

6 Datensammlung und Derivatisierungsversuche

6.1 Voruntersuchungen

Oft reichen polarisationsoptische Untersuchungen nicht aus, um zwischen einem Protein- oder Salzkristall des Kristallisationsexperiments zu unterscheiden. Gewissheit schaffen nur die ersten Beugungsexperimente. Dazu wurden Kristalle der idiomorphen, rhombischen Morphologie des *Crystal Screens* in eine Kapillare montiert und erste Testmessungen an einem *Imageplate*-System (MAR Research, Hamburg) mit Röntgenstrahlung, erzeugt am institutseigenen Generator mit Rotationsanoden (ENRAF-Nonius FR 571, Delft), durchgeführt. Mittels DENZO (Otwinowski und Minor, 1997) wurden erste Oszillationsaufnahmen indiziert und Gitterparameter ermittelt. Diese zeigten, dass die idiomorphen Kristalle dem orthorhombischen Kristallsystem zuzuordnen sind. Die Dimensionen der Gitterparameter (Tab.6.3.1) bewiesen, dass es sich bei dem vorliegenden Kristall um Protein und nicht um Salz handelt. Die mit diesen Kristallen erzielte Auflösung war auf 7 Å beschränkt.

Nach einer Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen konnten Kristalle besserer Qualität erhalten werden, die an institutseigenen Messgeräten bis zu einer Auflösung von ca. 5 Å beugten (Cu K α). Trotz einer Mosaizität von $\Delta\varphi = 0.7^\circ$ war die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes möglich. Da die Kristallpackung aus chiralen, isomeren Molekülen bestand, konnten die Kristallklasse von der Lauegruppe "mmm" unmittelbar auf die Punktgruppe "222" eingegrenzt werden. Der gemessene Datensatz enthielt die Reflexe aller drei für die Raumgruppenbestimmung notwendigen Auslöschungsrichtungen des reziproken Raums. Deshalb konnte die Kristallsymmetrie mit dem Raumgruppensymbol $P2_12_12_1$ bestimmt werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Kristallform als Modifikation I (Mod. I) bezeichnet.

Die Symmetrie der bei neutralem pH-Wert gezüchteten Kristalle (Mod. IV) war der Raumgruppe $P2_12_12_1$ zuzuordnen. Ein Vergleich der Gitterparameter zu den anderen rhombischen polytypen Modifikationen ergab keine naheliegende Symmetrieverwandtschaft der Molekülpackung (Tab.6.3.1).

Kristalle des ϵ, ζ (V234Stop) Proteins wurden in Quarzkapillaren montiert, so konnten am institutseigenen Generator Oszillationsaufnahmen gemacht werden. Die ermittelten

Gitterparameter ließen auf ein hexagonales Kristallsystem schließen. Die Auflösung war mit 3.5 Å beschränkt. Da diese Kristalle jedoch erst bei Beendigung dieser Arbeit erhalten wurden, konnten keine weiteren röntgenographische Experimente durchgeführt werden.

6.2 *Cryoexperimente*

Für Tieftemperaturexperimente (100 K) wurde nach Lösungen gesucht, bei denen ein Einkristall ohne Schaden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert werden konnte. Zu Beginn der Arbeit wurden dafür Kristalle für 10 min gegen Lösungen equilibriert, deren Konzentration an PEG 3 350 Da und Ethylenglykol sukzessive erhöht wurde. Ausgehend von der Zusammensetzung der Reservoirlösung der Kristallisation wurde der Gehalt an PEG 3 350 Da in 2 % (w/v) Schritten sukzessive auf 22 % (w/v) erhöht wurde. Im ersten Schritt wurde auch die Ethylenglykolkonzentration spontan auf 15 % (v/v) gesteigert.

Kristalle, die auf diese Weise präpariert waren, konnten mit *cryo-loops* (Hampton Research, Laguna Hills, CA) aus der Lösung gefischt und schockgefroren werden. Anschließend konnten diese im mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar bis zur Messung gelagert werden. Am Sockel der *cryo-loops* befand sich ein rundes Metallplättchen. Damit konnte dieser am Goniometerkopf, der einen magnetischen Stempel trug, befestigt werden. Dieses Schockgefrieren verbesserte die Auflösung zu durchschnittlich 4.0 Å. Die polymorphen Kristalle (Kapitel 5.2.1) konnten nach dem selben Protokoll für Tieftemperaturmessungen vorbereitet werden.

