

2. Materialien und Methoden

2.1. Hybridisierung und Reinigung der Nukleinsäuren

2.1.1. Der tRNA^{Ala}-Akzeptorstamm

Die RNA-Einzelstränge wurden nach der H-Phosphonatmethode im Laboratorium für Biochemie in der AG Prof. Sprinzl der Universität Bayreuth durch Harald Schübel synthetisiert (Ott *et al.*, 1996). Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels HPLC-Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Größenausschluß-Chromatographie zum Entsalzen der RNA-Fractionen. Die gereinigten Einzelstränge wurden anschließend einer Nukleosidanalyse unterzogen, um die Zielsequenz zu bestätigen (Schübel, 1997). Die bis zur Trockne durch Gefriertrocknung eingegangenen Einzelstränge wurden für die Kristallisation bereitgestellt. In dieser Form ist auch bei 298 K keine Degradation zu erwarten. Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Einzelstränge in je ca. 500 µl thermisch sterilisiertem (Millipore, Bedford-MA, USA) Wasser gelöst. Mit Hilfe des UV-Spektrometers (DU7400, Beckman) wurden bei 260 nm die Extinktion einer 1:1000 verdünnten Probe der Einzelstrang-RNA gemessen und durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetz [Glg. 2.1] äquimolare Aliquote der Einzelstränge erzeugt (Tab. 2.1).

$$E = \ln \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad [\text{Glg. 2.1}]$$

- E: Extinktion
 I: Intensität nach Durchgang durch die Probe
 I₀: Intensität vor dem Durchgang durch die Probe
 ε: molarer Extinktionskoeffizient [M⁻¹•cm⁻¹]
 c: Konzentration der Probe [M]
 d: Schichtdicke der durchstrahlten Probe [cm]

Tab. 2.1 Molare Massen und Extinktionskoeffizienten der Akzeptorstamm-RNA

Sequenz	5'-ggggcua-3'	5'-ggggcu(I)a-3'	5'-uagcucc-3'	5'-uagcccc-3'
mol. Masse [g/mol] ¹	2015	2141	1572	1570
ε _{260nm} [M ⁻¹ cm ⁻¹] ²	74450	74450	65670	71300

- 1: Molare Masse
 2: Molarer Extinktionskoeffizient, berechnet (Cantor & Tinoco, 1965)

Die Lösungen der komplementären Einzelstränge wurden vereinigt, intensiv vermischt und in einem kochenden Wasserbad für etwa eine Minute temperiert. Das Wasserbad wurde über einen Zeitraum von ca. 6 h auf 277 K abgekühlt. In diesem Zeitraum hybridisierte die Einzelstrang-RNA zu doppelsträngiger RNA. Im Falle der 5-Iod-Uridin haltigen RNA wurde die Substanz immer lichtgeschützt aufbewahrt, da die Gefahr bestand, daß die kovalente Iod-Kohlenstoffbindung innerhalb der aromatischen Base photolytisch gespalten wird (Rahn, 1992). Die hybridisierten Lösungen wurden auf 2 mM RNA-Doppelstrangkonzentration eingengt und bis zur Kristallisation bei 200 K gelagert.

2.1.2. Die HIV^{Chi}-Helix

Der chimäre Einzelstrang sowie der Homo-RNA-Strang wurden ebenso durch chemische Synthese nach der Phosphoramidit-Methode dargestellt (Scaringe *et al.*, 1990). Die gereinigten RNA- und 3'-RNA-DNA-5'-Einzelstränge wurden vom MPI für Biochemie, Martinsried, AG Dr. Heumann in einer wäßrigen Lösung zur Verfügung gestellt (**Tab. 2.2**) (Szyperski *et al.*, 1999).

Tab. 2.2 Molare Massen und Extinktionskoeffizienten der HIV^{HIVChi}-Einzelstränge

Sequenz	5'-gcaguggc-3'	5'-gccactgc-3'
mol. Masse [g/mol] ¹	2571	2428
$\epsilon_{260\text{nm}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] ²	76600	68800

1: Molare Masse

2: Molarer Extinktionskoeffizient, berechnet nach (Cantor & Tinoco, 1965)

Äquimolare Mengen der gelösten Einzelstränge wurden wie für die Ala-Akzeptorstamm-Helix beschrieben hybridisiert. Anschließend wurde der chimäre Duplex mittels FPLC-Anionenaustausch-Chromatographie (PHARMACIA, Uppsala) von Verunreinigungen, wie anderen Sekundärstrukturen oder nichthybridisierten Einzelsträngen, getrennt. Nach Auftragung der Gesamtstoffmenge an chimärem Duplex von 1 µmol auf eine MonoQ-Säule (PHARMACIA, Uppsala) die mit Puffer A, 20 mM TRIS-HCl (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol x HCl), pH 8,0, 5 mM MgCl₂, äquilibriert wurde, konnte der Duplex gegen eine Hochsalzlösung, Puffer B, 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 1 M NaCl, eluiert werden. Die Front des Duplexpeaks konnte bei einer NaCl-Konzentration von etwa 550 mM mittels UV-Absorption bei 254 nm detektiert werden (**Abb. 2.1**) (Mueller *et al.*, 1998).

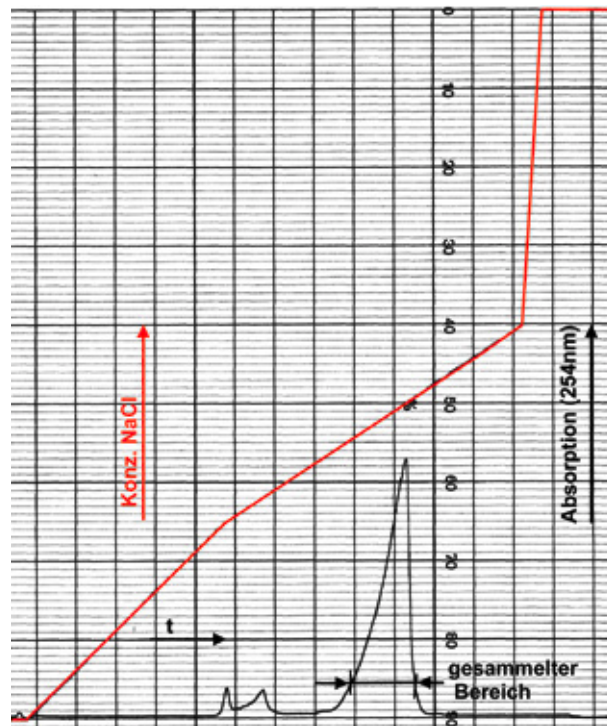


Abb. 2.1 Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie von HIV^{Chi}

Nach diesem Schritt wurde die gesammelte Peakfraktion in der Speedvac (SAVANT, New York, USA) von ca. 3 ml auf etwa 1 ml konzentriert und durch eine Größenausschluß-Chromatographie mittels einer Sephadex-G10-Säule (PHARMACIA, Uppsala) entsalzt. Der so erhaltene gereinigte Duplex wurde auf 2 mM konzentriert und aliquotiert und bei 200 K für die sich anschließende Kristallisation gelagert.

2.2. Kristallisation der Nukleinsäuren

Die Kristallisation von biologischen Makromolekülen ist ein multivariantes Problem. Der daraus resultierende vollständige Versuchsraum würde eine astronomische Anzahl von Einzelexperimenten für die Ermittlung der optimalen Kristallisationsbedingungen erfordern. Eine praktikable Lösung dieses Problems stellt die Durchführung von Matrix- oder "Screening"-Experimenten dar. Hierbei werden gleichzeitig viele Bedingungen wie Konzentration und Art mono- und divalenter Kationen, Konzentration und Art des Puffers, pH-Wert des Puffer, Konzentration und Art des Fällungsmittels, Konzentration und Art von speziellen Additiven, in einem sehr groben Raster variiert. Das Ziel ist die Ermittlung von Startbedingungen, die eine notwendige Grundlage für die weitere Optimierung des Kristallisationsexperiments sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Methode der Dampfdiffusion mit hängenden Tropfen benutzt. Wie mittels eines Phasendiagramms in

Abb. 2.2-A exemplarisch für zwei Einflußgrößen dargestellt, wird bei dieser Methode ein langsames Durchschreiten vom Bereich der ungesättigten Lösung (1) in Richtung der Nukleationszone realisiert. Dort ist die Bildung von Kristallkeimen wahrscheinlich, die dann entlang der Löslichkeitskurve zum makroskopischen Kristall wachsen (2). Die thermodynamische Triebkraft bei diesem Experiment ist die Einstellung des chemischen Gleichgewichts der flüchtigen Komponenten der räumlich getrennten Volumina (Tropfen und Reservoir) über Dampfphasendiffusion. Da der Tropfen im Normalfall durch eine Eins-zu-Eins Mischung der Reservoirolösung mit der Nukleinsäurelösung hergestellt wird, ist die Konzentration an Fällungsmittel im Reservoir etwa doppelt so hoch wie im Tropfen. Daraus folgt ein erhöhter Partialdampfdruck des Wassers im Tropfen, dessen Ausgleich eine Konzentrierung der schwererflüchtigen Komponenten im Tropfen nach sich zieht. Wenn das Fällungsmittel ein kurzkettiger Alkohol wie zum Beispiel *iso*-Propanol ist, findet eine Erhöhung des Tropfenvolumens durch Kondensation des Alkohols aus dem Reservoir statt. Da das Reservoirvolumen 500 bis 1000 mal größer als das Tropfenvolumen ist, verändert sich dessen Zusammensetzung wenig. Die Auswahl der Kristallisationstemperatur (277 K im Kühlraum, 293 K normale Raumtemperatur) beeinflusst das Experiment vielfältig. Wird die Temperatur erniedrigt, sinkt die Löslichkeit der Nukleinsäure stark ab. Dadurch gelangt das System schneller in den Bereich der Supersättigung und Keimbildung, welches zur Bildung eines Schauers von Mikrokristallen führen kann. Eine Temperaturerniedrigung verlangsamt aber auch die Äquilibration des Systems durch Diffusion über die Dampfphase. Je nachdem welcher der beiden gegenläufigen Prozesse einen größeren Einfluß hat, wird die Kristallisation beschleunigt oder verzögert.

Zur Kristallisation wurden alle Nukleinsäuren mit dem Nucleic-Acid-Mini-Screen (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) (Berger *et al.*, 1996) getestet. Bei diesem speziellen Matrixexperiment werden die Art und Konzentration ein- und zweiwertiger Kationen, die hauptsächlich als leichtlösliche Chloride vorliegen, verändert. Weiterhin wird der pH-Wert des ausschließlich verwendeten Natriumkakyolatpuffers von pH 5.5-8.0 variiert. Alle Lösungen enthalten 12 mM Spermintetrachlorid und 10% 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD). Die Zusammensetzung der Reservoirolösung wird konstant gehalten. Sie besteht aus einer 35%igen wäßrigen MPD-Lösung (Berger *et al.*, 1996). Alle Matrixexperimente wurden unter Zuhilfenahme von Linbro-Schalen (ICN Flow, Meckenheim), die 24 Einzelexperimente zulassen, durchgeführt. Als Deckgläschen wurden rund geschliffene, silikonisierte Glasplatten mit einem Durchmesser von 20 mm (Menzel-Gläser, Recker, Berlin) verwendet. Diese wurden mittels Silikonfett (Bayer, Leverkusen) an den Dichtflächen der Vertiefungen der Linbro-Schalen luftdicht fixiert (**Abb. 2.2.-B**).

