

Nach dieser Verfeinerung wurden mit dem Protokoll *water-pick* Wassermoleküle der Elektronendichte zugewiesen. Diese wurden anschließend visuell im Programm O auf eine korrekte Koordination durch Protein- oder andere Wassermoleküle überprüft. Gleichzeitig konnten falsche Konformationen der Seitenketten berichtigt werden. Abschließend wurde nach dem Protokoll *minimize* eine Energieminimierung der Torsionswinkel und Bindungslängen des Modells durchgeführt und dieses an die Elektronendichte angepasst bis eine Konvergenz der Verfeinerung erreicht wurde. Die Richtigkeit des Proteinmodells wurde mit dem Programm WHATCHECK (Vriend, 1990) überprüft.

7.2.4 Modellbau in Mod. IV und der Punktmutanten

Da das Phasenproblem der Mod. IV mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst wurde, war der Verlauf der Polypeptidketten nach einer Starre-Körper-Verfeinerung mit dem Protokoll *rigid* eindeutig. Die Verfeinerung erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 7.2.3 beschrieben. Aufgrund der schlechten Auflösung (3.0 Å) wurde die nichtkristallographische Symmetrie des Moleküls zur Parameter-Reduktion herangezogen. Ebenso wurden keine Wasseratome der Elektronendichte zugewiesen.

Die Kristallstruktur mit punktmutierten ζ-Protein war isomorph (isotyp) zu der des Wild-Typ Protein. Lediglich die mutierte Aminosäure wurde aus dem Modell entfernt. Zu Beginn der Verfeinerung wurde eine Starre-Körper-Verfeinerung nach dem Protokoll *rigid* durchgeführt. Die weiteren Schritte waren gleich zur in Kapitel 7.2.3 beschriebenen Verfeinerungsmethode.

8 Ergebnisse der Strukturanalyse

8.1 Mod. I

8.1.1 Lösung des Phasenproblems

Versuche, das Phasenproblem der A-Struktur mit Hilfe von dispersiven oder anomalen Pattersonfunktionen aus MAD-Daten anhand einer Kreuzvektorentabelle oder mit Hilfe von automatisierten Suchprogrammen zu lösen, führten zu keinem Erfolg. Ebenso konnten direkte Methoden keine eindeutigen Positionen der anomal streuenden Atome lokalisieren. Die Lösung des Phasenproblems erfolgte schließlich mit dem Programm SOLVE (Terwillinger und Berendzen, 1999) nach einer Begrenzung der Auflösung bei maximal 4.0 Å.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde bereits mehrere Male auf das Problem der tatsächlichen Stöchiometrie des $\epsilon_x\zeta_y$ -Proteinkomplexes hingewiesen. Auch bei der Lösung des Phasenproblems brachte dies Schwierigkeit mit sich. Aufgrund der durchschnittlichen Proteinkristalldichte konnte zwar angenommen werden, dass ein Komplexmolekül pro asymmetrischer Einheit (AE) vorläge ($\epsilon_2\zeta_2$ oder $\epsilon_1\zeta_2$), aber nicht genau wie viele Selenpositionen pro AE zu erwarten wären. Sieht man von den N-terminalen Selenomethioninen ab, so wären im Falle eines $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplexes 16 Selenatome, im Falle eines $\epsilon_1\zeta_2$ -Proteinkomplexes 15 Selenatome pro AE zu erwarten gewesen. Um eventuelle Probleme zu vermeiden, die mit einer nicht vorhandenen Selenatom-Position entstehen könnten, wurden dem Programm vorerst 15 mögliche anomal streuende Atome vorgegeben. Dem Programm SOLVE war es möglich, trotz der schlechten Datenqualität, diese zu lokalisieren und anschließend zu verfeinern. Ebenso wurde eine Elektronendichte berechnet, die deutliche Sekundärstrukturen eines Proteins aufwies. Damit konnte das Phasenproblem als anfänglich geklärt angesehen werden. In Tab.8.1.1.1 ist der *figure-of-merit*-Wert für eine Auflösung von 4.0 Å und dessen Verlauf in Abhängigkeit der maximaler Auflösung geben.