Nach der Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen von Mod. I wurden auch die Cryo-Bedingungen verbessert. Kurz nach dem Öffnen wurde der Kristallisationstropfen mit 5 µl einer Lösung bestehend aus 50 mM Natriumacetat und 50 mM PIPES titriert zu pH 7.0, 17 % (w/v) PEG 1 500 Da und 10 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol versetzt und für 10 min äquilibriert. Die so behandelten und schockgefrorenen Kristalle streuten an institutseigenen Messgeräten bis 2.3 Å, im Synchrotronstrahl bis zu 1.95 Å. Auch Kristalle mit punktmutierten ε,ζ Proteinkomplex wurden auf gleiche Weise für Tieftemperaturmessungen vorbereitet.

Kristalle, die bei pH 7.0 gebildet wurden, konnten in eine Quarzkapillare montiert und so Datensätze gesammelt werden. Versuche, diese Kristalle zu schockgefrieren, endeten in deutlich verschlechterter Kristallqualität.

6.3 Polytypie

Im Falle der Kokristallisation der drei polymorphen Modifikationen (Kapitel 5.2.1) zeigte sich bei den röntgenographischen Untersuchungen, dass zusätzlich eine Polytypie vorliegt. Es konnten von Einkristallen aller drei Modifikationen vollständige Datensätze gemessen und deren Symmetrieeigenschaften bestimmt werden (Tab. 6.3.1). Kristalle mit idiomorpher, rhombischer Tracht konnte der Mod. I zugeordnet werden. Die Kristalle xenomorpher Tracht beugten bis zu einer max. Auflösung von 2.9 Å und zeigten in Vergleich zu Mod. I stark verkürzte Translationsperioden des reziproken Raums, die Symmetrie der Kristalle war $P2_12_12_1$, analog zu Mod. I. Ein Vergleich der Gitterparameter von Mod. I und Mod. II ließ eine Symmetrieverwandtschaft zwischen den polytypen Formen vermuten. So können die Gitterparameter der Mod. II durch die Transformationsmatrix

$$\begin{pmatrix} 0 & 1/3 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

in vergleichbare der Mod. I überführt werden. Schon nach der Sammlung weniger Datensätze einzelner Kristalle der Mod. I zeigte sich, dass der Gitterparameter c stark variierte (± 8 Å), Gitterparameter a und b waren konstant. Die Differenz der in Tab. 6.3.1 angegebenen Gitterparameter c widerspricht aufgrund seiner Varianz nicht der vermuteten Symmetrieverwandtschaft.

Weiter zeigen Reflexreihen der Mod. II schwache Zwischengitterschichten in Richtung \mathbf{b}^* . Schichten des Typs $h,3n,l$ beinhalten Reflexe starker Intensitäten, Schichten der Multiplizität $h,3n-2,l$ und $h,3n-1,l$ Reflexe mit vergleichbar schwächerer Intensität. Dies kann bedeuten, dass die Mod. II eine Überstruktur von Mod. I darstellt, deren Translationskomponente in Mod. II durch Symmetriebrüche gegenüber Mod. I verdreifacht ist. Ein polysynthetischer Zwillings nach $[010]$ könnte dieses Beugungsbild ebenso erzeugen, polarisationsoptische Beobachtungen deuteten jedoch nicht darauf hin.

Kristalle der Mod. III beugten bis zu einer Auflösung von 3.3 Å, deren Kristallsymmetrie konnte den enantiomorphen Raumgruppen $P4_12_12$ / $P4_32_12$ zugeordnet werden.

Reservoirlösung I:
100 mM Natriumacetat pH 4.6, 10 % (w/v) PEG 6 000 and 15 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol

Raumgruppe	$P2_12_12_1$			
Gitterparameter		a [Å]	b [Å]	c [Å]
Mod. I		59.23	79.85	191.44
Mod. II		80.32	179.51	202.58
				Auflösung [Å]
Mod. I				4.00
Mod. II				2.90
Raumgruppe	$P4_12_12$ / $P4_32_12$			
Mod. III		65.04		209.00
				3.3

Reservoirlösung II:
100 mM Natriumacetat/Pipes pH 7.0, 10 % (w/v) PEG 3 350 and 15 % Ethylenglykol

Raumgruppe	$P2_12_12_1$			
Gitterparameter		a [Å]	b [Å]	c [Å]
Mod. IV		50.49	143.18	153.73
				Auflösung [Å]
				3.1

Tab. 6.3.1 Gitterparameter, Raumgruppensymbol und maximale Auflösung der polytypen Modifikationen. Die Daten der hier angegebenen Kristalle wurden an Synchrotronstrahlungsquellen gemessen. Zusätzlich sind die Kristallisationsbedingungen angegeben.

