

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Alle verwendeten und nicht gesondert aufgeführten Chemikalien besitzen Analysenqualität und sind bei Sigma-Aldrich erhältlich.

#### 2.1.1 Expressionsvektoren und -systeme

##### 2.1.1.1 *HexB*

kultivierte SF21-Drosophila Zellen

Plasmid PACYM-1BETA, als Träger der kodierenden Sequenz für die  $\beta$ -Untereinheit der Hexosaminidase

Baculovirus-Expressionssystem

##### 2.1.1.2 *SAP-C und SAP-D*

Plasmid pBHE0 als Träger der kodierenden Sequenz für Sap-Proteine

Plasmid pPIC9, pPIC9K: Invitrogen

Restriktionsenzyme EcoRI, SacI, Sall, XhoI: New England Biolabs

*Pichia pastoris* Stamm GS115: Invitrogen

Medien: RD, YPD, Basalsalzmedium zur Fermentation, MGY, PTM<sub>1</sub>-Spurensalze, alle nach Rezepten aus den *Pichia*-Expressions-Anweisungen: Invitrogen

Antibiotikum G418: Invitrogen

#### 2.1.2 Proteinreinigung

##### 2.1.2.1 *HexB*

Kationenaustausch-Chromatographie:

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0

Puffer B: 500 mM NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0

SP Sepharose Fast Flow: Amersham Biosciences

Entsalzung:

HiPrepDesalting 26/10: Amersham Biosciences

Affinitäts-Chromatographie:

Puffer A: 100mM NaCl in 10mM Phosphatpuffer, pH 6,0 mit

Puffer B: 125 $\mu$ M N-Acetyl- $\beta$ -D-glucono-1,5-lacton in Puffer A

2-Acetamido-N-( $\epsilon$ -aminocaproyl)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylamin-Sepharose 4B:  
Sigma

2-Acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lacton ( $\delta$ -Lacton): Toronto Research Chemicals

Konzentratoren: Biomax Ultrafree 30kDa, Millipore

Aktivitätsbestimmung:

Substratlösung: 2mM 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid (MUG, Toronto Research Chemicals) in 100mM Natriumcitrat-Puffer, pH 4,0

Stopplösung: 0,2M Glycin, 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

4-Methylumbelliferon: Sigma

Rinderserumalbumin (BSA): Pierce

Proteinbestimmung nach Bradford: Biorad

### 2.1.2.2 SapC und SapD

Kationenaustausch-Chromatographie:

Puffer A: 50mM Natriumphosphat-Puffer, pH 4,0

Puffer B: 50mM Natriumphosphat-Puffer, pH 4,0, 1M NaCl

Poros HS20: Applied Biosystems

Metallchelate-Chromatographie-Puffer:

Waschpuffer: 50mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0

Elutionspuffer: 50mM Natriumphosphat-Puffer, pH 4,0

Ni-NTA-Superflow: Qiagen

Gelfiltrationschromatographie:

Hiload16/60 Superdex75prep-Säule: Amersham Biosciences

Konzentratoren: Vivaspin 5kDa, Vivascience

Proteinbestimmung nach der BCA-Methode: Pierce

### 2.1.3 Kristallisation

Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen: Nelipak bv, Niederlande

Schalen mit 96 Vertiefungen: Greiner

Nylon-Schlaufen (Mounted Cryo Loops, CrystalCaps Copper): Hampton Research

#### 2.1.3.1 HexB

Proteinlösung: 10mg/ml HexB in 10mM Natriumcitrat-Puffer mit 100 mM NaCl, pH 6,0

n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid: Sigma

n-Octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranosid: Sigma

Katzenschnurrhaar

Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt: BRL, heute Teil von Invitrogen

2-Acetamido-2-desoxy-D-glucono-1,5-lacton ( $\delta$ -Lacton): Toronto Research Chemicals

K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>: Fluka

Di- $\mu$ -Iodobis(ethylendiamin)diplatin(II)-nitrat (PIP): Ventron, Karlsruhe

### 2.1.3.2 SapC und SapD

Proteinlösungen:

SapC, 8,5mg/ml in 25mM Natriumcitrat, 200mM NaCl, pH 4

SapD, 8mg/ml in 25mM Natriumacetat, 150mM NaCl, pH 4

Triiodidstammlösung: 0,54g I<sub>2</sub> zugefügt zu 1g KI in 4ml Aq. bidest.

## 2.2 Geräte

Fluoreszenzspektrometer RF5000: Shimadzu

CD-Spektropolarimeter J600: Jasco

Binokularmikroskop SZ60: Olympus

Röntgengenerator FR-571 mit rotierender Anode: Enraf-Nonius

Mar345 Image Plate: Mar-Research

BioCad Chromatographiesystem: Applied Biosystems

Äkta Chromatographiesystem: Amersham Biosciences

Zellkultur-Fermenter: Meredos

Phast-Gelelektrophoresesystem: Amersham Biosciences

## 2.3 Expression, Reinigung und Kristallisation von HexB

### 2.3.1 Expression und Reinigung

Die Expression und Reinigung von HexB wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sandhoff am Kekulé-Institut für Organische Chemie der Universität Bonn durchgeführt. Da Details sowohl der Expression als auch der Aufreinigung von großer Bedeutung für die Kristallisation der HexB sind, werden diese hier kurz dargestellt. Humane HexB wurde in einem rekombinanten Baculovirus-Expressionssystem in SF21-Insektenzellen exprimiert. Das Expressionsmedium wurde auf pH 4,0 angesäuert und steril filtriert. HexB wurde aus dem Medium mit SP Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) abgefangen und mit einem Gradient von 0-500mM NaCl in 10mM Phosphatpuffer, pH 6,0, eluiert. Nach dem Entsalzen auf einer HiPrepDesalting 26/10 Säule (AP Biotech) wurde HexB in einer Affinitätschromatographie an 2-Acetamido-N-( $\epsilon$ -aminocaproyl)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-amin-Sepharose 4B gebunden und mit 125 $\mu$ M 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lacton ( $\delta$ -Lacton) in 10mM Phosphatpuffer, pH 6,0, mit 100mM NaCl eluiert. Das Protein wurde anschließend entsalzt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Alternativ wurde als letzter Schritt noch eine Anionenaustausch-Chromatographie an einer MonoQ-Säule (Amersham Biosciences) durchgeführt. In einem Fall wurde das Protein als Ammoniumsulfat-Suspension, sonst bei 4°C in Lösung aufbewahrt.

### 2.3.2 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung der HexB erfolgt mit MUG als Substrat. Auf eine Unterscheidung der Aktivität verschiedener Isoformen wurde verzichtet, da aufgrund der rekombinanten Expression nur die Isoform HexB vorliegen konnte. Unter Eiskühlung wurden in ein 1,5ml Reaktions-

gefäß in folgender Reihenfolge pipettiert: 10µl Rinder-Serumalbumin-Lösung (1mg/ml), 20µl geeignet verdünnte Enzymlösung, 70µl Aqua bidest., 100µl Substratlösung. Die Mischung wurde 30Min. bei 37°C inkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1ml Stopplösung (0,2M Glycin, 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) beendet (Gesamtvolumen 1,2·10<sup>-3</sup>l). Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde durch Messung der Fluoreszenz bei 440nm bei einer Anregungswellenlänge von 365nm gemessen. Der in Abwesenheit vom Enzym bestimmte Leerwert wird vom Messwert subtrahiert. Das Fluoreszenzspektrometer wird mit einer 25µM (25·10<sup>-6</sup>mol/l) Lösung von 4-Methylumbelliferon auf einen Wert von 1000 eingestellt. Unter Verwendung des eingesetzten Volumens, der Zeit und der Konzentration an MUG ergibt sich:

$$1000 := \frac{25 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 1,2 \cdot 10^{-3} \text{l}}{30 \text{min}} = 1 \frac{\text{nmol}}{\text{min}}$$

Durch die Definition von 1Unit als der Enzymmenge, die unter den obigen Bedingungen 1µmol 4-Methylumbelliferon pro Minute freisetzt, gilt 1000:=1mU. Für die Volumenaktivität ergibt sich: 1000:=1mU/20µl entsprechen 50mU/ml.

### 2.3.3 Kristallisation

Zum anfänglichen Auffinden von Kristallisationsbedingungen wurden die Kristallisations-Reihentests 1 und 2 der Firma „Hampton Research“ genutzt, um eine große Zahl verschiedener Fällungsmittel, pH-Bereiche und Salzkonzentrationen mit minimalem Proteineinsatz zu testen. Für die Kristallisation wurde eine Lösung von HexB mit einer Konzentration von 10mg/ml in 10mM Natriumcitrat-Puffer mit 100mM NaCl, pH 6,0, eingesetzt. Die Proteinlösung wurde vor der Kristallisation durch einen Filter mit 0,2µm Porengröße sterilfiltriert. Die Kristallisationsexperimente erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen (Ducruix und Giegé, 1992). Dabei wurden 600µl der Kristallisationslösungen in die Vertiefungen (Reservoirs) von Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen (Nelipak bv, Niederlande) vorgelegt. Anschließend wurden 1-3µl der Reservoirelösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert und mit 1-3µl der Proteinlösung gemischt, bevor das Deckglas umgedreht und über die zugehörige Vertiefung gelegt wurde. Der Rand der Vertiefung war dabei mit Silikonfett beschichtet, so dass ein dichter Verschluss des Reservoirs durch das aufliegende Deckglas erfolgte. Die Schalen wurden bei 18°C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen unter einem Binokularmikroskop auf Kristallwachstum überprüft.

#### 2.3.3.1 Optimierung und Kokristallisation mit Inhibitor

Zur weiteren Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene Chargen des gereinigten Proteins sowie die systematische Variation der Art und Konzentration des Fällungsmittels, Puffers und weiterer Zusätze verwendet. Der optimierte Kristallisationspuffer enthielt 100mM Natriumcitrat-Puffer, pH 5,6, 18-22% (v/v) Polyethylenglykol (PEG) 8000 sowie 12-20% (v/v) Ethylenglykol, Isopropanol oder 2-Methylpentan-2,4-diol (MPD). Des Weiteren wurde der Einfluss eines Zusatzes der Detergentien n-Octyl-β-D-glucopyranosid und n-Octyl-

$\beta$ -D-thioglucopyranosid in einem Konzentrationsbereich von 0,1-0,25% (w/v) und Änderungen der anteiligen Zusammensetzung des hängenden Tropfes aus Reservoir und Proteinlösung erprobt. Zur Kokristallisation mit Inhibitor wurden 4 $\mu$ l Proteinlösung und 1 $\mu$ l 5mM 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lacton ( $\delta$ -Lacton) einem Tropfen aus 5 $\mu$ l Reservoirlösung auf einem Deckglas zugesetzt. Dieser Tropfen wurde mit der entsprechenden Reservoirlösung äquilibriert.

