\\_Guide\\_2016\\_eng.pdf](https://photon-science.desy.de/sites/site_photon-science/content/e58/e176720/e177229/e178737/e179091/e179098/e269721/P10_User_Guide_2016_eng.pdf) (besucht am 19.08.2022).
- [Dhont und Jülich 2008]: Dhont, Jan K. G. und Kernforschungsanlage Jülich, Hrsg. (2008). *Soft matter: from synthetic to biological materials ; lecture notes of the 39th Spring School 2008*. Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Schlüsseltechnologien 1. Jülich: Forschungszentrum, Zentralbibliothek. 906 S.
- [Dill und Chan 1997]: Dill, Ken A. und Hue Sun Chan (1997). „From Levinthal to pathways to funnels“. In: *Nat Struct Mol Biol* 4.1, S. 10–19.
- [Dumetz u. a. 2008]: Dumetz, André C., Aaron M. Chockla, Eric W. Kaler und Abraham M. Lenhoff (2008). „Protein Phase Behavior in Aqueous Solutions: Crystallization, Liquid-Liquid Phase Separation, Gels, and Aggregates“. In: *Biophysical Journal* 94.2, S. 570–583.
- [Duri und Cipelletti 2006]: Duri, A und L Cipelletti (2006). „Length scale dependence of dynamical heterogeneity in a colloidal fractal gel“. In: *Europhys. Lett.* 76.5, S. 972–978.
- [Einfeld u. a. 2014]: Einfeld, Dieter, Mark Plesko und Joachim Schaper (2014). „First multi-bend achromat lattice consideration“. In: *J Synchrotron Rad* 21.5, S. 856–861.
- [Eisenberg 1976]: Eisenberg, Henryk. (1976). *Biological macromolecules and polyelectrolytes in solution / by Henryk Eisenberg*. eng. Monographs on physical biochemistry. Oxford [Eng: Clarendon Press.
- [ESRF 2022a]: ESRF (2022a). *EBS Parameters*. URL: <https://www.esrf.fr/home/UsersAndScience/Accelerators/ebs---extremely-brilliant-source/ebs-parameters.html> (besucht am 19.08.2022).
- [ESRF 2022b]: ESRF (2022b). *Parameters*. URL: <https://www.esrf.fr/home/UsersAndScience/Accelerators/parameters.html> (besucht am 19.08.2022).
- [Exner 1878]: Exner, Karl (1878). „Ueber die Fraunhofer’schen Ringe, die Quetelet’schen Streifen und verwandte Erscheinungen“. In: *Ann. Phys. Chem.* 240.8, S. 525–550.
- [Falus u. a. 2006]: Falus, P., L. B. Lurio und S. G. J. Mochrie (2006). „Optimizing the signal-to-noise ratio for X-ray photon correlation spectroscopy“. In: *J Synchrotron Rad* 13.3, S. 253–259.
- [Feigin und Svergun 1987]: Feigin, L. A. und D. I. Svergun (1987). *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Hrsg. von George W. Taylor. Boston, MA: Springer US.

- [Fluerasu u. a. 2007]: Fluerasu, Andrei, Abdellatif Moussaïd, Anders Madsen und Andrew Schofield (2007). „Slow dynamics and aging in colloidal gels studied by x-ray photon correlation spectroscopy“. In: *Phys. Rev. E* 76.1, S. 010401.
- [Galkin u. a. 2002]: Galkin, Oleg, Kai Chen, Ronald L. Nagel, Rhoda Elison Hirsch und Peter G. Vekilov (2002). „Liquid–liquid separation in solutions of normal and sickle cell hemoglobin“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99.13, S. 8479–8483.
- [Gao u. a. 2015]: Gao, Yongxiang, Juntae Kim und Matthew E. Helgeson (2015). „Microdynamics and arrest of coarsening during spinodal decomposition in thermoreversible colloidal gels“. In: *Soft Matter* 11.32, S. 6360–6370.
- [Garrison 1987]: Garrison, Warren M. (1987). „Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins“. In: *Chem. Rev.* 87.2, S. 381–398.
- [Gennes und Witten 1980]: Gennes, P. G. de und Thomas A. Witten (1980). „*Scaling Concepts in Polymer Physics*“. In: *Physics Today* 33.6, S. 51–54.
- [Gibaud, Mahmoudi u. a. 2012]: Gibaud, Thomas, Najet Mahmoudi, Julian Oberdisse, Peter Lindner, Jan Skov Pedersen, Cristiano L. P. Oliveira, Anna Stradner und Peter Schurtenberger (2012). „New routes to food gels and glasses“. In: *Faraday Discuss.* 158, S. 267.
- [Gibaud und Schurtenberger 2009]: Gibaud, Thomas und Peter Schurtenberger (2009). „A closer look at arrested spinodal decomposition in protein solutions“. In: *J. Phys.: Condens. Matter* 21.32, S. 322201.
- [Girelli u. a. 2021]: Girelli, Anita, Hendrik Rahmann, Nafisa Begam, Anastasia Ragulskaya, Mario Reiser, Sivasurender Chandran, Fabian Westermeier, Michael Sprung, Fajun Zhang, Christian Gutt und Frank Schreiber (2021). „Microscopic Dynamics of Liquid-Liquid Phase Separation and Domain Coarsening in a Protein Solution Revealed by X-Ray Photon Correlation Spectroscopy“. In: *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, S. 7.
- [Glatter 1977]: Glatter, O. (1977). „A new method for the evaluation of small-angle scattering data“. In: *J Appl Crystallogr* 10.5, S. 415–421.
- [Glatter und Kratky 1982]: Glatter, O. und O. Kratky, Hrsg. (1982). *Small angle x-ray scattering*. London ; New York: Academic Press. 515 S.
- [Glatter 2018]: Glatter, Otto (2018). *Scattering Methods and their Application in Colloid and Interface Science*. Elsevier.
- [Goodman 2015]: Goodman, Joseph W. (2015). *Statistical optics*. Second edition. Wiley series in pure and applied optics. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 1 S.
- [Grübel u. a. 2008]: Grübel, G., A. Madsen und A. Robert (2008). „X-Ray Photon Correlation Spectroscopy (XPCS)“. In: *Soft-matter characterization*. Hrsg. von Redouane Borsali und Robert Pecora. 1st ed. New York: Springer.

- [Guinier u. a. 1956]: Guinier, André, Gérard Fournet, C. B. Walker und George H. Vineyard (1956). „Small-Angle Scattering of X-Rays“. In: *Physics Today* 9, S. 38.
- [Gunton u. a. 2007]: Gunton, James D., Andrey Shiryayev und Daniel L. Pagan (2007). *Protein Condensation: Kinetic Pathways to Crystallization and Disease*. 1. Aufl. Cambridge University Press.
- [Hansen und McDonald 2013]: Hansen, Jean-Pierre und Ian R. McDonald (2013). *Theory of simple liquids: with applications of soft matter*. Fourth edition. Amsterdam: Elsevier/AP. 619 S.
- [Hariharan 1972]: Hariharan, P. (1972). „Speckle Patterns: A Historical Retrospect“. In: *Optica Acta: International Journal of Optics* 19.9, S. 791–793.
- [Hawley 1971]: Hawley, S. A. (1971). „Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen“. In: *Biochemistry* 10.13, S. 2436–2442.
- [Henke u. a. 1993]: Henke, B.L., E.M. Gullikson und J.C. Davis (1993). „X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at  $E = 50\text{--}30,000$  eV,  $Z = 1\text{--}92$ “. In: *Atomic Data and Nuclear Data Tables* 54.2, S. 181–342.
- [Heremans und Smeller 1998]: Heremans, K. und L. Smeller (1998). „Protein structure and dynamics at high pressure“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1386.2, S. 353–370.
- [Hettel 2014]: Hettel, Robert (2014). „DLSR design and plans: an international overview“. In: *J Synchrotron Rad* 21.5, S. 843–855.
- [Hofmeister 1888]: Hofmeister, Franz (1888). „Zur Lehre von der Wirkung der Salze: Dritte Mittheilung“. In: *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 25.1, S. 1–30.
- [Ishimoto und Tanaka 1977]: Ishimoto, Coe und Toyochi Tanaka (1977). „Critical Behavior of a Binary Mixture of Protein and Salt Water“. In: *Phys. Rev. Lett.* 39.8, S. 474–477.
- [Jaeschke u. a. 2020]: Jaeschke, Eberhard J., Shaukat Khan, Jochen R. Schneider und Jerome B. Hastings, Hrsg. (2020). *Synchrotron Light Sources and Free-Electron Lasers: Accelerator Physics, Instrumentation and Science Applications*. Cham: Springer International Publishing.
- [Jain u. a. 2020]: Jain, Avni, Florian Schulz, Irina Lokteva, Lara Frenzel, Gerhard Grübel und Felix Lehmkuhler (2020). „Anisotropic and heterogeneous dynamics in an aging colloidal gel“. In: *Soft Matter* 16.11, S. 2864–2872.
- [Julius 2019]: Julius, Karin (2019). „Impact of organic osmolytes and crowding on the protein-protein interaction at high pressures“. Diss.
- [Julius, Al-Ayoubi u. a. 2018]: Julius, Karin, Samy R. Al-Ayoubi, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2018). „The effects of osmolytes and crowding

- on the pressure-induced dissociation and inactivation of dimeric LADH“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20.10, S. 7093–7104.
- [Julius, Weine, Berghaus u. a. 2018]: Julius, Karin, Jonathan Weine, Melanie Berghaus, Nico König, Mimi Gao, Jan Latarius, Michael Paulus, Martin A. Schroer, Metin Tolan und Roland Winter (2018). „Water-Mediated Protein-Protein Interactions at High Pressures are Controlled by a Deep-Sea Osmolyte“. In: *Phys. Rev. Lett.* 121.3, S. 038101.
- [Julius, Weine, Gao u. a. 2019]: Julius, Karin, Jonathan Weine, Mimi Gao, Jan Latarius, Mirko Elbers, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2019). „Impact of Macromolecular Crowding and Compression on Protein-Protein Interactions and Liquid-Liquid Phase Separation Phenomena“. In: *Macromolecules* 52.4, S. 1772–1784.
- [Jungwirth und Winter 2008]: Jungwirth, Pavel und Bernd Winter (2008). „Ions at Aqueous Interfaces: From Water Surface to Hydrated Proteins“. In: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59.1, S. 343–366.
- [Kaszuba u. a. 2007]: Kaszuba, Michael, Malcolm T. Connah, Fraser K. McNeil-Watson und Ulf Nobbmann (2007). „Resolving Concentrated Particle Size Mixtures Using Dynamic Light Scattering“. In: *Part. Part. Syst. Charact.* 24.3, S. 159–162.
- [Kataoka u. a. 1995]: Kataoka, Mikio, Ichiro Nishii, Tetsuro Fujisawa, Tatzuo Ueki, Fumio Tokunaga und Yuji Goto (1995). „Structural Characterization of the Molten Globule and Native States of Apomyoglobin by Solution X-ray Scattering“. In: *Journal of Molecular Biology* 249.1, S. 215–228.
- [Katayama u. a. 2010]: Katayama, Yoshinori, Takanori Hattori, Hiroyuki Saitoh, Takashi Ikeda, Katsutoshi Aoki, Hiroshi Fukui und Kenichi Funakoshi (2010). „Structure of liquid water under high pressure up to 17 GPa“. In: *Phys. Rev. B* 81.1, S. 014109.
- [Kitahara u. a. 2021]: Kitahara, Ryo, Ryota Yamazaki, Fumika Ide, Shujie Li, Yutaro Shiramasa, Naoya Sasahara und Takuya Yoshizawa (2021). „Pressure-Jump Kinetics of Liquid-Liquid Phase Separation: Comparison of Two Different Condensed Phases of the RNA-Binding Protein, Fused in Sarcoma“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 143.47, S. 19697–19702.
- [Koizumi u. a. 2007]: Koizumi, Masaharu, Harutaka Hirai, Teruaki Onai, Katsuaki Inoue und Mitsuhiro Hirai (2007). „Collapse of the hydration shell of a protein prior to thermal unfolding“. In: *J Appl Crystallogr* 40 (s1), s175–s178.
- [Koppel 1972]: Koppel, Dennis E. (1972). „Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants“. In: *The Journal of Chemical Physics* 57.11, S. 4814–4820.

- [Kotlarchyk und Chen 1983]: Kotlarchyk, Michael und Sow-Hsin Chen (1983). „Analysis of small angle neutron scattering spectra from polydisperse interacting colloids“. In: *The Journal of Chemical Physics* 79.5, S. 2461–2469.
- [Kowalczyk u. a. 2011]: Kowalczyk, P., A. Ciach, P.A. Gauden und A.P. Terzyk (2011). „Equilibrium clusters in concentrated lysozyme protein solutions“. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 363.2, S. 579–584.
- [Krall und Weitz 1998]: Krall, A. H. und D. A. Weitz (1998). „Internal Dynamics and Elasticity of Fractal Colloidal Gels“. In: *Phys. Rev. Lett.* 80.4, S. 778–781.
- [Kratky und Laggner 2001]: Kratky, O und P Laggner (2001). „X-Ray Small-Angle Scattering“. In: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, S. 50.
- [Krywka 2008]: Krywka, Christina (2008). „Ein Aufbau für Röntgenkleinwinkelstreuung an Protein-Lösungen an der Synchrotronstrahlungsquelle DELTA“. Diss.
- [Krywka u. a. 2008]: Krywka, Christina, Christian Sternemann, Michael Paulus, Metin Tolan, Catherine Royer und Roland Winter (2008). „Effect of Osmolytes on Pressure-Induced Unfolding of Proteins: A High-Pressure SAXS Study“. In: *ChemPhysChem* 9.18, S. 2809–2815.
- [Kuehner u. a. 1997]: Kuehner, D.E., C. Heyer, C. Rämisch, U.M. Fornefeld, H.W. Blanch und J.M. Prausnitz (1997). „Interactions of lysozyme in concentrated electrolyte solutions from dynamic light-scattering measurements“. In: *Biophysical Journal* 73.6, S. 3211–3224.
- [Kumar und Marx 2019]: Kumar, Narendra und Dominik Marx (2019). „How do ribozymes accommodate additional water molecules upon hydrostatic compression deep into the kilobar pressure regime?“ In: *Biophysical Chemistry* 252, S. 106192.
- [Kunz u. a. 2004]: Kunz, W., J. Henle und B.W. Ninham (2004). „‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers“. In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9.1, S. 19–37.
- [Kuwamoto u. a. 2004]: Kuwamoto, Shigeo, Shuji Akiyama und Tetsuro Fujisawa (2004). „Radiation damage to a protein solution, detected by synchrotron X-ray small-angle scattering: dose-related considerations and suppression by cryoprotectants“. In: *J Synchrotron Rad* 11.6, S. 462–468.
- [Landau und Lifshitz 1975]: Landau, L. D. und E. M. Lifshitz (1975). *The classical theory of fields*. 4th rev. English ed. Course of theoretical physics v. 2. Oxford ; New York: Pergamon Press. 402 S.
- [Laschtschenko 1909]: Laschtschenko, P. (1909). „Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß“. In: *Zeitschr. f. Hygiene*. 64.1, S. 419–427.