6.4 Derivatisierungsversuche

Die Methode des isomorphen (isotypen) Ersatzes mit Schweratomen bietet die Möglichkeit, das Phasenproblem bei einem Röntgenbeugungsexperiment an Proteinkristallen zu lösen. Voraussetzungen dafür sind, dass mindestens ein nativer Datensatz und ein derivatisierter Datensatz einer Kristallform vorliegen (*Single Isomorphous Replacement*). Letzterer sollte nach Möglichkeit bis auf gebundene Schweratome die selbe atomare Anordnung des Proteins wie das native besitzen. Aus diesem Grunde wurden Kristalle in Reservoirlösungen mit verschiedenen Schweratomkomponenten inkubiert. Dabei sollten Schweratome oder Schweratomkomplexe in die Lösungsmittelkanäle des Proteinkristalls diffundieren und an diskrete Stellen des Proteins binden.

Um eine mögliche Bindung zu überprüfen, wurden zuerst Proteinlösung und diverse Schweratomverbindungen gemischt und die Masse des Proteins mit Hilfe von MALDI-TOF bestimmt. Meist ließ sich so eine Verschiebung zu größeren Massen feststellen und folglich eine Bindung einer Komponente an das Protein zeigen. Dies half, eine Vorauswahl an möglichen Verbindungen zu treffen.

Anschließend wurden Kristalle mit den an das Protein bindenden Schweratomverbindungen inkubiert. Kristalle, die diesen Prozess ohne optische Schäden überstanden, wurden in Lösungen ohne Schweratomkomponenten gewaschen und in 50 mM Tris pH 7.5 gelöst. Erneut wurde an diesen Lösungen eine Massebestimmung mit MALDI-TOF durchgeführt, um eine Bindung der Schweratomverbindung an das Protein im Kristallfeld zu beweisen. Bei

diesem Schritt verringerte sich erneut die Anzahl an möglichen Derivatisierungsverbindungen. Bedingt durch den sauren pH-Wert, bei dem das Protein in Mod. I kristallisiert wurde, waren viele freie und damit mögliche Koordinationspartner protoniert. Ebenso besitzt keines der beiden Proteine ein Cystein in seiner Aminosäuren Sequenz, welches bevorzugt Quecksilber-Verbindungen kovalent bindet.

Mit den verbleibenden Verbindungen wurden dann weitere Kristalle inkubiert und daran Röntgenbeugungsexperimente durchgeführt. Deutlich verschlechterte Kristallqualität (Auflösungen $< 7 \text{ \AA}$) und hohe Mosaizität engten die Auswahl an Verbindungen erneut drastisch ein. An den verbleibenden Verbindungen erschwerten nicht-isotype Datensätze die Lösung der Pattersonfunktion einer Schweratomsstruktur. Aus diesem Grund wird auf eine Aufzählung der verwendeten Verbindungen in dieser Arbeit verzichtet. Diese Probleme führten dazu, dass der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Produktion von Selenomethionin-derivatisiertem Protein gelegt wurde, um daran ein MAD-Experiment durchzuführen.

An Kristallen der Mod. IV wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt. Hier konnte mittels MALDI-TOF gezeigt werden, dass die Verbindung K_2PtCl_4 zur Derivatisierung geeignet war. So war die Masse des ζ -Proteins eines gelösten, mit Schweratomlösung inkubierten, Proteinkristalls relativ zu nativen Protein deutlich verschoben (Abb.6.4.1).