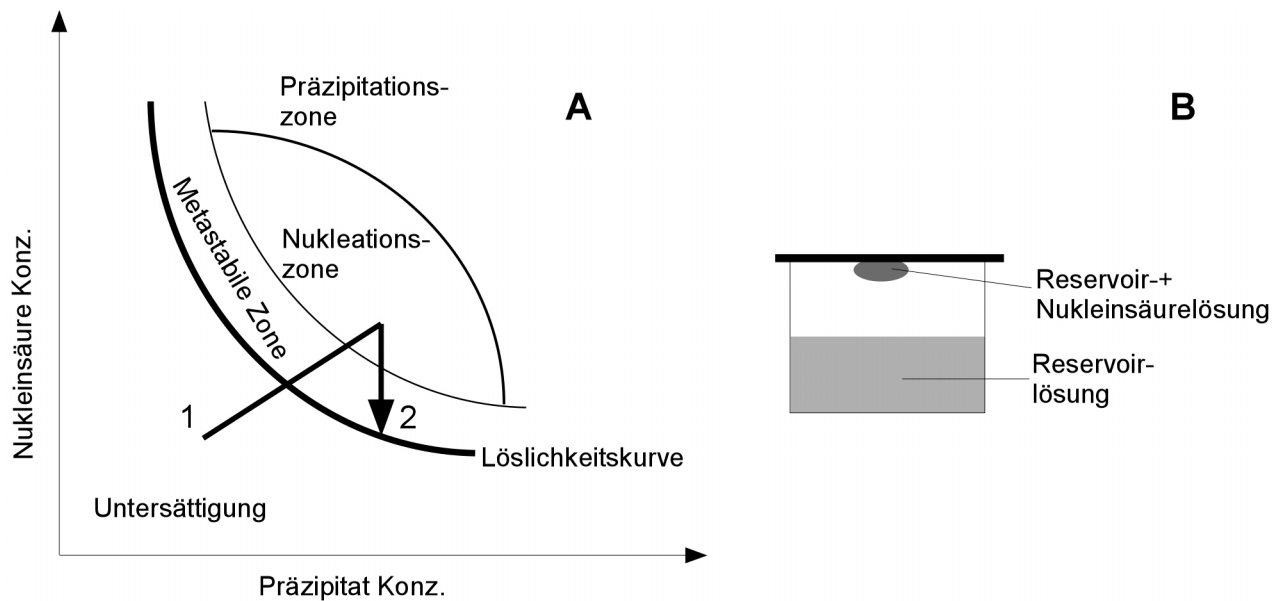


Abb. 2.2 Kristallisation von Nukleinsäuren A) Phasendiagramm, B) Skizze der Methode der Dampfdiffusion mit hängendem Tropfen.

Nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung bilden die meisten Lösungen diese Matrixexperimente, durch die hohe Konzentration an MPD beim Schockgefrieren, Gläser aus. Diese Eigenschaft ist für die Durchführung des Diffraktionsexperiments bei niedrigen Temperaturen wichtig (siehe **Abschnitt 2.4**).

2.3. Kristallisation von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}

Die Proteine wurden von Dieter Perl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Franz X. Schmid aus Bayreuth überexprimiert und gereinigt (Perl, 1997). Von jedem Protein standen jeweils ca. 15 mg in lyophilisierter Form zur Verfügung. Zur Vorbereitung der Kristallisation wurden die gefriergetrockneten Proben in einem Stabilisierungspuffer, 10 mM TRIS-HCl pH 7.5, gelöst und mittels MICROCON 3-Mikroconcentrator (AMICON, Beverly, USA), der eine Ausschlußgrenze von 3000 Da besitzt, auf 10.6 mg/ml für *Bc-Csp* bzw. 13.85 mg/ml für *Bc-Csp*^{R3E} konzentriert (Feske, 1998). Zur Kristallisation der Proteine wurde ebenfalls die Methode des hängenden Tropfens benutzt. Das Screen-Experiment zur Ermittlung von Startbedingungen der Kristallisation wurde mit zwei kommerziellen Screen-Experimenten, Protein Screen I und II (HAMPTON-RESEARCH, Laguna Niguel, USA) von Frau Anette Feske durchgeführt. Jeder Screen umfaßt jeweils 48 Einzelexperimente. Im Gegensatz zu den beschriebenen Nukleinsäure-Screens werden

bei den Proteinen eine größere Vielzahl von Fällungsmittel, Puffer über einen großen pH-Bereich, verschiedene Salze und andere Additive variiert (Jancarik & Kim, 1991; Cudney *et al.*, 1994). Die Kristallisationsexperimente erfolgten parallel bei 293 K wie auch bei 277 K.

2.4. Das Diffraktionsexperiment

2.4.1. Die Synchrotronstrahlungsquelle

Eine Voraussetzung für das Einkristall-Diffraktionsexperiment ist eine intensive Röntgenstrahlungsquelle. Für den Laboreinsatz bieten sich zum Beispiel Drehanoden-Generatoren an. Bei diesen Geräten wird Röntgenstrahlung einer vom Anodenmaterial abhängigen charakteristischen Energie durch die Kollision von hochbeschleunigten Elektronen mit dem Anodenmaterial (Cu, Mo) erzeugt. Die großen Nachteile dieser Methode sind unter Anderem die relativ geringe Intensität der Strahlung, die ein Experiment mit sehr kleinen und schlecht diffraktierenden Kristallen unmöglich macht, sowie die praktisch unveränderbare Röntgenenergie. Eine alternative Strahlungsquelle dazu stellt das Synchrotron dar. In den letzten Jahren hat sich die Anzahl und Qualität von Synchrotron-Meßplätzen für die Proteinkristallographie drastisch erhöht (Helliwell, 1998). Vergleicht man Vor- und Nachteile zu den konventionellen Strahlungsquellen, fallen besonders die um mehrere Größenordnungen höhere Intensität der vom Synchrotron erzeugten Strahlung, die größere Brillanz und die kleinere Strahldivergenz auf. Zusätzlich stellt die Wählbarkeit der Energie der Röntgenstrahlung in einen Bereich von etwa 7-17 keV eine wichtige Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten dar. Der Hauptnachteil der Synchrotronstrahlungsquelle ist die schlechtere Verfügbarkeit für die kurzfristige Versuchsplanung, die hauptsächlich aus dem hohen technischen und materiellen Aufwand der Bereitstellung der Experimentieranordnung resultiert. Die Funktionsweise eines Synchrotrons ist am Beispiel des modernsten Synchrotrons der 3. Generation, BESSY II in Berlin-Adlershof, in **Abb. 2.3** schematisch dargestellt. In einer Kathode werden freie Elektronen durch Glühemission erzeugt und auf 70 keV beschleunigt. Von dort gelangen sie in einen Vorbeschleuniger, das Mikrotron, in dem sie auf einer Kreisbahn geführt und auf 50 MeV beschleunigt werden. Im eigentlichen Synchrotron werden die Elektronen auf ihre Endenergie von 1.7 GeV beschleunigt. Die sich nun mit relativistischer Geschwindigkeit bewegendenden Elektronen werden in kleinen Paketen in den eigentlichen Speicherring injiziert. Dort werden sie wiederum auf eine in erster Näherung kreisförmigen Bahn geführt. Dieses geschieht durch die Wechselwirkung der Elektronen mit dem

Feld von Ablenkmagneten. An diesen Wechselwirkungsorten wird nun die Synchrotronstrahlung erzeugt. Zwischen zwei Ablenkmagneten können je nach experimentellen Erfordernissen spezielle Geräte wie Undulatoren oder Wiggler inseriert werden, die eine multiple Wechselwirkung der Elektronen mit speziell modulierten Magnetfeldern realisieren und damit die geradlinige Bahn der Elektronenpakete in eine sinusförmige Bahn umwandeln. Dabei kommt es durch konstruktive Interferenz der Synchrotronstrahlungsbeträge zu einem Verstärkungseffekt (Undulator). Das Spektrum der so emittierten Strahlung liegt je nach Teilchenenergie zwischen den Infrarot- und Röntgenbereich. Während eines Laufs (Arbeitsmodus nach erfolgter Injektion der Elektronenpakete in den Speicherring) fällt die Intensität der Synchrotronstrahlung exponentiell ab, da die Anzahl der sich im Speicherring befindlichen Elektronen stetig kleiner wird. Deshalb werden alle 8-10 Stunden erneut vorbeschleunigte Elektronenpakete in den Speicherring injiziert.

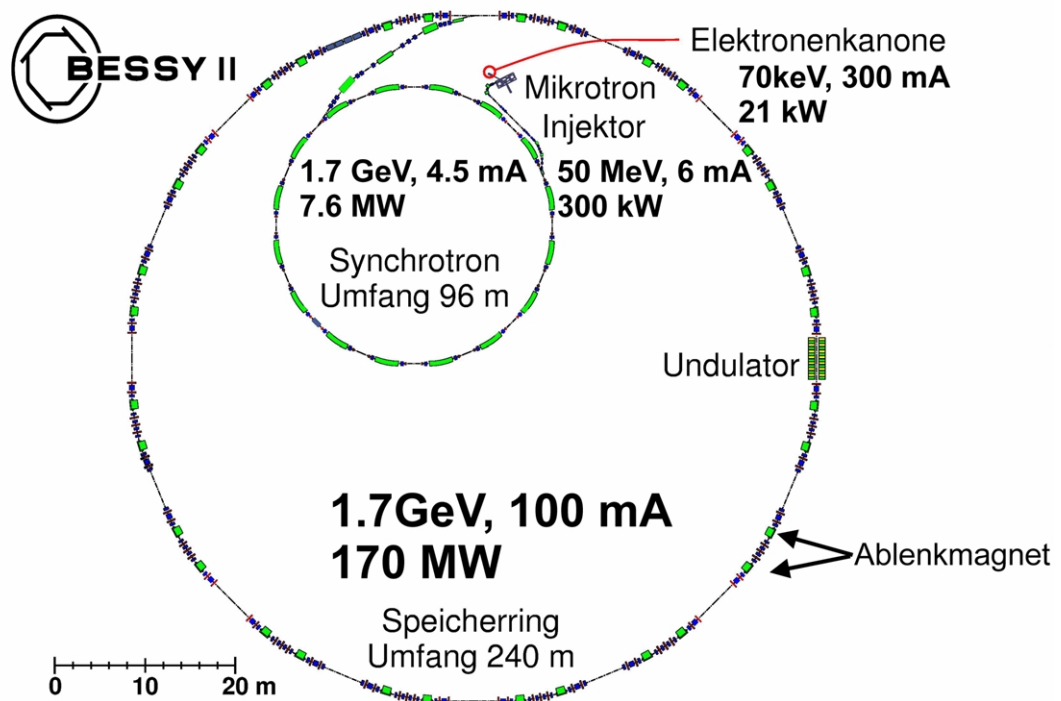


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau eines Elektronensynchrotrons der 3. Generation (BESSY II)

Neben der für eine Vielzahl von Experimenten interessanten spektralen Struktur, besitzt die Synchrotronstrahlung auch eine zeitliche Struktur. Diese Eigenschaft resultiert aus der Tatsache, daß die Synchrotronstrahlung nur bei der direkten Wechselwirkung der sich diskret bewegenden Elektronenpakete mit den Magnetfeldern erzeugt wird. Die gepulste Strahlung wird für zeitaufgelöste spektroskopische Methoden verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

Diffractionsexperimente, wurden ausschließlich an Synchrotronmeßplätzen des Deutschen Elektronensynchrotrons in Hamburg (DESY) und der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle in Grenoble (ESRF) realisiert.

