

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

7 Strukturlösung und Verfeinerung

7.1 Methoden zum Lösen des Phasenproblems

7.1.1 MAD (Multiple wavelength Anomalous Diffraction)

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

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

Der physikalische Effekt der anomalen Streuung bei MAD unterscheidet sich nicht vom isomorphen (isotypen) Ersatz mit anomalem Signal. Bei der letztgenannten Methode wird eine Änderung des Streuverhaltens durch das Einfügen eines ausreichend starken Schweratoms hervorgerufen. Die Differenz der Strukturfaktoren von mindestens zwei Datensätzen (nativ und derivatisiert) erlaubt die Positionen der Schweratome über Differenzpatterson-Synthesen zu ermitteln. Bei MAD wird das anomale Signal der im Kristall vorliegenden anomal streuenden Atome ausgenützt. Die Wellenlängenabhängigkeit des Streubeitrags f' und f'' dieser Atome führt zu interpretierbaren Differenzen der Strukturfaktoren. Weil alle Datensätze am selben Kristall gemessen werden, sind Intensitätsunterschiede, die auf Nicht-Isomorphie (Nicht-Isotypie) beruhen, nicht möglich. Unterschiedliche Extinktion bei unterschiedlichem Realbau verschiedener Kristalle selben Typs tritt ebenso nicht auf, weil bei einem MAD-Experiment Datensätze bei drei unterschiedlichen Wellenlängen an einem Kristall gemessen werden.

Bei einem MAD-Experiment sind bei folgenden Wellenlängen Datensätze zu sammeln:

- 1) am Minimum von f' (*edge*) $\equiv \lambda_1$,
- 2) am Maximum von f'' (*white line*) $\equiv \lambda_2$, bei der die Intensitätsdifferenz der Bijvoet-Paare am größten ist und
- 3) entfernt von der Kante $\equiv \lambda_3$, bei die Beträge von f' und f'' kleiner sind (*remote*).

Die typische Dateninterpretation erfolgt folgendermaßen:

F_P ist der beobachtete Strukturfaktor, F_A der nicht-anomale Beitrag aller Schweratome und F_B aller restlichen Atome zu F_P . ΔF ist der Beitrag aller anomal streuenden Atome des Kristalls zur anomalen Streuung. (ΔF_1 , ΔF_2 bzw. ΔF_3 , für Daten, die bei λ_1 , λ_2 bzw. λ_3 gemessen wurden). Ebenso wird der imaginäre Beitrag als F''_1 , F''_2 , bzw. F''_3 bezeichnet.

Interpretation als isomorphes oder dispersives MAD-Experiment (Abb. 7.1.1.1.a):

Hierbei wird die große Differenz von ΔF_3 und ΔF_1 als Hauptanteil der Änderung der Strukturfaktoren durch die anomal streuenden Atome benutzt. Da λ_1 entsprechend des Minimums von f' gewählt wurde, ist dessen Streubeitrag zum Strukturfaktor ΔF_1 kleiner als der Beitrag zu ΔF_3 bei λ_3 . Um den kleinen Beitrag von F'' zu verringern, werden die Bijvoet-Paare der beiden Datensätze gemittelt. Der Strukturfaktor F_P ergibt sich aus einer Vektoraddition von $F_B + F_A + \Delta F_3$. Wird nun eine Differenzpatterson (F_P .bei $\lambda_3 - F_P$.bei λ_1) berechnet, eine sogenannte dispersive Patterson, so können mittels dieser die Positionen

der anomal streuenden Atome ermittelt werden. Dies würde der Ermittlung anfänglicher Phasen mittels SIR (*Single Isomorphous Replacement*) entsprechen.

Interpretation als anomale Differenzpatterson (Abb. 7.1.2.b):

Da λ_2 entsprechend dem Maximum von F''^2 gewählt wurde, besitzt dieser Datensatz hohe Intensitätsdifferenzen der Bijvoet-Paare. In einer anomalen Differenzpatterson, bei der die Strukturformfaktoren der Bijvoet-Paare als voneinander unabhängig betrachtet werden, sollten nun die Positionen der anomal streuenden Atome lokalisiert werden können.