- [Lee u. a. 2013]: Lee, Sooheyong, W. Roseker, C. Gutt, B. Fischer, H. Conrad, F. Lehmkuhler, I. Steinke, D. Zhu, H. Lemke, M. Cammarata, D.M. Fritz, P. Wochner, M. Castro-Colin, S. O. Hruszkewycz, P. H. Fuoss, G. B. Stephenson, G. Grübel und A. Robert (2013). „Single shot speckle and coherence analysis of the hard X-ray free electron laser LCLS“. In: *Opt. Express* 21.21, S. 24647.
- [Li, Yoshizawa u. a. 2021]: Li, Shujie, Takuya Yoshizawa, Ryota Yamazaki, Ayano Fujiwara, Tomoshi Kameda und Ryo Kitahara (2021). „Pressure and Temperature Phase Diagram for Liquid–Liquid Phase Separation of the RNA-Binding Protein Fused in Sarcoma“. In: *J. Phys. Chem. B* 125.25, S. 6821–6829.
- [Li, Lubchenko u. a. 2011]: Li, Ye, Vassiliy Lubchenko und Peter G. Vekilov (2011). „The use of dynamic light scattering and Brownian microscopy to characterize protein aggregation“. In: *Review of Scientific Instruments* 82.5, S. 053106.
- [Li, King u. a. 2013]: Li, Yun R., Oliver D. King, James Shorter und Aaron D. Gitler (2013). „Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis“. In: *Journal of Cell Biology* 201.3, S. 361–372.
- [Liao u. a. 1999]: Liao, Guangdong, Yonglin Xie, Karl F. Ludwig, Rama Bansil und Patrick Gallagher (1999). „Small-angle x-ray scattering study of kinetics of spinodal decomposition in *N*-isopropylacrylamide gels“. In: *Phys. Rev. E* 60.4, S. 4473–4481.
- [Lifshitz und Slyozov 1961]: Lifshitz, I.M. und V.V. Slyozov (1961). „The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions“. In: *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 19.1, S. 35–50.
- [Lumma u. a. 2000]: Lumma, D., L. B. Lurio, S. G. J. Mochrie und M. Sutton (2000). „Area detector based photon correlation in the regime of short data batches: Data reduction for dynamic x-ray scattering“. In: *Review of Scientific Instruments* 71.9, S. 3274–3289.
- [Madsen 2011]: Madsen, A. (2011). „Conceptual Design Report: Scientific Instrument MID“. In: *DESY Technical Report*.
- [Madsen, Fluerasu u. a. 2018]: Madsen, Anders, Andrei Fluerasu und Beatrice Ruta (2018). „Structural Dynamics of Materials Probed by X-Ray Photon Correlation Spectroscopy“. In: *Synchrotron Light Sources and Free-Electron Lasers*. Hrsg. von Eberhard Jaeschke, Shaukat Khan, Jochen R. Schneider und Jerome B. Hastings. Cham: Springer International Publishing, S. 1–30.
- [Madsen, Leheny u. a. 2010]: Madsen, Anders, Robert L Leheny, Hongyu Guo, Michael Sprung und Orsolya Czakkell (2010). „Beyond simple exponential correlation functions and equilibrium dynamics in x-ray photon correlation spectroscopy“. In: *New J. Phys.* 12.5, S. 055001.
- [Maleknia u. a. 2001]: Maleknia, Simin D., Corie Y. Ralston, Michael D. Brenowitz, Kevin M. Downard und Mark R. Chance (2001). „Determination of Macromo-

- lecular Folding and Structure by Synchrotron X-Ray Radiolysis Techniques“. In: *Analytical Biochemistry* 289.2, S. 103–115.
- [Mandel 1959]: Mandel, L (1959). „Fluctuations of Photon Beams: The Distribution of the Photo-Electrons“. In: *Proc. Phys. Soc.* 74.3, S. 233–243.
- [Mandelbrot 1967]: Mandelbrot, Benoit (1967). „How Long Is the Coast of Britain? Statistical Self-Similarity and Fractional Dimension“. In: *Science* 156.3775, S. 636–638.
- [Mao u. a. 1995]: Mao, Y., M.E. Cates und H.N.W. Lekkerkerker (1995). „Depletion force in colloidal systems“. In: *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 222.1, S. 10–24.
- [Matsarskaia u. a. 2019]: Matsarskaia, Olga, Stefano Da Vela, Alessandro Mariani, Zhendong Fu, Fajun Zhang und Frank Schreiber (2019). „Phase-Separation Kinetics in Protein–Salt Mixtures with Compositionally Tuned Interactions“. In: *J. Phys. Chem. B* 123.9, S. 1913–1919.
- [Meersman u. a. 2006]: Meersman, Filip, Christopher M. Dobson und Karel Heremans (2006). „Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions“. In: *Chem. Soc. Rev.* 35.10, S. 908.
- [Megen u. a. 1991]: Megen, W. van, S. M. Underwood und P. N. Pusey (1991). „Nonergodicity parameters of colloidal glasses“. In: *Phys. Rev. Lett.* 67.12, S. 1586–1589.
- [Melnichenko 2016]: Melnichenko, Yuri B. (2016). *Small-Angle Scattering from Confined and Interfacial Fluids*. Cham: Springer International Publishing.
- [Mittelbach und Porod 1962]: Mittelbach, P t und G Porod (1962). „Zur Röntgenkleinwinkelstreuung verdünnter kolloider Systeme VII. Die Berechnung der Streukurven von dreiachsigen Ellipsoiden“. In: *Acta Physica Austriaca* 15, S. 122.
- [Möller 2014]: Möller, Johannes (2014). „Liquid-liquid phase separation and intermolecular interactions in dense protein solutions“. Diss.
- [Möller, Grobelny, Schulze, Bieder u. a. 2014]: Möller, Johannes, Sebastian Grobelny, Julian Schulze, Steffen Bieder, Andre Steffen, Mirko Erkamp, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2014). „Reentrant Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Solutions at Elevated Hydrostatic Pressures“. In: *Phys. Rev. Lett.* 112.2, S. 028101.
- [Möller, Grobelny, Schulze, Steffen u. a. 2014]: Möller, Johannes, Sebastian Grobelny, Julian Schulze, Andre Steffen, Steffen Bieder, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2014). „Specific anion effects on the pressure dependence of the protein–protein interaction potential“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16.16, S. 7423.
- [Möller, Reiser u. a. 2021]: Möller, Johannes, Mario Reiser, Jörg Hallmann, Ulrike Boesenberg, Alexey Zozulya, Hendrik Rahmann, Anna-Lena Becker, Fabian Wes-

- termeier, Thomas Zinn, Michael Sprung, Theyencheri Narayanan, Christian Gutt und Anders Madsen (2021). „Using low dose x-ray speckle visibility spectroscopy to study dynamics of soft matter samples“. In: *New J. Phys.* 23.9, S. 093041.
- [Möller, Schroer u. a. 2012]: Möller, Johannes, Martin A. Schroer, Mirko Erbkamp, Sebastian Grobelny, Michael Paulus, Sebastian Tiemeyer, Florian J. Wirkert, Metin Tolan und Roland Winter (2012). „The Effect of Ionic Strength, Temperature, and Pressure on the Interaction Potential of Dense Protein Solutions: From Nonlinear Pressure Response to Protein Crystallization“. In: *Biophysical Journal* 102.11, S. 2641–2648.
- [Möller, Sprung u. a. 2019]: Möller, Johannes, Michael Sprung, Anders Madsen und Christian Gutt (2019). „X-ray photon correlation spectroscopy of protein dynamics at nearly diffraction-limited storage rings“. In: *IUCrJ* 6.5, S. 794–803.
- [Monkos 1997]: Monkos, Karol (1997). „Concentration and temperature dependence of viscosity in lysozyme aqueous solutions“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1339.2, S. 304–310.
- [Mooney 1951]: Mooney, M. (1951). „The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles“. In: *Journal of Colloid Science* 6.2, S. 162–170.
- [Moron u. a. 2022]: Moron, M., A. Al-Masoodi, C. Lovato, M. Reiser, L. Randolph, G. Surmeier, J. Bolle, F. Westermeier, M. Sprung, R. Winter, M. Paulus und C. Gutt (2022). „Gelation Dynamics upon Pressure-Induced Liquid–Liquid Phase Separation in a Water–Lysozyme Solution“. In: *J. Phys. Chem. B* 126.22, S. 4160–4167.
- [Motz 1979]: Motz, H. (1979). „Undulators and ‘free-electron lasers’“. In: *Contemporary Physics* 20.5, S. 547–568.
- [Muschol und Rosenberger 1995]: Muschol, Martin und Franz Rosenberger (1995). „Interactions in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: Static and dynamic light scattering results“. In: *The Journal of Chemical Physics* 103.24, S. 10424–10432.
- [Muschol und Rosenberger 1997]: Muschol, Martin und Franz Rosenberger (1997). „Liquid–liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization“. In: *The Journal of Chemical Physics* 107.6, S. 1953–1962.
- [Neuman u. a. 1973]: Neuman, Robert C., Walter Kauzmann und Adam Zipp (1973). „Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers“. In: *J. Phys. Chem.* 77.22, S. 2687–2691.
- [Nikfarjam u. a. 2019]: Nikfarjam, S., M. Ghorbani, S. Adhikari, A. J. Karlsson, E. V. Jouravleva, T. J. Woehl und M. A. Anisimov (2019). „Irreversible Nature of Mesoscopic Aggregates in Lysozyme Solutions“. In: *Colloid J* 81.5, S. 546–554.



- [O'Neill u. a. 2002]: O'Neill, Peter, David L. Stevens und Elspeth F. Garman (2002). „Physical and chemical considerations of damage induced in protein crystals by synchrotron radiation: a radiation chemical perspective“. In: *J Synchrotron Rad* 9.6, S. 329–332.
- [Okhulkov u. a. 1994]: Okhulkov, A. V., Yu. N. Demianets und Yu. E. Gorbaty (1994). „X-ray scattering in liquid water at pressures of up to 7.7 kbar: Test of a fluctuation model“. In: *The Journal of Chemical Physics* 100.2, S. 1578–1588.
- [Ornstein und Zernike 1914]: Ornstein, L S und F Zernike (1914). „Accidental deviations of density and opalescence at the critical point of a single substance“. In: S. 15.
- [Orsi u. a. 2012]: Orsi, D., L. Cristofolini, G. Baldi und A. Madsen (2012). „Heterogeneous and Anisotropic Dynamics of a 2D Gel“. In: *Phys. Rev. Lett.* 108.10, S. 105701.
- [Osaka u. a. 2008]: Osaka, Noboru, Shin-ichi Takata, Takuya Suzuki, Hitoshi Endo und Mitsuhiro Shibayama (2008). „Comparison of heat- and pressure-induced gelation of  $\beta$ -lactoglobulin aqueous solutions studied by small-angle neutron and dynamic light scattering“. In: *Polymer* 49.12, S. 2957–2963.
- [Panuszko u. a. 2009]: Panuszko, Aneta, Piotr Bruździak, Jan Zielkiewicz, Dariusz Wyrzykowski und Janusz Stangret (2009). „Effects of Urea and Trimethylamine-*N*-oxide on the Properties of Water and the Secondary Structure of Hen Egg White Lysozyme“. In: *J. Phys. Chem. B* 113.44, S. 14797–14809.
- [Papagiannopoulos u. a. 2005]: Papagiannopoulos, A, T A Waigh, A Fluerasu, C Fernyhough und A Madsen (2005). „Microrheology of polymeric solutions using x-ray photon correlation spectroscopy“. In: *J. Phys.: Condens. Matter* 17.25, S. L279–L285.
- [Papon u. a. 2002]: Papon, Pierre, Jacques Leblond und Paul H. E. Meijer (2002). *The Physics of Phase Transitions*. Advanced Texts in Physics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [Parmar und Muschol 2009]: Parmar, Avanish S. und Martin Muschol (2009). „Hydration and Hydrodynamic Interactions of Lysozyme: Effects of Chaotropic versus Kosmotropic Ions“. In: *Biophysical Journal* 97.2, S. 590–598.
- [Pattni und Heyden 2019]: Pattni, Viren und Matthias Heyden (2019). „Pressure Effects on Protein Hydration Water Thermodynamics“. In: *J. Phys. Chem. B* 123.28, S. 6014–6022.
- [Perakis und Gutt 2020]: Perakis, Fivos und Christian Gutt (2020). „Towards molecular movies with X-ray photon correlation spectroscopy“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22.35, S. 19443–19453.

- [Percus und Yevick 1958]: Percus, Jerome K. und George J. Yevick (1958). „Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates“. In: *Phys. Rev.* 110.1, S. 1–13.
- [Perrett und Zhou 2002]: Perrett, Sarah und Jun-Mei Zhou (2002). „Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1595.1, S. 210–223.
- [Porod 1951]: Porod, G. (1951). „Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen: I. Teil“. In: *Kolloid-Zeitschrift* 124.2, S. 83–114.
- [Provencher 1982]: Provencher, Stephen W. (1982). „A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations“. In: *Computer Physics Communications* 27.3, S. 213–227.
- [Puertas u. a. 2003]: Puertas, Antonio M., Matthias Fuchs und Michael E. Cates (2003). „Simulation study of nonergodicity transitions: Gelation in colloidal systems with short-range attractions“. In: *Phys. Rev. E* 67.3, S. 031406.
- [Pusey 1979]: Pusey, P. N. (1979). „The study of Brownian motion by intensity fluctuation spectroscopy“. In: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 293.1402, S. 429–439.
- [Putnam u. a. 2007]: Putnam, Christopher D., Michal Hammel, Greg L. Hura und John A. Tainer (2007). „X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution“. In: *Quart. Rev. Biophys.* 40.3, S. 191–285.
- [Ragulskaya u. a. 2021]: Ragulskaya, Anastasia, Nafisa Begam, Anita Girelli, Hendrik Rahmann, Mario Reiser, Fabian Westermeier, Michael Sprung, Fajun Zhang, Christian Gutt und Frank Schreiber (2021). „Interplay between Kinetics and Dynamics of Liquid–Liquid Phase Separation in a Protein Solution Revealed by Coherent X-ray Spectroscopy“. In: *J. Phys. Chem. Lett.* 12.30, S. 7085–7090.
- [Raut und Kalonia 2016]: Raut, Ashlesha S. und Devendra S. Kalonia (2016). „Effect of Excipients on Liquid–Liquid Phase Separation and Aggregation in Dual Variable Domain Immunoglobulin Protein Solutions“. In: *Mol. Pharmaceutics* 13.3, S. 774–783.
- [Rayleigh 1914]: Rayleigh, Lord (1914). „On the Diffraction of Light by Spheres of Small Relative Index“. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* 90.617, S. 219–225.
- [Roche u. a. 2013]: Roche, Julien, Mariano Dellarole, José A. Caro, Douglas R. Norberto, Angel E. Garcia, Bertrand Garcia-Moreno, Christian Roumestand und Catherine A. Royer (2013). „Effect of Internal Cavities on Folding Rates and Routes Revealed by Real-Time Pressure-Jump NMR Spectroscopy“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 135.39, S. 14610–14618.

- [Royer 2002]: Royer, Catherine A. (2002). „Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1595.1, S. 201–209.
- [Sauter, Roosen-Runge, Zhang, Lotze, Feoktystov u. a. 2015]: Sauter, Andrea, Felix Roosen-Runge, Fajun Zhang, Gudrun Lotze, Artem Feoktystov, Robert M. J. Jacobs und Frank Schreiber (2015). „On the question of two-step nucleation in protein crystallization“. In: *Faraday Discuss.* 179, S. 41–58.
- [Sauter, Roosen-Runge, Zhang, Lotze, Jacobs u. a. 2015]: Sauter, Andrea, Felix Roosen-Runge, Fajun Zhang, Gudrun Lotze, Robert M. J. Jacobs und Frank Schreiber (2015). „Real-Time Observation of Nonclassical Protein Crystallization Kinetics“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 137.4, S. 1485–1491.
- [Schmidt u. a. 1991]: Schmidt, Paul W., David Avnir, David Levy, Axel Höhr, Mathias Steiner und Armin Röhl (1991). „Small-angle x-ray scattering from the surfaces of reversed-phase silicas: Power-law scattering exponents of magnitudes greater than four“. In: *The Journal of Chemical Physics* 94.2, S. 1474–1479.
- [Schreiber 2022]: Schreiber, Frank (2022). *Static and Dynamic Light Scattering (SLS/DLS)*. Static and Dynamic Light Scattering (SLS/DLS). URL: <http://www.soft-matter.uni-tuebingen.de/dls.html> (besucht am 19.08.2022).
- [Schroer 2011]: Schroer, Martin A. (2011). „Small angle X-ray scattering studies on proteins under extreme conditions“. Diss.
- [Schroer, Markgraf u. a. 2011]: Schroer, Martin A., Jonas Markgraf, D. C. Florian Wieland, Christoph J. Sahle, Johannes Möller, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2011). „Nonlinear Pressure Dependence of the Interaction Potential of Dense Protein Solutions“. In: *Phys. Rev. Lett.* 106.17, S. 178102.
- [Schroer, Zhai u. a. 2011]: Schroer, Martin A., Yong Zhai, D. C. Florian Wieland, Christoph J. Sahle, Julia Nase, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2011). „Exploring the Piezophilic Behavior of Natural Cosolvent Mixtures“. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 50.48, S. 11413–11416.
- [Schulze u. a. 2016]: Schulze, Julian, Johannes Möller, Jonathan Weine, Karin Julius, Nico König, Julia Nase, Michael Paulus, Metin Tolan und Roland Winter (2016). „Phase behavior of lysozyme solutions in the liquid–liquid phase coexistence region at high hydrostatic pressures“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18.21, S. 14252–14256.
- [Seeck und Murphy 2015]: Seeck, Oliver H und Bridget Murphy (2015). *X-Ray Diffraction: Modern Experimental Techniques*. CRC Press.
- [Segrè und Pusey 1997]: Segrè, P.N. und P.N. Pusey (1997). „Dynamics and scaling in hard-sphere colloidal suspensions“. In: *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 235.1, S. 9–18.

- [Shukla u. a. 2008]: Shukla, Anuj, Efstratios Mylonas, Emanuela Di Cola, Stephanie Finet, Peter Timmins, Theyencheri Narayanan und Dmitri I. Svergun (2008). „Reply to Stradner *et al.* : Equilibrium clusters are absent in concentrated lysozyme solutions“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105.44.
- [Siegert und Laboratory 1943]: Siegert, A.J.F. und Massachusetts Institute of Technology Radiation Laboratory (1943). *On the Fluctuations in Signals Returned by Many Independently Moving Scatterers*. Report (Massachusetts Institute of Technology. Radiation Laboratory). Radiation Laboratory, Massachusetts Institute of Technology.
- [Siggia 1979]: Siggia, Eric D. (1979). „Late stages of spinodal decomposition in binary mixtures“. In: *Phys. Rev. A* 20.2, S. 595–605.
- [Silva u. a. 2001]: Silva, Jerson L, Debora Foguel und Catherine A Royer (2001). „Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure“. In: *Trends in Biochemical Sciences* 26.10, S. 612–618.
- [Sophianopoulos u. a. 1962]: Sophianopoulos, A. J., C. K. Rhodes, D. N. Holcomb und K. E. Van Holde (1962). „Physical studies of lysozyme. I. Characterization“. In: *J Biol Chem* 237, S. 1107–1112.
- [Spalla 2002]: Spalla, Olivier (2002). „General theorems in small-angle scattering“. In: *Neutrons, X-rays and Light: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Bd. 1. 3. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- [Stradner, Cardinaux u. a. 2008]: Stradner, A., F. Cardinaux, S. U. Egelhaaf und P. Schurtenberger (2008). „Do equilibrium clusters exist in concentrated lysozyme solutions?“ In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105.44.
- [Stradner, Sedgwick u. a. 2004]: Stradner, Anna, Helen Sedgwick, Frédéric Cardinaux, Wilson C. K. Poon, Stefan U. Egelhaaf und Peter Schurtenberger (2004). „Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids“. In: *Nature* 432.7016, S. 492–495.
- [Sutton, Mochrie u. a. 1991]: Sutton, M., S. G. J. Mochrie, T. Greytak, S. E. Nagler, L. E. Berman, G. A. Held und G. B. Stephenson (1991). „Observation of speckle by diffraction with coherent X-rays“. In: *Nature* 352.6336, S. 608–610.
- [Sutton 2019]: Sutton, Mark (2019). „Evaluation of coherence factor for high  $\vec{Q}$  data“. In: S. 26.
- [Sutton, Laaziri u. a. 2003]: Sutton, Mark, Khalid Laaziri, F. Livet und F. Bley (2003). „Using coherence to measure two-time correlation functions“. In: *Opt. Express* 11.19, S. 2268.
- [Svergun 1992]: Svergun, D. I. (1992). „Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria“. In: *J Appl Crystallogr* 25.4, S. 495–503.