2.4.2. Das Tieftemperatur-Diffractionsexperiment

2.4.2.1. Die Kristallmontage

Bei der Bestrahlung eines Protein- oder Nukleinsäurekristalls mit Röntgenstrahlung hoher Intensität wird ein Teil der Strahlung von den Molekülen absorbiert. Dieser Teil führt zu Bindungsbrüchen innerhalb der kristallisierten Moleküle unter zusätzlicher Bildung freier Radikale. Diese hochreaktiven Spezies diffundieren anschließend innerhalb des Kristallgitters und führen zu sekundären Degradationsprozessen. Beide Prozesse führen zu einer stetigen Degradation der Moleküle, die das Kristallgitter bilden, und beeinflussen damit die Diffractionseigenschaften des untersuchten Kristalls negativ. Dieses Problem, das mit der verstärkten Nutzung von Synchrotronstrahlung an Bedeutung gewann, konnte vor wenigen Jahren mit der Entwicklung von Kryo-Diffractionsexperimenten prinzipiell gelöst werden (Garman & Schneider, 1997). Durch eine Kühlung des Kristalls auf Temperaturen von 90-110 K durch Stickstoffkühlung (73 K Siedetemperatur N₂) ist eine kontinuierliche Abführung der absorbierten Wärmemenge aus dem Kristall möglich. Wichtiger ist die fast vollständige Unterbindung der sekundären Radikalwechselwirkungen, die durch die stark reduzierte Diffusion im Kristall verringert werden. Dadurch kann eine sehr lange Verweilzeit des Kristalls im Röntgenstrahl, ohne den erwähnten Verlust der Diffractionseigenschaften, erzielt werden. Als problematisch erweist sich aber das Auffinden von Bedingungen, die es ermöglichen, den Kristall mit dem ihn umgebenden Solvens beim Einfrieren zu vitrifizieren. Darunter versteht man die Herstellung einer unterkühlten Schmelze, eines Glases, durch das Schockgefrieren des Kristalls. Die Ausbildung von Wasser- und Salzkristallen beim Abkühlprozess muß unbedingt vermieden werden, da die Diffraction dieser kristallinen Komponenten das eigentliche Meßsignal überlagern würde. Das Abkühlen des Kristalls mittels Temperatursprung sorgt weiterhin für den möglichst störungsfreien Erhalt des Kristallgitters. Die beschriebenen Anforderungen werden in der experimentellen Anordnung des Kristalls bei gleichzeitigen Kühlung gewährleistet (**Abb. 2.4**). Hierbei wird der Kristall innerhalb eines kalten Stickstoffstroms mit Röntgenstrahlung bestrahlt und gleichzeitig durch einen trockenen Warmluftstrom von der Umgebungsluftfeuchtigkeit isoliert. Diese experimentelle Anordnung

wurde innerhalb dieser Arbeit ausschließlich durch das Oxford-Cryosystem (Oxford Cryosystems, Oxford) realisiert. Unter Zuhilfenahme spezieller Werkzeuge ist es im Anschluß an das Experiment möglich, den vitrifizierten Kristall, ohne daß dieser auftaut, in einen mit flüssigen Stickstoff gefüllten Lagerbehälter zu überführen, um ihn somit für weitere Untersuchungen zu lagern.

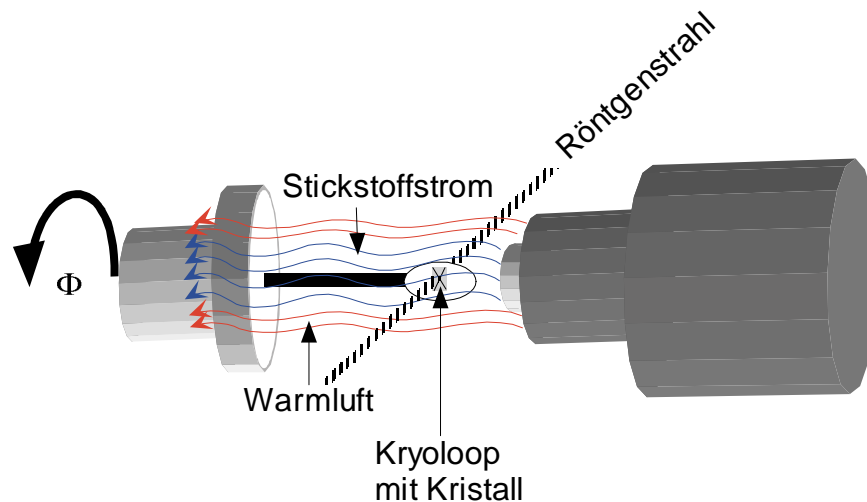


Abb. 2.4 Experimentelle Anordnung des Diffraktionsexperiments bei tiefen Temperaturen.

Besonders wichtig ist diese Methode zur Vorbereitung eines Synchrotronexperiments, da man an der Laborröntgenquelle die Kristalle nach ihren Diffraktionseigenschaften selektieren kann und so die limitierte Synchrotronmeßzeit ausschließlich zur Datensammlung benutzen kann.

2.4.2.2. Das Diffraktionsexperiment

Bei der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Atomen eines Moleküls, das innerhalb eines Einkristalls in einem dreidimensionalen Gitter organisiert ist, wird nach dem Bragg-Gesetz [Glg. 2.2] ein Teil der eingestrahnten Strahlung diffraktiert. Das dabei entstehende Diffraktionsbild stellt ein Abbild des Kristallgitters dar und kann orts- und intensitätsaufgelöst detektiert werden. Die Intensitätsverteilung der Reflexe wird nicht durch [Glg. 2.2] beschrieben. Diese trägt aber die Strukturinformation der im Kristall periodisch angeordneten Moleküle.

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

[Glg. 2.2]

d : Netzebenenabstand

θ : Einfallswinkel des Röntgenstrahl entsprechenden Netzebene

λ : Wellenlänge des einfallenden Röntgenstrahls

Beim Diffraktionsexperiment kann lediglich die Intensität des Reflexes gemessen werden [Glg. 2.3]. Die Phaseninformation α des diffraktierten Röntgenstrahls ist dabei nicht detektierbar und geht verloren [Glg. 2.4]. Diese Größe ist aber von essentieller Bedeutung und muß durch die Anwendung anderer Methoden *de novo* generiert werden (siehe Abschnitt 2.5).

$$I_{hkl} = \mathbf{F}_{hkl} \mathbf{F}_{hkl}^* = F_{hkl}^2 \quad [\text{Glg. 2.3}]$$

I_{hkl} : Intensität des Reflexes hkl
 \mathbf{F}_{hkl} : Strukturfaktor des Reflexes hkl
 \mathbf{F}_{hkl}^* : komplex-konjugierter Strukturfaktor des Reflexes hkl

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) = F_{hkl} \exp i\alpha_{hkl} \quad [\text{Glg. 2.4}]$$

F_{hkl} : Strukturfaktoramplitude des Reflexes hkl
 f_j : atomarer Streufaktor
 α_{hkl} : Phase des Reflexes hkl

Das Ziel des Diffraktionsexperiments ist die Akquisition eines redundanten Datensatzes, der alle möglichen Reflexe bis zu einer durch experimentelle Einschränkungen bedingten Auflösungsgrenze beinhaltet. Je nach Größe und Anzahl der Moleküle, die die asymmetrische Einheit innerhalb der Elementarzelle des Kristalls bilden, kann die Anzahl der unabhängigen Reflexe bei einer mittleren Auflösung von $2 \text{ \AA} \cdot 10^4$ - 10^5 betragen. Aus diesem Grund wird das Diffraktionsexperiment in Form der Rotations- oder Oszillationsmethode durchgeführt, die eine Aufnahme von vielen Reflexen innerhalb eines Bildes erlaubt (Stout & Jensen, 1989). Während der Belichtung des Kristalls wird die Φ -Achse, die senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl steht, um ein bestimmtes Winkelinkrement gedreht (Abb. 2.4).

Dadurch werden gleichzeitig eine Vielzahl von Gitterpunkten in Beugungsstellung gebracht und auf einer Detektorfläche abgebildet. Die Größe von Φ , die Zellparameter der Elementarzelle sowie der Abstand des diffraktierenden Kristalls zur Detektorfläche, bestimmen die Anzahl der pro Aufnahme abgebildeten Reflexe. Um jeden Reflex vollständig ohne Überlappung mit Nachbarreflexen abzubilden, muß Φ sowie der Abstand vom Kristall zur Detektorfläche optimiert werden. Als Detektoren werden hauptsächlich Flächendetektoren, die so genannten "Image-Plates" benutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Diffraktionsexperimente durch Image-Plates der Firma MAR-RESEARCH (Hamburg) detektiert. Mit diesem Flächendetektor ist eine kontinuierliche Belichtung

und Auslesung der Beugungsdaten möglich, die in digitalisierter Form für die weitere Rohdatenprozessierung abgelegt werden.

2.4.3. Prozessierung der Meßdaten

Die Auswertung des Diffraktionsexperiments erfolgt in mehreren Teilschritten. Zuerst wird eine Autoindizierung der Reflexe eines Teildatensatzes zur Bestimmung der Orientierung des Kristalls in Bezug auf das Laborkoordinatensystem des Detektors durchgeführt. Anschließend erfolgt die Identifikation des entsprechenden Bravais-Gitters. Nach Festlegung dieser grundlegenden Eigenschaften werden Detektorparameter wie auch spezielle Kristalleigenschaften innerhalb einer iterativer Verbesserung des Modells zur Beschreibung des Diffraktionsexperiments definiert. Ist dieser Prozeß abgeschlossen, wird der gesamte Datensatz, die sukzessiv aufgenommenen Einzelbilder des Beugungsmusters bei Drehung des Kristalls um Φ , in die Verfeinerung einbezogen. Die Startwerte des anzupassenden Modells werden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate verbessert (**Tab. 2.3**) (Otwinowski & Minor, 1997). Nach erreichter Konvergenz werden die auf dem Modell basierenden Reflexprofile integriert.