### 2.3.3.2 Animpfen

Durch strichartiges Animpfen von Kristallisationsansätzen wurde versucht, größere Einkristalle zu erhalten. Hierzu wurde ein Ansatz mit kleineren, verwachsenen Kristallen geöffnet, anschließend wurde mit dem dünneren Ende eines Katzenschnurrhaars über die Oberfläche eines Kristalls in diesem Ansatz gestrichen. Sofort danach wurde das Katzenhaar mit demselben Ende über die Oberfläche eines Kristallisationstropfens bewegt, der zuvor 12Std. mit der zugehörigen Kristallisationslösung äquilibriert wurde und noch keinerlei Kristalle enthielt, dann wurde dieser Tropfen zurück auf das zugehörige Reservoir gesetzt.

### 2.3.3.3 Kristallisation im Agarose-Gel

Um die beobachtete sekundäre Nukleation zurückzudrängen und weniger verwachsene Kristalle zu erhalten, wurde die Kristallisation auch im Agarosegel durchgeführt (Provost und Robert, 1991). Hierzu wurde eine Reservoirlösung vorbereitet, die zwischen 0,05% und 0,1% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt enthielt. Diese Reservoirlösung wurde kurz auf 90°C erhitzt und anschließend unter Schütteln bis zur Verwendung bei 37°C aufbewahrt. In ein Reservoir wurde Reservoirlösung ohne Agarose vorgelegt, dann wurde zu einem 2-4 $\mu$ l Tropfen der Proteinlösung, die bei 18°C aufbewahrt wurde, auf einem Deckglas ein gleiches Volumen der entsprechenden Reservoirlösung mit Agarose pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend sofort verschlossen und bei 18°C aufbewahrt. Hierbei polymerisierte das Agarosegel in wenigen Stunden vollständig aus.

## 2.4 Expression, Reinigung und Kristallisation von SapC und SapD

### 2.4.1 Expression von SapC und SapD

Die kodierenden Sequenzen für humanes SapC und -D wurden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus dem Vektor pBHE0 (Henseler et al., 1996) amplifiziert, dabei wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen und C-terminal kodierende Abschnitte für sechs His-Reste und beim SapC für einen zusätzlichen Arg-Rest vor den His-Resten eingefügt. Um für SapD ein Konstrukt ohne zusätzliche Aminosäuren nach der Sekretionssignalsequenz oder am C-Terminus zu erhalten, wurde zunächst unter Verwendung der XhoI- und der EcoRI-Schnittstellen in den Vektor pPIC9 (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit SacI und Sall verdaut. Das so erhaltene Fragment, das für SapD kodiert, wurde gereinigt und mit dem Vektor pPIC9K (Invitrogen), der ebenfalls zuvor mit Sall und SacI geschnitten wurde, zum Plasmid pPIC9K-D religiert. Im Falle des SapC wurde das erhaltene PCR-Produkt direkt

mit SnaBI und MfeI geschnitten und in das Plasmid pPIC9K ligiert, das zuvor mit EcoRI verdaut wurde, um das Plasmid pPIC9K-C für die Expression von SapC zu erhalten. Anschließend wurde der *Pichia pastoris* Stamm GS115 (Invitrogen) mit pPIC9K-C oder pPIC9K-D, die vorher durch Verdau mit Sall bzw. SacI linearisiert wurden, durch Elektroporation transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf RD-Agarplatten (Invitrogen) angezogen. Die Transformanten wurden auf eine Mehrfach-Integration der kodierenden Sequenzen in die genomische DNA selektiert, indem sie auf YPD-Agarplatten angezogen wurden, die das Antibiotikum G418 in verschiedenen Konzentrationen bis zu 4mg/ml enthielten. Der Phentyp von Klonen, die noch bei der höchsten G418-Konzentration wuchsen, wurde durch das Wachstum auf Methanol als einziger Kohlenstoff-Quelle als Mut<sup>+</sup> bestimmt.

Für die Hochzell-dichte-Fermentation wurden 3,5l Basalsalz-Medium, zu dem 2ml/l PTM1-Spuren-salzlösung zugegeben wurde, in einem Meredos-Zellkultur-Fermenter mit einer 24Std. gewachsenen Kultur in MGY-Medium angeimpft. Über eine Mikroprozessor-gesteuerte Kontroll-einheit wurde die Temperatur durch kombiniertes Kühlen und Heizen auf 30°C und der pH-Wert durch Zugabe von NH<sub>4</sub>OH bei 5,0 gehalten. Zunächst wurde der Anteil an gelöstem Sauerstoff (dissolved oxygen, DO) durch Anpassen der Rühr-geschwindigkeit bei 35% Sättigung gehalten. Bei ansteigendem Sauerstoffbedarf wurde die Rühr-geschwindigkeit nicht über 850U/Min. erhöht, stattdessen wurde Sauerstoff aus einer Druckgasflasche in die eingeleitete Druckluft zugemischt. Sobald das Glycerin aus dem MGY-Medium aufgebraucht war, begann eine vier- bis achtstündige Zufütterphase, in der dem Medium mit einer kontinuierlichen Fluss-rate von 15ml/l·h (ml pro Stunde pro Liter Medium) eine 50%ige wässrige Glycerinlösung zugesetzt wurde. Anschließend wurde der pH-Wert auf 3,0 eingestellt und dort gehalten. Die Zellen wurden durch eine Zufütterung von Methanol mit Zusatz von 2ml/l PTM1-Spuren-salzen mit langsam auf bis zu 12ml/l·h ansteigender Flussrate an das Wachstum auf Methanol gewöhnt. Die Induktion der Proteinexpression durch Methanol wurde dann für 96Std. fort-gesetzt, bevor das Medium durch zwei Zentrifugationsschritte, zunächst 15Min. bei 1000g, dann 30Min. bei 15000g, geerntet wurde. SapC oder -D wurden aus dem Medium durch Kationenaustausch-Chromatographie an Poros HS20 (Applied Biosystems) abgefangen, dabei wurde als Waschlösung 50mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 4, verwendet; die Elution erfolgte mit einem linearen Kochsalz-Gradienten bis auf 1M NaCl in demselben Puffer. Der pH-Wert der eluierten proteinhaltigen Fraktionen wurde anschließend mit 0,1M NaOH auf 7,5 ein-gestellt, dann wurden die jeweils vereinigten Fraktionen auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Superflow-Säule (Qiagen) aufgetragen. Diese Säule wurde mit 50mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 6, ge-waschen und mit 50mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 4, eluiert. Für SapC wurde die so erhal-tene Proteinlösung für die Kristallisation in 25mM Natriumcitrat, 200mM NaCl, pH 4, umge-puffert und auf 8,5mg/ml, gemessen nach der BCA-Methode, konzentriert.

Im Falle des SapD wurden die von der Metallchelate-Säule eluierten Fraktionen vereinigt, kon-zentriert und auf einer Hiload16/60 Superdex75prep-Säule (Amersham Biosciences), äquili-briert mit 25mM Natriumacetat, 150mM NaCl, pH 4, bei einer Flussrate von 1ml/Min. gefiltert. Die so erhaltene Proteinlösung wurde zur Kristallisation auf 8mg/ml, gemessen nach der BCA-Methode, konzentriert.

### 2.4.2 Kristallisation von SapC und SapD

Für die Kristallisation wurde SapC bei einer Konzentration von 8,5mg/ml in 25mM Natriumcitrat, 200mM NaCl, pH 4, und SapD bei einer Konzentration von 8mg/ml in 25mM Natriumacetat, 150mM NaCl, pH 4, eingesetzt. Für SapC wurde die Proteinlösung vor der Kristallisation durch einen Filter mit 0,2µm Porengröße sterilfiltriert. Die SapD-Lösung wurde vor der Kristallisation unter langsamem Schütteln auf 37°C erwärmt, da die Löslichkeit des Proteins besonders stark temperaturabhängig ist. Kristallisationsansätze wurden mit der erwärmten Proteinlösung bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend auf 18°C gekühlt.

Die Kristallisationsexperimente erfolgten entweder nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden (Ducruix und Giegé, 1992) oder im sitzenden Tropfen. Dabei wurden für hängende Tropfen, wie für HexB beschrieben, 2-3µl Protein- mit 2-3µl Reservoirlösung versetzt und mit 800µl (SapC) bzw. 600µl (SapD) der Reservoirlösung in Platten mit 24 Vertiefungen äquilibriert. Für sitzende Tropfen wurden 1µl Proteinlösung mit 1µl Reservoirlösung in Platten mit 96 Vertiefungen (Greiner) gegen 80µl Reservoirlösung äquilibriert. Zum anfänglichen Auffinden von Kristallisationsbedingungen wurden wiederum die Kristallisations-Reihentests 1 und 2 der Firma „Hampton Research“ genutzt, um eine große Zahl verschiedener Fällungsmittel, pH-Bereiche und Salzkonzentrationen mit minimalem Proteineinsatz zu testen. Die weitere Optimierung der Kristallisationsbedingungen erfolgte unter Verwendung von Gitter-Reihentests, bei denen die Konzentration eines Fällungsmittels und der pH-Wert gleichzeitig optimiert wurden. Für SapC enthielten optimierte Reservoirlösungen 0,1M Natriumcitrat-Puffer, pH 4,2-4,6, 66% (v/v) Isopropanol und zusätzlich 0-12% (v/v) Ethylenglykol. SapD kristallisierte optimal bei Verwendung einer Reservoirlösung aus 2,3M Ammoniumsulfat in 0,1M Natriumcacodylat, pH 6, oder 0,1M BisTris, pH 5,9. Die Kristallisation von SapD wurde durch Verwendung von Tropfen aus 2,5µl Proteinlösung, 2µl Reservoirlösung und 0,5µl eines organischen Additivs verbessert. Als geeignete Additive erwiesen sich 0,1M Phenol, 30% (v/v) Dimethylsulfoxid und 1M Glycin.

## 2.5 Kristallographische Methoden

### 2.5.1 Vorbereiten von Kristallen zur Raumtemperatur-Messung

Für die Datensammlung bei Raumtemperatur wurde ein Kristall mit Mutterlauge in eine Quarzglaskapillare (Wandstärke 0,01mm, Durchmesser je nach Kristallgröße 0,3mm bis 0,7mm, Firma W. Müller, Berlin) gesaugt und mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette von Mutterlauge befreit. Um zu verhindern, dass der Kristall austrocknet, wurde an einem Ende der Kapillare Mutterlauge zugegeben, die Kapillare mit Hartwachs (Harvard, Glaswachs Berlin) auf beiden Seiten versiegelt und auf einem Goniometerkopf befestigt.