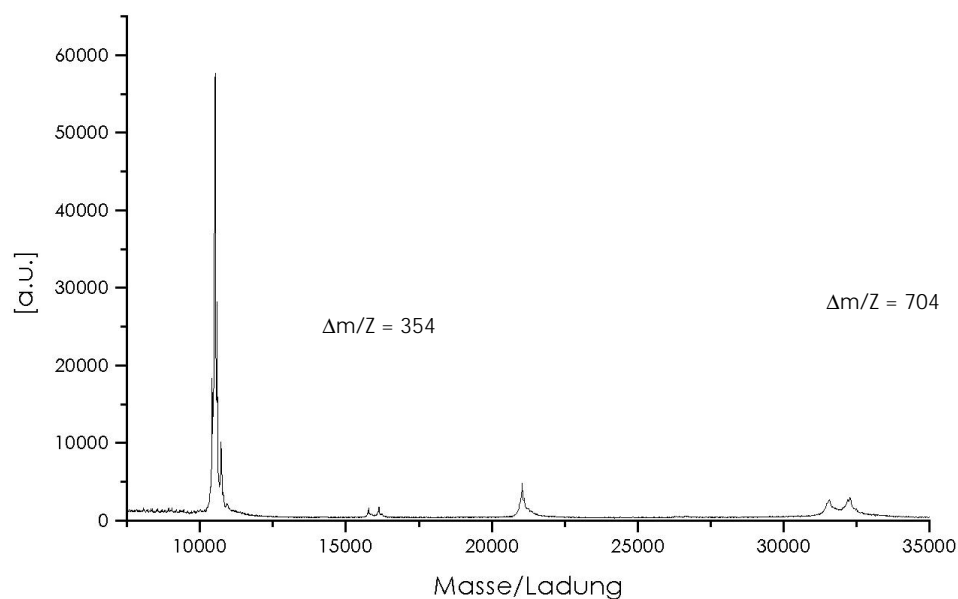


Abb.6.4.1 MALDI-TOF Analyse an einer Mischung bestehend aus nativer $\epsilon_x\zeta_y$ - Proteinlösung und mit K_2PtCl_4 derivatisierten, gelösten $\epsilon_2\zeta_2$ Proteinkristallen der Mod. IV. Deutliche Massenunterschiede von 354 und 704 m/z deuten auf eine erfolgreiche Derivatisierung.

6.5 Datensammlung

Alle in dieser Arbeit gesammelten Datensätze wurden nach der Oszillationsmethode aufgenommen. Die Indizierung und Integration der Reflexe der einzelnen Diffraktionsmuster erfolgte mit DENZO (Otwinowski und Minor, 1997). Mit Hilfe von SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) wurden die Beugungsbilder zueinander skaliert und zu einem Datensatz zusammengefasst.

6.5.1 MAD-Datensammlung in Mod. I

Die Messungen der Selenomethionin-derivatisierten Proteinkristalle wurden am Strahlrohr BM14 des ESRF, Grenoble, durchgeführt. Diese Messstation ermöglicht durchstimmbare Wellenlängen und ist mit einem Cryosystem und einem CCD-Detektor ausgestattet. Dies gewährleistet eine schnelle Datensammlung bei 100 K. Ebenso ist die Ausstattung für einen EXAFS- (Röntgenfluoreszenz-) *scan* vorhanden. Ein Computer-gesteuerter Monochromator erlaubt, die Energie der Strahlung (damit die Wellenlänge) kontinuierlich zu verändern. Damit besteht die Möglichkeit, direkt am gefrorenen Proteinkristall einen Fluoreszenzscan durchzuführen und das Fluoreszenzmaximum der Selenatome an deren K-Kante im Kristallfeld zu bestimmen.