Tab. 2.3 Verfeinerbare Modellparameter eines Diffraktionsexperiments bei der Auswertung mit DENZO (Otwinowski & Minor, 1997)

Parameter	Beschreibung
crystal rotx roty rotz	Anpassung des Kristallkoordinatensystems an das Detektorkoordinatensystem
x beam y beam	Position des Primärstrahls auf der Detektorfläche
cell	Zellparameter
angular offset radial offset	Korrektur der Transformation der Radialkoordinaten in orthogonale Koordinaten
cassette rotx roty rotz	Abweichung der Orientierung der Detektorfläche bei Kassettenfilmen
crossfire x y xy	Maß für die Strahldivergenz und Fokus
distance	Abstand Kristall zum Detektor
mosaicity	Größe der Reflexe entlang der Drehrichtung als Maß der Unordnung im Kristall

Damit erhält man für jeden möglichen Reflex die integrierte Reflexintensität, die Standardabweichung der Integration, die Zuordnung der Millerschen Indizes, sowie die Zuordnung der Art des Reflexes (vollständig oder nur teilweise detektierter Reflex). Für diese Auswertung wurde das Programm DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) benutzt. Im Anschluß werden die Reflexe in Abhängigkeit von der möglichen Raumgruppe des Kristalls durch das Programm SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) zusammengefaßt, zueinander skaliert und die redundanten Reflexe gemittelt. Durch Anwendung von raumgruppenabhängigen Auslöschungsregeln und den direkten Vergleich der integrierten Intensitäten symmetrieverwandter Reflexe wird die richtige Raumgruppensymmetrie ermittelt. Vorteilhaft ist die Messung vieler redundanter Daten, die eine Mittelwertbildung aus vielen Einzelmessdaten erlauben. Eine Redundanz von 3-4 unabhängigen Einzelmessungen für jeden Reflex stellt einen vertretbaren Kompromiß in Hinblick auf die Meßzeit dar, die aber oft nicht erreicht werden. Das Endergebnis der Skalierung und Mittelwertbildung der redundanten Reflexe ist ein reduzierter Datensatz, der keine redundanten Informationen enthält (unabhängige Daten). Der R_{sym} -Wert stellt bei der Reduzierung der mehrfach gemessenen Reflexe einen integralen Wert der Abweichung der mehrfach gemessenen symmetrieverwandten Reflexe vom ihren Mittelwert dar [Glg. 2.5]. Er kann damit auch als Kriterium der Validierung der richtigen Punktgruppensymmetrie des Datensatzes benutzt werden. Zusätzlich wird er als Gütekriterium für die Datenqualität des Diffraktionsdatensatzes verwendet.

$$R_{sym} = 100 \bullet \left(\frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}} \right) \quad [\text{Glg. 2.5}]$$

hkl : Millerscher Index
 i : Index für Messungen eines unabhängigen Reflexes hkl
 $\langle I \rangle_{hkl}$: mittlere Reflexintensität des Reflexes hkl

2.5. Die Methode des Isomorphen Ersatzes der tRNA^{Ala}-Helix

Die Methode des isomorphen Ersatzes stellt die zentrale Methode der Lösung des kristallographischen Phasenproblems dar. Ziel ist dabei, die beim Diffraktionsexperiment nicht meßbare Phase α des Strukturfaktors [Glg. 2.4] zu ermitteln. Dazu wurde ein isomorpher Schweratom-Datensatz der ALA^{wt}-Helix, die ein 5-Iod-Uridin an Position U6 im purinreichen Strang des RNA-Duplexes enthält, am Synchrotron bei einer Wellenlänge von 1.6 Å vermessen. Unterscheiden sich beide Strukturen nur durch das zusätzlich eingeführte Schweratom, ist eine Bestimmung der Phasenbeziehungen für die Schweratom-Teilstruktur F_H prinzipiell möglich. Praktisch wird aber die Isomorphie von Kristallen gestört. Oftmals weichen die Zellparameter mehr als 1% ab und die Wahrscheinlichkeit einer Strukturlösung ist damit sehr gering. Durch die Auswertung der Differenz-Pattersonfunktion [Glg. 2.9], die aus den gemessenen Daten berechnet wird, ist die Lokalisierung der Schweratom-Lagen innerhalb der Elementarzelle möglich. Diese anfängliche Auswertung stellt die Grundlage der weiteren Analysen dar. Der Zusammenhang zwischen den Beiträgen der Teilstrukturen läßt sich prinzipiell nach [Glg. 2.6] und dem Argand-Diagramm (Abb. 2.5) herstellen.

$$\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_p + \mathbf{F}_H \quad [\text{Glg. 2.6}]$$

\mathbf{F}_{PH} : Strukturfaktor des Schweratom-Derivats
 \mathbf{F}_p : Strukturfaktor des Wildtyp-Kristalls
 \mathbf{F}_H : Strukturfaktor der Schweratom-Teilstruktur

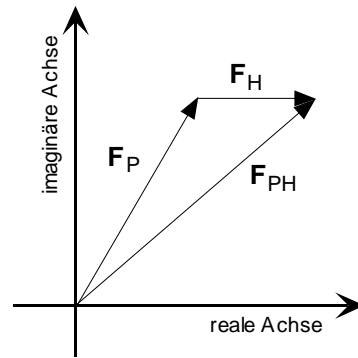


Abb. 2.5 Argand-Diagramm der Phasenbestimmung mittels isomorphem Ersatz

Da aber die Phasen der Struktur Faktoren F_{PH} und F_P ebenfalls nicht bekannt sind, ergeben sich nach der HARKER-Konstruktion, unter Voraussetzung der bekannten Schweratom-Teilstruktur F_H , für den resultierenden Strukturfaktor F_P prinzipiell zwei Lösungen, die durch die Schnittpunkte der beiden Kreise (möglicher Phasenbereich) dargestellt sind (Abb. 2.6).

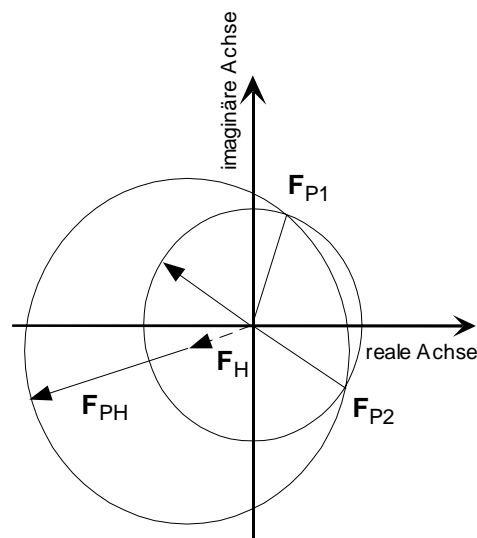


Abb. 2.6 HARKER-Konstruktion für die Phasenbestimmung mit einem Schweratom-Derivat

Um diese Phasenambiguität lösen zu können, benötigt man zusätzliche experimentelle Informationen. Hierzu wurde der anomale Effekt von Iod benutzt. Strahlt man Röntgenstrahlung mit einer Energie entsprechend der Absorptionskante des enthaltenen Schweratoms ein, so tritt dieser Effekt auf. Hierbei wird der atomare Streufaktor von einer reellen zu einer komplexen Größe [Glg. 2.7]. Das hat wiederum zur Folge, daß die Strukturfaktoramplitude von Reflexen h,k,l ungleich der von Reflexen $-h,-k,-l$ wird. Das Friedelsche Gesetz ist gebrochen (Blundell & Johnson, 1976).

$$f_j = f_j' + i\Delta f_j'' \quad [\text{Glg. 2.7}]$$

- f_j : atomarer Streufaktor
 f_j' : realer Teil des atomaren Streufaktors
 f_j'' : imaginärer Teil des atomaren Streufaktors

[Glg. 2.6] kann dann folgendermaßen geschrieben werden [Glg. 2.8].

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{PH}(+) &= \mathbf{F}_H(+) + i\mathbf{F}_H''(+) + \mathbf{F}_P(+) \\ \mathbf{F}_{PH}(-) &= \mathbf{F}_H(-) + i\mathbf{F}_H''(-) + \mathbf{F}_P(-) \end{aligned} \quad [\text{Glg. 2.8}]$$

- (+): Reflexe hkl
 (-): Reflexe -h-k-l

Die vektorielle Darstellung der entsprechenden Teilstrukturfaktoren sieht dann wie folgt aus (Abb. 2.7).

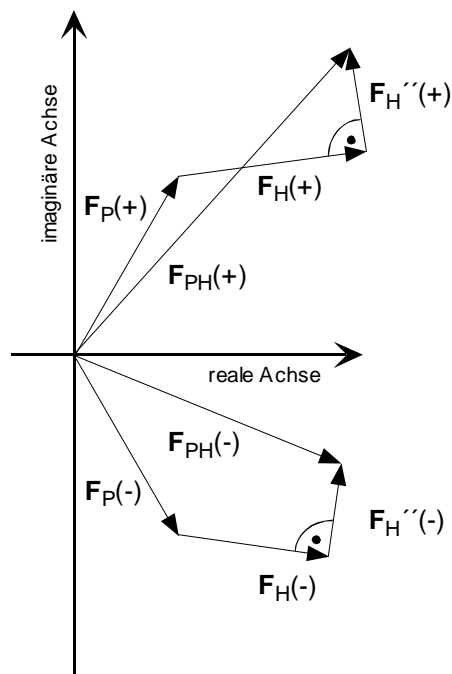


Abb. 2.7 Argand-Diagramm für die anomale Diffraction

Nutzt man das anomale Signal als zweites Derivat im Rahmen der Methode des isomorphen Ersatzes ist es möglich, eine eindeutige Lösung, die durch den Schnittpunkt der drei Kreise

dargestellt wird, für das Phasenproblem zu erhalten (SIRAS-Methode, "single isomorphous replacement, anomalous scattering"). Die entsprechende HARKER-Konstruktion für diesen Fall ist in **Abb. 2.8** dargestellt.

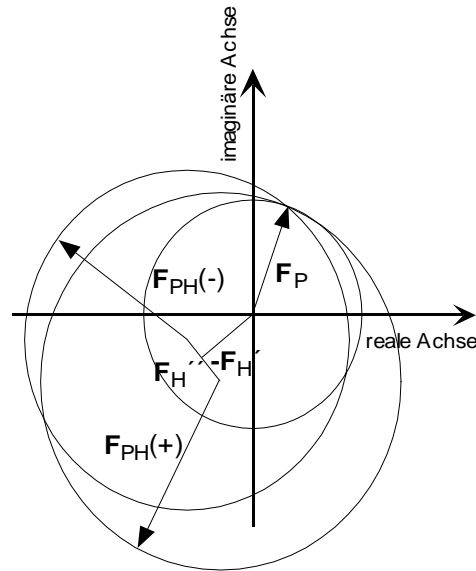


Abb. 2.8 HARKER-Konstruktion der SIRAS-Methode

Für die Anwendung der SIRAS-Methode ist die Ermittlung der Position der Schweratome in der asymmetrischen Einheit notwendig. Zur ihrer Bestimmung werden häufig Patterson-Methoden verwendet. Die isomorphe Differenz-Pattersonfunktion kann nach **[Glg. 2.9]** aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden des Schweratom- und Wildtypdatensatzes berechnet werden. Die automatische oder manuelle Analyse der Funktion liefert die Schweratom-Lagen.

$$P_{uvw} = \frac{2}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} |F_{PH} - F_P|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad [\text{Glg. 2.9}]$$