### 2.5.2 Vorbereiten von HexB-Kristallen zur Tieftemperatur-Messung

Zur Tieftemperaturmessung wurden einzelne Kristallisationsansätze von HexB geöffnet. Die erhaltenen Kristallbündel oder einzelnen Kristalle wurden mit Hilfe einer eingefassten Nylon-schleife in einen 10µl Tropfen einer Erntelösung gehoben. Diese entsprach in ihrer Zusam-

mensetzung der zur Kristallisation verwendeten Reservoirolösung, lediglich die Fällungsmittelkonzentration war um 10% erhöht. Alle Zusätze, die außer der Reservoirolösung in dem entsprechenden Kristallisationsansatz verwendet wurden (Detergens, Inhibitor, Additive) wurden in der gleichen Konzentration auch der Erntelösung zugesetzt. Kristallbündel wurden in der Erntelösung mit Hilfe einer feinen Edelstahlnadel in einzelne Kristalle zerteilt. Die Kristalle wurden dann erneut mit einer Nylon-Schleufe in einen Tropfen Tieftemperaturpuffer gehoben. Der Tieftemperaturpuffer entsprach in seiner Zusammensetzung der Erntelösung, nur die Konzentration des organischen Additivs (Ethylenglykol, Isopropanol, MPD) ist hier auf 30% (v/v) erhöht. Nach einer Minute in dem Tieftemperaturpuffer wurden die einzelnen Kristalle in eine Nylon-Schleufe gehoben und mit dieser schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.5.3 Vorbereiten von Sap-Kristallen zur Tieftemperatur-Messung

Die erhaltenen Kristalle von SapC können ohne Transfer in einen Tieftemperaturpuffer direkt in flüssigem Stickstoff ohne Eisbildung eingefroren werden. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit des zur Kristallisation zugesetzten Isopropanols erfolgt das Montieren der Kristalle in eine Nylon-Schleufe bei 4°C. SapD-Kristalle wurden aus dem Kristallisationstropfen in eine Erntelösung überführt, die in ihrer Zusammensetzung der verwendeten Kristallisationslösung mit zusätzlich 5% (v/v) Glycerin entsprach. In der Erntelösung wurden verwachsene Kristalle auseinander gebrochen und anschließend mit einer Nylonschleufe in Reservoirolösung mit zusätzlich 22,5% (v/v) Glycerin überführt. Aus dieser Lösung wurden die Kristalle direkt schockgefroren. Bei der Behandlung von SapD-Kristallen wurde die Beanspruchung der Kristalle durch Bewegungen in den Lösungen nach Möglichkeit minimiert, da die teilweise sehr dünnen Plättchen bei Belastung sehr leicht in mehrere Teile brachen, selbst wenn die Kristalle sich bereits in einer Nylonschleufe befanden.

### 2.5.4 Derivatisierung von HexB Kristallen mit Schweratomen

Zur Derivatisierung wurden die erhaltenen HexB-Kristalle für Zeiträume von einer Stunde bzw. 24Std. in einem Tieftemperaturpuffer aufbewahrt, der jeweils eine der folgenden Substanzen in einer Konzentration von 1mM enthielten:  $K_2PtCl_4$ ,  $HgCl_2$ , Di- $\mu$ -Iodobis(ethylendiamin)-diplatin(II)-nitrat (PIP). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kristalle, die für 24Std. mit  $HgCl_2$  inkubiert worden waren, wurden anschließend noch für 1Min. in einem entsprechenden Tieftemperaturpuffer ohne  $HgCl_2$  inkubiert, um nicht gebundenes  $HgCl_2$  zu entfernen. Als weitere Derivatisierungs-Methode wurde eine kurze Inkubation mit hohen Konzentrationen von Halogenid-Anionen, ein sog. „Quick Halide Soaking“ (Dauter et al., 2000), angewandt. Hierbei wurde ein Kristall für 15-45Sek. in einen Tieftemperaturpuffer getaucht, der 1M NaBr enthielt. Des Weiteren wurden Kristalle in einer für diesen Zweck gefertigten Druckkammer mit Xenon begast (Stowell et al., 1996). Ein Teil der Druckkammer wurde dabei mit Tieftemperaturpuffer gefüllt, so dass sich die gesamte Kammer auf den Dampfdruck dieser Lösung einstellte, um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern. Anschließend wurde ein Kristall in Tieftemperaturpuffer mit einer Nylon-Schleufe in die Kam-

mer gesetzt, die dann verschraubt und für 10Min. mit Xenon aus einer Druckgasflasche bei 10bar Überdruck begast wurde. Anschließend wurde der Überdruck abgelassen, die Kammer geöffnet und der Kristall innerhalb weniger als 30Sek. in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **2.5.5 Derivatisierung von SapD-Kristallen mit Schweratomen**

Zur Derivatisierung von SapD-Kristallen wurde die Methode der Inkubation der Kristalle mit Triiodid-Ionen nach Evans und Bricogne (2002) eingesetzt. Eine KI/I<sub>2</sub>-Stammlösung wurde hergestellt, indem 1g KI in 4ml Aq. bidest. gelöst und anschließend 0,54g I<sub>2</sub> zugegeben wurden, so dass Endkonzentrationen von ca. 0,47M I<sub>2</sub> und 0,67M KI erreicht wurden. Diese Lösung wurde 1:10 mit Aq. tridest. verdünnt, dann wurde 1:10 Volumenanteil dieser Lösung zu einem Kristall in einem Tropfen Erntelösung zugesetzt, der Tropfen enthielt damit ca. 5-10mM Gesamtiod. Die Aufnahme von Iod durch den Kristall ließ sich leicht an der zunehmend rotbraunen Verfärbung des Kristalls verfolgen. Nach verschiedenen Zeiten zwischen fünf Minuten und 24Std. wurden Kristalle mit einer Nylonschleife aus den Derivatisierungstropfen in Tropfen der Tieftemperaturpufferlösung überführt und darin in der Schleife verbleibend für fünf Sekunden inkubiert. Direkt anschließend wurden die potentiell derivatisierten Kristalle in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **2.5.6 Kristallographische Datensammlung**

Sämtliche Kristalle wurden mit der Rotationsmethode (Arndt und Wonnacott, 1977) entweder in Quarzglaskapillaren (Firma W. Müller, Berlin) bei Raumtemperatur oder in Nylon-Schleifen (Hampton Research) unter Stickstoffstrom bei 100K vermessen. Datensammlungen erfolgten im Institut an einem Röntgengenerator mit rotierender Kupferanode (ENRAF-Nonius FR571, Delft) mit einem Imageplate-System (Mar-Research GmbH, Norderstedt, Deutschland). Hocho aufgelöste Synchrotron Datensätze wurden an der „European Synchrotron Radiation Facility“ (ESRF, Grenoble) an den Strahlrohren ID14 und ID29 gemessen; zur Detektion wurden CCD-Flächendetektoren des Typs Quantum (ADSC Area Detector Systems Corporation, Poway, CA, U.S.A.) eingesetzt. Datensätze für potentielle Schweratomderivate von HexB wurden am Strahlrohr BAMLine am BESSYII (Berlin) unter Detektion mit einem Imageplate-System gemessen. Potentielle Schweratomderivate des SapD wurden an dem Strahlrohr BLI der Proteinstrukturfabrik am BESSYII (Berlin) unter Detektion mit einem 165mm CCD-Detektor (Mar-Research GmbH, Norderstedt, Deutschland) vermessen. Bei der Wahl der verwendeten Wellenlänge wurde die Maximierung des anomalen Signals der jeweiligen Schweratome berücksichtigt.

Vor der Sammlung eines Datensatzes wurde eine Oszillationsaufnahme durchgeführt und mit dem Programm „DENZO“ in Verbindung mit dem Graphikprogramm „XDISPLAYF“ aus dem HKL-Paket (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert und prozessiert. Mit den Programmen marPREDICT und marSTRATEGY (Mar-Research GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde unter Vorgabe der angestrebten Vollständigkeit der Datensammlung der optimale totale Rotationswinkel und Startwinkel bestimmt. Das Winkelinkrement und der Abstand zwischen

Detektor und Kristall wurden ebenfalls mit Hilfe des am Anfang aufgenommenen Beugungsbildes unter Berücksichtigung der Zellparameter, der Kristallmosaizität, der Strahleigenschaften und der zu messenden Auflösung gewählt. Mit dem Programm „SCALEPACK“ aus dem HKL-Paket (Otwinowski und Minor, 1997) wurden die einzeln mit „DENZO“ integrierten Beugungsbilder aufeinander skaliert, die partiellen Reflexe aufsummiert und die Kristallparameter verfeinert. Dabei wurden die Gitterkonstanten und die Mosaizität einheitlich für den gesamten Datensatz und nicht unabhängig für jedes Bild berechnet. Die Auswertung hochreduzanter Datensätze erfolgte mit dem Programm „RMERGE“ (Weiss, 2001) zur Bestimmung von redundanzunabhängigen R-Werten und Fehlerabschätzungen. Alternativ wurde zur Datenprozessierung auch das Programm „XDS“ (Kabsch, 1993) und die in diesem Programm verwendeten Qualitätsindikatoren nach Diederichs und Karplus (1997) verwendet.

## 2.6 Strukturbestimmung von HexB nach der MIRAS-Methode

### 2.6.1 Das Phasenproblem

Wird ein Einkristall mit Röntgenlicht durchstrahlt, so tritt aufgrund der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der Elektronenhülle der Atome Beugung auf. Die Beugung der Strahlung resultiert aus der konstruktiven Interferenz zwischen den Teilstreuwellen benachbarter, um eine Translationsperiode verschobener Atome im Kristall. Für jeden Reflex gilt dabei die Braggsche Bedingung:  $2d(hkl)\sin\theta=n\lambda$ , wobei  $d(hkl)$  der Abstand zwischen den reflektierenden imaginären Netzebenen beschrieben durch die Miller Indizes  $hkl$ ,  $\lambda$  die Wellenlänge des eingestrahlteten Röntgenlichts,  $n$  die Beugungsordnung und  $\theta$  der Reflexionswinkel ist. Jeder einzelne Reflex ist durch seine Lage, Amplitude und Phase charakterisiert und wird durch den als Strukturfaktor bezeichneten Wellenvektor  $F(hkl)=F(hkl)e^{i\alpha(hkl)}$  vollständig beschrieben.  $F$  stellt die Amplitude ( $F=|F|$ ) und  $\alpha$  die Phase der gebeugten Röntgenwelle dar. Mit den verwendeten Flächendetektoren lassen sich die Lagen und Intensitäten, die dem Betrag des Strukturfaktors zum Quadrat proportional sind ( $I(hkl) \sim |F(hkl)|^2$ ), der einzelnen Beugungsreflexe bestimmen, die Phaseninformation jedoch geht verloren. Zur Lösung dieses Phasenproblems existieren verschiedene Methoden: Direkte Methoden, die Patterson-Methode, molekularer Ersatz, die Messung der anomale Dispersion bei einer einzelnen (SAD) oder mehreren Wellenlängen (MAD) und der einfache (SIR) oder multiple (MIR) isomorphe Ersatz. Dabei kann die Messung der anomalen Dispersion (SAD/MAD) als ein Spezialfall des isomorphen Ersatzes aufgefasst werden. Wird bei den Methoden des isomorphen Ersatzes zusätzlich das anomale Signal eines Schweratoms bei einer einzelnen Wellenlänge zur Bestimmung der Position dieses Schweratoms verwendet, so wird diese Methode als einfacher bzw. multipler isomorpher Ersatz mit anomaler Streuung (SIRAS/MIRAS) bezeichnet. Direkte Methoden kamen zur Lösung des Phasenproblems in den vorliegenden Fällen nicht in Frage, da diese sich heutzutage nur für Strukturen bis maximal 10-15kDa bei außergewöhnlich guter (atomarer) Auflösung der Diffraktionsdaten von ca. 1,0Å anwenden lassen.