- [Svergun, Richard u. a. 1998]: Svergun, D. I., S. Richard, M. H. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin und G. Zaccai (1998). „Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.5, S. 2267–2272.
- [Svergun und Koch 2003]: Svergun, Dmitri I und Michel H J Koch (2003). „Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution“. In: *Rep. Prog. Phys.* 66.10, S. 1735–1782.
- [Talman 2006]: Talman, Richard (2006). *Accelerator X-Ray Sources*. 1. Aufl. Wiley.
- [Tanaka 2000]: Tanaka, Hajime (2000). „Viscoelastic phase separation“. In: *J. Phys.: Condens. Matter* 12.15, R207–R264.
- [Tardieu u. a. 1999]: Tardieu, A., A. Le Verge, M. Malfois, F. Bonneté, S. Finet, M. Riès-Kautt und L. Belloni (1999). „Proteins in solution: from X-ray scattering intensities to interaction potentials“. In: *Journal of Crystal Growth* 196.2, S. 193–203.
- [Tavares u. a. 2014]: Tavares, Pedro F., Simon C. Leemann, Magnus Sjöström und Åke Andersson (2014). „The MAX IV storage ring project“. In: *J Synchrotron Rad* 21.5, S. 862–877.
- [Testard u. a. 2011]: Testard, Vincent, Ludovic Berthier und Walter Kob (2011). „Influence of the Glass Transition on the Liquid-Gas Spinodal Decomposition“. In: *Phys. Rev. Lett.* 106.12, S. 125702.
- [Thomson u. a. 1987]: Thomson, J A, P Schurtenberger, G M Thurston und G B Benedek (1987). „Binary liquid phase separation and critical phenomena in a protein/water solution.“ In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84.20, S. 7079–7083.
- [Tobias und Hemminger 2008]: Tobias, Douglas J. und John C. Hemminger (2008). „Getting Specific About Specific Ion Effects“. In: *Science* 319.5867, S. 1197–1198.
- [Verwey 1947]: Verwey, E. J. W. (1947). „Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.“ In: *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* 51.3, S. 631–636. eprint: <https://doi.org/10.1021/j150453a001>.
- [Verwohlt u. a. 2018]: Verwohlt, Jan, Mario Reiser, Lisa Randolph, Aleksandar Matic, Luis Aguilera Medina, Anders Madsen, Michael Sprung, Alexey Zozulya und Christian Gutt (2018). „Low Dose X-Ray Speckle Visibility Spectroscopy Reveals Nanoscale Dynamics in Radiation Sensitive Ionic Liquids“. In: *Phys. Rev. Lett.* 120.16, S. 168001.
- [Vliegthart und Lekkerkerker 2000]: Vliegthart, G. A. und H. N. W. Lekkerkerker (2000). „Predicting the gas–liquid critical point from the second virial coefficient“. In: *The Journal of Chemical Physics* 112.12, S. 5364–5369.

- [Voet u. a. 2008]: Voet, Donald, Judith G. Voet und Charlotte W. Pratt (2008). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley. 1099 S.
- [Wang u. a. 2021]: Wang, Bin, Lei Zhang, Tong Dai, Ziran Qin, Huasong Lu, Long Zhang und Fangfang Zhou (2021). „Liquid–liquid phase separation in human health and diseases“. In: *Sig Transduct Target Ther* 6.1, S. 290.
- [Weck u. a. 2009]: Weck, G., J. Eggert, P. Loubeyre, N. Desbiens, E. Bourasseau, J.-B. Maillet, M. Mezouar und M. Hanfland (2009). „Phase diagrams and isotopic effects of normal and deuterated water studied via x-ray diffraction up to 4.5 GPa and 500 K“. In: *Phys. Rev. B* 80.18, S. 180202.
- [Weis 2007]: Weis, Thomas (2007). „DELTA The Dortmund 1.5 GeV Synchrotron Radiation Light Source“. Riezlern.
- [Weiss u. a. 2000]: Weiss, Manfred S., Gottfried J. Palm und Rolf Hilgenfeld (2000). „Crystallization, structure solution and refinement of hen egg-white lysozyme at pH 8.0 in the presence of MPD“. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56.8, S. 952–958.
- [Wertheim 1963]: Wertheim, M. S. (1963). „Exact Solution of the Percus-Yevick Integral Equation for Hard Spheres“. In: *Phys. Rev. Lett.* 10.8, S. 321–323.
- [Wikimedia 2022]: Wikimedia (2022). *Die natürlich vorkommenden 20 proteinogenen Standard-Aminosäuren, gruppiert nach physikalisch-chemischen Eigenschaften*. URL: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9685121> (besucht am 19.08.2022).
- [Williams und Watts 1970]: Williams, Graham und David C. Watts (1970). „Non-symmetrical dielectric relaxation behaviour arising from a simple empirical decay function“. In: *Trans. Faraday Soc.* 66, S. 80.
- [Winter 2019]: Winter, Roland (2019). „Interrogating the Structural Dynamics and Energetics of Biomolecular Systems with Pressure Modulation“. In: *Annu. Rev. Biophys.* 48.1, S. 441–463.
- [Winter und Noll 1998]: Winter, Roland und Frank Noll (1998). *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Bearb. von Christoph Elschenbroich, Friedrich Hensel und Henning Hopf. Teubner Studienbücher Chemie. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag.
- [Wu u. a. 2020]: Wu, Xiandeng, Qixu Cai, Zhe Feng und Mingjie Zhang (2020). „Liquid-Liquid Phase Separation in Neuronal Development and Synaptic Signaling“. In: *Developmental Cell* 55.1, S. 18–29.
- [Zaccarelli 2007]: Zaccarelli, Emanuela (2007). „Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes“. In: *J. Phys.: Condens. Matter* 19.32, S. 323101.

- [Zbinden u. a. 2020]: Zbinden, Aurélie, Manuela Pérez-Berlanga, Pierre De Rossi und Magdalini Polymenidou (2020). „Phase Separation and Neurodegenerative Diseases: A Disturbance in the Force“. In: *Developmental Cell* 55.1, S. 45–68.
- [Zernike und Prins 1927]: Zernike, F. und J. A. Prins (1927). „Die Beugung von Röntgenstrahlen in Flüssigkeiten als Effekt der Molekülanordnung“. In: *Z. Physik* 41.2, S. 184–194.
- [Zhang, Allen u. a. 2012]: Zhang, F., A. J. Allen, L. E. Levine, J. Ilavsky und G. G. Long (2012). „Ultra-Small-Angle X-ray Scattering—X-ray Photon Correlation Spectroscopy: A New Measurement Technique for In-Situ Studies of Equilibrium and Nonequilibrium Dynamics“. In: *Metall and Mat Trans A* 43.5, S. 1445–1453.
- [Zhang, Roosen-Runge u. a. 2012]: Zhang, F., F. Roosen-Runge, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, M. Wolf, Ph. Callow, H. Frielinghaus, V. Pipich, S. Prévost und F. Schreiber (2012). „Hydration and interactions in protein solutions containing concentrated electrolytes studied by small-angle scattering“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14.7, S. 2483.
- [Zhang, Skoda u. a. 2007]: Zhang, Fajun, Maximilian W. A. Skoda, Robert M. J. Jacobs, Richard A. Martin, Christopher M. Martin und Frank Schreiber (2007). „Protein Interactions Studied by SAXS: Effect of Ionic Strength and Protein Concentration for BSA in Aqueous Solutions“. In: *J. Phys. Chem. B* 111.1, S. 251–259.
- [Zhang, Zocher u. a. 2011]: Zhang, Fajun, Georg Zocher, Andrea Sauter, Thilo Stehle und Frank Schreiber (2011). „Novel approach to controlled protein crystallization through ligandation of yttrium cations“. In: *J Appl Crystallogr* 44.4, S. 755–762.
- [Zhang, Royall u. a. 2013]: Zhang, Isla, C Patrick Royall, Malcolm A Faers und Paul Bartlett (2013). „Phase separation dynamics in colloid–polymer mixtures: the effect of interaction range“. In: *Soft Matter*.

## Anhang A

# Parameter ausgewählter Synchrotronstrahlungsquellen



	Energie (GeV)	Lorentzfaktor $\gamma$	Umfang (m)	horiz. Emittanz (nm rad)
PETRA III [DESY, 2022a]	6	11742	2304	1,2
ESRF [ESRF, 2022b]	6	11742	844	3,8
ESRF-EBS [ESRF, 2022a]	6	11742	844	0,134
Max IV [Tavares u. a., 2014]	3	871	528	0,33
DELTA [Weis, 2007]	1,5	2935	115	16

Tabelle A.1: Parameterübersicht ausgewählter Synchrotronstrahlungsquellen.

Anhang B

Zusätzliche SAXS-Daten

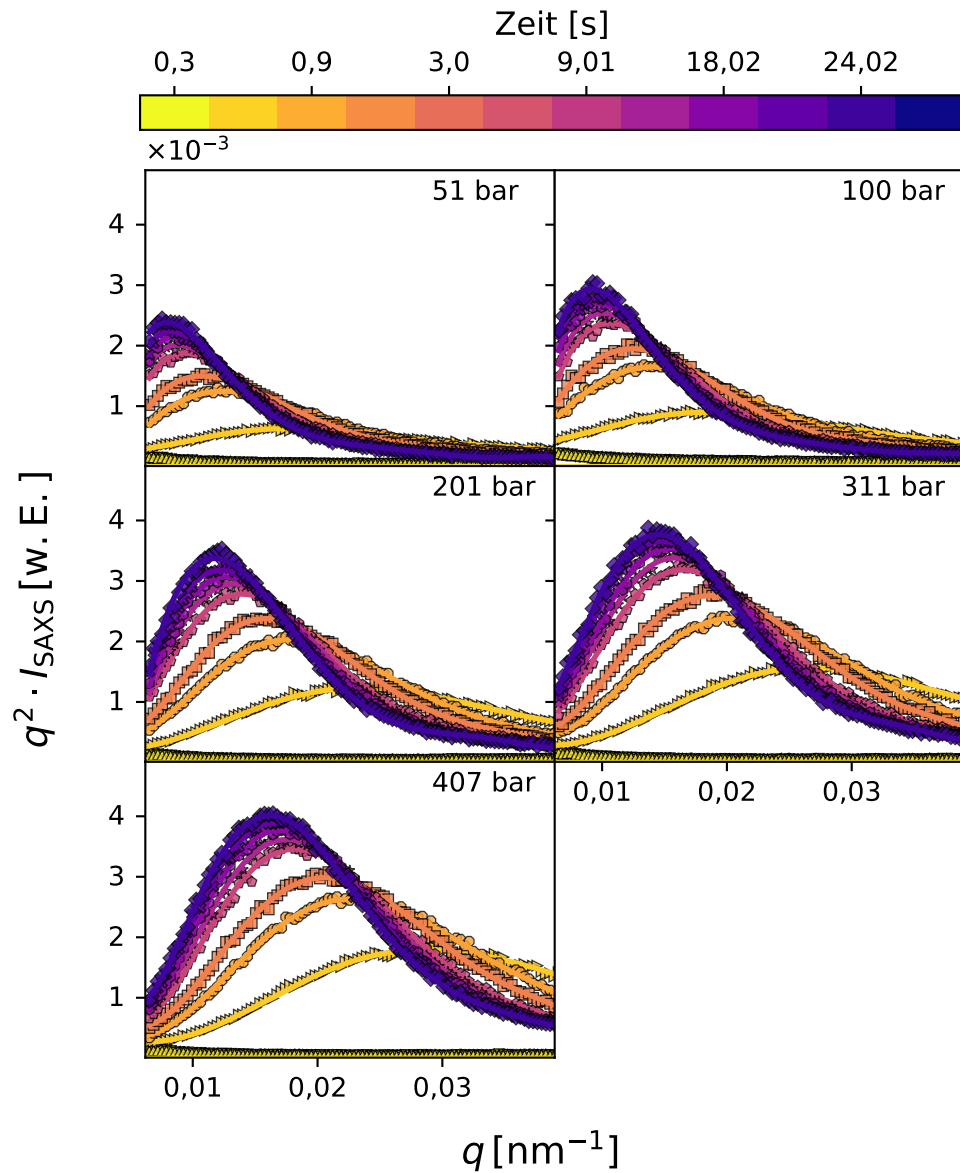


Abbildung B.1: SAXS-Kurven in der Kratky-Darstellung für die druckinduzierte LLPS einer Lysozymlösung mit  $c_p = 238 \text{ mg/mL}$  und einer NaCl-Konzentration von  $c_{\text{NaCl}} = 500 \text{ mM}$  bei  $T = 7,6 \text{ °C}$  für ausgewählte Quenchtiefen und Zeiten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Modellierung der Kratky-Kurven mit einem Polynom 6. Grades.

## Anhang C

# Zusätzliche Daten zur Dynamik

### C.1 Lysozym Quenchserie

#### C.1.1 Zwei-Zeiten Korrelation für weitere Wellenvektorüberträge

In den nachfolgenden Abbildungen sind TTCs aus dem gesamten betrachteten  $q$ -Bereich für alle Quenchtiefen dargestellt. Der Trend des nicht-monotonen Verhaltens der Zerfallsraten in Abhängigkeit von  $\Delta p$  bleibt über den gesamten  $q$ -Bereich erhalten. Mit steigendem  $q$  nimmt der Streukontrast ab, bis letztlich für  $\Delta p = 0$  bar keine Korrelation mehr gemessen wird (Abbildung C.3).



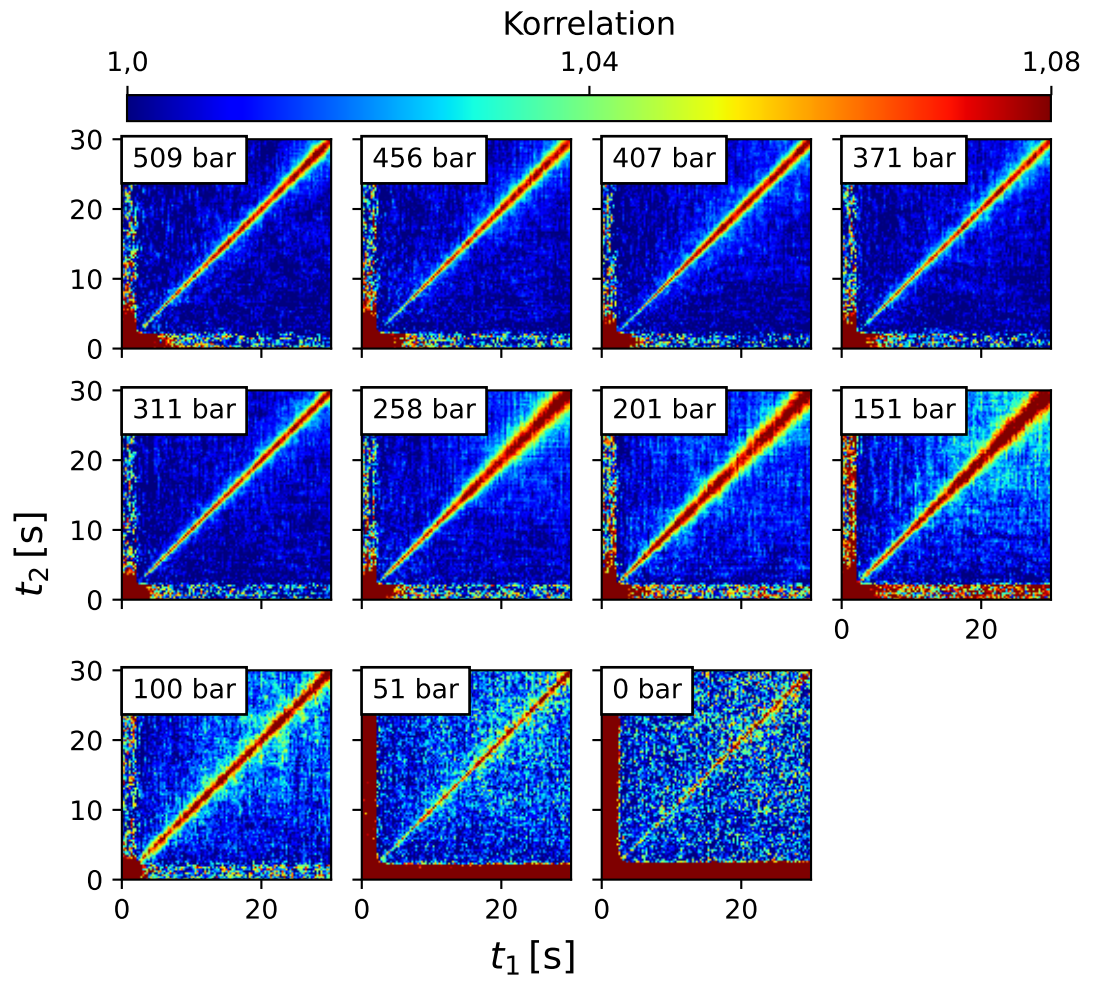


Abbildung C.2: Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen für die druckinduzierte LLPS einer konzentrierten Lysozymlösung für verschiedene Quenchtiefen bei  $q = 0,016 \text{ nm}^{-1}$ .