P_{uvw} : Pattersonfunktion

V : Volumen der Elementarzelle

Eine weitere Möglichkeit der Pattersonsynthese bildet die anomale Differenz-Pattersonfunktion. Diese unterscheidet sich von **[Glg. 2.9]** lediglich in der Wahl des Differenztermes, der hier $F_{PH(+)} - F_{PH(-)}$ ist. Dieser Ausdruck wird auch anomale Differenz genannt. Der Vorteil dieser Synthese beruht eindeutig auf dem Wegfallen von Isomorphieproblemen, da $F_{PH(+)}$ und $F_{PH(-)}$ bei

der Messung eines Kristalls, während eines Diffraktionsexperiments, ermittelt werden. Nachteilig wirkt sich das sehr kleine Meßsignal aus, welches im selben Größenbereich wie der experimentelle Fehler des Diffraktionsexperiments liegt. Da das Meßsignal im Gegensatz zum statistischen Rauschen aber eine gerichtete Größe darstellt, kann es aus dem Rauschen der Meßdaten extrahiert werden. Für die Phasierung von polaren Raumgruppen, wie zum Beispiel C2, sind immer mindestens zwei Schweratom-Lagen in der asymmetrischen Einheit notwendig. Da im Falle von C2 die Lage des Koordinatenursprungs entlang der y-Richtung unbestimmt ist -C2 wird deshalb als polare Raumgruppe bezeichnet- erhält man immer bei der Positionsbestimmung eines Schweratoms pro asymmetrischer Einheit eine zentrosymmetrische Lösung x, y, z und $-x, y-0.5, -z$ ($y=0.5$ willkürlich gewählt). Die Strukturformfaktoren, die von diesem Atom berechnet werden, haben nur Phasen von 0 oder π . Die resultierende Elektronendichte würde eine Konvolution aus beiden enantiomorphen Lösungen darstellen, die nicht weiter interpretierbar ist. Für eine 2. Schweratom-Position ist die absolute Positionierung auf Basis der ersten Lösung möglich (Stout & Jensen, 1989). Das Resultat der durchgeführten Schweratom-Verfeinerung wird anhand von verschiedenen Qualitätsparametern evaluiert. Das Phasierungspotential, "phasing power", stellt die Strukturformfaktoramplitude des Schweratoms zum Phasierungsfehler "lack of closure" in Bezug [Glg. 2.10] (Drenth, 1994).

$$PP = \sqrt{\frac{\sum_N |F_H|^2}{\sum_N |E|^2}} \quad \text{mit} \quad \sum_N |E|^2 = \sum_N \left[|F_{PH\text{obs}}| - \sum_N |F_{PH\text{calc}}| \right]^2 \quad [\text{Glg. 2.10}]$$

$F_{PH\text{obs}}$: gemessene Strukturformfaktoramplitude des Schweratom-Derivats

$F_{PH\text{calc}}$: aus dem Schweratom-Modell berechnete Strukturformfaktoramplitude des Schweratom-Derivats

Das Phasierungspotential ist auflösungsabhängig und ein guter Indikator für den Auflösungsbereich, bei dem die Phaseninformation einen signifikanten Beitrag zur Strukturlösung besitzt. Ein weitere wichtige Größe ist der Cullis R-Faktor, R_c , der mit dem Phasierungspotential verbunden ist [Glg. 2.11].

$$R_c = \frac{\sum_N ||F_{PH} \pm F_P| - F_H\text{calc}|}{\sum_N |F_{PH} - F_P|} \quad [\text{Glg. 2.11}]$$

Die "Figure of Merit" ist ein integrales Maß der Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(\alpha)$ der Phasen α_P [Glg. 2.12]. Der \cos^{-1} von m entspricht dem Erwartungswert des Phasenfehlers jedes Strukturfaktors F_P (Dickerson *et al.*, 1961).

$$m = \frac{|F_{hkl,best}|}{|F_{hkl}|} \quad \text{mit} \quad F_{hkl,best} = \frac{\sum_{\alpha=0}^{2\pi} P(\alpha) \cdot F_{hkl}(\alpha)}{\sum_{\alpha=0}^{2\pi} P(\alpha)} \quad [\text{Glg. 2.12}]$$

Auf der Grundlage der aus dem Schweratom berechneten Phasen ist es möglich, die Elektronendichte in der Elementarzelle des Kristalls durch eine Fouriersynthese zu berechnen [Glg. 2.13].

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F_{hkl} \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad [\text{Glg. 2.13}]$$

Zur möglichst vollständigen Interpretierbarkeit der experimentellen Elektronendichtekarten können diese durch Dichtemodifikationsalgorithmen verbessert werden. Die Methode zur Modifikation der Solvensdichte wird "solvent flattening" genannt (Wang, 1985). Hierbei wird versucht, verrauschte, niedrigkonturierte Dichte, die dem Solvensbereich zugeschrieben wird, von der höher konturierten Elektronendichte des Makromoleküls in einem iterativen Prozeß zu entfernen. Hilfreich ist dabei die Angabe des Solvensanteils im Kristall oder die Eingabe einer dreidimensionalen Maske, die Proteindichte vom Solvensbereich abtrennen soll. Die Absenkung der Elektronendichte soll dabei den Kontrast der Dichtekarte erhöhen. Die so gefilterte Dichtekarte wird durch eine reverse Fouriertransformation in Strukturfaktoren umgewandelt und die verbesserten Phasen zusammen mit den Strukturfaktoramplituden einen neuen Zyklus der Verfeinerung unterworfen bis der Algorithmus konvergiert ist. Zur Durchführung der Dichtemodifikation wurde das Programm DM (CCP4, 1994) verwendet.

Die Wahl der richtigen enantiomorphen Schweratom-Lösung kann oftmals erst nach dem Auffinden von bestimmten molekularen Mustern, wie einer rechtshändigen Doppelhelix bei der A-Form-RNA oder Sekundärstrukturelementen bei Proteinen, in der Elektronendichtekarte getroffen werden. Die

Qualitätsparameter der Schweratom-Verfeinerung sind oftmals unempfindlich für die falsche enantiomorphe Lösung.

2.6. Die Methode des Molekularen Ersatzes bei HIV^{Chi} und Bc-Csp

Die Methode des Molekularen Ersatzes stellt einen sehr effizienten Phasierungsalgorithmus dar, der aber nicht universell angewandt werden kann. Die grundlegende Voraussetzung der Anwendbarkeit ist das Vorhandensein eines hinreichend genauen Strukturmodells, welches als Suchmuster für die Positionierung des Makromoleküls in der asymmetrischen Einheit der Einheitszelle benutzt werden kann. Im Falle von HIV^{Chi} wurde eine kanonische A-RNA-Doppelhelix mit der entsprechenden Sequenz in der A-Form durch das Programm HELIX (Heinemann, 1995) generiert. Das Suchmodell für die Strukturlösung von Bc-Csp war die Kristallstruktur des CspB von Hermann Schindelin (Schindelin *et al.*, 1993), die bis zu einer Auflösung von 2.5 Å verfeinert wurde (PDB-Eintrag: 1Csp).

Die rechnerische Durchführung der Strukturlösung wurde ausschließlich mit dem Programm AMORE (CCP4, 1994) realisiert. Die Positionierung des Strukturmodells in der Elementarzelle stellt ein sechs-dimensionales Suchproblem dar. Um den Rechenaufwand zu reduzieren, wird die Suche in eine Rotations- und Translationssuche zerlegt, die nacheinander im Pattersonraum durchgeführt werden.

2.6.1. Die Kreuzrotationsfunktion

Die Rotationssuche hat das Auffinden der richtigen Orientierung des Moleküls in der asymmetrischen Einheitszelle zum Ziel. Dazu wird eine Superpositionierung der Pattersonfunktion des Strukturmodells P1, zur Pattersonfunktion des experimentell bestimmten Datensatzes P2, durch die Kreuzrotationsfunktion R, innerhalb des Integrationsvolumens U [Glg. 2.14] durchgeführt (Rossmann & Blow, 1962). Die Kreuzrotationsfunktion liefert die Rotationswinkel der Superpositionierung, die der Orientierung des Moleküls entsprechen. Wichtig ist hierbei die Wahl der Länge der einzubeziehenden Pattersonvektoren, da möglichst nur intramolekulare- also Selbstvektoren selektiert werden sollen. Da vom Programm meistens eine sphärische Auswahl der Vektoren benutzt wird, kann es zur Beeinflussung der Superpositionierung durch intermolekulare Pattersonvektoren, die Kreuzvektoren, bei nicht globulären Strukturen wie zum Beispiel bei

Nukleinsäureduplexen kommen. Obwohl hier das Suchmodell eine hohe Übereinstimmung mit der realen Struktur hat, gestaltet sich die Strukturlösung oftmals wegen der oben genannten Gründe recht kompliziert.

$$R(C) = \int_U P_2(X_2) P_1(X_1) dX_1 \quad [\text{Glg. 2.14}]$$

2.6.2. Die Translationsfunktion

Die Translationssuche dient der Bestimmung der richtigen Position des durch die Rotationssuche orientierten Moleküls im Kristall. Die Translationsfunktion $T(t)$ beschreibt die Überlagerung der Patterson-Funktion $P(u, t)$, die durch das Suchmodell generiert wurde, mit der Patterson-Funktion des gemessenen Datensatzes $P(u)$ [Glg. 2.15] (Crowther & Blow, 1967). Dazu wird die Abtastung, die eine Maximierung des Überlappungsintegrals beider Funktionen zum Ziel hat, auf einem Suchraster im reziproken Raum durchgeführt. Das Ergebnis ist ein Translationsvektor t , mit dem die richtige Position des orientierten Suchmodells generiert werden kann.

$$T(t) = \int P(u) P(u, t) du \quad [\text{Glg. 2.15}]$$

Neben dem Wert der Translationsfunktion wird in AMORE auch der kristallographische R-Faktor [Glg. 2.16] und der Korrelationskoeffizient [Glg. 2.17] für jede berechnete Position angegeben. Anhand dieser Größen ist oftmals aber keine sichere Identifikation der richtigen Strukturlösung möglich. Eine Erhöhung des Kontrasts des Lösungsraums bietet die Verfeinerung als "starrer Körper" aller Translationslösungen, da hierbei auch Rotationswinkel und Translationsvektoren außerhalb des ursprünglich definierten, groben Rasters möglich sind.

$$R = 100\% \cdot \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad [\text{Glg. 2.16}]$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} \left[\left(|F_{obs}| - |\overline{F_{obs}}| \right) \cdot \left(|F_{calc}| - |\overline{F_{calc}}| \right) \right]}{\sqrt{\sum_{hkl} \left(|F_{obs}| - |\overline{F_{obs}}| \right)^2 \cdot \sum_{hkl} \left(|F_{calc}| - |\overline{F_{calc}}| \right)^2}} \quad [\text{Glg. 2.17}]$$

Mit Hilfe von Packungsanalysen, wie der Berechnung des Volumens pro Basenpaar im Falle doppelhelikaler Nukleinsäurestrukturen (Heinemann, 1991), kann die Anzahl von Molekülen in der asymmetrischen Einheit abgeschätzt werden. So beträgt das Volumen für ein Basenpaar bei A-Form-DNA bzw. -RNA je nach Kristallpackung zwischen 1400-1600 Å³. Für Proteine stellt die Berechnung des V_M-Werts (Matthews, 1968) eine Alternativmöglichkeit dar. Dieser Wert entspricht einer Abschätzung des Solvensanteils eines Proteinkristalls und erreicht eine Größe von 1.6-4.0 (entspricht 25-70% Solvensanteil bei einer angenommenen Proteindichte von 1.35 g/cm³). Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nukleinsäuren und Proteinen, ergaben diese Abschätzungen eine wahrscheinliche Anzahl von zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit. In diesem Falle ist es innerhalb des Programms AMORE möglich, eine modifizierte Translationssuche auszuführen. Dabei wird die 1. potentielle Translationslösung als Grundlage eines weiteren Durchgangs der Translationssuche fixiert. Alle Rotationslösungen mit Ausnahme der 1. potentiellen Translationslösung werden benutzt, um mit Hilfe dieses erweiterten Suchmodells die Positionierung des 2. Moleküls durchzuführen. Die aus zwei Teillösungen bestehende Gesamtlösung muß einen niedrigeren R-Wert und einen höheren Korrelationskoeffizient als jede Teillösung für sich aufweisen, da die Gesamtlösung den Inhalt der asymmetrischen Einheit besser erklärt. Die manuelle Inspektion der Strukturlösungen mittels Computergraphik gibt schnell Aufschluß über prinzipiell falsche Lösungen, die im Falle der Nukleinsäuren meistens Überlappungen mit symmetrieverwandten Molekülen aufwiesen.