d _{min.} :	4.0	12.27	8.48	6.84	5.89	5.25	4.78	4.42	4.12
durchschn. FOM	0.67	0.64	0.66	0.76	0.77	0.71	0.67	0.63	0.57

Tab.8.1.1.1 FOM-Werte bei einer Auflösung von 4.0 Å und bei ansteigender maximaler Auflösung;

Die von SOLVE aufgrund der Selen-Lagen ermittelten anfänglichen Phasen wurden als Ausgangsbasis für eine anschließende Dichtemodifikation und Phasenerweiterung zu 3.1 Å mit dem Programm DM (CCP4, 1994) verwendet. Damit konnte eine deutlich verbesserte Elektronendichte (2Fo-Fc) mit FFT (CCP4, 1994) berechnet werden. Diese ermöglichte, zwischen Proteindichte und Lösungsmittel zu differenzieren, einzelne Moleküle voneinander zu unterscheiden und Sekundärstrukturmerkmale wie Helizes und β -Stränge zu erkennen.

8.1.2 Verfeinerung

Die verbesserte, dichtemodifizierte 2Fo-Fc Elektronendichte ermöglichte eine Identifizierung des Proteinrückgrats. Nach dem Editieren des "bones"-Modell war eine zweizählige Molekülsymmetrie erkennbar. Damit konnte der Proteinkomplex eindeutig als $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer identifiziert werden. Folglich musste eine 16. Selenposition vorliegen, diese konnte in einer Fo-Fc Elektronendichte identifiziert werden.

Anschließend wurde das Proteinrückgrat des $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplexes gebaut. Die Selenpositionen erleichterten die Zuweisung der Aminosäure-Sequenz der ϵ und ζ Proteine. Ebenso war die korrekte Sekundärstrukturvorhersage eine gute Zusatzinformation. Die Qualität der Elektronendichte war in den zwei $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheiten stark unterschiedlich. Mit Hilfe der Molekülsymmetrie konnten auch schlecht interpretierbare Bereiche gebaut werden. So konnten mit Hilfe des Programms O (Jones *et al.*, 1991) 55 % der Aminosäuren den vier Polypeptidketten eines Heterotetramers und weitere 15 % als Polyalaninkette in die Elektronendichte modelliert werden.

Nach der Starre-Körper-Verfeinerung mit den hoch aufgelösten nativen Daten konnte das Modell verbessert und verfeinert werden. Die in Kapitel 7.2.3 beschriebene Verfeinerungsmethode wurde bis zur Konvergenz durchgeführt. Die einzelnen Kriterien zur Evaluierung der Qualität des Wild-Typ Modells sind in Tab.8.1.2.1 aufgeführt.

Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterparameter [Å]	$a = 59.54,$ $b = 79.85,$ $c = 191.44;$
Anzahl an $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetrameren pro AE	1
Auflösungsbereich [Å]	20.00 - 1.95
R_{free}	0.235
R_{work}	0.199
Rmsd Bindungslängen [Å]	0.005
Rmsd Winkel [°]	1.11
Anzahl der Aminosäuren pro AE	712
Anzahl der zuordnenbaren Wasseratomen pro AE	695
Anzahl der gebundenen $[SO_4]^{2-}$ -Ionen pro AE	2
Anzahl der Atome	6482

Tab.8.1.2.1 Verfeinerungsstatistik für die Struktur des Wild-Typ $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplexes

8.2 Mod. III

8.2.1 Lösung des Phasenproblems

Schon ein Vergleich der Größen der asymmetrischen Einheit von Mod. III ($55\,393\text{ Å}^3$) und Mod. I ($113\,770\text{ Å}^3$) ließ vermuten, dass die asymmetrische Einheit ein $\epsilon_1\zeta_1$ -Heterodimer enthält und das $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer durch einen kristallographischen Operator erzeugt wird. Deshalb wurde eine $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit als Startmodell für ROTING verwendet. Da der Pattersonraum zentrosymmetrisch ist, konnte in diesem Schritt keine Entscheidung über die richtige enantiomorphe Raumgruppe, $P4_12_12$ oder $P4_32_12$, getroffen werden.