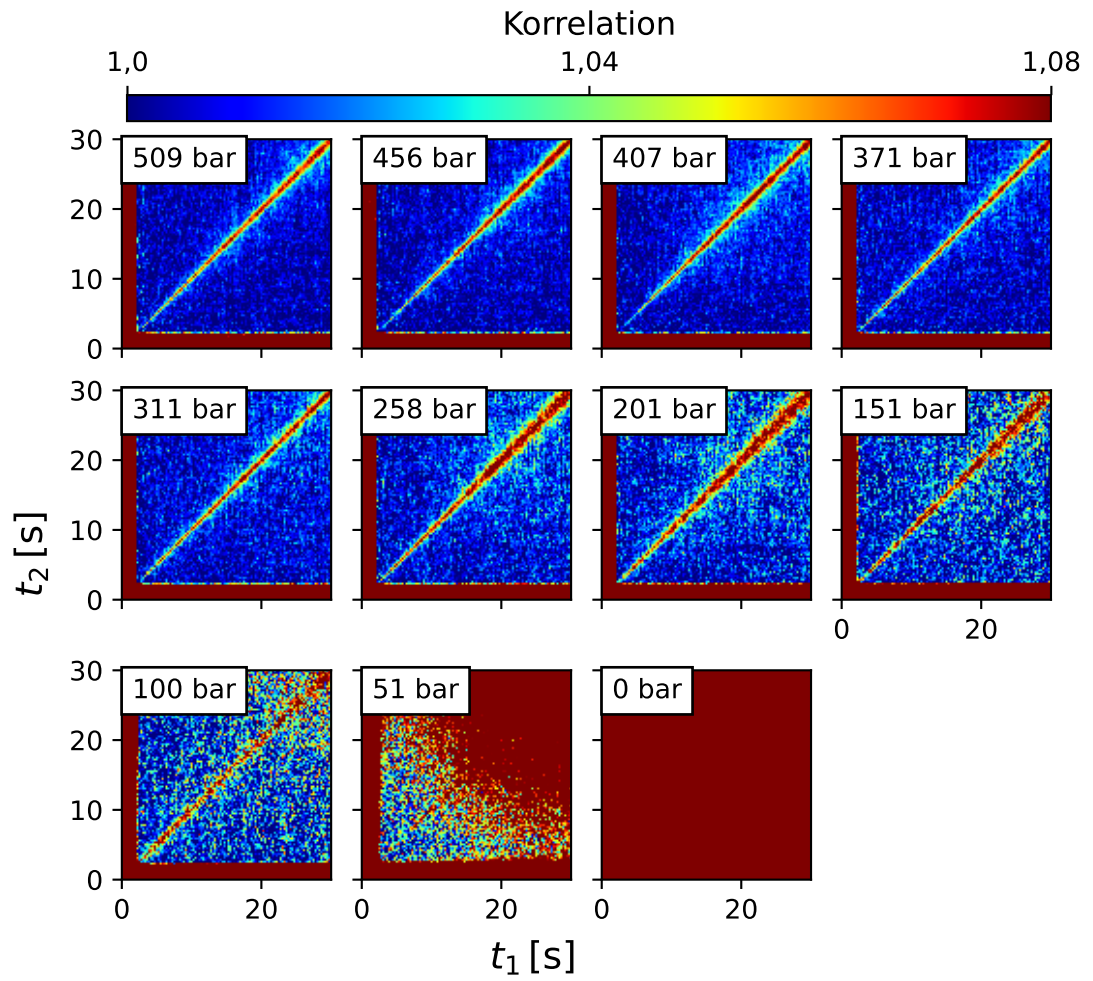


Abbildung C.3: Zwei-Zeiten Korrelationsfunktionen für die druckinduzierte LLPS einer konzentrierten Lysozymlösung für verschiedene Quenchtiefen bei  $q = 0,023 \text{ nm}^{-1}$ .

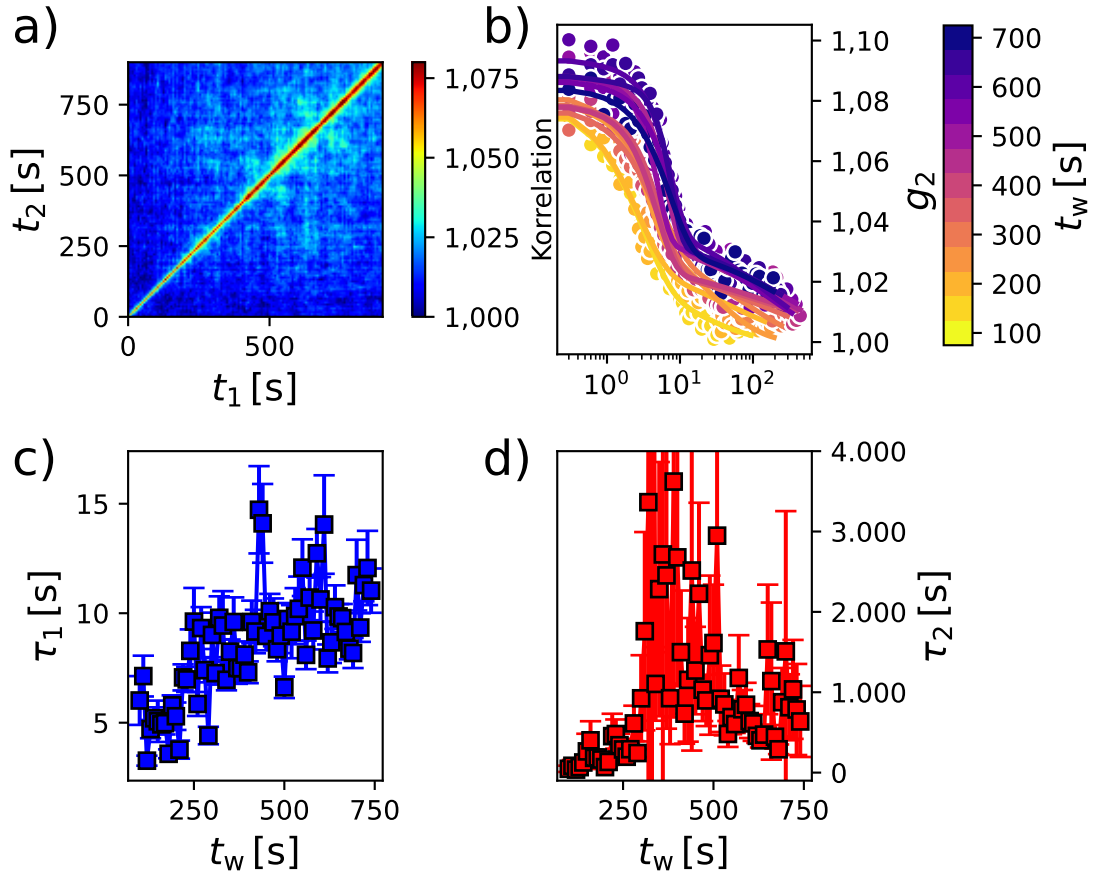


Abbildung C.4: TTC (a) und zugehörige  $g_2$ -Funktionen (b) für ausgewählte  $t_w$  zwischen 100 s und 750 s bei  $q = 0,009 \text{ nm}^{-1}$  für eine Lysozymprobe mit  $c_p = 238 \text{ mg/mL}$  nach der druckinduzierten LLPS. Die Quenchtiefe  $\Delta p$  beträgt 225 bar. Die Linien repräsentieren die modellierten  $g_2$ -Funktionen. In c) und d) sind die Zerfallszeiten  $\tau_{1,2}$  in Abhängigkeit des Probenalters gezeigt.



C.1.2 Parameter der modellierten  $g_2$ -Funktionen

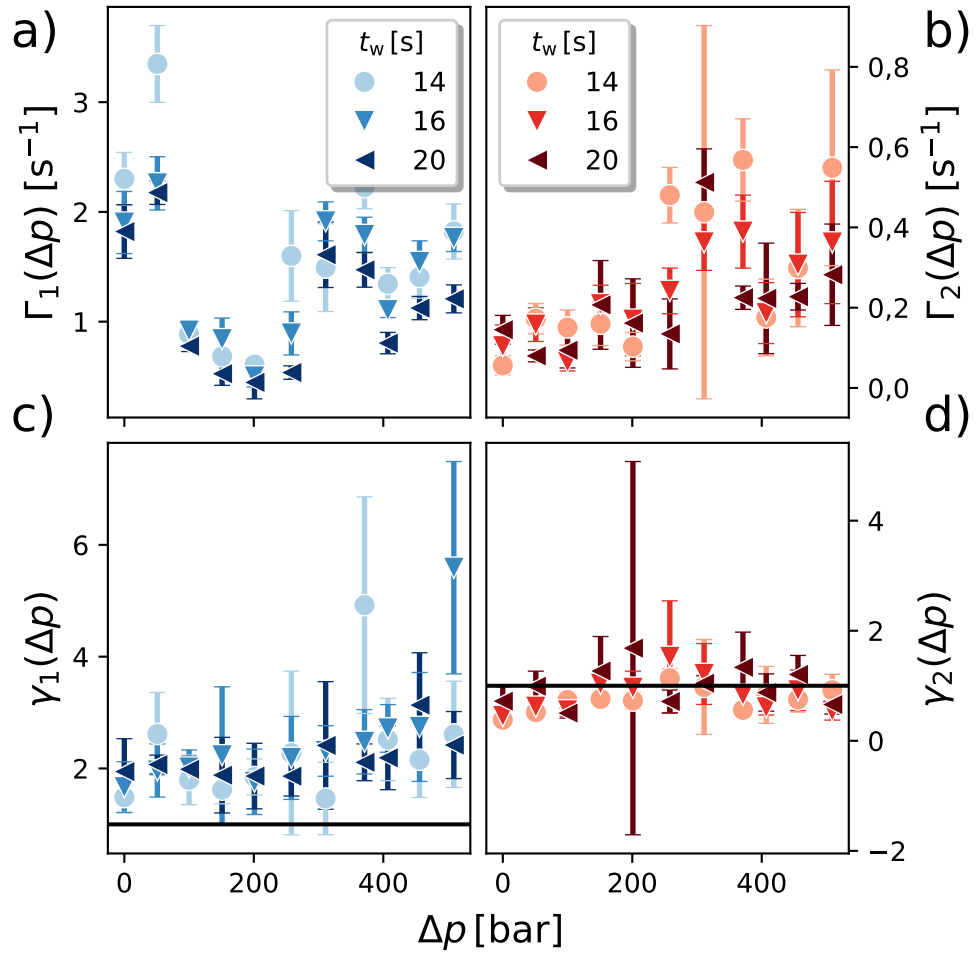


Abbildung C.5: Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  und KWW-Exponenten  $\gamma_{1,2}$  für ausgewählte Zeiten bei  $q = 0,008 \text{ nm}^{-1}$  von  $\Delta p$ .

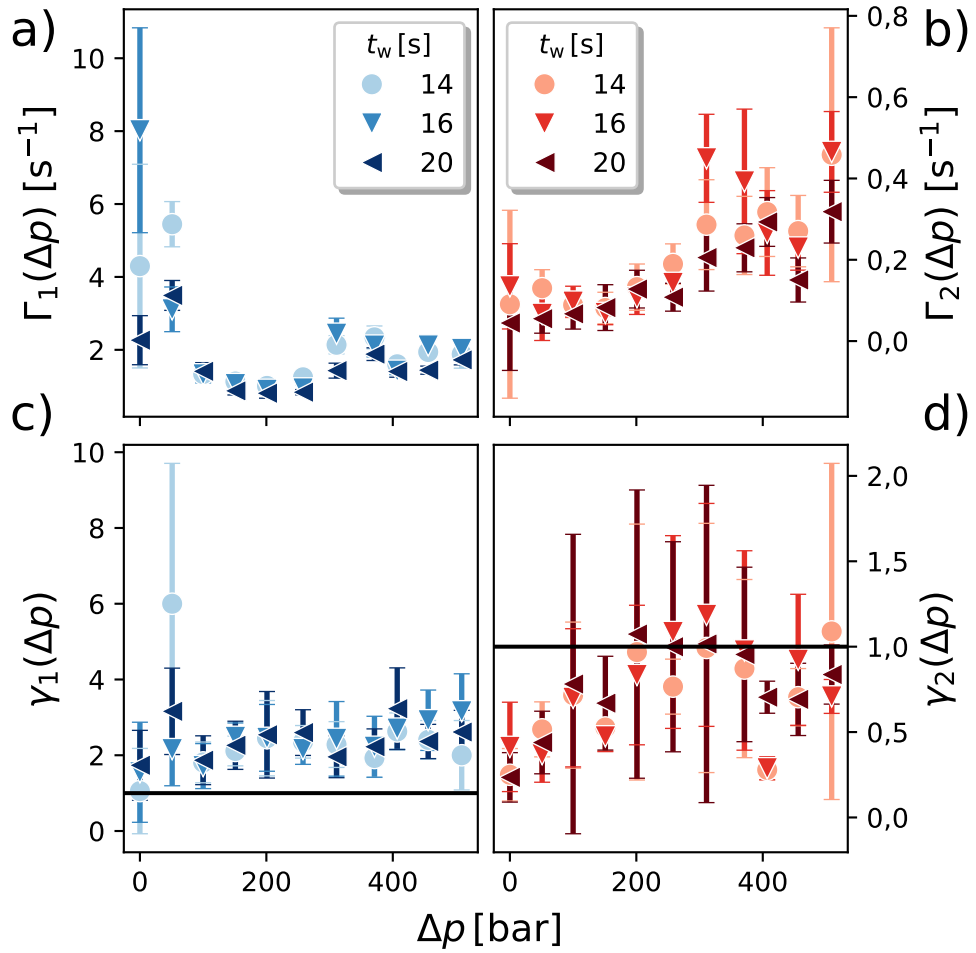


Abbildung C.6: Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  und KWW-Exponenten  $\gamma_{1,2}$  für ausgewählte Zeiten bei  $q = 0,015 \text{ nm}^{-1}$  von  $\Delta p$ .

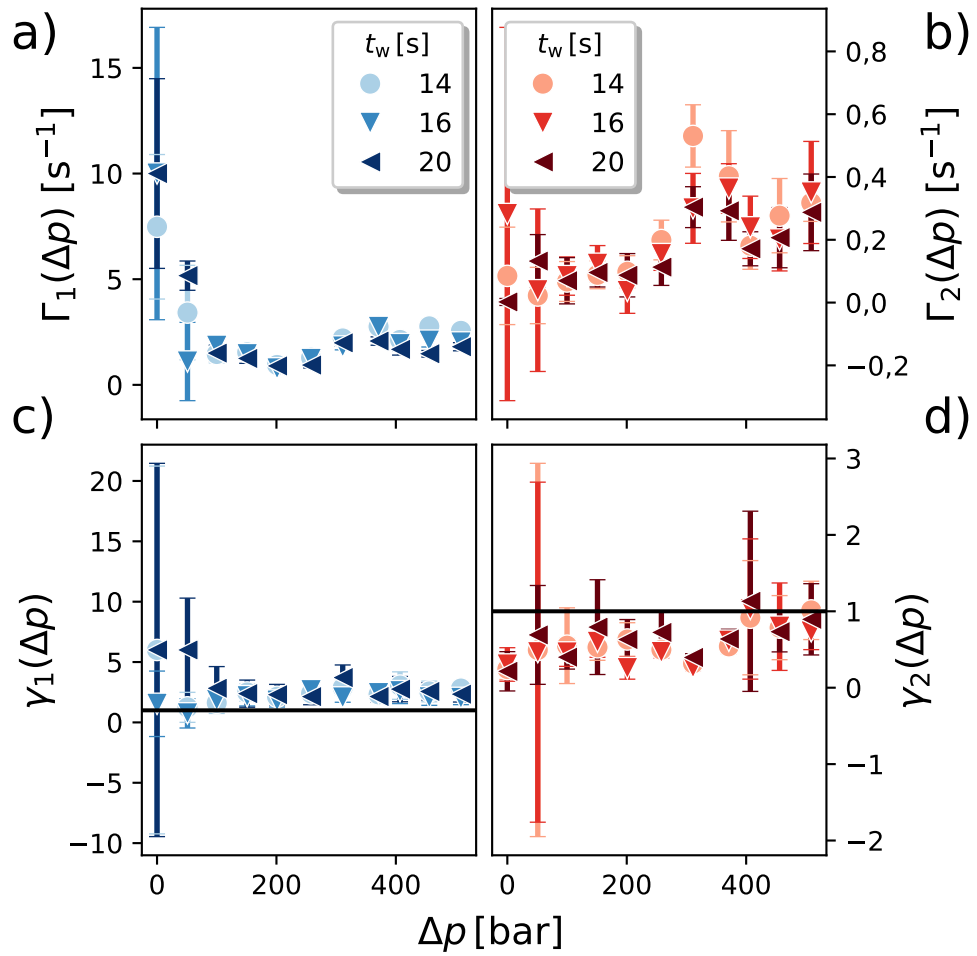


Abbildung C.7: Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  und KWW-Exponenten  $\gamma_{1,2}$  für ausgewählte Zeiten bei  $q = 0,018 \text{ nm}^{-1}$  von  $\Delta p$ .