2.7. Detektion und Dekonvolution von Fehlordnungsstrukturen

Innerhalb eines Kristallgitters können Fehlordnungen durch verschiedene Eigenschaften der Moleküle auftreten. Lokale Fehlordnungen von einzelnen Atomgruppen, Seitenketten einer Polypeptidkette oder ähnliches, treten bei der statistischen Population energetisch vergleichbarer Konformationen auf. Im Falle von doppelhelikaler Nukleinsäuren, wie dem tRNA^{Ala}-Akzeptorstamm, kommt es aufgrund einer pseudo-zweizähligen Symmetrie, die senkrecht zur helikalen Achse positioniert ist und die beiden Einzelstränge ineinander überführt, zur Fehlordnung der gesamten Struktur. Obwohl die perfekte zweizählige Rotationssymmetrie bei nicht selbstkomplementären, doppelhelikalen Nukleinsäuren gestört ist, kann die im Gegensatz dazu hochsymmetrische Teilstruktur des Polyphosphatrückgrats im beobachteten Fall beide Positionierungen um die pseudo-zweizählige Rotationsachse der Helices im Kristallgitter realisieren. Die Fehlordnung wird dadurch möglich, daß die meisten intermolekularen Kristallkontakte entlang des hochsymmetrischen Polyphosphatrückgrats erfolgen. Daraus resultierend sind beide Anordnungen innerhalb des Kristallgitters energetisch ununterscheidbar. Eine Folge der statistischen Superpositionierung innerhalb des Kristalls ist der Aufbau eines höher symmetrischen Bravais-Gitters.

Findet die Fehlordnung innerhalb räumlich getrennter Domänen des Kristalls statt, so bezeichnet man dieses Phänomen als Zwillingsbildung. Unter einem Zwilling versteht man im kristallographischen Sinne das anomale Kristallwachstum unter Bildung von separaten Kristalldomänen, die sich in definierten Orientierungen innerhalb eines Kristalls zueinander anordnen (Yeates, 1997). Die parallele Anordnung einiger oder aller Gitterorientierungen der Domänen zueinander führt zu einer teilweisen oder vollständigen Überlappung der Kristallgitter. Zwillingsbildung wird relativ häufig bei Kristallen, die aus kleinen anorganischen oder organischen Molekülen aufgebaut sind, beobachtet. Obwohl die Zwillingsbildung innerhalb der makromolekularen Kristallographie ebenso auftreten kann, sind nur wenige Fälle der Strukturlösung derartiger Fälle beschrieben worden (Sweet *et al.*, 1977; Rees & Lipscomb, 1980; Pal *et al.*, 1985; Neidhart *et al.*, 1987; Gomis Ruth *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1996; Schäfer *et al.*, 1998; Valegard *et al.*, 1998; Shah & Brünger, 1999). Ein spezieller Fall der Zwillingsbildung ist der merohedrale Zwilling. Bestimmte Raumgruppen, deren Rotationssymmetrie die der zugrundeliegenden Punktgruppe überschreiten, wie in Punktgruppe 3, 4, 6, sind dazu in der Lage. Dabei bildet das Zwillingsgesetz den Symmetrieoperator des Kristalls, nicht aber der Punktgruppe. Praktisch führt die Überlappung der Reflexmuster der

Zwillingsdomänen zur Ausbildung einer höheren Symmetrie des Beugungsmusters. Das Modell der statistischen Fehlordnung, das im Falle der Heptameren tRNA^{Ala}-Akzeptorstämme favorisiert werden konnte, kann zusätzlich als perfekter pseudo-merohedraler Zwilling kristallographisch beschrieben werden (Herbst-Irmer & Sheldrick, 1998). Dieser Zwilling entsteht, wenn durch Anwendung des Zwillingsoperators Zwillingsdomänen mit einer speziellen Geometrie zueinander eine höher symmetrische Struktur aufbauen als ihnen einzeln betrachtet zugrunde liegt. Im beobachteten Fall bauen zwei Domänen der Punktgruppe 1 einen Zwilling der Punktgruppe 2 auf. Die Zwillingsfraktion α beträgt 0.5, entspricht also einen perfekten pseudo-merohedralen Zwilling. Anhand des Diffraktionsmusters läßt sich diese Eigenschaft aber nicht ermitteln. Die beobachteten Reflexintensitäten I , stellen die Summe der Einzelbeiträge der Domänendiffraktion $I_{obs}(\mathbf{h}_1)$, $I_{obs}(\mathbf{h}_2)$, dar [Glg. 2.18].

$$\begin{aligned} I_{obs}(\mathbf{h}_1) &= (1 - \alpha)I(\mathbf{h}_1) + \alpha I(\mathbf{h}_2) \\ I_{obs}(\mathbf{h}_2) &= \alpha I(\mathbf{h}_1) + (1 - \alpha)I(\mathbf{h}_2) \end{aligned} \quad [\text{Glg. 2.18}]$$

Mögliche Indikatoren der Zwillingsbildung sind ein aus Packungsabschätzungen zu kleines Volumen der asymmetrischen Einheit. Diese Eigenschaft ist aber nicht zwingend und wird somit nicht immer zu einer Identifizierung der Zwillingsbildung beitragen. Eine andere Methode stellt die Analyse der Intensitätsstatistik dar. Obwohl die Intensitäten der Domänenbeiträge einer normalen Wilson-Statistik folgen, zeigen die gemessenen Intensitäten, die eine Summe aller Domänenbeiträge sind, ein anderes Verhalten (Stanley, 1972; Yeates, 1997). Anhand der Statistik der azentrischen Reflexe (Tab. 2.4) kann eine mögliche Zwillingsbildung abgeschätzt werden.

Tab. 2.4 Indikatoren perfekter merohedraler Zwillingsbildung

	Zwilling	kein Zwilling
$\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$	1.5	2
$\langle F^2 \rangle / \langle F \rangle^2$	0.885	0.785
$ E^2 - 1 ^1$	$\ll 0.736$	≥ 0.736

1: E entspricht der nomalisierten Strukturfaktoramplitude (Herbst-Irmer & Sheldrick, 1998)

Eine andere interessante Eigenschaft von merohedralen Zwillingen kommt bei der Interpretation von isomorphen Differenzpattersonkarten zum Tragen. Die Schweratome, die in getrennten Domänen organisiert sind, besitzen bei der Auswertung in der höher symmetrischen Raumgruppe

keine Kreuzvektoren, da durch die räumliche Trennung der Schweratome innerhalb der Zwillingsdomänen keine Interferenz bei der Diffraktion der Schweratome stattfindet (Yeates, 1997). Damit sind die Pattersonfunktionen zur Bestimmung der Schweratom-Positionen nicht anwendbar (siehe **Abschnitt 2.5**).

Hat man die Fehlordnung analysiert, ist es möglich, die Struktur in der höher symmetrischen Raumgruppe als Fehlordnungsstruktur, durch die Verfeinerung der superpositionierten Moleküle zu beschreiben. Die andere Möglichkeit, die in diesem Falle Anwendung fand, ist die Beschreibung der Struktur in der niedriger symmetrischen Raumgruppe, hier in P1, als analytisch gelösten Zwilling. Zuvor müssen die Beugungsdaten nochmals in dieser Raumgruppe prozessiert werden. Das führt dann aber immer zu einer Verschlechterung der Redundanz der Meßdaten. Die Bestimmung der Orientierung und Position des Strukturmodells (zwei Duplexe) in der triklinen Elementarzelle, ist nun unter anderem mittels Molekularen Ersatz möglich. Bei Kenntnis der Zwillingsmatrix kann eine anschließende Zwillingsverfeinerung mit dem Programm SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1997) erfolgen.

2.8. Strukturverfeinerung von HIV^{Chi} mit XPLOR-V3.8

Die Verfeinerung des Strukturmodells, dessen Orientierung und Position im Kristall als Ergebnis der Methode des Molekularen Ersatzes erhalten wurde, stellt den Zusammenhang zwischen den Meßdaten und der Struktur des Modells auf atomarer Ebene her. Im Rahmen der Verfeinerung mit dem Programm XPLOR-V3.8 (Brünger, 1992A) werden die Positionen aller Atome und der isotrope Temperaturfaktor (B-Faktor) jedes Atoms, gegen die Diffraktionsdaten iterativ verbessert. Der B-Faktor ist ein Maß für die mittlere quadratische Auslenkung "u" aus der Ruhelage des Atoms [**Glg. 2.19**], die innerhalb eines sphärischen Volumens definiert wird.

$$B = 8\pi^2 \overline{u^2} \quad [\text{Glg. 2.19}]$$

Das Ziel der Verfeinerung ist die möglichst gute Anpassung der aus dem Strukturmodell berechneten $F_{hkl}(\text{calc})$ zu den gemessenen $F_{hkl}(\text{obs})$. Der kristallographische R-Wert [**Glg. 2.16**], dient als Indikator des Fortschritts der Verfeinerung. Verändert sich dieser bei weiter durchgeführten Verfeinerungszyklen nicht mehr, dann ist die Verfeinerung konvergiert. Ein weitaus besseres Konvergenzkriterium stellt die Verwendung des freien R-Werts (R_{free}) (Brünger, 1992B)

dar [Glg. 2.20]. Dieser unterscheidet sich vom kristallographischen R-Wert lediglich darin, daß nur 5-10% der $F_{hkl}(\text{obs})$ mit den entsprechenden $F_{hkl}(\text{calc})$ verglichen werden. Die Auswahl der Reflexe erfolgt nach dem Zufallsprinzip, unter Berücksichtigung der Selektion von Reflexen die ähnliche Bragg-Winkel θ besitzen [Glg. 2.2] (Kleywegt & Jones, 1995). Dieser Teildatensatz, der nicht zur Verfeinerung des Strukturmodells herangezogen wird, stellt ein sensitives Instrument zur Indikation einer Überfittung des Strukturmodells dar.

$$R_{free} = 100\% \cdot \frac{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}| - k |F_{calc}|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|} \quad [\text{Glg. 2.20}]$$