Die Methode des molekularen Ersatzes beruht auf der Existenz der Struktur eines verwandten

Proteins, die mit Hilfe verschiedenster Suchalgorithmen rechnerisch in der Einheitszelle des untersuchten Kristalls platziert wird und als Startpunkt für die Berechnung der Phaseninformation dient. Da Strukturen homologer Proteine und sogar ein Homologiemodell für HexB vorhanden sind, wurde versucht, die Struktur durch molekularen Ersatz zu bestimmen. Hierbei wurden in optimierter Weise mehr als 1000 Rechenprozesse mit den Programmen „AMORE“, „MOLREP“, „BEAST“, „QS“, „EPMR“ und „COMO“ durchgeführt. In diesen Rechnungen wurden sämtliche entscheidende Parameter in einem weiten Bereich variiert. Damit wurden alle zu dieser Zeit bekannten prinzipiellen Ansätze zum molekularen Ersatz getestet, nämlich der Einsatz getrennter Rotations- und Translationsfunktionen („AMORE“, „MOLREP“, „COMO“), die 6-dimensionale Suche mittels evolutionärer Algorithmen („EPMR“), die Suche nach der „Methode der größten Wahrscheinlichkeit“ („BEAST“) sowie die „Rohe-Gewalt“-Suche („QS“). Bei all diesen Ansätzen wurde keinerlei Lösung gefunden. Der Hauptgrund hierfür liegt darin, dass die asymmetrische Einheit der vorliegenden Kristallform insgesamt sechs monomere Untereinheiten enthält. Das Homologiemodell umfasst lediglich 2/3 einer gesamten Untereinheit, so dass das Suchmodell für den molekularen Ersatz nur 1/9 des Inhalts der asymmetrischen Einheit repräsentierte. Dieser extrem geringe Anteil des Suchmodells in Kombination mit der hohen Symmetrie der Kristallform (P3<sub>1</sub>21) machte das Finden einer korrekten Lösung äußerst schwierig. Somit wurde zur Phasenbestimmung von HexB-Kristallen eine experimentelle Phasierungsmethode herangezogen, die auf der Derivatisierung mit Schweratomen beruht. Durch die erfolgreiche Derivatisierung mit wenigstens zwei Schwermetallen bestand die Freiheit, die MAD-, SAD-, MIR- oder MIRAS-Methode zu verwenden. Da an dem schnellstzugänglichen Synchrotron-Strahlrohr (BAMline, BESSY II, Berlin) zwar die Wellenlänge verstellbar war, jedoch keine Möglichkeit bestand, dort Röntgen-Fluoreszenz-Spektren in der Nähe der Absorptionskanten der betreffenden Schweratome aufzunehmen, fiel die Entscheidung auf die MIRAS-Methode. Für die Verwendung dieser Methode ist es erforderlich, Diffraktionsdaten von isomorphen Schweratomderivaten zu messen und dabei auch das anormale Signal hinreichend genau zu detektieren.

### 2.6.2 Theorie der experimentellen Lösung des Phasenproblems

Es sei der Streuvektor  $\mathbf{S}$  definiert als Differenzvektor der Wellenvektoren des reflektierten ( $\mathbf{s}$ ) und des einfallenden ( $\mathbf{s}_0$ ) Strahls, beide mit der Länge  $1/\lambda$ , wobei  $\lambda$  die Wellenlänge ist:

$$\mathbf{S} = \mathbf{s} - \mathbf{s}_0$$

Der Betrag von  $\mathbf{S}$  ist dann gegeben als :

$$S = |\mathbf{S}| = \frac{2\sin\theta}{\lambda}$$

Sind  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ ,  $\mathbf{c}$  die Basisvektoren der Einheitszelle, so erfüllen nur die Streuvektoren  $\mathbf{S}(hkl)$  die Laue-Bedingung, für die gilt:

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = h, \quad \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} = k, \quad \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} = l$$

wobei  $h, k, l$  ganze Zahlen sind. Diese Bedingung ist äquivalent zur Bragg'schen Beugungsbedingung:

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

Für ein Atom  $i$  im Kristallgitter ist die Streukraft  $g$  gegeben durch:

$$g(i, \mathbf{S}) = f(i, \mathbf{S}) \cdot e^{-B_i S^2(\mathbf{h})}$$

dabei ist:

$\mathbf{h}$  die Vektordarstellung von  $(h, k, l)$ ,  $B$  der atomare Temperaturfaktor, der in der isotropen Definition gegeben ist als  $B_i = 8\pi^2 \langle u_i^2 \rangle$ , wobei  $u_i^2$  die mittlere quadratische Abweichung des Atoms  $i$  von seiner Ruheposition ist und  $f(i, \mathbf{S})$  der atomare Streufaktor.

Damit lässt sich die Abhängigkeit des Strukturfaktors  $\mathbf{F}(\mathbf{h})$  von dem atomaren Aufbau der asymmetrischen Einheit wiedergeben:

$$\mathbf{F}(\mathbf{h}) = |\mathbf{F}(\mathbf{h})| \cdot e^{i\alpha_{\mathbf{h}}} = \sum_i g(i, \mathbf{S}) \cdot e^{2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{x}}$$

wobei  $\mathbf{x}$  die Vektordarstellung der Atomkoordinaten  $(x, y, z)$  ist.

Elektronen sind durch Kräfte an den Atomkern gebunden, die vom atomaren Kraftfeld und dem Quantenzustand des Elektrons abhängen. Sie müssen als Oszillatoren mit Eigenfrequenzen betrachtet werden. Ist die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung gleich der Eigenfrequenz der Elektronen tritt Resonanz auf. Die Streuung wird in diesem Fall als anomal bezeichnet und der atomare Streufaktor  $f(i, \mathbf{S})$  muß durch eine komplexe Größe ersetzt werden:

$$f(i, \mathbf{S}) = f_a(i, \mathbf{S}) + \Delta f(i) + i f''(i) = f'(i, \mathbf{S}) + i f''(i)$$

wobei  $\Delta f'$  der Realteil und  $i f''$  der Imaginärteil der anomalen Dispersionskorrektur sind. Diese beiden Korrekturterme sind von der bei der Datensammlung verwendeten Wellenlänge abhängig, aber nahezu unabhängig von der Auflösung, d.h. nicht abhängig von  $S$ .

Bei den zugänglichen Wellenlängen besitzen die Elemente C, N, O vernachlässigbar kleine Werte für  $f''$ . Für S und Cl sind diese klein, aber detektierbar ( $f'' \sim 0,5$ , CuK $\alpha$ -Strahlung) und mit zunehmenden Ordnungszahlen der Elemente nehmen sie weiter zu, so besitzt z.B. Hg ein  $f'' \approx 8$  bei Verwendung von CuK $\alpha$  Strahlung.

Betrachten wir ein Protein als ein System mit vernachlässigbar kleinem anomalem Streubeitrag, so können wir die anomale Dispersion durch Schweratome (als solche gelten im Falle einiger SAD-Messungen dann auch proteineigene S- oder proteingebundene Cl-Atome), als einen Spezialfall des isomorphen Ersatzes betrachten und die Methoden SIR/MIR, SIRAS/MIRAS und SAD/MAD zunächst gemeinsam betrachten. Für jede Wellenlänge, bei der anomale Daten aufgenommen werden, bzw. für jedes isomorphe Schweratomderivat, gilt:

$$\mathbf{F}(\mathbf{h})_{\text{PH}} = \mathbf{F}_p + \mathbf{F}_{\text{H/anom}} = \sum_p g(i, \mathbf{S}) \cdot e^{2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{x}} + \sum_{\text{H/anom}} g(i, \mathbf{S}) \cdot e^{2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{x}}$$

wobei die Indices bezeichnen:

$F_P$  - reiner Proteinanteil ohne Schweratome und anomalen Beitrag

$F_{PH}$  - Gesamtheit aus Protein und Schweratom

$F_{H/Anom}$  - Schweratom- oder anomale Beiträge

Im anomalen Fall kann  $F_{H/Anom}$  auch ausgedrückt werden als:

$$F_{H/Anom}(\mathbf{h}) = |F'_{H_{real}}(\mathbf{h})| \cdot e^{-i\alpha} + |F''_{H_{imag}}(\mathbf{h})| \cdot e^{i(\alpha+90)}$$

Dies bedeutet, dass im Phasendiagramm der Imaginäranteil dem Realteil immer um  $90^\circ$  vorausläuft.

Durch Einsetzen von  $h = (-h)$  ergibt sich:

$$F_{H/Anom}(-\mathbf{h}) = |F'_{H_{real}}(\mathbf{h})| \cdot e^{-i\alpha} + |F''_{H_{imag}}(\mathbf{h})| \cdot e^{i(-\alpha+90)}$$

Damit sind zwar die Beträge von  $F_H(\mathbf{h})$  und  $F_H(-\mathbf{h})$  identisch, nicht aber ihre Phasen und  $F_H(-\mathbf{h})$  ist nicht länger die Komplex-konjugierte von  $F_H(\mathbf{h})$ , so dass das Friedel-Gesetz  $F(\mathbf{h})=F(-\mathbf{h})$  gebrochen ist. Es gilt:

$$F_{PH}(\mathbf{h}) = F_P(\mathbf{h}) + F_H(\mathbf{h})$$

$$F_{PH}(-\mathbf{h}) = F_P(-\mathbf{h}) + F_H(-\mathbf{h}) = F_P(\mathbf{h}) + F_H(-\mathbf{h})$$

Daher sind weder die Beträge noch die Phasen von  $F_{PH}(\mathbf{h})$  und  $F_{PH}(-\mathbf{h})$  identisch. Diese Zusammenhänge lassen sich in einem Phasendiagramm verdeutlichen, in dem die Struktur-faktoren anhand ihres Imaginär- und Realteils in der Ebene der komplexen Zahlen aufgetragen werden. Diese Diagramme zeigen zugleich eine graphische Lösung zur Bestimmung des Phasenwinkels  $\alpha$  bei den verschiedenen Phasierungsmethoden auf. Ein einfaches Phasendiagramm (Abbildung 5) zeigt, wie sich Imaginär-, Realteil und somit auch der Phasenwinkel  $\alpha$  eines Strukturfaktor  $F_{PH}(\mathbf{h})$  durch die Gegenwart eines Schweratoms und seines Beitrags,  $F_H(\mathbf{h})$ , aus dem Strukturfaktor des Proteins allein,  $F_P(\mathbf{h})$ , ergibt.

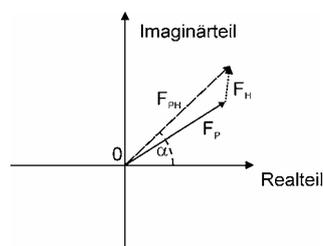


Abbildung 5: Einfaches Phasendiagramm.