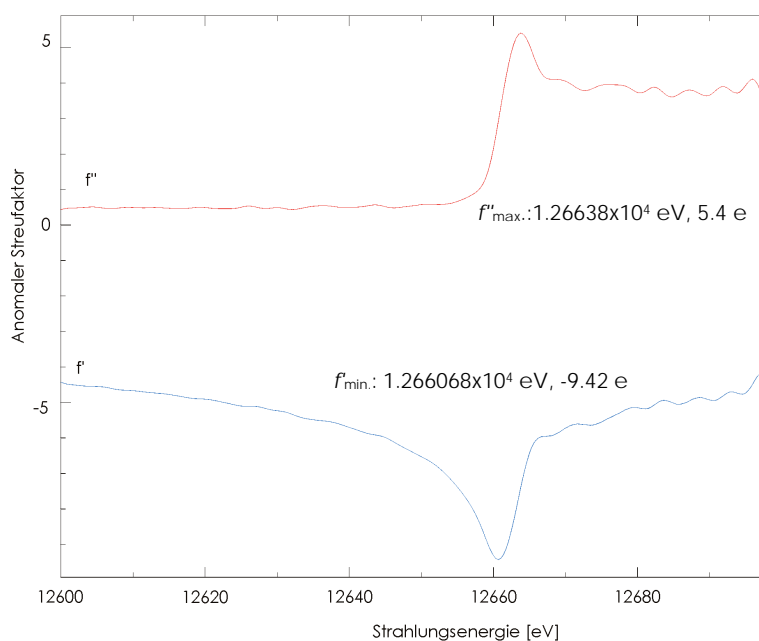


Abb.6.5.1.1 Normierter f'' scan und Kramers-Kronig-Transformation zu f' ; Darstellung von f'' und f' um die K-Kante von Selen als Funktion der Energie der Röntgenstrahlung;

Das ausgeprägte Fluoreszenzsignal der Selenomethionin-derivatisierten Proteinkristalle (Abb.6.5.1.1) ermöglichte eine Dateninterpretation mit Hilfe des Programms Chooch (Evans und Pettifer, 2001). So konnte das Maximum von f'' und das Minimum von f' bestimmt und zwei Datensätze bei den entsprechenden Wellenlängen gesammelt werden. Die dritte Wellenlänge des MAD-Experiments wurde bei höherer Energie gemessen.

Bei einem Winkelinkrement von $\Delta\varphi = 0.25^\circ$ wurden Drehkristallaufnahmen gesammelt. Bedingt durch ein kleines Streuvolumen und schlechtem Realbau der Kristalle konnte nur eine maximale Auflösung von 3.1 Å erreicht werden. Eine Verfeinerung der Kristallmosaizität führte unweigerlich zu einer Fehlermeldung des Skalierungsprogramms, deshalb wurde diese mit $\Delta\varphi = 0.7^\circ$ festgesetzt. Ein Vergleich der anomalen Differenzen von Bijvoet-Paaren zeigte, dass das anomale Signal bei einer Auflösung von ca. 4.0 Å im Untergrundrauschen verschwand.

	remote λ_3	white line λ_1	edge λ_2
Energie [eV]	13 500.0	12 663.9	12 660.7
Wellenlänge [Å]	0.91841	0.97900	0.97931
f' (EXAFS)	-1.8	-6.0	-9.4
f'' (EXAFS)	3.4	5.4	3.0
Raumgruppe		$P2_12_12_1$	
Gitterparameter [Å]	$a = 59.54$	$b = 79.67$	$c = 195.21$
		SCALEPACK	
Auflösungsgrenzen [Å]		20.0 - 3.1 (3.13 - 3.10)	
gemessene Reflexe	55 569	77 845	55 569
unabhängige Reflexe	17 130 (337)	17 461 (406)	17 457 (406)
Vollständigkeit	99.5 (99.6)	99.9 (100)	100 (100)
durchschn. I/σ	13.81 (4.60)	14.10 (5.30)	19.14 (6.83)
$R_{\text{in.}}$	0.070 (0.386)	0.063 (0.313)	0.074 (0.308)
		SOLVE	
Auflösungsgrenzen [Å]		20.0 - 4.0 (4.20 - 4.00)	
anomale Vollständigkeit	88.3 (81.8)	92.5 (88.3)	95.8 (91.1)
f' (SOLVE verfeinert)	-1.97	-6.43	-8.98
f'' (SOLVE verfeinert)	3.59	6.08	3.01

Tab.6.5.1.2 Datenstatistik des MAD-Experiments ausgewertet mittels SCALEPACK und SOLVE; Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; $R_{\text{in.}}: (\sum(|I-\langle I \rangle|))/\sum I$

6.5.2 Datensammlung an nativen Kristallen

Von allen beschriebenen Modifikationen konnten Datensätze mit Synchrotronstrahlung am DESY, Hamburg, gesammelt werden. CCD-Detektoren wurden zur Messung der Beugungsbilder eingesetzt. Die Datenstatistiken sind in Tab.6.5.2.1 aufgelistet.