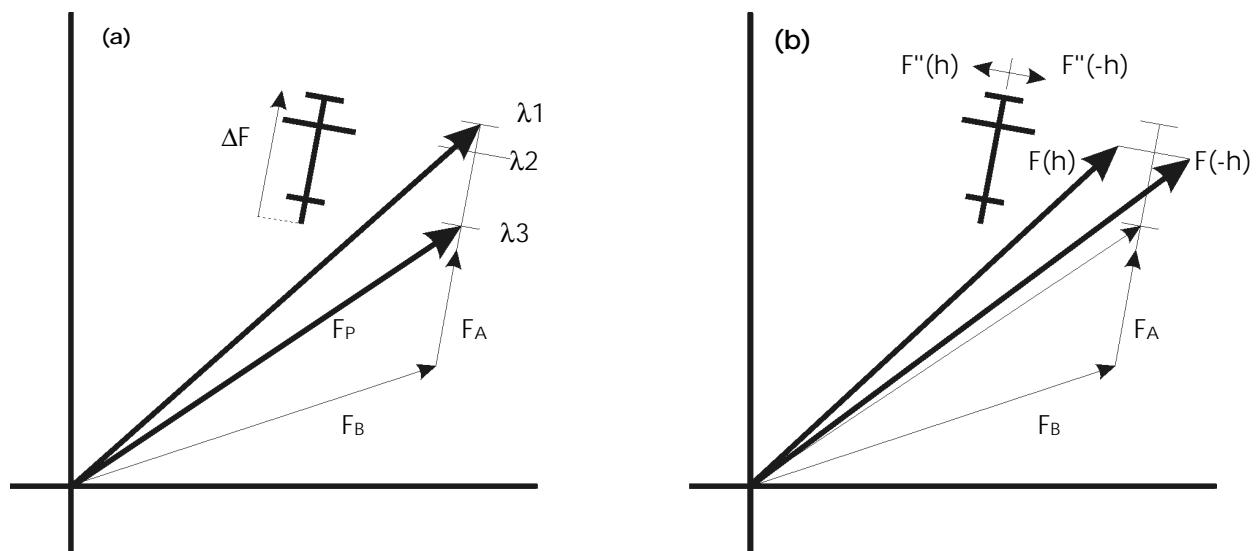


Abb.: 7.1.1.1 MAD als isomorpher Ersatz; Der tatsächliche Strukturformfaktor setzt sich folgendermaßen zusammen: $F_P = F_B + F_A + \Delta F$. Die anomalen Streubeträge ΔF und F'' wurden überzeichnet dargestellt. Um die Darstellung zu vereinfachen, wurde das Signum von ΔF als positiv angenommen. (a) Der Ansatz der Dateninterpretation erfolgte gemäß dem des isomorphen Ersatzes, die Differenz $\Delta F_1 - \Delta F_3$ ist mit dem Streubeitrag eines Schweratoms bei der Methode des isomorphen (isotypen) Ersatzes vergleichbar. (b) Dateninterpretation als anomale Differenz der Bijvoetpaare $|F(h)|$ und $|F(-h)|$. Der Strukturformfaktor $F(-h)$ des äquivalenten Friedelreflexes wurde in der Darstellung des Arganddiagramm an der Ordinate gespiegelt. (nach Principles of Protein X-Ray Crystallography, S. 215)

Werden nun die Informationen beider Dateninterpretationsmöglichkeiten miteinander kombiniert, so erhält man eine gute anfängliche Phaseninformation, die anschließend verfeinert zu interpretierbaren Elektronendichten des Proteinkristalls führt.

7.1.2 Molekularer Ersatz mit AMoRe

Die Methode des Molekularen Ersatzes wurde zum ersten Mal von Rossmann und Blow (1962) angewendet. Die Lokalisierung eines Moleküls in der Zieleinheit zelle bedarf einer genauen Orientierung und Positionierung. Dies bedeutet, dass eine Rotationsmatrix und ein Translationsvektor benötigt werden, um die exakte Positionierung zu ermöglichen. Diese

Lokalisierung geschieht im Pattersonraum. Da im Pattersonraum Vektoren zwischen zwei Atomen des reellen Raums als Vektor vom Ursprung des Pattersonraums ausgehend abgebildet werden, können diese im Falle von Molekülkristallen in zwei Gruppen unterteilt werden: Intramolekulare Vektoren stellen Vektoren von Atompaares eines Moleküls dar. Diese sind verhältnismäßig kurz und nahe des Ursprungs zu finden. Intermolekulare Vektoren, die Vektoren zwischen Atomen unterschiedlicher Moleküle repräsentieren, sind länger und deshalb eher weit entfernt vom Ursprung des Pattersonraums zu finden. Würden zum Beispiel keine intermolekularen Vektoren vorliegen, so wäre der ursprungsnahe Bereich des Pattersonraums für verschiedene Kristallformen des gleichen Moleküls nahezu identisch.