### 2.6.2.1 Einfacher isomorpher Ersatz (SIR)

Im Falle des einfachen isomorphen Ersatzes gilt:

$$\mathbf{F}_P(\mathbf{h}) = \mathbf{F}_{PH}(\mathbf{h}) - \mathbf{F}_H(\mathbf{h})$$

Es werden daher zwei Kreise aufgetragen, einer mit dem Radius  $|\mathbf{F}_P|$  um den Ursprung und ein zweiter mit dem Radius  $|\mathbf{F}_{PH}|$  mit dem Mittelpunkt am Endpunkt des Vektors  $-\mathbf{F}_H$  (Abbildung 6). Zur Anwendbarkeit der graphischen Lösung müssen die Beträge der Strukturfaktoren  $|\mathbf{F}_P|$  und  $|\mathbf{F}_{PH}|$  und der Strukturfaktor  $\mathbf{F}_H$  bekannt sein. Die Beträge der Strukturfaktoren gehen direkt aus der Intensitätsmessung hervor, zur Kenntnis des Strukturfaktors  $\mathbf{F}_H$  hingegen ist die Kenntnis der Schweratomsubstruktur nötig! Die Bestimmung der Schweratomlagen kann im allgemeinen durch direkte Methoden oder durch Patterson-Methoden erfolgen; direkte Methoden werden bevorzugt, wenn eine größere Zahl schwächer besetzter Schweratomlagen gesucht wird. Die Schnittpunkte beider Kreise geben zwei mögliche Phasenwinkelösungen an, die zwei möglichen Händigkeiten der zugrundeliegenden Struktur entsprechen. Im Falle des einfachen isomorphen Ersatzes bleibt somit immer eine Phasenzweideutigkeit, die aber z.B. durch das Vorwissen über die zu bestimmende Struktur gelöst werden kann.

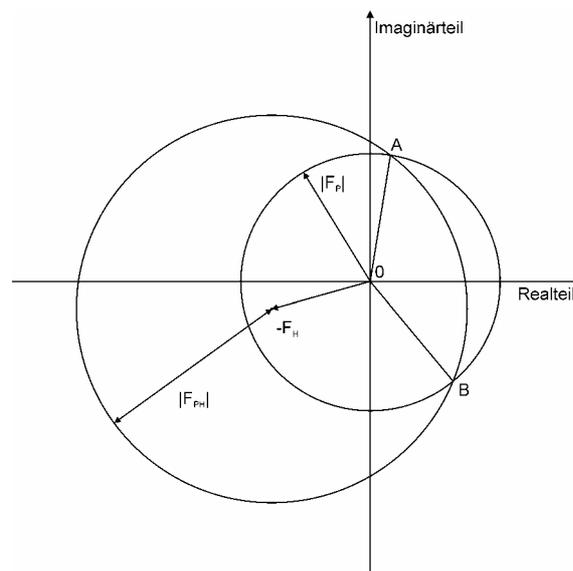


Abbildung 6: Phasendiagramm für die SIR-Methode.

### 2.6.2.2 Multipler isomorpher Ersatz (MIR)

Im Falle des multiplen isomorphen Ersatzes wird im Vergleich zu SIR mindestens ein weiteres Schweratomderivat mit einer eigenen Substruktur benötigt (gestrichelt in Abbildung 7). Durch die Existenz eines zweiten Derivats wird die Phasenzweideutigkeit gebrochen. Nur Schnittpunkt A aus Abbildung 6 ist auch ein Schnittpunkt mit dem das zweite Derivat repräsentierenden Kreis.

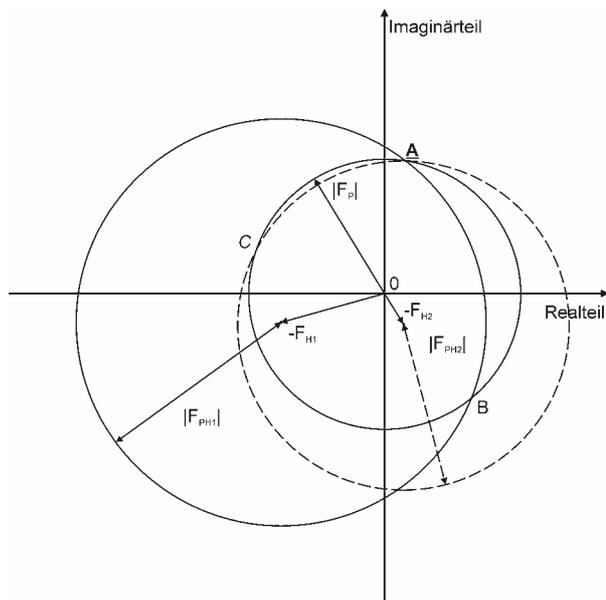


Abbildung 7: Phasendiagramm für die MIR-Methode. In diesem einfachsten Beispiel werden zwei verschiedene Schweratomderivate verwendet, das gegenüber Abbildung 6 hinzugekommene ist gestrichelt gezeigt.

### 2.6.2.3 SIRAS/MIRAS

Im Phasendiagramm für den einfachen isomorphen Ersatz mit anomaler Dispersion (SIRAS) wird der Strukturfaktor  $F_H$  der Schweratomsstruktur in seinen Realteil  $F'_H$  und den Imaginärteil  $F''_H$  aufgeteilt (Abbildung 8).

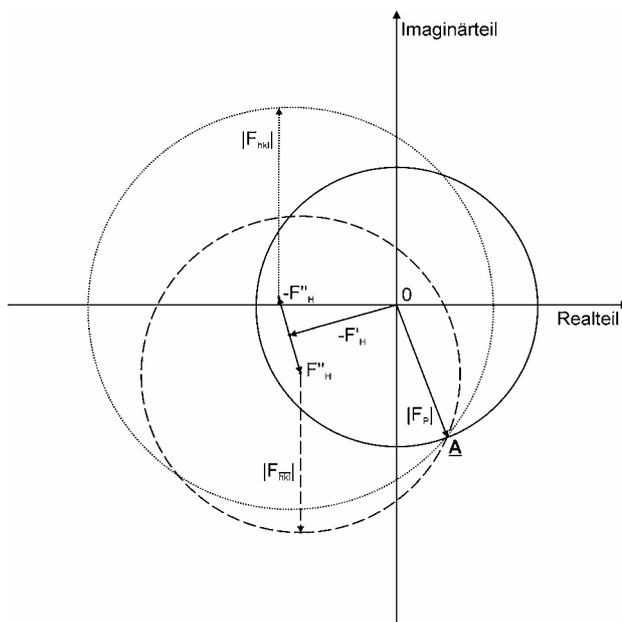


Abbildung 8: Phasendiagramm für die SIRAS-Methode.

Wie oben gezeigt, läuft  $F''_H$   $90^\circ$  vor  $F'_H$  und  $F''_H(\mathbf{h})$  und  $F''_H(\mathbf{h}) = F''_H(-\mathbf{h})$  besitzen umgekehrte Orientierung. Damit ist zwar der Betrag, nicht aber der Phasenwinkel von  $(-F'_H(\mathbf{h}) + F''_H(\mathbf{h}))$  und  $(-F'_H(\mathbf{h}) - F''_H(\mathbf{h}))$  identisch. Durch Kombination mit dem Beitrag des Proteins  $F_P(\mathbf{h})$  ergeben sich unterschiedliche Beträge und Phasen für die Strukturfaktoren eines Friedelpaares,  $F_{PH}(\mathbf{h})$  und  $F_{PH}(-\mathbf{h})$ . Diese beiden Strukturfaktoren können also genau so wie zwei Schweratomderivate im Falle des multiplen isomorphen Ersatzes zur Konstruktion eines Phasendiagramms herangezogen werden. In Anlehnung an das Phasendiagramm für den multiplen isomorphen Ersatz ergibt sich durch Hinzufügen eines weiteren Derivats, diesmal mit anomalem Beitrag, das Phasendiagramm für MIRAS.

#### 2.6.2.4 Messung der anomalen Dispersion bei einer/mehreren Wellenlängen (SAD/MAD)

Das Phasendiagramm für die SAD-Messung lässt sich direkt aus dem für die SIRAS-Methode ableiten. Im Falle einer SAD-Messung werden bei nur einer Wellenlänge die durch die anomale Dispersion ausgelösten Differenzen in den Strukturfaktoren eines Friedelpaares zur Phasenbestimmung verwendet. Dabei ist der Realteil  $F'_H$  für beide Reflexe eines Friedelpaares identisch und kann als Nullvektor angenommen werden (Abbildung 9). Im Fall der SAD-Methode wird nur das „Schweratomderivat“ und zwar nur bei einer Wellenlänge vermessen. Daher stehen, wie bei der SIR-Methode, nur zwei Messungen, nämlich  $F_{PH}(\mathbf{h})$  und  $F_{PH}(-\mathbf{h})$  zur Phasierung zur Verfügung. Dementsprechend tritt bei der SAD-Methode genau wie bei der SIR-Methode eine Phasenzweideutigkeit auf. Diese wird, in Analogie zum Übergang von der SIR- zur MIR-Methode, erst durch Anwendung der MAD-Methode und damit der Messung bei mindestens zwei, oft drei Wellenlängen, gebrochen.

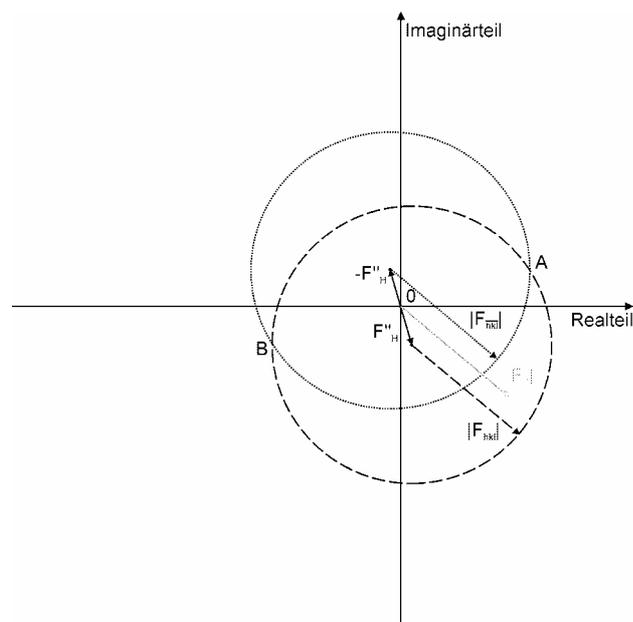


Abbildung 9: Phasendiagramm für die SAD-Methode. Der Beitrag nur des Proteins  $|F_P|$  (grau) ist im Gegensatz zur SIR- oder MIR-Methode nicht direkt zugänglich.

### 2.6.3 Bestimmung von Schweratomlagen und Phasierung

Die für die potentiellen Derivate aufgenommenen Datensätze wurden zunächst auf die Anwesenheit eines anomalen Signals überprüft. Hierzu wurden die Datensätze anomal prozessiert und skaliert, dann wurde die Skalierung nicht-anomal unter der Annahme der Gleichheit von Friedelpaaren erneut durchgeführt. Ist ein deutliches anomales Signal in den Daten vorhanden, so steigt der die Qualität der Datenanpassung bewertende  $\chi^2$ -Wert deutlich an. Zur folgenden Bestimmung der Schweratomlagen wurden die beiden Datensätze mit dem größten Anstieg des  $\chi^2$ -Wert und hinreichender Auflösung verwendet.