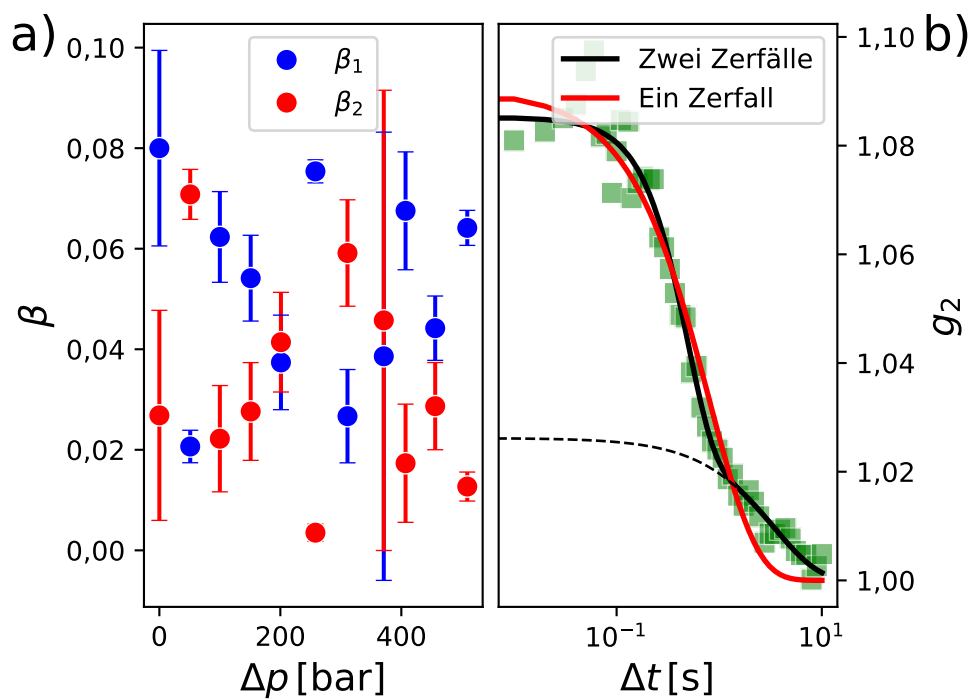


Abbildung C.8: a) Kontrastfaktoren des ersten und zweiten Zerfalls in Abhängigkeit der Quenchtiefe bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$  und  $t_w = 16 \text{ s}$ . b) Gemessene Autokorrelationsfunktion für die LLPS einer Lysozymbilösung nach einem Drucksprung von  $\Delta p = 51 \text{ bar}$  bei  $t_w = 16 \text{ s}$  und die zugehörigen Modellierungen mit einem exponentiellen Zerfall (rot) und zwei exponentiellen Zerfällen (schwarz).

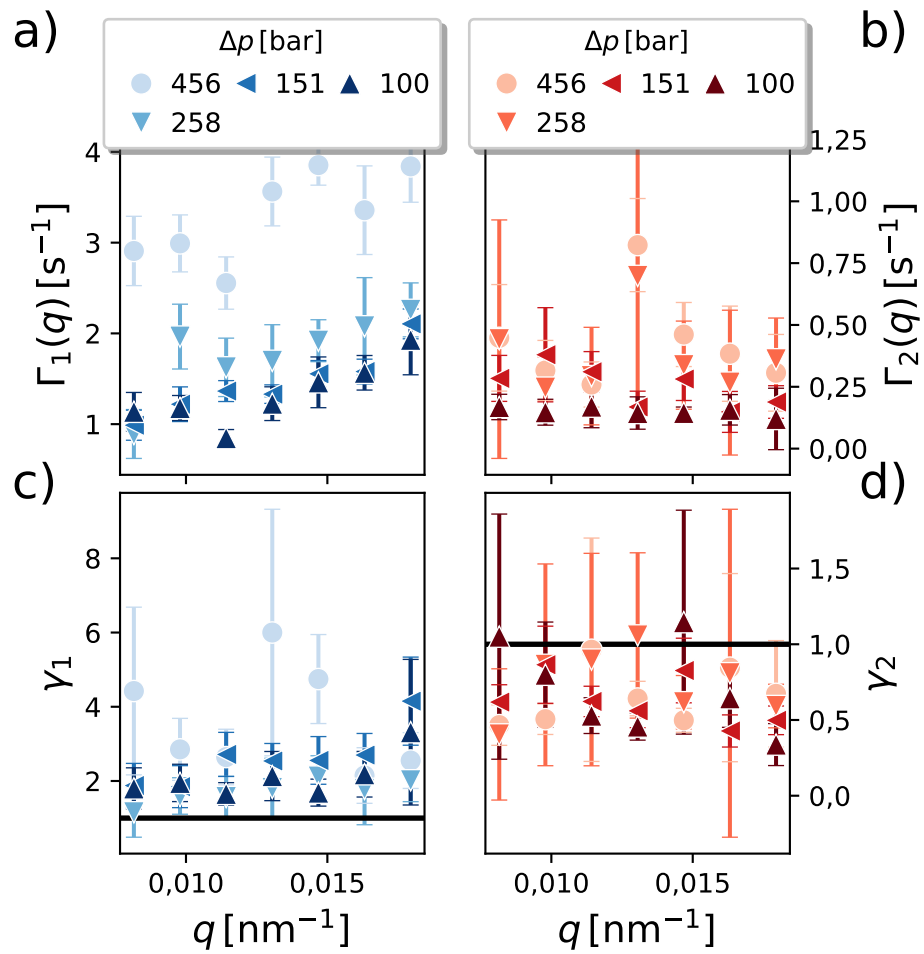


Abbildung C.9: Zerfallsraten und KWW-Exponenten in Abhängigkeit von  $q$  für  $t_w = 10$  s.

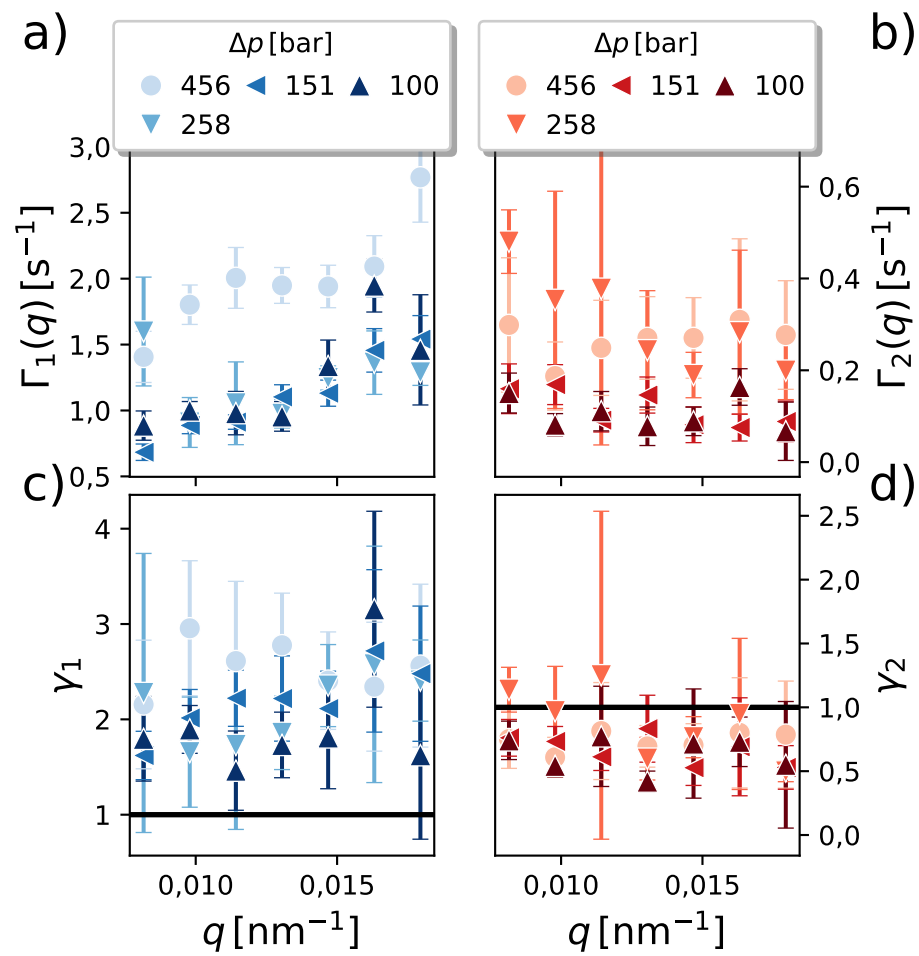


Abbildung C.10: Zerfallsraten und KWW-Exponenten in Abhängigkeit von  $q$  für  $t_w = 14$  s.

## C.2 HP-LLPS Lysozym

### C.2.1 TTCs und $g_2$ -Funktionen

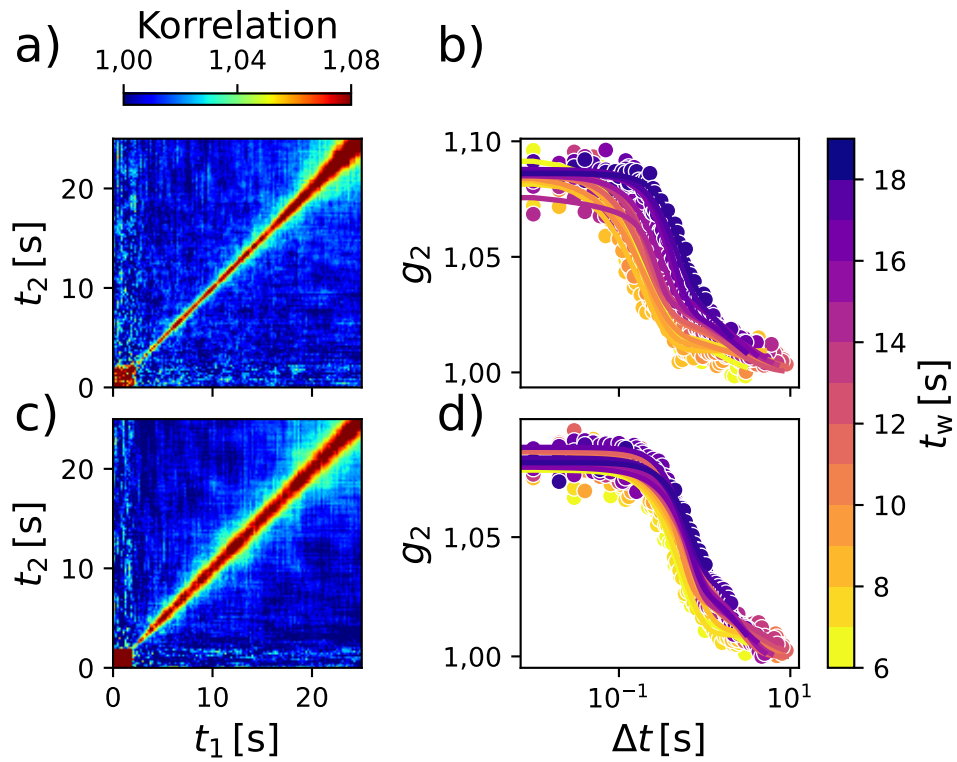


Abbildung C.11: TTCs und  $g_2$ -Funktionen für die druckinduzierte HP-LLPS (a-b)) und LP-LLPS (c-d)) bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .

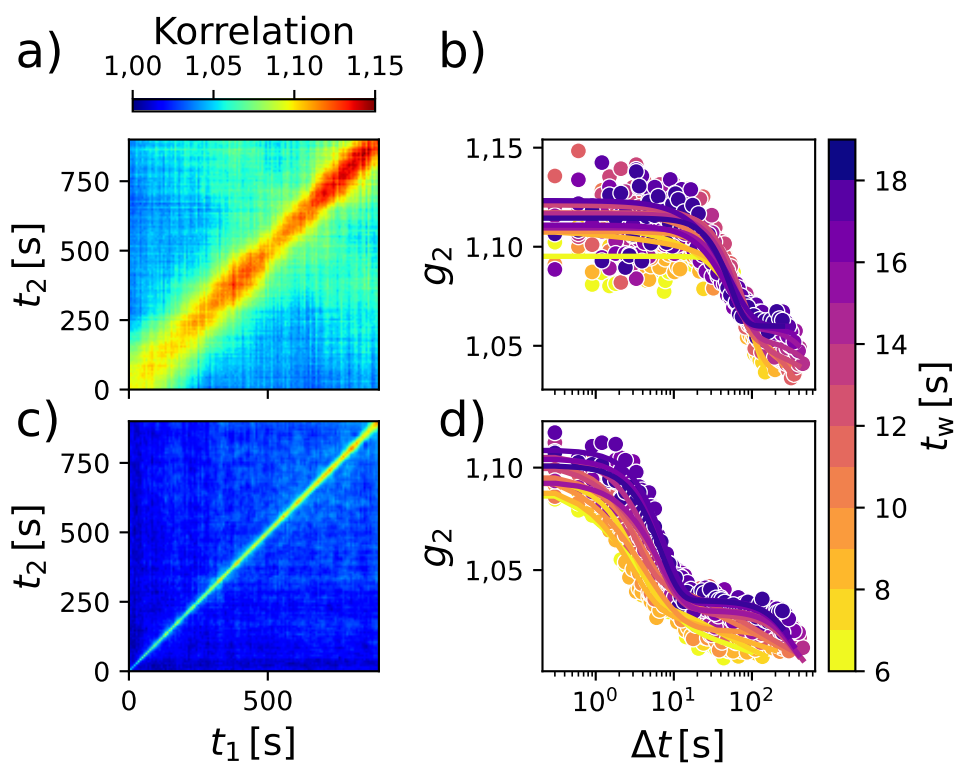


Abbildung C.12: TTCs und  $g_2$ -Funktionen für die druckinduzierte HP-LLPS (a-b)) und LP-LLPS (c-d)) bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .



### C.2.2 Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen

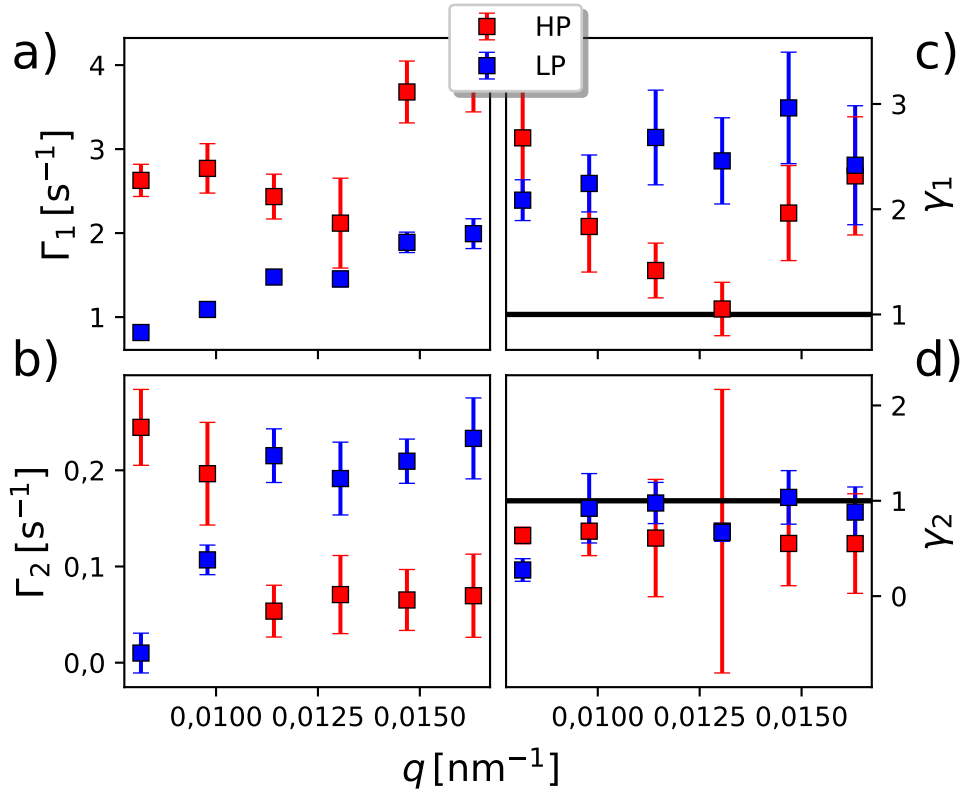


Abbildung C.13:  $q$ -Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_1$  (a) und  $\Gamma_2$  (b) und KWW-Exponenten  $\gamma_1$  (c) und  $\gamma_2$  (d) für die HP- und LP-LLPS einer konzentrierten Lysozymlösung bei  $t_w = 14\text{ s}$

## C.3 $\gamma$ D-Kristallin

### C.3.1 Zwei-Zeiten Korrelation und $g_2$ -Funktionen

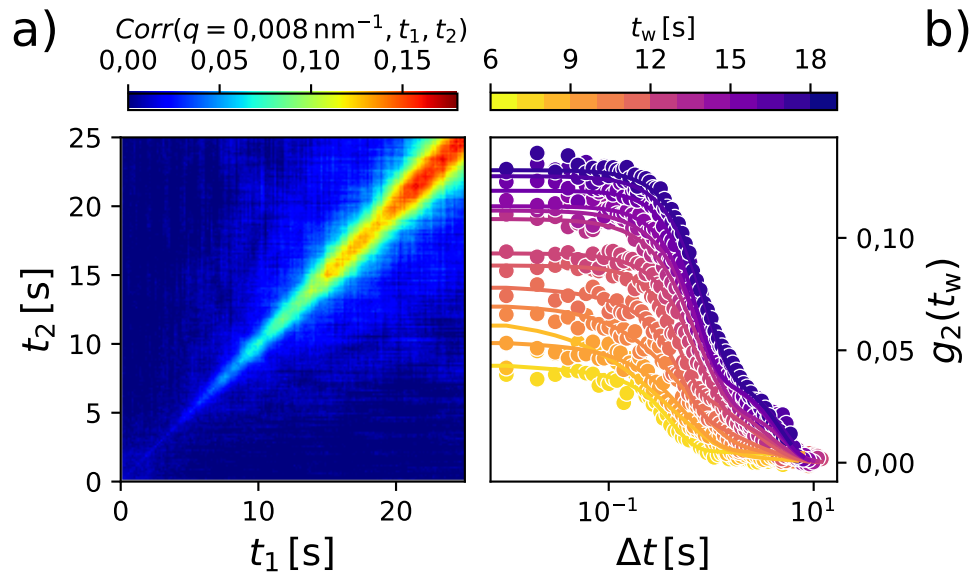


Abbildung C.14: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die frühe Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 182 \text{ mg/mL}$ .