Bei der Verfeinerung von makromolekularen Strukturen entsteht ein prinzipielles Problem durch die auflösungsbedingte geringe Anzahl an experimentellen Daten, an die eine große Anzahl von atomaren Parametern angepaßt werden soll. Das schlechte Daten-zu-Parameter-Verhältnis läßt sich durch die Einbeziehung von zusätzlichen Informationen, den "restraints" verbessern [Glg. 2.22]. Diese Werte entsprechen Standardgeometrien, die durch die Auswertung einer großen Anzahl hochaufgelöster Kristallstrukturen erhalten wurden (Engh & Huber, 1991). Die Wichtigkeit dieser Zusatzinformationen gegen die experimentellen Daten hängt von der Auflösung und Qualität der Meßdaten ab. Alle Abweichungen des Strukturmodells von den Meßdaten, wie auch von den "restraints", werden innerhalb der XPLOR-Verfeinerung als Energiefunktionen formuliert [Glg. 2.21]. Dabei enthält der komplexe E_{EMP} -Energieterm alle Hauptwechselwirkungen, der E_{XRAY} -Term die experimentellen Daten des Diffraktionsexperiments. Diese Zielfunktion wird nach der Methode der "conjugate gradient minimization" zu einem globalen Minimum von E_{TOTAL} optimiert (Jack & Levitt, 1978; Tronrud *et al.*, 1987).

$$E_{TOTAL} = E_{EMP} + wE_{XRAY} \quad [\text{Glg. 2.21}]$$

$$\begin{aligned}
 E_{EMP} = \sum_{p=1}^N & \left(\omega_{bond}^p E_{bond} + \omega_{angle}^p E_{angle} + \omega_{dihe}^p E_{dihe} \right. \\
 & + \omega_{imp}^p E_{imp} + \omega_{vdW}^p E_{vdW} + \omega_{elec}^p E_{elec} + \omega_{pvdW}^p E_{pvdW} \\
 & \left. + \omega_{pelec}^p E_{pelec} + \omega_{H-bond}^p E_{H-bond} \right)
 \end{aligned}
 \tag{Glg. 2.22}$$

$$E_{XRAY} = \sum_{hkl} \left[|F_{hkl}(obs)| - k |F_{hkl}(calc)| \right]^2
 \tag{Glg. 2.23}$$

Die XPLOR-Verfeinerung von HIV^{Chi} wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt (**Abb. 2.9**). Das Startstrukturmodell und die Meßdaten, die in Test- und Arbeitsdatensatz eingeteilt wurden, stellen den primären Input dar. Den Start der Verfeinerung bilden wenige Zyklen der "starrten Körper"-Verfeinerung bei einer mittleren Auflösung von 8-4 Å. Danach erfolgen mehrere Zyklen Koordinatenverfeinerung mit sukzessive steigender Datenauflösung bis etwa 2.0 Å. Die Verfeinerung der B-Faktoren bei derselben Auflösung, führt zu einer starken Verringerung von R und R_{Free} von etwas 5-8%. Die anschließende automatische Ermittlung potentieller Wasserpositionen durch die Analyse der +(Fo-Fc)-Dichtekarte auf einer Konturierungsstufe von 3-4 σ erweitert das atomare Strukturmodell. Gebundene Wassermoleküle, wobei lediglich die Elektronendichte des Sauerstoffatoms sichtbar ist, bilden einen wichtigen Bestandteil von Nukleinsäure- und Proteinstrukturen (Blundell & Johnson, 1976; Saenger, 1984). Die Strukturmodelle aller Verfeinerungsschritte werden mit Hilfe einer Grafikworkstation auf mögliche Fehler wie unsinnige Wasserpositionen oder unwahrscheinliche Konformationen der Nukleinsäure kontrolliert.

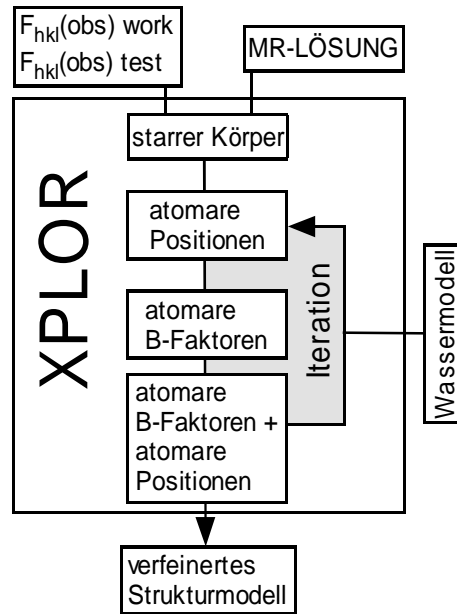


Abb. 2.9 Schematischer Ablauf der Verfeinerung von HIV^{Chi} mit XPLOR

Dazu ist die Synthese der Elektronendichtekarten notwendig. Die $(2Fo-Fc)$ -Elektronendichtekarte [Glg. 2.24] bildet die Hüllfunktion des verfeinerten Strukturmodells. Sie ist damit ein Abbild der Elektronendichteverteilung im Kristall. Von größerem Interesse ist die $(Fo-Fc)$ -Differenzdichtekarte [Glg. 2.25]. Innerhalb dieser Dichtekarte entspricht positive Dichte Bereichen fehlender Elektronendichte, zum Beispiel noch nicht definierter Wasserpositionen. Negative Dichte ist ein Indikator für eine zu hohe Elektronenkonzentration im Volumenelement, zum Beispiel durch ein Wassersauerstoffatom, das fälschlicher Weise als Chlorid-Anion interpretiert wurde.

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} (2F_{obs_{hkl}} - |F_{calc_{hkl}}|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{calc}] \quad [\text{Glg. 2.24}]$$

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} (F_{obs_{hkl}} - |F_{calc_{hkl}}|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{calc}] \quad [\text{Glg. 2.25}]$$

Eine verbesserte Dichtekartensynthese ist die SigmaA-gewichtete Elektronendichte ($2mFo-DFc$). Bei dieser Funktion werden die F_{obs} wie auch die F_{calc} nach dem abgeschätzten experimentellen Fehlern gewichtet. Diese Wichtungsfaktoren können auch bei der Synthese der Differenzdichte

(mFo-DFc) benutzt werden und sind empfindlichere Indikatoren einer falschen oder unvollständigen Teilstruktur (Read, 1986).

Nach der Anpassung des Strukturmodells an die Meßdaten wird eine Korrektur des Streubeitrags des diffusen Solvensanteils nach der Methode von Brünger (Brünger, 1992A) durchgeführt. Das Ziel ist die Abgrenzung des Raums diffuser Solvensdichte im Kristall und die Skalierung der Elektronendichte in diesem Bereich. Dazu wird der berechnete Strukturfaktor $F_{hkl}(\text{calc})$ in einen Teilstrukturfaktor, der das atomare Modell $F_{hkl}(\text{calc-protein})$ und $F_{hkl}(\text{calc-solvent})$ beinhaltet, zerlegt. Der Skalierungsfaktor k und der B-Faktor werden dann iterativ an den Datensatz angepaßt [Glg. 2.26]. Diese Erweiterung des Strukturmodells wird bei der weiteren Verfeinerung mitbenutzt. Die letzte Iteration unter Einbeziehung aller Daten und der Freigabe des Testdatensatzes bildet den Abschluß der kristallographischen Verfeinerung.

$$F_{hkl}(\text{calc} - \text{total}) = F_{hkl}(\text{calc} - \text{protein}) + kF_{hkl}(\text{calc} - \text{solvent}) \exp\left(-\frac{B_{\text{SOL}}}{4d^2}\right) \quad [\text{Glg. 2.26}]$$

2.9. Verfeinerung von ALA^{wt}, ALA^{C70} und Bc-Csp mit SHELXL-97

Die Verfeinerung von Strukturmodellen gegen atomar aufgelöste Datensätze wurde mit dem Programm SHELXL-97-2 (Sheldrick & Schneider, 1997) durchgeführt. Die wichtigsten Unterschiede gegenüber dem Programm XPLOR sind im Folgenden aufgelistet.

- Die Verfeinerung erfolgt gegen I_{obs} und σI_{obs} . Der Vorteil gegenüber einer Verfeinerung gegen F_{obs} liegt in der besseren Fehlerabschätzung bei kleinen I_{obs} -Werten (wurde bei ALA^{C70}, Bc-Csp und Bc-Csp^{R3E} angewendet).
- Die Zielfunktion der Verfeinerung ist nicht als Energiefunktion definiert. Die Verfeinerung von Strukturmodellen gegen sehr niedrig aufgelöste Datensätze ($< 2.5 \text{ \AA}$) ist mit SHELXL97 nicht möglich.
- Es ist eine Verfeinerung von anisotropen B-Faktoren möglich. Das isotrope Modell des sphärischen Volumens als wahrscheinlicher Aufenthaltsort eines schwingenden Atoms wird in ein Ellipsoidvolumen überführt, welches die tatsächliche anisotrope Beweglichkeit von gebundenen Atomen besser wiedergibt (Pratt *et al.*, 1971; Jameson, 1982).

- SHELXL verfeinert gleichzeitig alle Parameter innerhalb einer Matrix. Das heißt, daß eine nacheinander erfolgende Verfeinerung von Positionen und B-Faktoren nicht notwendig ist.
- SHELXL erlaubt die Verfeinerung eines analytisch gelösten Zwillings unter Verwendung der Zwillingsmatrix und damit eine vollständige Dekonvolution der superpositionierten Elektronendichte.
- SHELXL generiert mögliche Wasserstoffpositionen, ohne zusätzliche Parameter ("riding hydrogen model") einzufügen.
- Durch die Invertierung der vollständigen Verfeinerungsmatrix ist eine Abschätzung der Standardabweichung jedes Parameterwerts möglich (Press *et al.*, 1989).

2.9.1. Die Verfeinerung von ALA^{wt} , ALA^{I-U6} und ALA^{C70}

Die Verfeinerung wurde nach der Bestimmung der Zwillingsmatrizen in der triklinen Raumgruppe P1 durchgeführt. Zuvor wurden die Kreuzrotations- und Translationsfunktion in dieser Raumgruppe für zwei Duplexmoleküle in der asymmetrischen Einheit gelöst. Die generelle Herangehensweise entspricht dem schematischen Ablauf der XPLORE-Verfeinerung (**Abb. 2.9**). 5-10% der Reflexe wurden nach der Methode der "thin resolution shells" ausgewählt. Die Verfeinerung mit isotropem B-Faktor und automatischer Wassersuche erfolgte bei beiden Strukturen bis zur Konvergenz unter Verwendung aller Daten bis 15 Å. Die Option der Zwillingsverfeinerung erlaubt die vollständige Dekonvolution der superpositionierten Elektronendichte unter zusätzlicher Verfeinerung der Zwillingsfraktion α [**Glg. 2.18**]. SHELXL benutzt dabei die Zwillingsverfeinerung nach Pratt und Jameson (Pratt *et al.*, 1971; Jameson, 1982). Die verwendeten "restraints" wurden unter Verwendung hochaufgelöster Mono- und Dinukleotidkristallstrukturen, die aus der "Cambridge Structural Database" und "Nucleic Acid Database" entnommen wurden, von SHELXL benutzt (Clowney *et al.*, 1996; Gelbin *et al.*, 1996; Parkinson *et al.*, 1996). Sie umfassen die Definition von Bindungslängen, Bindungswinkeln (in Form von 1,3-Abständen), Planarität aromatischer Ringe, chirale Volumina der C1'-Atome der Ribosen und den Abstoßungs-"restraints", die aus Van-der-Waals-Abständen von Atomen generiert wurden. Zusätzlich bietet SHELXL die Möglichkeit sogenannte "similarity restraints" für 1,2- und 1,3-Abstände zu definieren. Damit kann die Ähnlichkeit von bestimmten Wiederholungseinheiten, wie dem Phosphatrückgrat, den Geometrien der Ribose und den glykosidischen Bindungen der einzelnen Nukleotide beschrieben werden. Die Verwendung dieser speziellen "similarity restraints" ist aber nur bei der Verfeinerung

hochaufgelöster Strukturen sinnvoll. Die SHELXL-Verfeinerung basiert nicht auf einer kraftfeldorientierten Definition der "restraints". Dadurch kann das Strukturmodell schneller zum globalen Minimum konvergieren. Der Konvergenzradius der Verfeinerung ist zusätzlich größer als zum Beispiel bei XPLOR-3.8 (Sheldrick & Schneider, 1997). Die weniger rigide Art der Verfeinerung benötigt dafür aber mehr experimentelle Daten, so daß eine ungefähre Auflösungsgrenze von 2.5 Å als sinnvolles Kriterium zum Wechseln zur XPLOR Verfeinerung anzusehen ist.