Zur Bestimmung der Schweratomlagen wurde das Programm „SOLVE“ angewendet (Terwilliger und Berendzen, 1999). Zunächst wurden damit zur Überprüfung der Qualität der Datensätze in beiden einzeln Schweratomlagen gesucht. Im Folgenden wurden in einem MIRAS-Protokoll ohne Vorgabe der zuvor für die einzelnen Datensätze bestimmten Schweratomlagen erneut Schweratompositionen gesucht. Als Eingabe wurden dabei die skalierten Intensitäten für einen nativen und die beiden Derivatdatensätze verwendet, die direkt aus der Datenprozessierung mit „SCALEPACK“ (Otwinowski und Minor, 1997) gewonnen wurden. Im Anschluß an die automatische Bestimmung der Schweratomlagen und die Phasenbestimmung und Verfeinerung in „SOLVE“ wurde direkt eine erste Dichtemodifikation mit dem Programm „RESOLVE“ durchgeführt, das in der zu dieser Zeit verfügbaren Version noch nicht in der Lage war, eine nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) aus den Schweratomlagen zu erkennen und sie in der Dichtemodifikation zu nutzen.

### 2.6.4 Dichtemodifikation zur Phasenverbesserung

Durch das Einpassen von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen in die aus „SOLVE“ erhaltene Elektronendichte mit dem Programm „FFFEAR“ (Cowtan, 1998) wurden vorläufige, rohe Modelle aller sechs HexB-Monomere in der asymmetrischen Einheit erhalten. Diese wurden zur Bestimmung anfänglicher Operatoren der Nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS-Operatoren) mit dem Programm „LSQKAB“ (Kabsch, 1976) und der Erstellung einer NCS-Maske mit dem Programm „NCSMASK“ (CCP4, 1994) verwendet. Unter Verwendung dieser NCS-Operatoren wurde eine Dichtemodifikation der aus „SOLVE“ erhaltenen experimentellen Elektronendichte mit dem Programm „DM“ (Cowtan, 1994) durchgeführt, anschließend mit Hilfe des Programms „FFT“ eine Elektronendichte berechnet. Bei der Dichtemodifikation wurde neben der NCS-Mittelung (ncs averaging) auch die Histogramm-Anpassung (histogram matching) und die Lösungsmittel-Abflachung (solvent flattening) eingesetzt. Aufgrund der vorhandenen sechsfachen nicht-kristallographischen Symmetrie war es möglich, die Phasen bis 4Å Auflösung (aus „SOLVE“) auf die Auflösung des nativen Datensatzes (2,25Å) zu erweitern (phase extension). Diese Prozedur wurde mehrmals unter Optimierung der NCS-Maske und der NCS-Operatoren wiederholt. Das Ergebnis der Dichtemodifikation war eine leicht interpretierbare Elektronendichte von hoher Qualität, die direkt zum Modellbau verwendet wurde.

### 2.6.5 Modellbau

Der Modellbau erfolgte graphisch mit Hilfe des Programms „O“ (Jones, 1978), die wichtigsten verwendeten Befehle sind jeweils angegeben. Zunächst wurden in die erhaltene Elektronendichte  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge aus Polyalaninsequenzen manuell eingepasst (*grab\_fragment*). Anschließend wurden die Verbindungen zwischen den Sekundärstrukturelementen manuell als Polyalanin-Modell eingefügt (*baton\_build*). Für die Zuordnung der gebauten Modellteile zur Aminosäure-Sequenz von HexB wurden die bekannten Positionen der in der NCS-gemittelten Elektronendichtekarte klar erkennbaren Disulfidbrücken und Glykosylierungsstellen und die Überlagerung des Modells mit den bekannten Strukturen der bakteriellen Homologen verwendet. Der Umbau des Polyalanin-Modells in ein Modell mit korrekter Aminosäureabfolge erfolgte durch Mutation der einzelnen Aminosäurepositionen (*mutate\_replace*) unter Auswahl einer passenden Rotamerstruktur (*lego\_sidechain*) (Lovell et al., 2000). Während des Modellbaus wurde die Stereochemie des erhaltenen Modells immer wieder verfeinert, um chemisch nicht sinnvolle Konstruktionen zu korrigieren (*Refi\_zone*). Ein vollständiges Modell wurde zunächst für eine Untereinheit gebaut und dann unter Verwendung der verfeinerten NCS-Operatoren in die Elektronendichte der anderen fünf Untereinheiten eingepasst. Alle sechs Untereinheiten wurden anschließend noch einmal manuell vollständig kontrolliert und optimiert, bevor zur kristallographischen Verfeinerung übergegangen wurde.

### 2.7 Strukturbestimmung von SapD durch molekularen Ersatz

Es existierten bereits die Strukturen der zu SapD homologen Proteine NK-Lysin (Liepinsh et al., 1997), Granulysin (Anderson et al., 2003) und SapB (Ahn et al., 2003), die als Suchmodell in Frage kamen. Alle drei Proteine besitzen auf Sequenzebene eine ähnliche Verwandtschaft zu SapD; die bekannten Strukturen unterschieden sich allerdings durch eine Öffnungsbewegung des als Grundmotiv gemeinsamen Vier-Helix-Bündels. Da nicht von vornherein bekannt war, in welcher dieser Konformationen SapD unter den Kristallisationsbedingungen vorlag, wurden zunächst auf der Basis jeweils einer experimentellen Struktur, der von SapB oder der von NK-Lysin, Homologiemodelle für SapD unter Verwendung des Programms „MODELLER“ mit Standardparametern erstellt (Marti-Renom et al., 2000). Die korrekte Identifikation konservierter Disulfidbrücken und Sekundärstrukturbereiche, sowie die Qualität der Sequenzanpassung wurden manuell überprüft. Der strukturelle Übergang zwischen den beiden modellierten Konformationen des SapD wurde unter Verwendung des im Internet verfügbaren Programms „MORPHSERVER“ (Krebs und Gerstein, 2000) in 12 Schritten interpoliert. In den dabei erhaltenen Modellen wurden die Temperaturfaktoren auf feste Werte zurückgesetzt, mit einem B-Wert für die Hauptkettenatome, der dem um 25% verringerten Wilson-B-Wert des verwendeten Datensatzes entspricht.

Der molekulare Ersatz wurde zunächst für die durch die Iodierung entstandene Kristallform in der Raumgruppe  $C222_1$  durchgeführt, da hier nur ein Molekül pro asymmetrischer Einheit vorlag und somit das erwartete Signal-zu-Rausch-Verhältnis für eine korrekte Lösung deutlich höher war als für die Kristalle in der Raumgruppe P1 mit 4 Molekülen pro asymmetrischer Einheit.

Die Suche erfolgte mit dem Programm „AMORE“ (Navaza, 1994) in mehreren Schritten: Zunächst wurde eine Rotationssuche, dann eine Translationssuche und schließlich eine Starre-Körper-Anpassung durchgeführt. Für die einzelnen Suchschritte wurden verschiedene Parametersätze getestet, mit Variation der Auflösungsgrenzen zwischen 15-8Å für die niedrigste bzw. 4,5-3Å für die höchste Auflösung. Die Suche wurde für die einzelnen zwölf Suchmodelle aus der Interpolation mit dem „MORPHSERVER“, für Poly-Serin-Varianten der Suchmodelle sowie für einzelne aus zwei Helices bestehende rigide „Domänen“ (s. Abschnitt 4.6) bzw. Poly-Ser-Modellen derselben durchgeführt. Das beste Suchergebnis, beurteilt anhand des Abstands zur zweitbesten Lösung, des Korrelationskoeffizienten und des R-Wertes, beinhaltete nur ein Poly-Ser-Modell einer Domäne. Die zweite Domäne wurde in verschiedenen Positionen entsprechend den zwölf Suchmodellen zu dem Modell hinzugefügt, anschließend wurden Starre-Körper-Anpassungen mit dem Programm „REFMAC“ (Murshudov et al., 1997) durchgeführt, bei denen jede einzelne Helix einen eigenständig zu bewegendem Körper bildete. Das beste Modell für SapD wurde anschließend mehreren Runden einer Verfeinerung unter Verwendung geometrischer Randbedingungen unterworfen. Für das so erhaltene Rückgratmodell wurde mit Hilfe des Programms „ARP/wARP“ im Modus für den molekularen Ersatz (Perrakis et al., 2001) eine Optimierung des Modells durchgeführt. Mit diesem Modell wurde eine optimierte Elektronendichte berechnet, in die mit der „ARP/wARP“-Routine „GUISIDE“ die fehlenden Seitenketten eingepasst und verfeinert wurden. Das so entstandene Modell für SapD in der orthorhombischen Kristallform wurde anschließend verwendet, um den molekularen Ersatz für die trikline Kristallform vorzunehmen. Hierzu wurde das vollständige Modell mit den verfeinerten B-Werten für eine Dyaden-Suche, bei der direkt Dimere einer bestimmten Symmetrie gesucht werden, nach zwei Dimeren mit dem Programm „MOLREP“ (Vagin und Teplyakov, 1997; Vagin und Teplyakov, 2000) eingesetzt. Die erhaltene Lösung wurde anschließend einer Starre-Körper-Anpassung und einer Koordinaten- und B-Wert-Verfeinerung mit „REFMAC“ unterzogen, bevor erneut eine Optimierung der erhaltenen Elektronendichte mit dem Programm „ARP/wARP“ im Modus für den molekularen Ersatz durchgeführt wurde. Daran anschließend wurden die Seitenkettenkonformationen mit „GUISIDE“ optimiert. Das erhaltene Modell wurde schließlich weiter verfeinert.