	nativer Datensatz Mod. I	nativer Datensatz Mod. II	nativer Datensatz Mod. III
Wellenlänge [Å]	1.01629	0.9090	1.0500
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2 oder P4 ₃ 2 ₁ 2
Gitterparameter [Å]	<i>a</i> = 59.54 <i>b</i> = 79.85 <i>c</i> = 191.44	<i>a</i> = 80.55 <i>b</i> = 181.05 <i>c</i> = 202.55	<i>a</i> = 65.12 <i>b</i> = 65.12 <i>c</i> = 209.00
Auflösungsgrenzen [Å]	20.00 - 1.95 (2.00 - 1.95)	55.00 - 3.10 (3.29 - 3.10)	30.00 - 3.30 (3.45 - 3.30)
gemessene Reflexe	319 120	248 291	86 962
unabhängige Reflexe	64 215 (4 067)	51973 (8 169)	7304 (859)
Vollständigkeit +/- [%]	95.5 (91.8)	95.3 (91.6)	99.2 (97.2)
durchschn. <i>I</i> / σ	15.50 (5.14)	8.34 (1.34)	12.92 (1.64)
Mosaizität [°]	0.30	0.62	0.72
R _{in.}	0.051 (0.170)	0.087 (0.480)	0.075 (0.317)

Tab. 6.5.2.1 Datenstatistik der nativen Datensätze der verschiedenen Modifikationen; Werte in Klammer beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; R_{in.}: ($\sum(|I| - \langle I \rangle) / \sum I$)

Auch von den Kristallen mit ϵ und punktmutierten ζ -Protein wurden Datensätze gesammelt. Datensätze von Kristallen aus ϵ, ζ (K46A)-Protein wurden am institutseigenen Generator mit MAR-Imageplate System, Kristalle aus ϵ, ζ (R171)-Protein wurden am ESRF, Grenoble, mit CCD-Detektor gemessen.

	Mutante ϵ, ζ (K46A) nativer Datensatz Mod. I	Mutante ϵ, ζ (R171S) nativer Datensatz Mod. I
Wellenlänge [Å]	1.5456	0.9393
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Gitterparameter [Å]	<i>a</i> = 60.21 <i>b</i> = 80.24 <i>c</i> = 193.95	<i>a</i> = 59.71 <i>b</i> = 80.03 <i>c</i> = 193.49
Auflösungsgrenzen [Å]	20.00 - 2.30 (2.35 - 2.30)	20.00 - 1.55 (1.58 - 1.55)
gemessene Reflexe	117 088	1 470 220
unabhängige Reflexe	41 078 (2 719)	134 527 (6 695)
Reflexe	96.3 (97.4)	99.5 (100)
Vollständigkeit +/- [%]	12.30 (3.75)	16.70 (3.97)
durchschn. <i>I</i> / σ	0.73	0.25
Mosaizität [°]	0.048(0.268)	0.068 (0.493)
R _{in.}		

Tab.6.5.2.2 Datenstatistik der Datensätze mit punktmutiertem ζ -Protein; Werte in Klammer beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; R_{in.}: ($\sum(|I| - \langle I \rangle) / \sum I$)

6.5.3 Datensammlung an Schweratom-derivatisierten Kristallen

Obwohl MALDI-TOF Experimente eindeutig auf eine erfolgreiche Derivatisierung hinwiesen, zeigte ein EXAFS-Scan an derivatisierten Proteinkristallen der Mod. IV (Kapitel 6.4) am Strahlrohr X31 (DESY, Hamburg) kein Fluoreszenzsignal. Deshalb wurde die Wellenlänge entsprechend dem Maximum von f'' an der Platinkante des freien Tetrachloroplatinats in Lösung gewählt. Da nur in Kapillaren montierte Kristalle messbar waren und Cryobedingungen nicht etabliert werden konnten, verschlechterte sich die Kristallqualität im Verlauf der Messung bedingt durch Strahlungsschäden. Ebenso konnte kein Datensatz bei einer Energie entfernt vom Maximum von f'' gemessen werden. Dieser hätte zur Lösung des Phasenproblems entscheidend beitragen können.

Trotz des negativen Ergebnisses des EXAFS-Scans zeigte ein Vergleich der Bijvoet-Paare, dass ein anomales Signal vorhanden war. Eine anomale Differenzpatterson-Synthese wies jedoch keine interpretierbaren Harkermaxima auf. Nicht-Isomorphie (Nicht-Isotypie) verhinderte die Lösung mittels isomorphen (isotypen) Ersatzes. Erst als im Verlauf der Arbeit die Kristallstruktur der Mod. I gelöst und verfeinert werden konnte, war die Lösung des Phasenproblems mittels Molekularen Ersatzes möglich und Schweratome konnten in der Struktur lokalisiert werden.