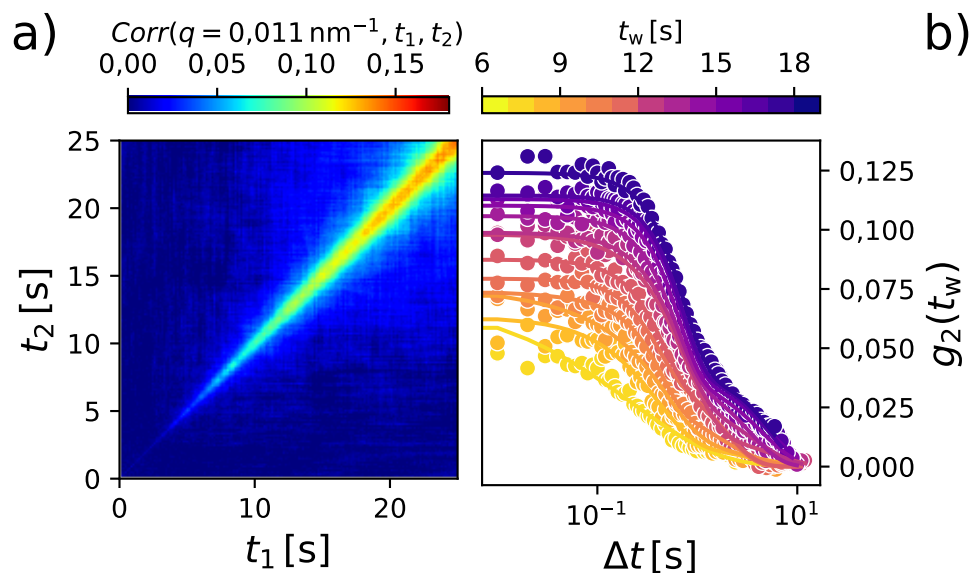


Abbildung C.15: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die frühe Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 182 \text{ mg/mL}$ .

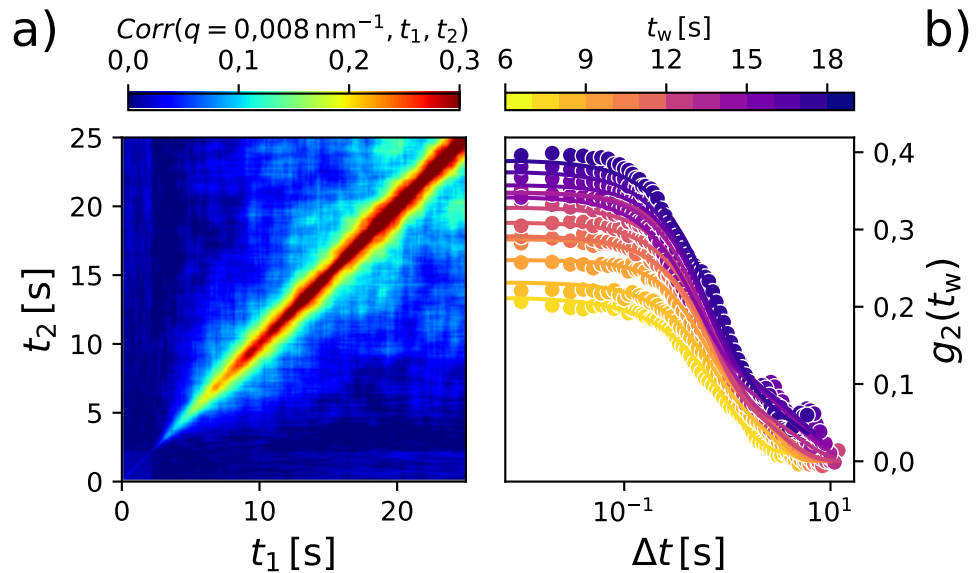


Abbildung C.16: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die frühe Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 211 \text{ mg/mL}$ .

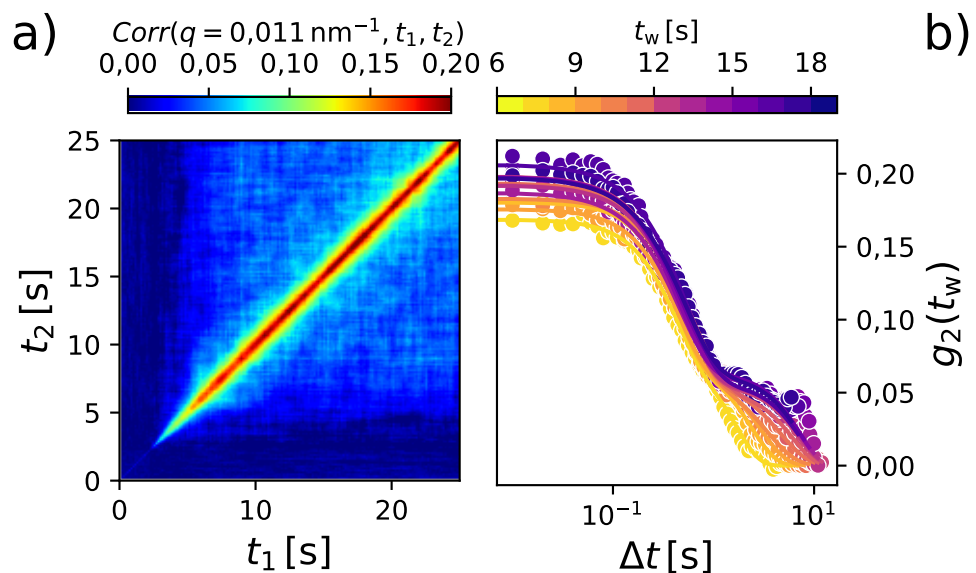


Abbildung C.17: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die frühe Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 211 \text{ mg/mL}$ .

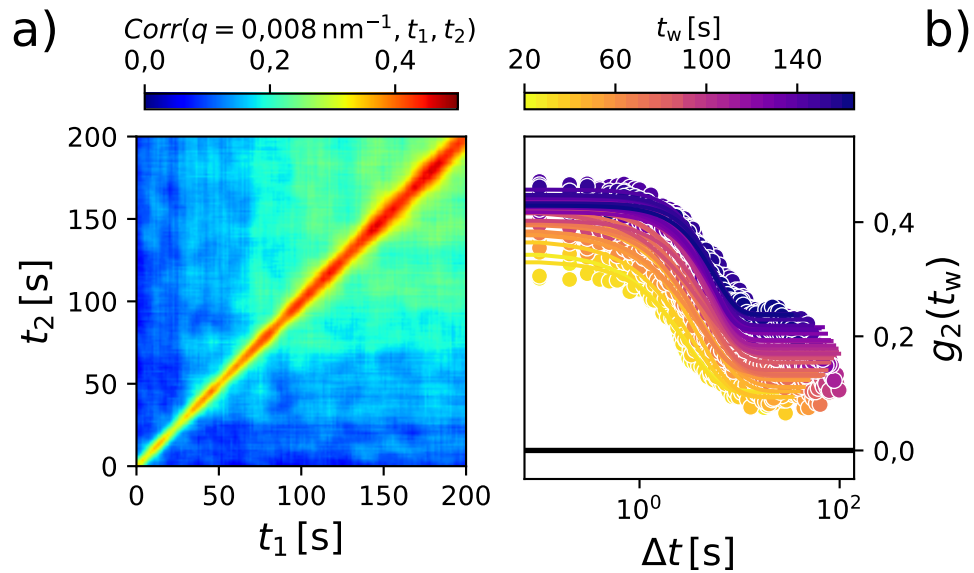


Abbildung C.18: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die späte Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 182 \text{ mg/mL}$ .

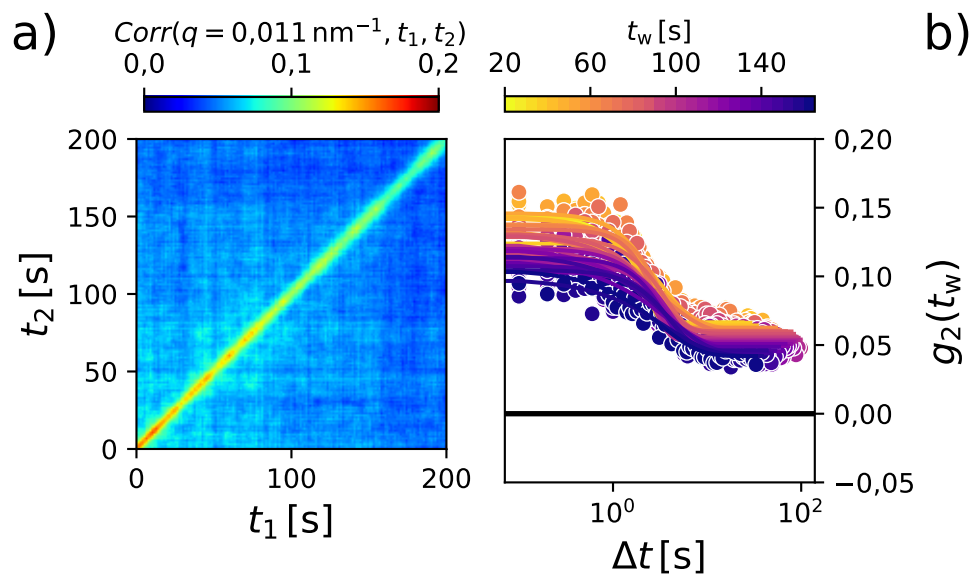


Abbildung C.19: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die späte Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 182 \text{ mg/mL}$ .

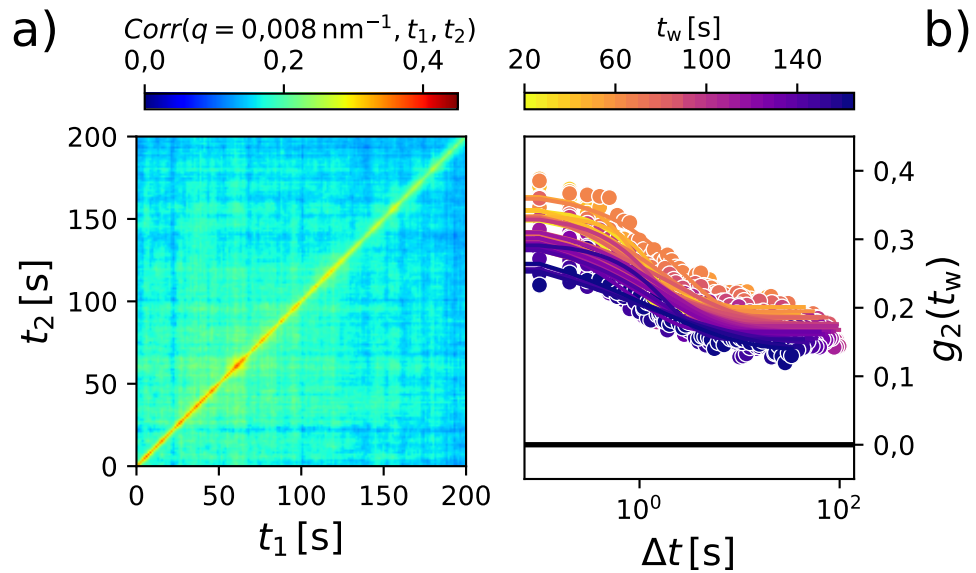


Abbildung C.20: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die späte Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 211 \text{ mg/mL}$ .

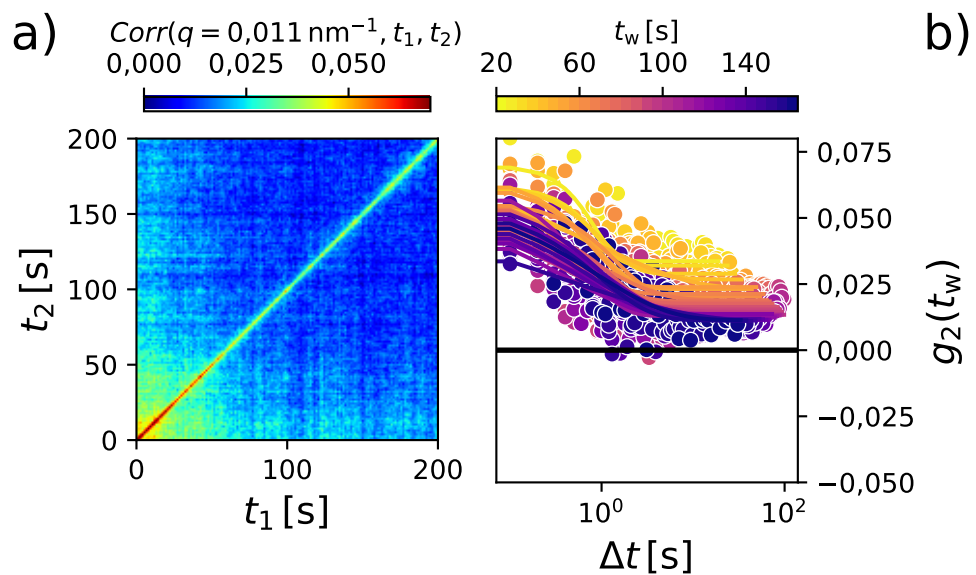


Abbildung C.21: TTC (a)) und Schnitte der TTC  $g_2$  (b)) für ausgewählte  $t_w$  für die späte Phase der druckinduzierten LLPS einer  $\gamma$ D-Kristallin Lösung mit  $c_{\gamma D} = 211 \text{ mg/mL}$ .

C.3.2 Parameter der modellierten  $g_2$ -Funktionen

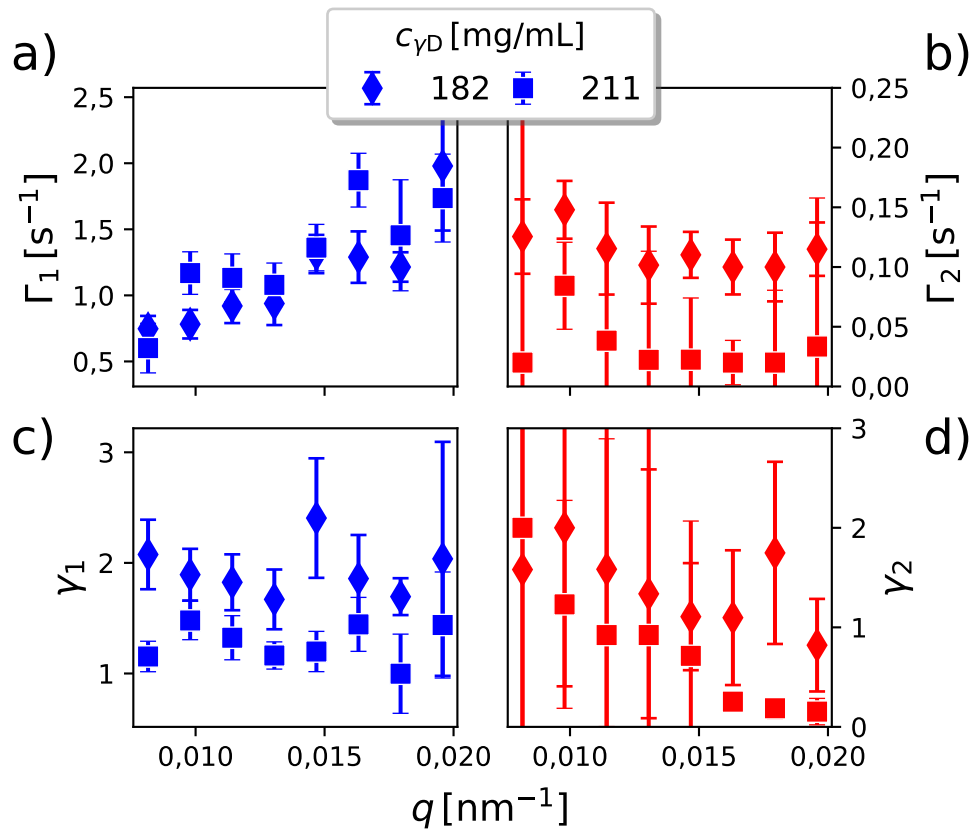


Abbildung C.22:  $q$ -Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  und KWW-Exponenten  $\gamma_{1,2}$  der druckinduzierten LLPS von  $\gamma$ D-Kristallin Lösungen mit  $c_{\gamma D} = 182$  mg/mL und  $c_{\gamma D} = 211$  mg/mL bei  $t_w = 18$  s.