## 2.8 Modellverfeinerung

### 2.8.1 Verfeinerung des HexB-Modells

Die Modellverfeinerung des HexB Modells erfolgte mit dem Programm „CNS“ in der Version 1.0 (Brunger et al., 1998) anhand der vom Autor bereitgestellten Eingabeskripte (in Klammern angegeben). Zunächst wurde eine topologische Beschreibung des Modells und die Parametrisierung der stereochemischen Randbedingungen erstellt (*generate*). Für die Kreuzvalidierung wurden 1% aller verwendeten Reflexe, das sind 1703 Reflexe im sog. Test-Satz, von allen folgenden Verfeinerungsschritten ausgeschlossen. Zum Beseitigen grober Unkorrektheiten wurde das gebaute Modell zunächst einem simulierten Tempern (simulated annealing, *anneal*) in kartesischen Koordinaten bei einer Anfangstemperatur von 3500K und einem Temperatur-

abfall von 150K pro Schritt unter Verwendung der nicht-strikten NCS als Randbedingung unterzogen, gefolgt von einer Koordinatenverfeinerung (*minimize*) und einer Anpassung individueller, isotroper Temperaturfaktoren (B-Werte) (*bindividual*) unter Verwendung der NCS; anschließend wurden diese drei Schritte noch einmal wiederholt. Dieses Modell wurde mehrmals zunächst visuell begutachtet und manuell optimiert, schließlich wurde eine Koordinaten- und B-Wert-Verfeinerung durchgeführt. Die manuelle Optimierung erfolgte erneut mit dem Programm „O“ anhand der von „CNS“ berechneten 2Fo-Fc- und Fo-Fc-Elektronendichten. Diese Art der Verfeinerung wurde beibehalten, bis der freie R-Wert (der R-Wert für den Testsatz) konvergierte. Danach erfolgte eine gleichartige Modellverfeinerung ohne Verwendung der NCS-Randbedingung. Nachdem auch diese Verfeinerung konvergiert war, wurden Wassermoleküle in der Fo-Fc-Differenzelektronenkarte gesucht und ihre Positionen und Temperaturfaktoren optimiert (*water\_pick*). Danach wurden anhand von chemischen Randbedingungen und der Korrelation mit der erhaltenen 2Fo-Fc-Elektronendichte potentiell falsch zugeordnete Wassermoleküle entfernt (*water\_delete*). Auch diese beiden Schritte wurden iteriert, bis keine neuen Wassermoleküle mehr gefunden wurden, dann wurden die erhaltenen Wassermoleküle visuell kontrolliert.

Einzelne Paare nah benachbarter Wassermoleküle wurden durch Moleküle des im Tieftemperaturpuffer enthaltenen Ethylenglykol ersetzt, und der zur Kokristallisation verwendete Inhibitor wurde in die Elektronendichtekarte eingepasst. Die Topologiebeschreibung und Parametrisierung des Inhibitors wurde dabei mit dem Programm „XPLO2D“ (Kleywegt, 1995) unter manueller Korrektur erstellt. Anschließend wurden, wo sichtbar, auch die N-glykosidisch gebundenen Zuckerstrukturen in das Modell aufgenommen. Für das damit vollständige Modell wurden Gewichtungsfaktoren für die Koordinaten- und Temperaturfaktorverfeinerung so optimiert, dass der freie R-Wert bei einer angemessenen Stereochemie des Modells minimiert wurde (*rweight*, *wa\_weight*) und erneut Koordinaten- und Temperaturfaktorverfeinerungen bis zur Konvergenz durchgeführt wurden. Abschließend wurden für einige Aminosäurereste alternative Seitenkettenkonformationen in das Modell aufgenommen (*alternate*, modifiziert für die Verwendung mit mehreren Ketten). Die Verfeinerung wurde mit neuerlichen Koordinaten- und Temperaturfaktorverfeinerungen bis zur Konvergenz abgeschlossen.

### 2.8.2 Verfeinerung des SapD-Modells

Die erhaltenen Proteinmodelle für beide Kristallformen wurden unter Verwendung von „REFMAC“ verfeinert, bevor alle Teile des Modells manuell begutachtet wurden. Wassermoleküle und Heterogruppen (Glycerin, Sulfat und 4-Iodo-Tyrosin) wurden manuell in einer Fo-Fc-Differenzelektronendichte oder automatisch mit dem Programm „ARP\_WATERS“ (CCP4, 1994) gesucht. Die visuelle Kontrolle erfolgte graphisch unter Verwendung des Programms „O“ (Jones, 1978). Stereochemische Parameter für Heterogruppen wurden aus der Monomer-Bibliothek von „CCP4“/„REFMAC“ übernommen und mit Hilfe des Programms „LIBCHECK“ (CCP4, 1994) auf ihre Plausibilität überprüft. Zur Gewichtung des Röntgenterms wurde in „REFMAC“ die Matrixmethode unter Verwendung der experimentell bestimmten Standardabweichungen der Strukturfaktoren als Gewichtungsfaktoren angewendet. Zur

Optimierung des Gewichtungsfaktors werden für beide Kristallformen einzelne, von ein und derselben Struktur ausgehende Koordinaten- und Temperaturfaktor-Minimierungen durchgeführt, bei denen der Gewichtungsfaktor von 0,05 in 0,05er-Schritten bis auf 0,65 erhöht wurde. Anschließend wurden diejenigen Gewichtungsfaktoren ausgewählt, die in dem niedrigsten freien R-Wert resultierten. Dies führt im vorliegenden Fall zu größeren geometrischen Abweichungen als in den Empfehlungen zu „CNS“ angegeben, gibt aber dennoch das beste unter den erhältlichen Modellen wieder.

## 2.9 Modellanalyse

Die Bewertung der stereochemischen Qualität der Modelle erfolgte mit den Programmen „WHATCHECK“ (Hooft et al., 1996) und „PROCHECK“ (Laskowski et al., 1993). Zum Vergleich mit verwandten Strukturen wurden strukturbasierte Überlagerungen mit den Programmen „CE“ (Shindyalov und Bourne, 1998) und „TOP“ (CCP4, 1994) durchgeführt. Reine Sequenzanpassungen wurden mit „CLUSTALW“ (Thompson et al., 1994) erstellt. Die Darstellung von Sequenzanpassungen erfolgte mit „ALSCRIPT“ (Barton, 1993). Darstellungen der Proteintopologie wurden mit „TOPS“ erzeugt (Westhead et al., 1999). Zur schematischen Darstellung von Protein-Ligand-Interaktionen wurde das Programm „LIGPLOT“ verwendet (Wallace et al., 1995). Die Analyse von Wasserstoffbrücken erfolgte mit „HBPLUS“ (McDonald und Thornton, 1994). Inter- und intramolekulare Kontakte wurden mit „CONTACT“ (CCP4, 1994) bestimmt, dabei wurde, wenn nicht anders erwähnt, für einen interatomaren Kontakt in Übereinstimmung mit der Programm-Dokumentation ein maximaler Abstand von 3.66Å zugrunde gelegt. Die Lösungsmittelzugänglichkeiten von Oberflächen und einzelner Aminosäuren wurden mit dem Programm „AREAIMOL“ untersucht (CCP4, 1994). Graphische Moleküldarstellungen wurden mit den Programmen „MOLSCRIPT“ (Kraulis, 1991) und „RASTER3D“ (Merritt und Bacon, 1997) unter Verwendung einer graphischen Benutzeroberfläche (N. Sträter, nicht publiziert) erstellt. Dabei wurden zur Darstellung von Elektronendichten und von molekularen Oberflächen die Programme „CONSCRIPT“ (Lawrence und Bourke, 2000) bzw. „MSMS“ (Sanner et al., 1996) verwendet. Zur Analyse der zwischen SapB und SapD beobachteten Domänenrotation wurde das Programm „DYNDOM“ (Hayward und Berendsen, 1998) eingesetzt.

## 2.10 Röntgen-Kleinwinkelstreuung

### 2.10.1 Theorie der Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuung (Small angle X-ray scattering, SAXS) ist eine Technik, die geeignet ist, Informationen über strukturelle Inhomogenitäten mit charakteristischen Größen ab ca. 10nm in Elektronendichteverteilungen zu liefern. Sie basiert auf der Messung der Streuung von Röntgenstrahlung durch Partikel in Lösung und ist damit geeignet, hochauflösende kristallographische Messungen zu komplementieren, indem sie eine niedrig aufgelöste Beschreibung des Verhaltens der entsprechenden Partikel in Lösung ermöglicht.

### 2.10.1.1 Grundlagen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung

SAXS wird zur Messung von Abständen eingesetzt, die gegenüber den interatomaren Entfernungen in den beobachteten Partikeln sehr groß sind. Daher können die beobachteten Partikel durch eine homogene Elektronendichte approximiert werden. Es wird angenommen, dass die beobachtete Streuung elastisch ist. Dann gilt für die Amplitude  $F(\mathbf{S})$  der gestreuten Strahlung:

$$F(\mathbf{S}) = \int_{V_r} \rho(\mathbf{r}) \cdot e^{-2\pi i \cdot \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}} dV_r$$

wobei  $\rho(\mathbf{r})$  die Elektronendichte der Probe an der Stelle  $\mathbf{r}$  und  $\mathbf{S}$  der Streuvektor, definiert als Differenzvektor der Wellenvektoren  $\mathbf{s}_1$  des gestreuten und  $\mathbf{s}_0$  des einfallenden Strahls,  $\mathbf{S} = \mathbf{s}_1 - \mathbf{s}_0$ , ist. Aufgrund der Beschränkung auf kleine Streuwinkel  $\theta$  gilt folgende Näherung:

$$S = |\mathbf{S}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \cong \frac{2\theta}{\lambda}$$

Für  $S=0$  ist die Amplitude der gestreuten Strahlung  $F(\mathbf{0})$  damit gleich der Zahl an Elektronen im Streuvolumen  $V_r$ .

Die Intensität der gestreuten Strahlung ergibt sich aus:

$$I(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S}) \cdot F^*(\mathbf{S})$$

wobei  $F^*(\mathbf{S})$  die komplex konjugierte von  $F(\mathbf{S})$  ist. Sei  $V_r \gamma(\mathbf{R})$  die Autokorrelationsfunktion der Elektronendichte  $\rho(\mathbf{r})$ , mit

$$\mathbf{R} = \mathbf{r} - \mathbf{r}'$$

$$\gamma(\mathbf{R}) = \frac{1}{V_r} \int_{V_r} \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r} + \mathbf{R}) dV_r$$

dann kann die Intensität der gestreuten Strahlung beschrieben werden als:

$$I(\mathbf{S}) = \int_{V_R} V_R \cdot \gamma(\mathbf{R}) \cdot e^{-2\pi i \cdot \mathbf{R} \cdot \mathbf{S}} dV_R$$

$\gamma(\mathbf{R})$  ist die „*charakteristische Funktion*“ eines Partikels, die die Wahrscheinlichkeit angibt, einen Punkt im Partikel in der Entfernung  $R$  von einem gegebenen Punkt zu finden.

Im Falle von *Partikeln in Lösung* entsteht die beobachtete Streuung durch den Kontrast an Elektronendichte  $\Delta\rho$  zwischen den Partikeln und dem homogenen Lösungsmittel mit der konstanten Elektronendichte  $\rho_0$ ,  $\Delta\rho = \rho(\mathbf{r}) - \rho_0$ . Damit ergibt sich:

$$F(\mathbf{S}) = \int_{V_r} \Delta\rho(\mathbf{r}) \cdot e^{-2\pi i \cdot \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}} dV_r$$

Für Partikel in Lösung ist die Probe aufgrund der Brown'schen Bewegung zudem *isotrop*. Nur der sphärische Mittelwert der Intensität ist experimentell zugänglich. Damit ergibt sich:

$$I(S) = 4\pi \int_0^{\infty} p(R) \frac{\sin 2\pi RS}{2\pi RS} dR$$

und

$$p(R) = R^2 V \gamma(R) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} R \cdot S \cdot I(S) \cdot \sin 2\pi RS dS$$

$p(R)$  wird als „*Paar- oder Abstands-Verteilungsfunktion*“ bezeichnet; für homogene Partikel entspricht  $p(R)$  dem Histogramm aller Abstände zwischen Punktepaaren in dem Partikel.