Im nächsten Schritt wurde mit TRAING eine Translationsfunktion berechnet. Hier wurden die Daten in beide enantiomorphen Raumgruppen prozessiert, um das Phasenproblem in der richtigen Händigkeit zu lösen. Zwei Translationslösungen, prozessiert in $P4_32_12_1$, hoben sich mit ihren Gütefaktoren deutlich von den restlichen Lösungen hervor. Im Vergleich dazu hatte die beste Lösung der Translationsfunktion, prozessiert in $P4_32_12_1$, deutlich schlechtere Gütefaktoren. Damit konnte das Problem der Enantiomorphie geklärt werden. Anschließend wurde mit FITING eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt. Die Lösungen sind in Tab.8.2.2.1. aufgeführt.

Translationslösung	ALPHA	BETA	GAMMA	Tx	Ty	Tz	CC_F	Rfac.
Rot1 / Trans1	57.36	83.67	341.20	0.9491	0.7922	0.1577	55.1	51.1
Rot2 / Trans1	33.00	96.09	160.79	0.2906	0.4491	0.3418	54.8	51.5
Rot3 / Trans1	19.63	62.57	177.40	0.1980	0.3576	0.0718	26.1	62.6
Rot4 / Trans1	35.25	45.33	148.99	0.1265	0.2190	0.4879	27.4	62.9

Tab.8.2.2.1 Die vier besten Lösungen der Translationsfunktion der Mod. III nach einer Starre-Körper-Verfeinerung mit FITING.

Genauere Betrachtung der ersten beiden Lösungen in Tab.8.2.2.1 zeigte, dass diese symmetrieäquivalent sind. Nachdem das Suchmodell mit den in Tab.8.2.2.1. angegebenen Operationen in die korrekte Orientierung gebracht wurde, konnte mit dem Protokoll *composite-omit-map* eine Elektronendichte berechnet werden. Es zeigte sich, dass die Polypeptidketten keine signifikante Abweichung von denen der Mod. I besaßen und keine Konformationsänderung vorlag. Deshalb wurde von einer anschließenden Verfeinerung abgesehen. Zusätzlich hätte die schlechte Auflösung von 3.3 Å keine detaillierte Diskussion der Unterschiede der beiden Modifikationen erlaubt.

8.3 Mod. IV

8.3.1 Lösung des Phasenproblems

Im Falle der orthorhombischen Mod. IV lag aufgrund der Größe der asymmetrischen Einheit der Schluss nahe, dass diese ein $\epsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimer oder ein $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer enthält. Da Rotationsfunktionen mit einem ζ -Molekül als Startmodell vergleichbare Ergebnisse lieferte wie im Falle eines $\epsilon_1\zeta_1$ -Heterodimers, wurden Rotationslösungen des letzteren zur Translationssuche eingesetzt. Zwei Lösungen hoben sich von den restlichen deutlich hervor. Weil diese vergleichbare Verlässlichkeitswerte besaßen und die Translationsfunktion mit einem $\epsilon_1\zeta_1$ -Heterodimer als Startmodell durchgeführt wurde, war anzunehmen, dass die Kristallpackung aus $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetrameren gebildet wurde.

Da jedoch die Lösungen von TRAIING im ersten Schritt unabhängig voneinander behandelt wurden, war keine identische Ursprungswahl gegeben. Deshalb wurde in einer zweiten Translationsuche eine Translationslösung fixiert und mit der anderen Rotationslösung erneut eine Translationsfunktion berechnet. Deutlich war an den Gütefaktoren erkennbar, dass die zweite Rotationslösung dem zweiten Teil des Heterotetramers zugeordnet werden konnte.