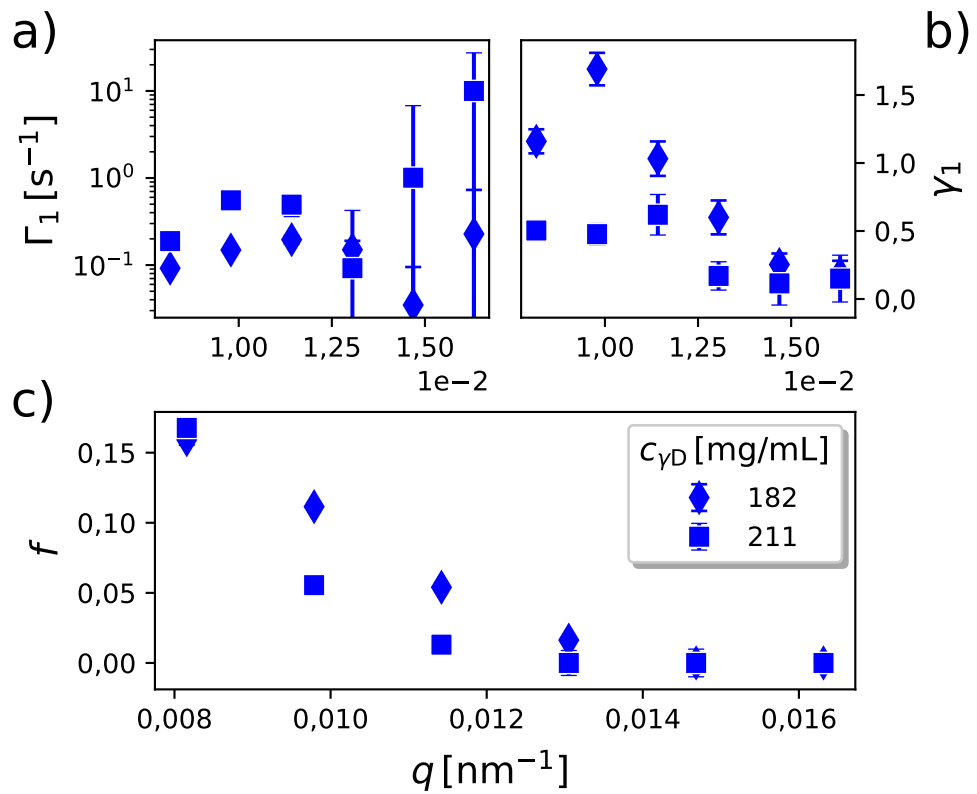


Abbildung C.23:  $q$ -Abhängigkeit der Zerfallsraten  $\Gamma_{1,2}$  und KWW-Exponenten  $\gamma_{1,2}$  für die druckinduzierte LLPS von  $\gamma$ D-Kristallin Lösungen mit  $c_{\gamma D} = 182 \text{ mg/mL}$  und  $c_{\gamma D} = 211 \text{ mg/mL}$  bei  $t_w = 100 \text{ s}$ .

## C.4 Lysozym und PEG

### C.4.1 TTCs und $g_2$ -Funktionen

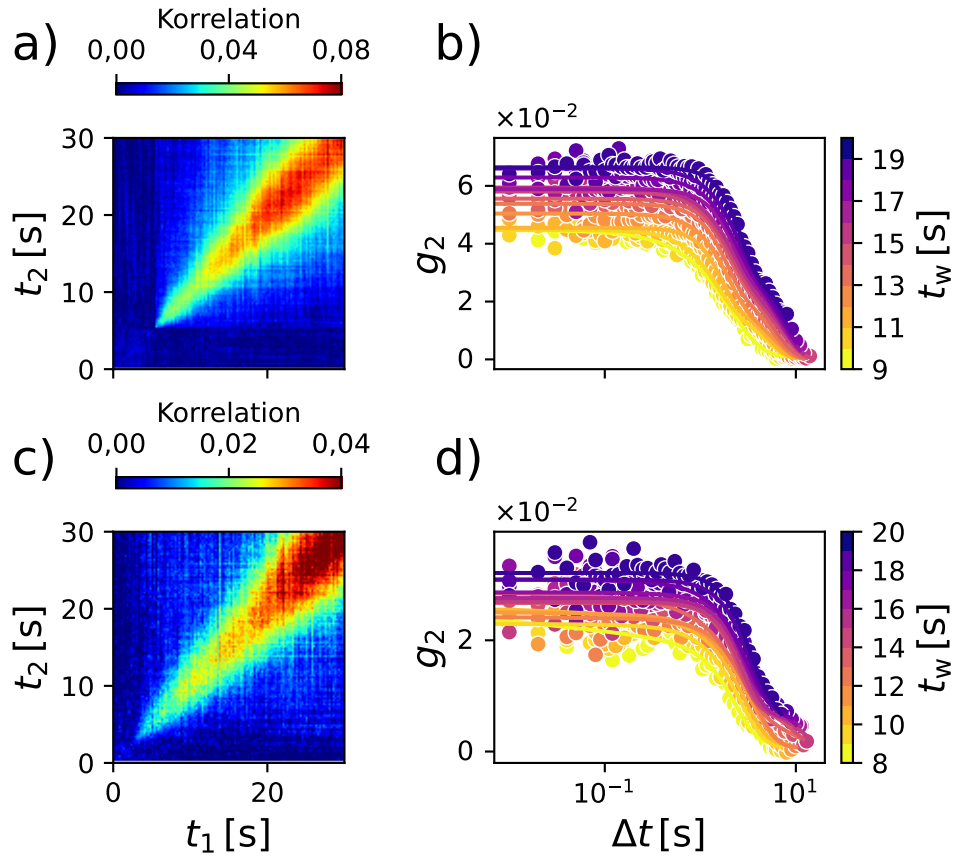


Abbildung C.24: TTCs (a) und c)) und  $g_2$ -Funktionen (b) und d)) für die druckinduzierte LLPS in eines PEG2k (a)-b)) und eines PEG4k Systems (c)-d)) bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .

### C.4.2 Parameter der modellierten $g_2$ -Funktionen



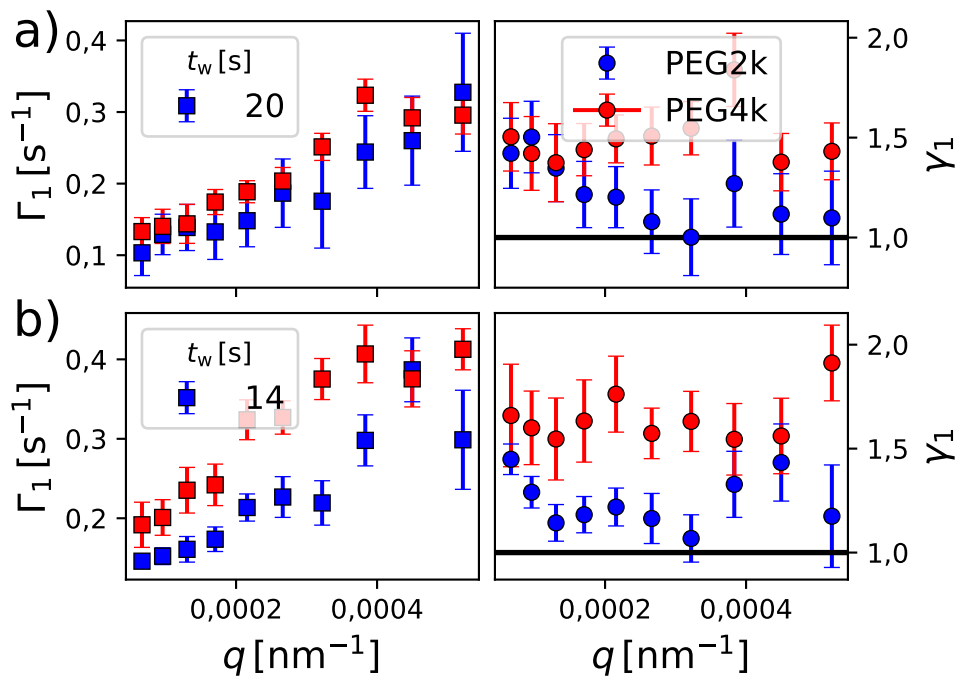


Abbildung C.25: Zerfallsraten und KWW-Exponenten für  $t_w = 20$  s (a) und  $t_w = 14$  s (b) für die druckinduzierte LLPS eines PEG2k (blau) und PEG4k (rot) Systems in Abhängigkeit von  $q$ .

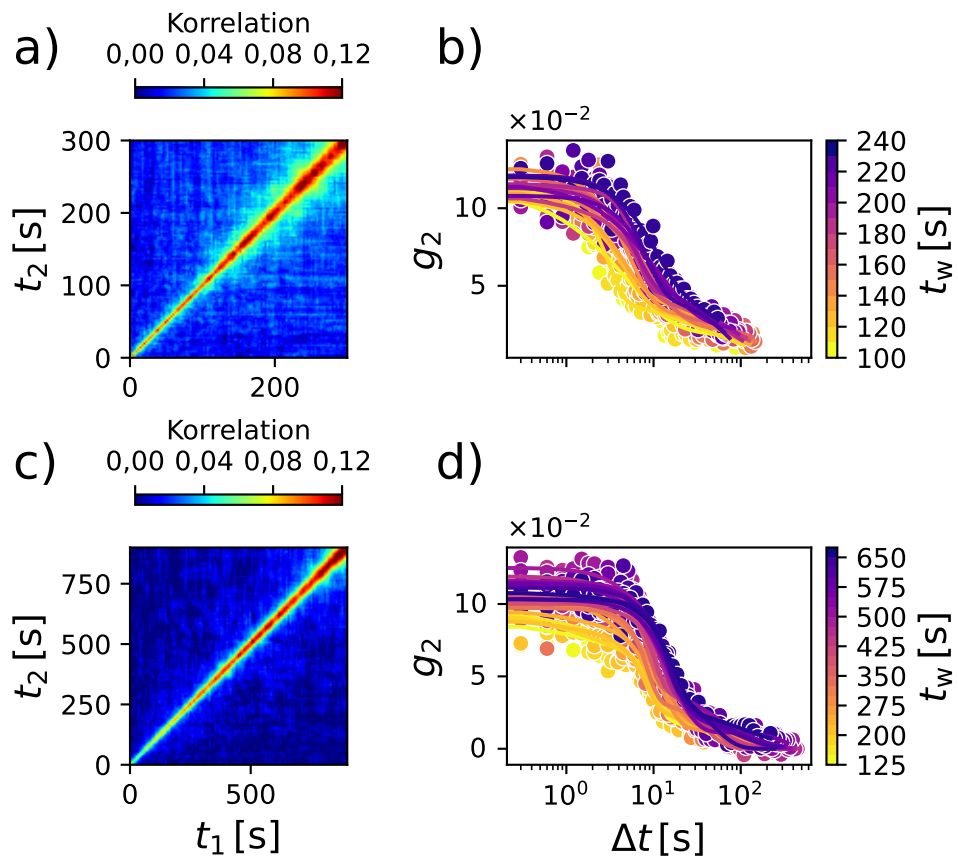


Abbildung C.26: TTCs (a) und c)) und  $g_2$ -Funktionen (b) und d)) für die späte Phase der druckinduzierten LLPS eines PEG2k (a-b)) und eines PEG4k Systems (c-d)) bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ .

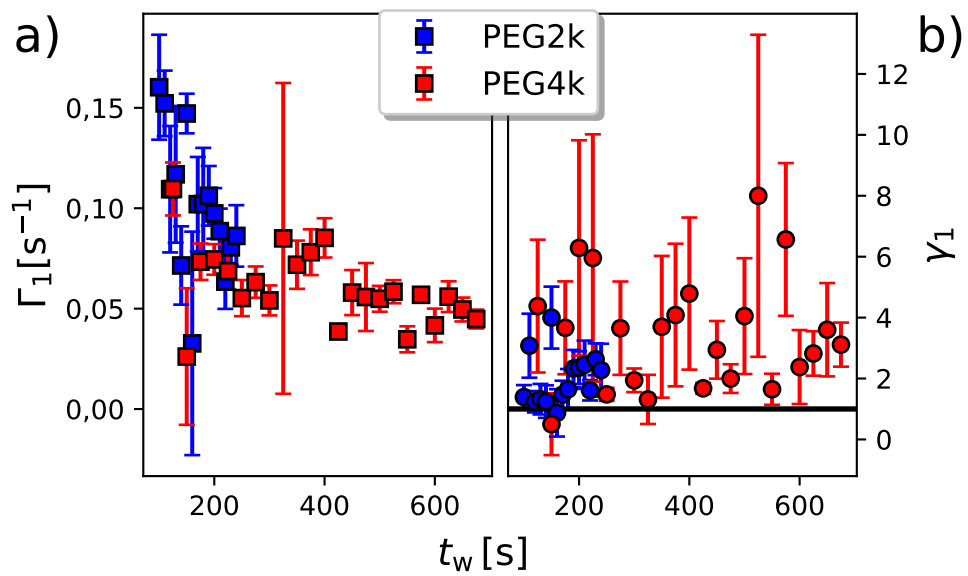


Abbildung C.27: a) Zerfallsraten des ersten Zerfalls während der späten Phase der LLPS eines Lysozym/PEG Systems bei  $q = 0,01 \text{ nm}^{-1}$ . Die zugehörigen KWW-Exponenten sind in b) dargestellt.

## C.5 Temperaturinduzierte Phasenübergänge in Lysozymbösungen

### C.5.1 SAXS-Daten

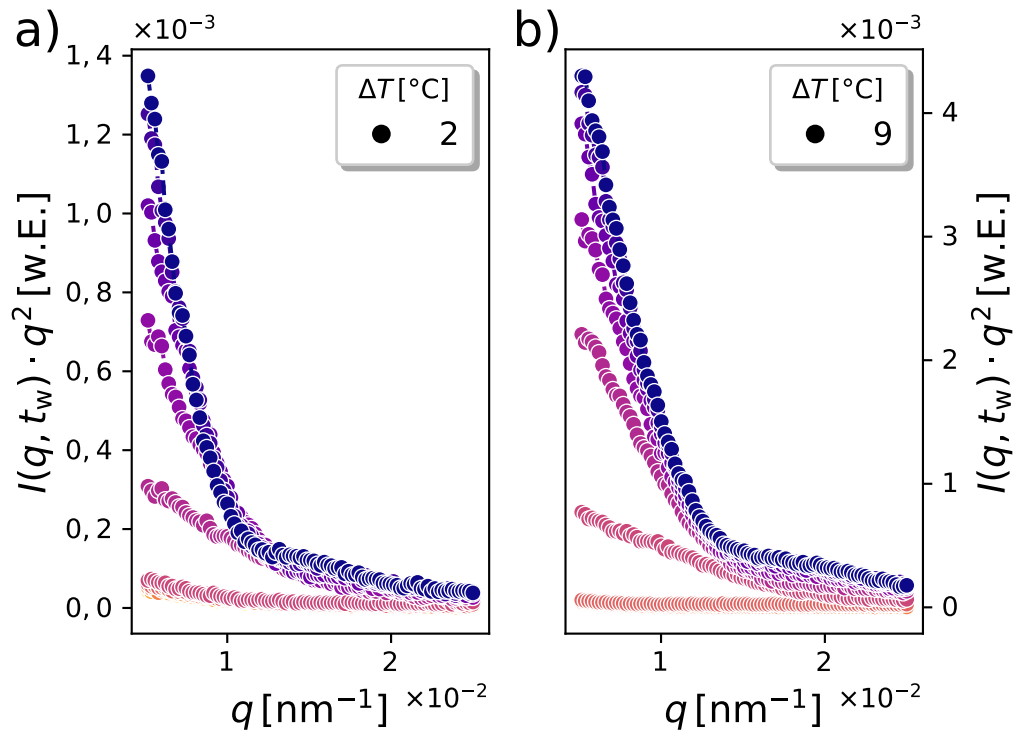


Abbildung C.28: Zeitabhängige SAXS-Kurven in der Kratky-Darstellung aufgenommen während der temperaturinduzierten LLPS einer Lysozymbösung mit Quenchtiefen von a)  $\Delta T = 2^\circ\text{C}$  und b)  $\Delta T = 9^\circ\text{C}$ .