Maxima der intramolekularen Vektoren liegen im Raum um den Ursprung der Pattersonfunktion, dessen Radius den Dimensionen des Moleküls (oder Untereinheit) entspricht. Liegt eine Anzahl von gleichen Molekülen (oder Untereinheiten) innerhalb einer asymmetrischen Einheit vor, so ist die Verteilung ihrer intramolekularen Vektoren exakt die gleiche für alle Moleküle. Ausgenommen davon sind Rotationen, deren Abbildungsoperationen nichtkristallographischen Rotationssymmetrien im reellen Raum entsprechen. Maximale Übereinstimmung liegt vor, wenn eine Pattersonfunktion mit einer korrekt rotierten Pattersonfunktion überlagert wird. Dies bedeutet gleichzeitig, dass im Falle zweier unterschiedlicher Kristallgitter der Pattersonraum eines Moleküls bis zur maximalen Übereinstimmung mit dem beobachteten Pattersonraum rotiert werden muss, um eine Rotationslösung zu finden.

Anschließend erfolgt eine Translation des Moleküls aus dem Ursprung und bedeutet gleichzeitig die Ursprungsfixierung. Dabei wird zum Beispiel das Molekül schrittweise in der asymmetrischen Einheit bewegt. Für jede mögliche Ursprungswahl wird nach einer Fouriertransformation die Übereinstimmung mit den gemessenen Strukturfaktoren überprüft und durch Korrelationskoeffizient und R-Wert die Güte der Lösung charakterisiert. Schneller ist jedoch die Berechnung der Translationsfunktion aus der Korrelation zwischen einem Satz an Kreuzvektoren der Pattersonfunktion für die Modellstruktur und einem Satz der beobachteten Pattersonfunktion. Unter Kreuzvektoren sind Vektoren symmetrieverwandter Atome gemeint.

Das Programm AMoRe wurde von Navaza (1994) entwickelt. Es enthält drei zentrale Programme: ROTING zur Orientierung, TRAINING für die Translation und FITING zur Verfeinerung der Ergebnisse (Navaza und Vernoslova, 1995; Navaza und Soludjian, 1997). ROTING ist eine schnelle Rotationsfunktion, die als Überlagerung von beobachteter und berechneter Pattersonfunktion definiert ist. Die aus der Rotationsfunktion erhaltenen Maxima

werden getestet und entsprechend der Korrelation der errechneten und beobachteten Strukturfaktoren ausgewählt. Die Ausgabedatei von ROTING ist gleichzeitig Eingabedatei für TRAIING. Dabei wird nicht einfach eine einzelne Translationsfunktion errechnet, sondern der Benutzer kann zwischen vier verschiedenen schnellen Translationsfunktionen wählen. Die höchsten Maxima dieser Funktionen werden mit Hilfe der Korrelation von berechneten und beobachteten Strukturfaktoren getestet. So werden die besten Lösungen ausgewählt und an diesen eine Starre-Körper-Verfeinerung mit dem Programm FITING (Castellano et al., 1992) durchgeführt. Der Unterschied dieses Programms zu anderen Starre-Körper-Verfeinerungsprogrammen ist, dass FITING das Suchmodell als Elektronendichte und nicht als atomares Modell vorgibt.

7.2 Modellbau und Verfeinerung

7.2.1 Berechnung der Elektronendichte und Dichtemodifikation

Die aus den Positionen der Selenatome erhaltenen Phaseninformationen wurden mit Hilfe des Programms DM (CCP4, 1994) verbessert. Dabei wurde in einem iterativen Prozess eine Dichtemodifikation (*density-modification*) durchgeführt. Zusätzlich wurde die nicht-kristallographische Symmetrie der asymmetrischen Einheit für eine Dichtemittlung verwendet. Gleichzeitig war eine Phasenerweiterung von 4.0 Å zu 3.1 Å möglich. Mit dem Programm FFT (CCP4, 1994) wurde mit Hilfe der verfeinerten, berechneten Strukturfaktoren und Phasen eine 2Fo-Fc Elektronendichte berechnet.