	[PtCl ₄] ²⁻ Derivat Mod. IV
Wellenlänge [Å]	1.0688
Raumgruppe	<i>P</i> ₂ <i>1</i> ₂ <i>1</i>
Gitterparameter [Å]	a = 50.47 b = 143.18 c = 153.74
Auflösungsgrenzen [Å]	20.00 - 3.00 (3.10 - 3.00)
gemessene Reflexe	202 296
unabhängige Reflexe	22 621 (1 854)
Vollständigkeit +/- [%]	97.0 (81.0)
durchschn. $\langle I/\sigma \rangle$	20.67 (13.11)
Mosaizität [°]	0.41
R _{int} .	0.080 (0.315)

Tab.6.5.3.1 Datenstatistik des Derivatdatensatzes der Mod. IV; Werte unter Klammer beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; R_{int}: $(\sum(|I| - \langle I \rangle) / \sum I)$

6.5.4 Allgemeines zur Datensammlung

Generell war die Präparation der bisher beschriebenen Kristalle problembehaftet. Nach Öffnen eines Kristallisationsansatzes und sekundenkurzer Exposition an Luft bekamen die meisten Kristalle Risse und brachen nach undefinierten Richtungen. Bruchstücke zeigten in der Röntgenbeugung hohe Mosaizität ($\Delta\phi = 1^\circ - 1.5^\circ$). Einzelne Reflexe im niedrigen

Auflösungsbereich waren in Richtung c^* extrem verbreitert und liefen ineinander über. Kristalle des Typs, wie in Abb.5.2.1.1.d abgebildet, brachen nach dem Öffnen des Ansatzes sofort entzwei, oft war der typische zentrale Riss zu einem Hohlraum erweitert, der an skelettales Wachstum erinnerte. Zwar konnten diese Kristalle der Mod. I zugeordnet werden, die Messung eines vollständigen Datensatz war aber nie möglich. Kristalle wie in Abb.5.2.1.1.e abgebildet erreichten Kantenlängen bis zu 0.5 mm, waren ohne optisch sichtbaren Defekt und zeigten im polarisierten Licht saubere Auslöschung. Auch diese Kristalle erwiesen sich als nicht stabil. Zwar konnten sie Mod. I zugewiesen werden, die final erhaltene Kristallqualität war jedoch nie zur Sammlung eines vollständigen Datensatzes ausreichend.

7 Strukturlösung und Verfeinerung

7.1 Methoden zum Lösen des Phasenproblems

7.1.1 MAD (Multiple wavelength Anomalous Diffraction)

Seitdem Synchrotronstrahlungsquellen die Möglichkeit bieten, kontinuierlich durchstimmbare Wellenlängen zu verwenden, kann der wellenlängenabhängige Effekt der anomalen Streuung zur Lösung des Phasenproblems herangezogen werden. Hendrickson *et al.* (1988) waren die ersten, die dies zur Bestimmung der Struktur an einem Proteinkristall ausnutzten.

Wichtig ist, dass der Kristall Atome an geordneten Positionen enthält, die ein starkes anomales Signal im mit Synchrotronstrahlung zugänglichen Wellenlängenbereich aufweisen. Die Einbringung anomal streuender Elemente kann entweder durch Kokristallisation des Proteins mit Schweratomlösungen erfolgen, ebenso können Schweratome auch durch Lösungsmittelkanäle des Proteinkristalls diffundieren und an bestimmte Bereiche des Proteins binden. Eine weitere Möglichkeit ist eine *in vivo* Substitution von Methioninresten der Proteine durch Selenomethionin. Dies kann durch Anzucht von Methionin-defizienten Organismen in synthetischen Medien mit Selenomethionin erfolgen. Nachdem in diesem Projekt eine Schweratom-Derivatisierung der Proteinkristalle zu keinen interpretierbaren Patterson-Dichten führte, jedoch eine Selenomethionin-Derivatisierung erfolgreich verlief, war ein MAD (*Multiple wavelength Anomalous Diffraction*) Experiment die geeignete Methode, das Phasenproblem zu lösen. Dies erfolgte mit dem Programm SOLVE (Terwillinger und Berendzen, 1999) nach einer Begrenzung der Auflösung bei maximal 4.0 Å.