In einer idealen, monodispersen Lösung aus  $N$  Partikeln einer Sorte mit der Elektronendichteverteilung  $\rho(r)$  und der Streuintensität  $i_1(S)$  wird die experimentell zu beobachtende Streuintensität beschrieben durch:

$$I(S) = N \cdot i_1(S)$$

### 2.10.1.2 Bestimmung von Molekulargewicht und Gyrationradius

Die gestreute Intensität  $I_0$  für  $S=0$  ist, wie sich aus den gegebenen Beziehungen ableiten lässt, eine lineare Funktion des Molekulargewichts eines Partikels:

$$\frac{I_0}{c} = \frac{N_A M}{\mu^2} (1 - \rho_0 \psi)^2$$

Dabei ist  $c$  die Konzentration in g/l,  $M$  das Molekulargewicht,  $\mu$  das Verhältnis des Molekulargewichts  $M$  zur Zahl der Elektronen  $m$  ( $\mu=M/m$ ) (für Proteine gilt  $\mu=1,87$ ),  $N_A$  die Avogadro'sche Zahl und  $\psi$  das elektronische spezifische Partialvolumen des Partikels. Da  $\rho_0$  und  $\psi$  für Proteine als Konstanten angenommen werden können, eine definierte Konzentration  $c$  vorgegeben und  $I$  gemessen wird, lässt sich das Molekulargewicht direkt bestimmen.

Die gestreute Intensität kann als Reihe in  $S^2$  entwickelt werden, als Näherung für kleine Werte von  $S$  kann die Reihe auf das erste Glied beschränkt werden:

$$I(S) \cong I(0) \exp\left(-\frac{4\pi^2}{3} R_g^2 S^2\right)$$

Dieser Zusammenhang wird als Guinier-Beziehung bezeichnet. Der Gyrationradius  $R_g$  ist definiert über:

$$R_g^2 = \frac{\int_{V_r} \Delta\rho(\mathbf{r}) r^2 dV_r}{\int_{V_r} \Delta\rho(\mathbf{r}) dV_r}$$

wobei der Ursprung des Vektors  $\mathbf{r}$  im Massenzentrum des Partikels liegt. Der Gyrationradius misst den Grad der (Nicht-) Sphärizität. Für ein gegebenes Volumen ist der kleinste mögliche Gyrationradius der einer Kugel:

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}}R$$

wobei  $R$  der Radius der Kugel ist.

Zur Bestimmung des Gyrationradius wird in der Praxis  $\ln[I(S)]$  gegen  $S^2$  aufgetragen (Guinier-Diagramm), die Steigung ergibt den Gyrationradius und die Extrapolation auf  $S=0$  die Intensität am Ursprung. Alternativ zur Auftragung gegen  $S$  wird die gegen den Momenttransfer  $Q$ , definiert als  $Q=2\pi \cdot S$  verwendet. Die Anwendung dieser Gesetzmäßigkeiten setzt eine ideale, monodisperse Lösung und die Messung der Intensität hinreichend nahe an  $S=0$ , für sphärische Partikel z.B. bei  $S \cdot R_g < 0,1$ , voraus.

### 2.10.1.3 Datenprozessierung

Das Ziel der Datenprozessierung ist, die ideale Streuintensität eines Partikels aus der fehlerbehafteten experimentell ermittelten Intensität zu erhalten. Die wesentlichen Messfehler liegen in der Strahldivergenz der verwendeten Röntgenstrahlung, mangelnder Monochromatizität, der Detektorauflösung und auch in schwachen Restinteraktionen zwischen den Partikeln in Lösung. Um diese Fehler minimieren zu können, wird die Streuintensität in einem bestimmten Winkelbereich  $S_{\min} < S < S_{\max}$  für verschiedene Konzentrationen des Partikels in der Lösung und der partikelfreien Lösung gemessen. Ohne auf Details eingehen zu können, ist ein wesentliches Problem hierbei die korrekte Wahl eines Skalierungsfaktors, der von dem maximal erwarteten Durchmesser des Partikels bestimmt wird. Es existieren allerdings auch Methoden zur automatischen Bestimmung eines geeigneten Wertes dieses Skalierungsfaktors, die in den Programmen „GNOM“ und „ORTOGNOM“ implementiert sind.

### 2.10.1.4 Bestimmung von Partikelformen

Die Zahl der Parameter, die insgesamt benötigt wird, um eine Streukurve in einem typischen Auflösungsbereich vollständig zu beschreiben, liegt nur bei 10-15 und damit deutlich unter der Parameterzahl die zur Beschreibung einer Proteinstruktur nötig ist. Daher erfolgt eine Interpretation typischerweise im Rahmen von Starre-Körper-Modellen. Üblicherweise wird ein Versuch-und-Irrtum-Ansatz verwendet, bei dem berechnete Streukurven für verschiedene plausible Modelle unter Einbeziehung von Solvationseffekten mit den experimentell bestimmten Werten verglichen werden (implementiert in „CRYSOL“ (Svergun et al., 1995)). Dabei kann eine Starre-Körper-Anpassung von Untereinheiten einer bekannten Struktur verwendet werden, um die Übereinstimmung zwischen dieser Struktur und den gemessenen Daten zu erhöhen (implementiert in „ALM22INT“, „ASSA“, (Kozin und Svergun, 2001; Kozin et al., 1997) und „MASSHA“ (Konarev et al., 2001)).

Eine *ab initio* Interpretationsmethode verwendet Summationen von Kugelflächenfunktionen (spherical harmonics), um komplexe Körper mit geringer Parameterzahl zu beschreiben (implementiert in „SASHA“ (Svergun et al., 1996)) und minimiert die Abweichung der für die Summe der Kugelflächenfunktionen berechneten Streukurve von der experimentell bestimmten. Die Verlässlichkeit kann bei Verwendung dieser und anderer Vorhersagen deutlich erhöht werden, wenn Vorkenntnisse oder Annahmen über die innere Symmetrie der vermessenen Partikel vorliegen.

Eine neuere *ab initio* Interpretationsmethode verwendet zur Strukturvorhersage aus der Streukurve verknüpfte Ketten aus degenerierten Aminosäure-Platzhaltern („dummy residues“). Zur vollständigen Beschreibung der Struktur einer solchen Kette sind zwar weniger Parameter als zur Beschreibung einer atomaren Struktur, aber immer noch deutlich mehr als die oben erwähnten 10-15 Parameter der Streukurve nötig. Dieses Problem wird gelöst, indem erstens Messdaten von besonderer Qualität hinsichtlich der Auflösung und des Signal-Rausch-Verhältnisses verwendet werden und indem zusätzliche Randbedingungen eingeführt werden. Die *in silico* Faltung dieser Kette geschieht durch mehrmaliges simuliertes Tempern („simulated annealing“) und Auswählen der besten Lösung. Als wichtigste Randbedingung neben anderen wird dabei die Grenzfläche zwischen der Restekette und dem Lösungsmittel im fortgeschrittenen Verfeinerungsstadium minimiert. Diese Methode ist in dem Programm „GASBOR“ (Svergun et al., 2001) implementiert. Schließlich ermöglicht das Programm „DAMAVER“ (D.I. Svergun, EMBL Hamburg) die Erzeugung des wahrscheinlichsten Strukturmodells aus den mit verschiedenen *ab initio* Verfahren gewonnen Einzelmodellen. Der Vergleich zwischen so erhaltenen Modellen aus Aminosäure-Platzhaltern und auch zwischen diesen und hochaufgelösten Strukturmodellen erfolgt anhand der normalisierten räumliche Diskrepanz (normalised spatial discrepancy, NSD) zwischen zwei Sätzen an Punkten  $P_1$  und  $P_2$ , die definiert ist als

$$NSD = \rho(P_1, P_2) = \left\{ \frac{1}{2} \left[ \frac{1}{N_1 d_2^2} \sum_{i=1}^{N_1} \rho^2(p_{1i}, P_2) + \frac{1}{N_2 d_1^2} \sum_{i=1}^{N_2} \rho^2(p_{2i}, P_1) \right] \right\}^{1/2},$$

dabei ist  $N_i$  die Zahl der Punkte in  $P_i$ ,  $d$  der durchschnittliche Abstand benachbarter Punkte in  $P_i$  und  $\rho(p_{1i}, P_2)$  der durchschnittliche Abstand eines beliebigen Punktes  $p_{1i}$  in  $P_1$  zu dem nächsten Punkt in  $P_2$ . Die NSD strebt für zunehmend ähnliche Modelle gegen null.

### 2.10.2 Probenvorbereitung

Zur Messung von Röntgen-Kleinwinkelstreudaten wurde eine Lösung von HexB in 10mM Natriumcitrat-Puffer mit 100mM NaCl, pH 6,0, durch Gelfiltration auf einer Superdex75 HiLoad16/60-Säule (Amersham Biosciences) vollständig auf 20mM Natriumcitrat-Puffer, 100mM NaCl, pH 5,6, entsprechend den zur Kristallisation verwendeten Bedingungen, umgepuffert. Anschließend wurde die Lösung durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von 13,5mg/ml gemäß der vorhergesagten Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm aufkon-

zentriert. Von geeigneten Verdünnungen dieser Lösung wurde die spezifische Aktivität bestimmt, um die Integrität des Proteins nachzuweisen. Dann wurde eine serielle Verdünnung dieser Lösung in 20mM Natriumcitrat-Puffer, 100mM NaCl, pH 5,6, vorbereitet und bis zur Messung der Röntgen-Kleinwinkelstreuung in Eis aufbewahrt.

### **2.10.3 Datensammlung und Auswertung**

Die Datensammlung erfolgte am Strahlrohr X33-D1/2 (EMBL Außenstelle Hamburg, DESY) mit einer Vieldrahtproportional-Zählkammer mit verzögerter Spektrenauslesung als Detektor. Die Streukurven wurden bei einem Probe-Detektor-Abstand von 1,70m entsprechend einem Bereich des Momenttransfers von  $0,2\text{nm}^{-1} < Q < 3,5\text{nm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von  $1,5\text{\AA}$  gemessen. Von den verschiedenen Probenkonzentrationen wurden je 10 Aufnahmen von je einer Minute bei  $15^{\circ}\text{C}$  genommen. Zwischen zwei Probenmessungen wurde jeweils eine identische Messung des Probenpuffers ohne Protein durchgeführt, diese wurden als Hintergrund von den Probenmessungen abgezogen. Die Programme „SAPOKO“ und „PRIMUS“ (Konarev et al., eingereicht) wurden zur primären Datenprozessierung verwendet. Hierbei erfolgte die Korrektur der Strahlintensitätsschwankungen und der Detektoransprechkurve, die Mittelung der einzelnen Aufnahmen, die Subtraktion des Hintergrunds und das Verwerfen von Aufnahmen, die bereits von Strahlenschäden betroffen sind. Der Vergleich der experimentellen Streukurve und der für verschiedene mögliche Oligomere berechneten Streukurven erfolgte mit „CRYSOL“, *ab initio* Vorhersagen der Struktur wurden mit den Programmen „GASBOR“ und „DAMMIN“ erzeugt.