7.2.2 Modellbau in Mod. I

Zum Modellbau wurde das Programm O (Jones et al., 1991) verwendet, welches gleichzeitig Elektronendichte, und Modellkoordinaten darstellen kann. Die Interpretation der dichtemodifizierten Elektronendichte aus MAD-Daten erfolgte in zwei Schritten:

1. Erzeugung eines Grundgerüsts innerhalb der Elektronendichte. Mit dem Programm MAPMAN (Kleywegt und Jones, 1996) wurde ein sogenanntes "bones"-Modell erstellt. Im ersten Schritt sucht die Software dabei nach Dichtemaxima mit vorgegebener Höhe und platziert im Zentrum eines jeden ein Skelettatom. Sind die Abstände der einzelnen Skelettkoordinaten kürzer als 1.6 Å, so werden diese automatisch verbunden. Dieses Grundgerüst wurde anschließend manuell solange verändert, bis einzelne ununterbrochene, unverzweigte Ketten durch die Elektronendichte vorlagen. Diese entsprachen dem Verlauf des Proteinrückgrats von ϵ und ζ .

1. Zuweisung zur Aminosäuren-Sequenz. Dies war durch die Position der Selenatome, welche direkt den Selenomethioninen der Aminosäuren-Sequenz zugewiesen werden konnten, vereinfacht. In gut interpretierbaren Bereichen der Elektronendichte wurde der Verlauf der Polypeptidketten von ϵ und ζ direkt der Primärstruktur zugewiesen. Teile die nicht eindeutig interpretierbar waren, wurden als Polyalaninkette gebaut. Ebenso wurde mit dem Programm PHDsec (Rost und Sander, 1993) eine Sekundärstrukturvorhersage angefertigt, die sich im späteren Verlauf als richtig und damit sehr hilfreich herausstellte.

7.2.3 Verfeinerung

Für die kristallographischen Verfeinerungen mit CNS, Version 0.4, (Brünger *et al.*, 1998) wurden die vom Autor angegebenen Protokolle verwendet. Zur Berechnung eines freien R-Wertes wurden 5 % der Daten als Testreflexe mit dem Protokoll *make_cv* markiert und in den anschließenden Verfeinerungsschritten von diesen ausgeschlossen.

Das nach der Interpretation der MAD-Daten erhaltene Modell wurde in einer Starre-Körper-Verfeinerung mit dem Protokoll *rigid* an den nativen Datensatz (Auflösung: 1.95 Å) angepasst. Anschließend erfolgte ein simuliertes Aufheizen und Abkühlen (Protokoll: *anneal*) der Polypeptidketten und führte damit zu einem verbesserten Modell. Die mit dem Protokoll *map* berechnete Elektronendichte war aufgrund der erweiterten Phasen und Auflösung deutlich besser interpretierbar. Abwechselnd wurden falsch interpretierte Teile des Proteinmodells korrigiert, neue Bereiche so weit als möglich gebaut und erneut eine Verfeinerung nach dem *anneal*-Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden mit dem Protokoll *B-individual* die thermischen Verschiebungsparameter isotrop für jedes einzelne Atom verfeinert. Um eine Überschätzung der berechneten Phasen zu vermeiden, wurde nach dem *composit-omit-map*-Protokoll eine Elektronendichte berechnet. Bei diesem Protokoll wurden Bereiche des Modells von der Berechnung einer 2Fo-Fc-Elektronendichte ausgeklammert. Dies wurde so oft wiederholt, bis alle Bereiche des Modells je einmal von der Berechnung einer Elektronendichte ausgeschlossen worden waren. Diese ausgeschlossenen Bereiche des reellen Raumes wurden anschließend zu einer Elektronendichte zusammengefügt, die viel weniger fehlerbehaftet war als eine übliche 2Fo-Fc-Dichte. Mit dieser Dichte wurde das Proteinmodell erneut manuell verbessert und erweitert. Dieser Zyklus wurde wiederholt, bis keine Restelektronendichte an den Termini der Polypeptidketten der vorhergesagten Aminosäure-Sequenz mehr zugewiesen werden konnte.

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

7.2.4 Modellbau in Mod. IV und der Punktmutanten

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

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

8 Ergebnisse der Strukturanalyse

8.1 Mod. I

8.1.1 Lösung des Phasenproblems

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