8.3.2 Verfeinerung

Mit den beiden Lösungen konnte aus dem $\epsilon_1\zeta_1$ -Startmodell mit Hilfe der Rotations- und Translationsoperationen ein Modell des Heterotetramers mit korrekter Orientierung erstellt werden. Dieses wurde als Ausgangsmodell für eine Starre-Körper-Verfeinerung mit dem Protokoll *rigid* verwendet. Das Modell wurde mit dem *anneal*- und anschließend mit dem *B-individual*-Protokoll verfeinert. Mit letzterem erfolgte eine isotrope Verfeinerung der atomaren B-Faktoren. Mit dem Protokoll *map* wurde dann eine Elektronendichte berechnet. Neben der Elektronendichte des Proteinmodells wurden auch acht, dem Modell nicht zugehörige, Maxima beobachtet. Sechs Platinatome binden in beiden $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheiten kovalent an die Methyl-thio-ethyl-gruppen von Met ζ 131, Met ζ 162 und Met ζ 168. Zwei weitere Restdichten liegen an der Position, an der in Mod. I in beiden Untereinheiten ein Sulfat-Ion gefunden wurde. Da in beiden Untereinheiten das Zentrum dieser Restdichte ca. 2.8 Å zu den Sauerstoffatomen der Carboxylatgruppe von Glu ϵ 12 entfernt liegt, kann aufgrund der negativen Ladung der Carboxylatgruppe eine Bindung eines Sulfat-Ions ausgeschlossen werden. Deshalb wurden diese beiden Restdichten als Platinatome und nicht als schlecht definierte Sulfationen interpretiert. In einer anomalen Patterson-Synthese konnten jedoch keine sich vom Untergrund erhebende Maxima an allen acht Positionen der Schweratome beobachtet werden.

Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterparameter [Å]	$a = 50.47,$ $b = 143.18,$ $c = 153.74;$
Anzahl an $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetrameren pro AE	1
Auflösungsbereich [Å]	20.00 - 3.0
R_{free}	0.304
R_{work}	0.260
Rmsd Bindungslängen [Å]	0.012
Rmsd Winkel [°]	1.5
Anzahl der Aminosäuren pro AE	707
Anzahl der Platinatome pro AE	8
Anzahl der Atome	5763

Tab.8.3.2.1 Verfeinerungsstatistik für die Struktur des [PtCl₄]²⁻

Derivates der Mod. IV als $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplex;

Anschließend wurde nach dem *composite-omit-map*-Protokoll eine 2Fo-Fc Elektronendichte berechnet und das Modell manuell mit dem Programm O verfeinert. Danach erfolgte erneut eine Verfeinerung mit den Protokollen *anneal* und *B-individual*. Dies wurde bis zur Konvergenz des Systems wiederholt. Aufgrund der niedrigen Auflösung ($d_{\min} = 3.0 \text{ \AA}$) war die Überbestimmung des Gleichungssystems nicht sehr hoch. Deshalb wurden die zwei Heterodimere über einen nichtkristallographischen Symmetrieoperator gekoppelt. Da es sich dabei um eine nicht-verzerrende, affine Abbildung handelt, wurden dessen 6 unabhängige Komponenten in der Verfeinerung miteingeschlossen. Ebenso wurde wegen der schlechten Datenqualität keine Restdichten als Wassermoleküle dem Modell hinzugefügt.

8.4 Punktmutanten

8.4.1 Verfeinerung

Da die Kristallstruktur beider Punktmutanten isomorph (isotyp) zu Mod. I waren, musste das Phasenproblem nicht erneut gelöst werden. Es erfolgte lediglich eine Starre-Körper-Verfeinerung nach dem *rigid*-Protokoll. Die mutierten Seitenketten wurden vorher aus dem Modell entfernt. Danach erfolgte die Verfeinerung wie in Kapitel 7.2.3 beschrieben. Nach dem ersten Verfeinerungszyklus konnte die korrekte, mutierte Seitenkette dem Modell hinzugefügt werden.