### C.5.2 TTCs und $g_2$ -Funktionen

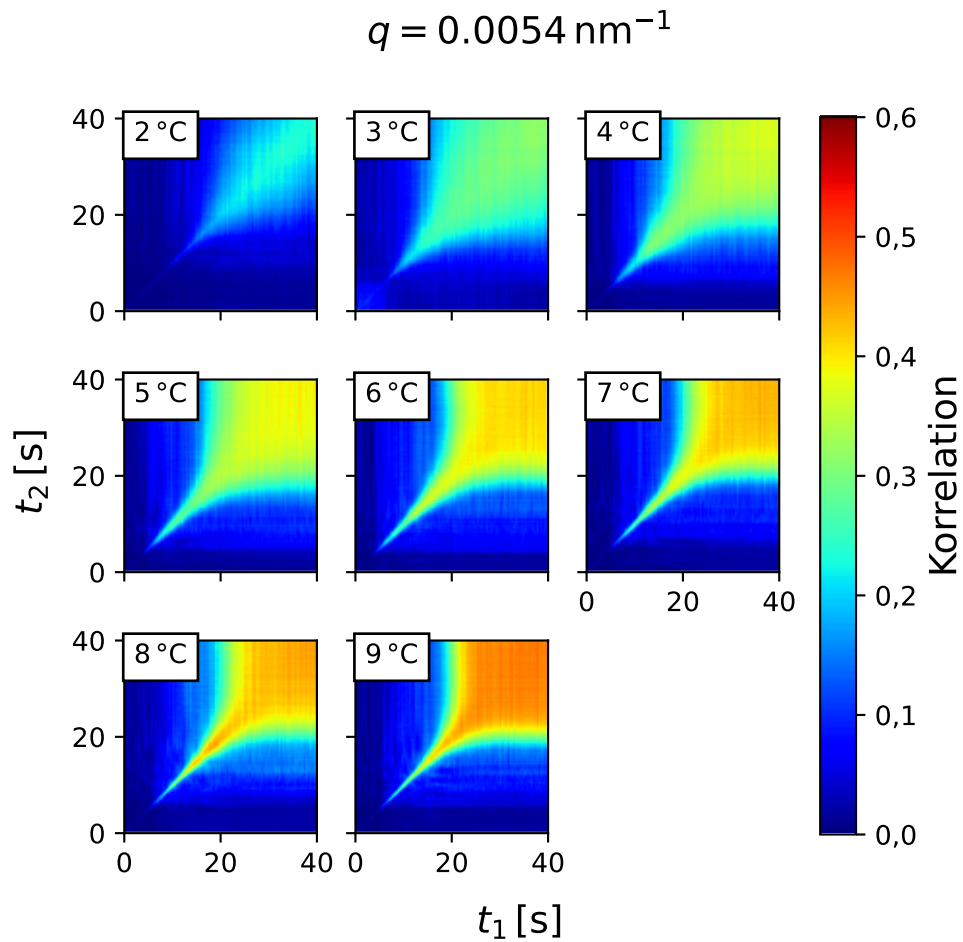


Abbildung C.29: TTCs aufgenommen während der temperaturinduzierten LLPS einer Lysozymlösung für verschiedene Quenchtiefen. Die Temperaturangabe entspricht der Quenchtiefe  $\Delta T$ .

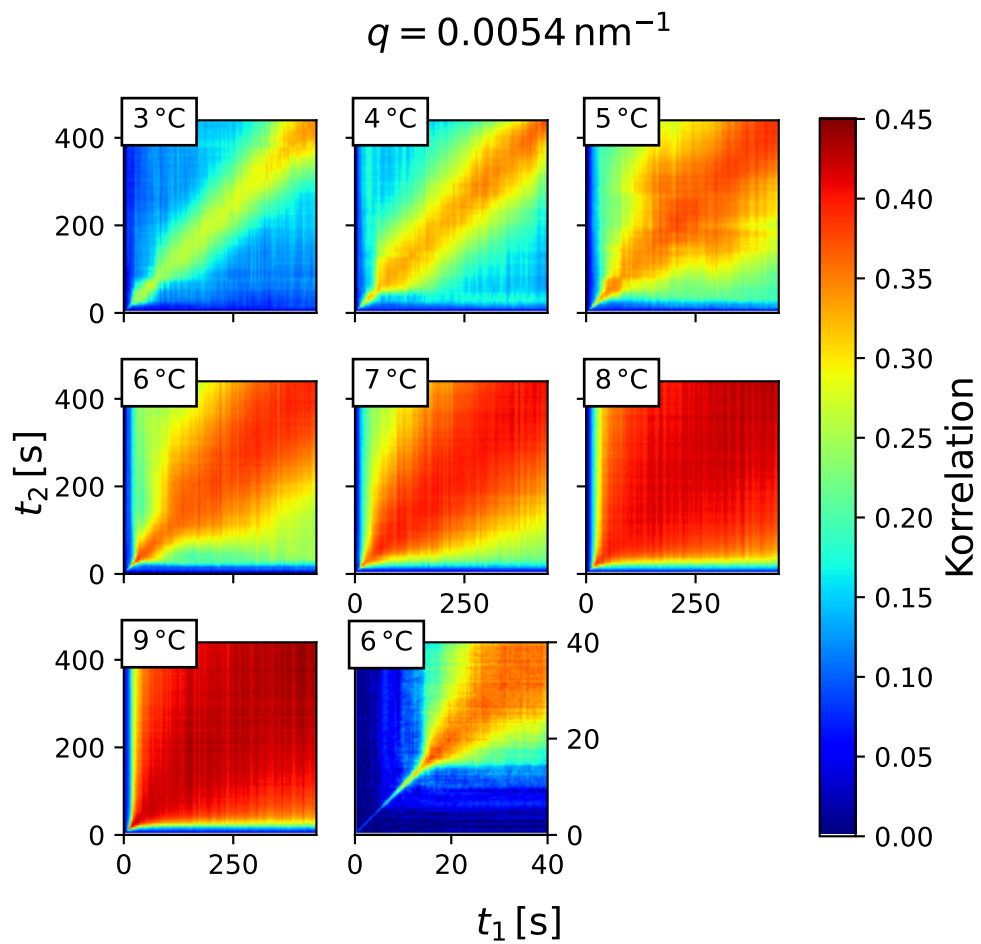


Abbildung C.30: TTCs aufgenommen während der temperaturinduzierten LLPS einer Lysozymlösung für verschiedene Quenchtiefen. Die Temperaturangabe entspricht der Quenchtiefe  $\Delta T$ . Die Gesamtmessdauer betrug 440 s. Im unteren mittleren Teil der Abbildung ist eine vergrößerte Darstellung des Bereichs der frühen LLPS für  $\Delta T = 6^\circ\text{C}$  zur Verdeutlichung der qualitativen Übereinstimmung mit den kurzen Messungen aus Abbildung C.29.

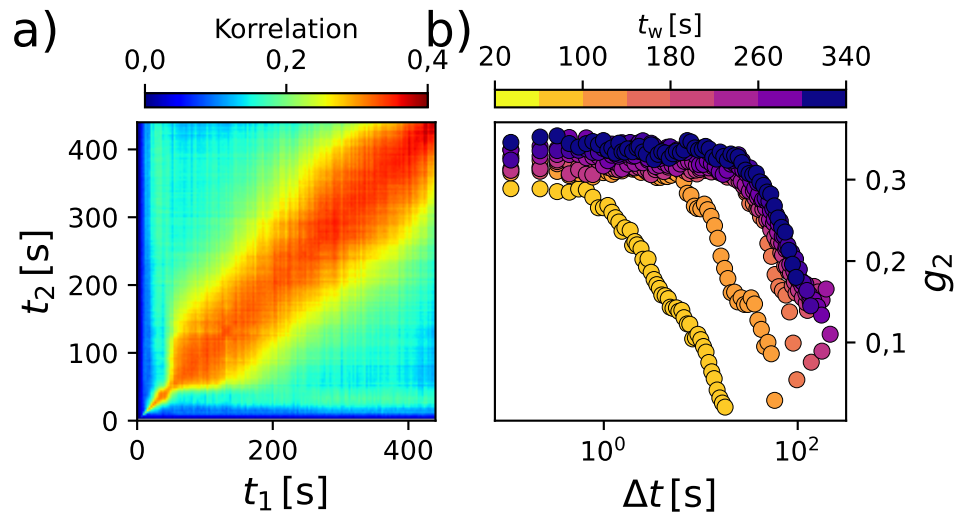


Abbildung C.31: TTC und  $g_2$  Funktionen während der temperaturinduzierten LLPS mit einer Quenchtiefe von  $\Delta T = 3^\circ\text{C}$  bei  $q = 0,0054 \text{ nm}^{-1}$ .

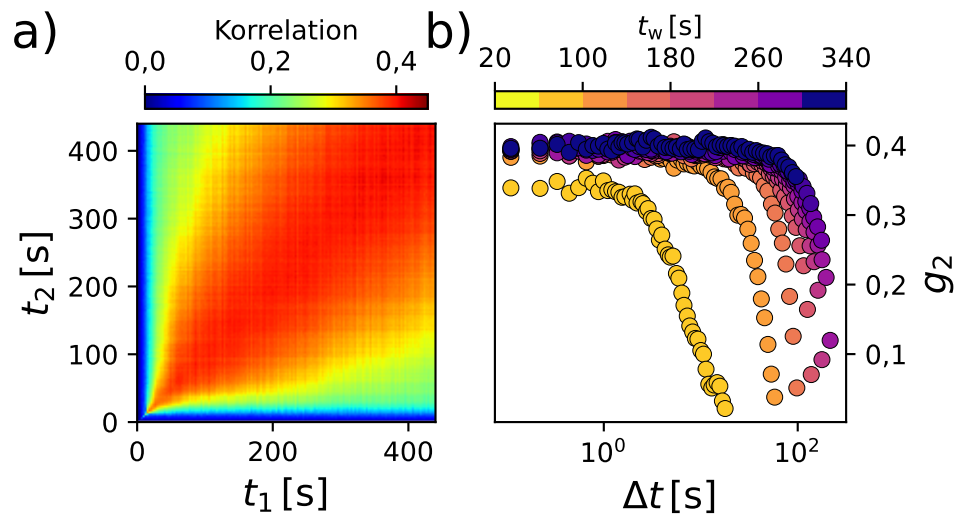


Abbildung C.32: TTC und  $g_2$  Funktionen während der temperaturinduzierten LLPS mit einer Quenchtiefe von  $\Delta T = 6^\circ\text{C}$  bei  $q = 0,0054 \text{ nm}^{-1}$ .

C.5.3 Parameter der modellierten  $g_2$ -Funktionen

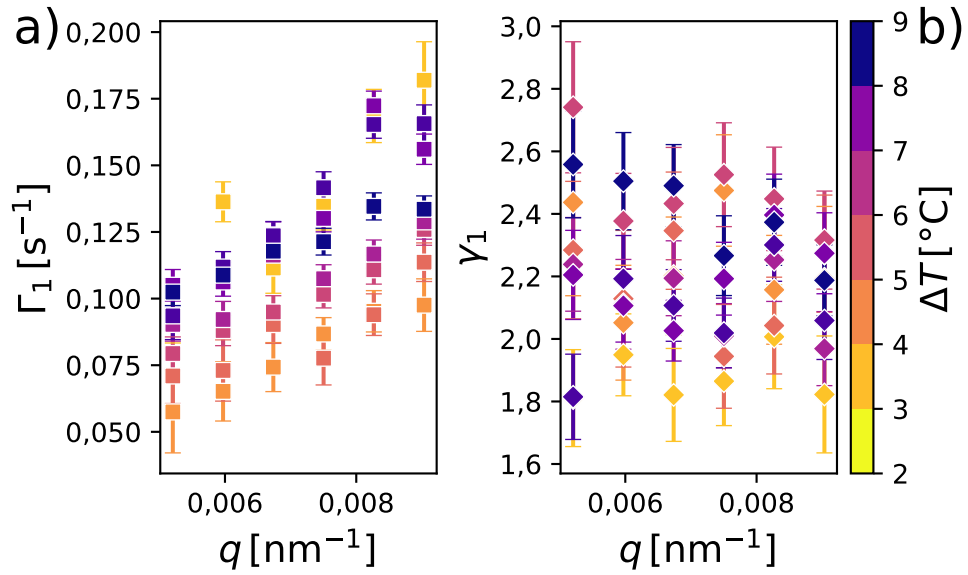


Abbildung C.33:  $q$ -Abhängigkeit der a) Zerfallsraten  $\Gamma_1$  und der b) KWW-Exponenten  $\gamma_1$  für die betrachteten Quenchtiefen  $\Delta T$  bei  $t_w = 25$  s.



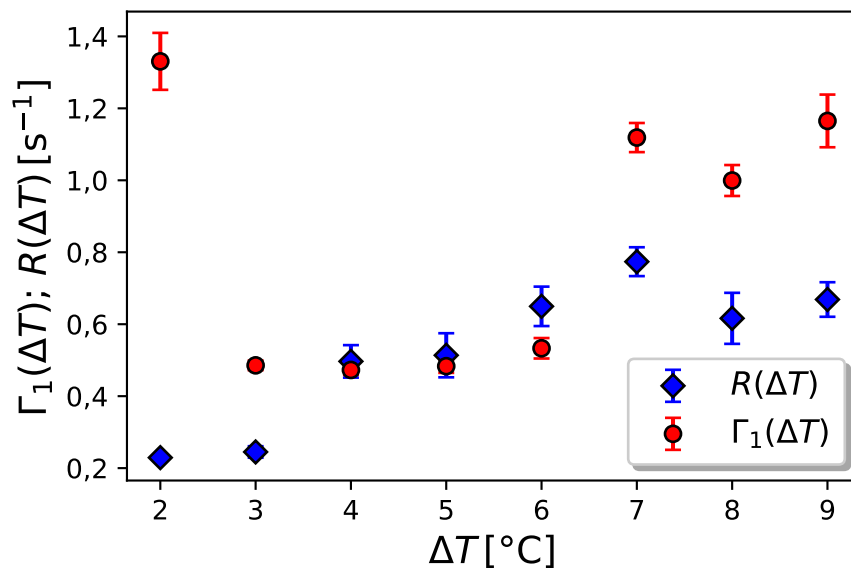


Abbildung C.34: Zerfallsrate  $\Gamma_1$  und Wachstumsrate  $R$  in Abhängigkeit der Quenchtiefe  $\Delta T$  für die frühe Phase der LLPS. Die gezeigten Parameter wurden für  $q = 0,007 \text{ nm}^{-1}$  und bei  $t_{w,dyn} = 12 \text{ s}$  bestimmt. Die Wachstumsraten aus dem SAXS-Signal wurden über ein Zeitintervall zwischen 4 s und 10,5 s abhängig von der Quenchtiefe berechnet.

## C.6 Diffusion in homogenen Lösungen

### C.6.1 DLS-Daten

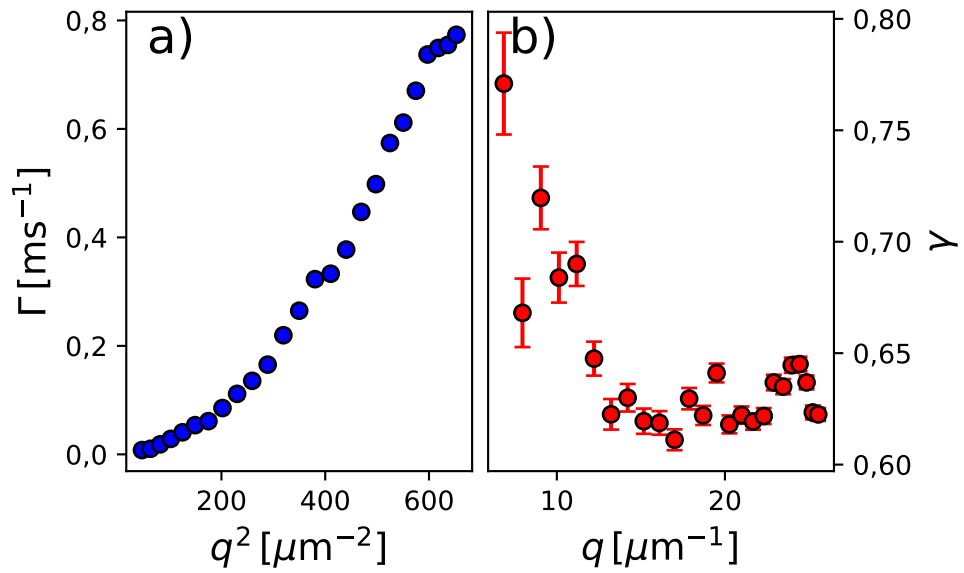


Abbildung C.35: Zerfallsrate a) und KWW-Exponent b) aus der Modellierung der Autokorrelationsfunktionen einer ungefilterten Lysozymbösung.

# Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Metin Tolan und Prof. Dr. Roland Winter für die Möglichkeit bedanken an diesem interessanten Thema arbeiten zu können und für die hilfreichen Ratschläge und regelmäßigen Diskussionen.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Christian Gutt für die Einführung in die XPCS-Methode, seine hilfreichen Ratschläge und anregenden Diskussionen, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Prof. Dr. Frank Schreiber bedanke ich mich für die Möglichkeit, DLS-Messungen an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Ich bedanke mich außerdem bei Dr. Michael Paulus für die intensive Betreuung, die vielen hilfreichen Ratschläge und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Weiterer Dank gilt Dr. Christian Sternemann für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge. Ein großer Dank gilt außerdem allen Beteiligten, die mich bei den Messzeiten unterstützt haben. Dabei möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. Christian Gutt, Dr. Michael Paulus, Dr. Mario Reiser, Dr. Göran Surmeier, Dr. Jennifer Bolle, Dr. Lisa Randolph, Sonja Timmermann und allen weiteren Personen, die ich vergessen haben könnte, bedanken. Bei PETRA III und den Ansprechpartnern vor Ort, Dr. Michael Sprung und Dr. Fabian Westermeier, bedanke ich mich für die Strahlzeit und für die durchgehende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Für die tolle Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl E1a bedanke ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Lehrstuhlmitgliedern, insbesondere bei meinem Bruder und Bürokollegen Mike Moron, Nicola Thiering, Christian Albers, Alexander Kononov, Dr. Susanne Dogan, Dr. Göran Surmeier und Gordon Scholz.

Bei RESOLV (EXC 2033) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Für die Unterstützung während des Studiums bedanke ich mich bei meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern, die allesamt immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Partnerin Julia Helmig, die mir während meines gesamten Studiums zur Seite stand.