Die Durchführung der Verfeinerung mit anisotropen B-Faktoren führte zu einer drastischen Verbesserung des Strukturmodells. Grund dafür ist die Tatsache, daß die Beweglichkeit gebundener Atome immer anisotrop ist (Pratt *et al.*, 1971; Jameson, 1982). Die anisotrope Beweglichkeit eines Atoms kann mit Hilfe seines Vibrations- oder Anisotropieellipsoids beschrieben werden. Wird im isotropen Fall die Elektronendichte um ein Streuzentrum durch eine sphärische Gauß-Verteilung beschrieben, so entspricht die anisotrope, elliptische Beschreibung drei Gauß-Funktionen (**Abb. 2.10**). Der anisotrope B-Faktor wird jetzt über eine symmetrische Matrix beschrieben, deren Matrixelemente $\langle u_x u_y \rangle$ den mittleren Auslenkungen der Atome entlang der Koordinatenachsen entsprechen [**Glg. 2.27**]. Damit erhöht sich die Anzahl der freien Parameter pro Atom von vier ($x, y, z + B$) auf neun ($x, y, z + 6$ U-Matrixelemente).

$$\mathbf{B} = 8\pi^2 \cdot \mathbf{U} = 8\pi^2 \cdot \begin{pmatrix} \langle u_x u_x \rangle & \langle u_x u_y \rangle & \langle u_x u_z \rangle \\ \langle u_x u_y \rangle & \langle u_y u_y \rangle & \langle u_y u_z \rangle \\ \langle u_x u_z \rangle & \langle u_y u_z \rangle & \langle u_z u_z \rangle \end{pmatrix} \quad [\text{Glg. 2.27}]$$

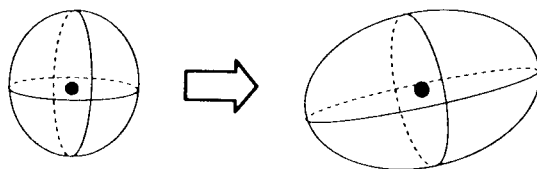


Abb. 2.10 Übergang des isotropen in den anisotropen B-Faktor. (Schneider, 1996)

Die anisotrope B-Faktor-Verfeinerung wird von zusätzlichen "restraints" eingeschränkt. Durch Anwendung von "rigid-bond restraints" DELU, versucht man die Komponente des anisotropen Temperaturfaktors, die entlang einer 1,2- oder 1,3-Bindung zeigt, in Abhängigkeit der

vorgegebenen Standardabweichung gegen Null konvergieren zu lassen (Rollett, 1970). Der "similar-anisotropic-displacement restraint" SIMU wirkt auf die Matrixelemente u_{ij} räumlich benachbarter Atome und versucht sie aneinander anzugleichen (Hendrickson, 1985). Die Anisotropie-Ellipsoide ungebundener Atome, wie Sauerstoffatome in Wassermolekülen werden mit dem ISOR "restraint" in isotrope, nahezu sphärische Formen, gebracht (**Abb. 2.11**). Die Wahl der Standardabweichungen der einzelnen Einschränkungen verschärft oder lockert sie. Bei der Verfeinerung der niedriger aufgelösten ALA^{C70} Struktur wurden deshalb alle "restraints" durch kleinere σ -Werte "angezogen".

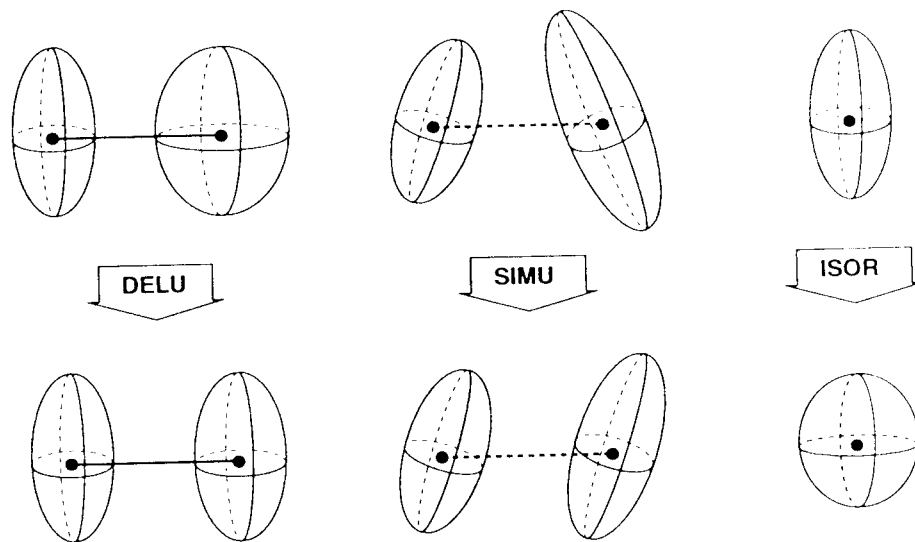


Abb. 2.11 Schematische Darstellung der Einschränkungen der anisotropen B-Faktorverfeinerung (Schneider, 1996)

Die drastische Verbesserung der SigmaA gewichteten (2mFo-DFc)-Dichtekarte und der (mFo-DFc)-Differenzdichtekarte (siehe **Abschnitt 2.8**) führte zur Lokalisierung zusätzlicher Wasserpositionen. Potentielle Wasserpositionen, die sich durch einen weit geringeren isotropen B-Faktor und kurze Abstände zu anderen Wassermolekülen oder Nukleinsäureatomen von den normalen Werten unterschieden, wurden als Na⁺-Kationen und beim ALA^{wt} zusätzlich als Sr²⁺-Kation identifiziert. Sauerstoffatome von Wassern mit kleineren Abständen als 2.3 Å zu anderen Sauerstoffatomen wurden mit einem Besetzungsfaktor von 0.5 als alternative Positionen verfeinert. Am Ende der Verfeinerung wurden die Reflexe des Testdatensatzes in den letzten Verfeinerungszyklus einbezogen, ohne jedoch das Strukturmodell zu erweitern.

2.9.2. Die Verfeinerung von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}

Die Verfeinerung von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E} erfolgte nach einer automatischen Generierung des Startinputs durch das Zusatzprogramm SHELXPRO (Sheldrick & Schneider, 1997) unter der Verwendung von "restraints", die auf einer Strukturbibliothek für Proteinstrukturen (Engh & Huber, 1991) basieren. Diese umfassen Bindungslängen und Bindungswinkel, chirale Volumina der C α -Atome und Planaritätseinschränkungen der Peptidgruppe und aromatischer Seitengruppen. 5% der Reflexe wurden nach der Methode der "thin resolution shells" als Testdatensatz ausgewählt (Kleywegt & Jones, 1995). Nach erreichter Konvergenz der Verfeinerung unter Einbeziehung isotroper B-Faktoren und Ausnutzung aller Reflexe bis zum Auflösungslimit, wurde auch hier mit der anisotropen B-Faktorverfeinerung begonnen. Die Bestätigung der Richtigkeit dieser Herangehensweise konnte auch für den nur bis 1.4 Å aufgelösten Datensatz von *Bc-Csp*^{R3E} durch die Verringerung des R_{free}-Werts nach dem ersten anisotropen Verfeinerungszyklus verifiziert werden. Die automatische Wassersuche durch das Programm SHELXWAT identifizierte etwa 95% der möglichen Wasserpositionen. Diese vorgeschlagenen Positionen wurden auch hier manuell an der Grafikworkstation kontrolliert. Aufgrund ungewöhnlich kurzer O-O-Abstände und verbleibender +(mFo-DFc) Restdichte bei der Verfeinerung als Wassersauerstoff, konnten einige dieser Positionen als Na⁺-Kationen beschrieben werden.

Die Detektion und Beschreibung von fehlgeordneten Seitenketten spielt bei hochaufgelösten Proteinstrukturen eine große Rolle. Hinweise darauf waren die Konzentration positiver Differenzdichte in der Nähe von Seitenkettenatomen. Die Analyse von Rotamerbibliotheken, die alternative Konformationen von Seitenketten bekannter Proteinstrukturen enthalten, stellen ein wichtiges Hilfsmittel bei der Beschreibung dieser Fehlordnungen dar (McRee, 1993). Alternativ modellierte Seitenketten wurden zuerst isotrop verfeinert. Anschließend wurde eine Verfeinerung der Besetzungswahrscheinlichkeit der Teilkonformationen durchgeführt. Die Summe der Teilbesetzungen sollte dabei 1.0 betragen. Nach erfolgter Konvergenz wurden die alternativen Seitengruppen ebenfalls anisotrop verfeinert. Zusätzlich wurden Standardprotonenpositionen nach der Methode der "riding hydrogens" eingeführt (Sheldrick & Schneider, 1997). Hierbei wird die Verteilung von Protonen um Zentralatome wie etwa Methylgruppen, die durch C-C- σ -Bindungen rotationssymmetrisch sind, entlang einer möglichen Kreisbahn beschrieben. Auch wenn durch die noch zu geringe Auflösung der Diffraktionsexperimente einzelne Wasserstoffatome nicht sichtbar sind, führt dieses Modell zu einer weiteren Verringerung von R und R_{free}. Die Anzahl der freien Parameter wird bei der Anwendung dieser Methode nicht erhöht.

Die Bestimmung der optimalen globalen Standardabweichungen für die "restraints" (DEFS Befehl) bildet den Abschluß der Verfeinerung. Dabei wurde die Standardabweichung für die Planarität des Torsionswinkels der Peptidgruppe ω auf 5° gelockert. Grund dafür ist die Verletzung der Planarität im Proteinrückgrat, die oftmals bei atomar aufgelösten Kristallstrukturen beobachtet werden kann (Morris *et al.*, 1992; MacArthur & Thornton, 1996). Die Güte des Strukturmodells wurde während der Verfeinerung regelmäßig unter Zuhilfenahme der Strukturvalidierungsprogramme PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996) geprüft. Die letzten Verfeinerungszyklen wurden unter Verwendung aller gemessenen Reflexe durchgeführt.