	$\epsilon_2\zeta(\text{K46A})_2$	$\epsilon_2\zeta(\text{R171S})_2$
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Gitterparameter [\AA]	$a = 60.21,$ $b = 80.24,$ $c = 193.95;$	$a = 59.71,$ $b = 80.03,$ $c = 193.49;$
Anzahl an $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetrameren pro AE	1	1
Auflösungsbereich [\AA]	20.00 - 2.3	20.00 - 1.55
R_{free}	0.238	0.216
R_{work}	0.201	0.218
Rmsd Bindungslängen [\AA]	0.006	0.004
Rmsd Winkel [$^\circ$]	1.12	1.07
Anzahl der Aminosäuren pro AE	711	713
Anzahl der zuordnenbaren Wassermolekülen pro AE	330	469
Anzahl der gebundenen $[\text{SO}_4]^{2-}$ -Ionen	1	2
Anzahl der Atome	6108	6266

Tab.8.4.1.1 Verfeinerungsstatistik für die Struktur des $\epsilon_2\zeta(\text{K46A})_2$ -Heterotetramers und $\epsilon_2\zeta(\text{R171S})_2$ -Heterotetramers;

8.4.2 Strahlungsschäden

In Tab.8.4.1.1 fallen die hohen R-Werte ($R_{\text{work.}} : 0.218$ und $R_{\text{free.}} : 0.216$) des hochaufgelösten Datensatzes ($d_{\text{min.}} = 1.55 \text{ \AA}$) gesammelt an Kristallen von ϵ, ζ (R171S)-Protein auf. Schon bei der Skalierung der einzelnen Beugungsbilder mit SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) war ein Abnehmen der abgebeugten Synchrotronstrahlung im Verlauf der Messung in Form von abnehmenden Skalierungsfaktoren zu verzeichnen. Dieser Datensatz wurde am Strahlrohr ID14-EH4 des ESRF, Grenoble, gesammelt. Dieses Strahlrohr liefert einen sehr starken, fein kollimierten und brillanten Synchrotronstrahl. Deshalb ist anzunehmen, dass das Abnehmen der Intensität der abgebeugten Strahlung auf Strahlungsschäden zurückzuführen ist.

Nach dem ersten Verfeinerungsschritt wies eine bei -3σ -konturierte Fo-Fc Elektronendichte negative Werte in Bereichen des Modells auf. Auffälligerweise waren diese immer an Carboxylat-Seitenketten von Glutamaten in der Aminosäuren-Sequenz der ϵ und ζ Proteine zu beobachten. Dieses bekannte Phänomen wird als Strahlungsschäden im Verlauf einer Tieftemperaturmessung beschrieben und ist typisch für dieses intensive Strahlrohr (z.B. Burmeister, 2000; Weik *et al.*, 1999). Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus ist ein Transfer eines Elektronenlochs zur Carboxylgruppe, was zur Bildung von CO_2 und einem Kohlenstoffradikal führt (Burmeister, 2000). Ein Vorliegen unterschiedlicher Konformere kann ausgeschlossen werden, da in der Nähe dieser Seitenketten keine positive Dichte identifiziert werden konnte.

Aus diesem Grund wurden in einer abschließenden Verfeinerung mit dem Protokoll *qindividual* die Besetzungsfaktoren von Glutamat-Seitenketten verfeinert, wobei die B-Faktoren festgehalten wurden. Dabei sanken die Besetzungsfaktoren der Carboxylatgruppen, die vorher negative Dichte aufwiesen. Dadurch konnten beide R-Werte um 1% gesenkt werden. Diese Strahlungsschäden verhinderten jedoch, dass bessere R-Werte erzielt werden konnten.