

2. Grundlagen

2.1. Proteinaufbau

Bei der strukturellen Beschreibung von Proteinen greift man auf ein hierarchisches Modell zurück. Die Sequenz, die Abfolge der Aminosäuren, wird als Primärstruktur bezeichnet. Die Polypeptidkette lagert sich lokal zu α -Helices, β -Faltblättern und Schleifen ("Loops" und "Turns") zusammen - allgemein als Sekundärstruktur bezeichnet. Aus der Anordnung dieser Sekundärstrukturen im dreidimensionalen Raum zueinander bildet sich die Tertiärstruktur. Besitzt ein Protein mehrere Ketten, wird deren räumliche Organisation als Quartärstruktur bezeichnet.

Als sinnvoll hat sich erwiesen, den Übergang von Sekundär- zur Tertiärstruktur als fließend zu betrachten und Zwischenstufen einzuführen. Supersekundärstrukturen wie Superhelices oder Motive wie "Hairpins" - Haarnadeln- oder das "Helix-Turn-Helix"- Motiv seien hier genannt. Große Proteine können in mehrere kompakte Bereiche - Domänen - falten. Sie sind wie Perlen auf einer Kette angeordnet und oft durch flexible Linker miteinander verbunden. Häufig sind den Domänen spezifische Funktionen zugeordnet. So können zum Beispiel multifunktionelle Proteine entstehen.

2.2. Proteinstabilität

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins wird durch verschiedene Kräfte stabilisiert. Zu nennen sind elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals Wechselwirkungen und der hydrophobe Effekt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich räumlicher Struktur, Bindungsstärke und Spezifität voneinander und werden zusätzlich vom umgebenden Milieu unterschiedlich beeinflusst.

Elektrostatische Wechselwirkungen treten zwischen elektrischen Ladungen auf. Diese Kräfte können attraktiv sein, wenn die Ladungen entgegengesetzt sind, oder repulsiv, wenn die Ladungen gleichnamig sind.

Die Kraft, die zwischen zwei Ladungen q_1 und q_2 wirkt, wird mit dem Coulombschen Gesetz beschrieben.

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad [\text{Glg. 1}]$$

2. Grundlagen

Diese Kräfte mit prinzipiell großer Reichweite nehmen mit dem Quadrat des Abstandes ab. Die Dielektrizitätskonstante ϵ_0 gibt den Einfluß des umgebenden Mediums wieder. Im Vakuum ist sie eins und in Wasser 80. Im hydrophoben Kern des Proteins beträgt sie 3 bis 5. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß solche Kräfte im Inneren von Proteinen groß und an der Proteinoberfläche klein sind. Tatsächlich finden sich aber häufig auf der Oberfläche von Proteinen geladene Reste. Ihre Kräfte werden jedoch auf der Oberfläche abgeschwächt und liefern somit nur einen geringen Beitrag in Hinblick auf die Proteinstabilität.

Man nennt diese Art der Bindung auch Ionenbindung, Salzbrücke oder auch Ionenpaarbindung.

Wasserstoffbrücken sind ebenfalls elektrostatischer Natur. Sie sind stark gerichtet und für die Ausbildung von Sekundärstrukturen verantwortlich. Wasserstoffbrücken werden zwischen einem Protonendonator und einem partiell negativ geladenen Akzeptor, der den Wasserstoff anzieht, ausgebildet (D-H ... A). Donatoren sind Sauerstoff oder Stickstoff mit einem kovalent gebundenen Wasserstoff, Akzeptoren sind ebenfalls Sauerstoff und Stickstoff.

Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind sehr viel schwächer als elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken, sind aber aufgrund ihrer Vielzahl in Proteinen von Bedeutung. Ihr Auftreten beruht auf der wechselseitigen Polarisierbarkeit dicht benachbarter Atome oder Atomgruppen. Die Stärke der van-der-Waals-Wechselwirkungen ist proportional zu r^{-6} .

Der **Hydrophobe Effekt** gehört zu den weiteren stark stabilisierenden Kräften bei Proteinen. Im ungefalteten Zustand sind die unpolaren Seitenketten von einem hochgeordneten Wassernetz umgeben. Bei der Faltung des Proteins, gehen diese geordneten Strukturen verloren und die Unordnung des Wassers nimmt zu. Die hydrophoben Reste werden ins Proteininnere gekehrt, weil sie keine Wasserstoffbrücken ausbilden können. Auf der Oberfläche bleiben im wesentlichen die geladenen und polaren Reste. Dieser hydrophobe Kollaps verläuft spontan.

Die Faltung eines Proteins ist thermodynamisch nur möglich, wenn die Entropieabnahme, hervorgerufen durch die räumliche Organisation der Polypeptidkette, durch eine Entropieerhöhung der Umgebung ausgeglichen wird. Entropieänderungen sind experimentell schwer meßbar. Diese Schwierigkeit kann mit der Einführung der freien Energie nach Gibbs überwunden werden. Sie ist definiert als

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{[Glg. 2]}$$

mit ΔG als der Änderung der freien Energie, ΔH als der Änderung der Enthalpie und ΔS als Entropieänderung. Die Enthalpie stellt die geleistete Arbeit des Systems dar. Dabei setzt sich die Änderung der Enthalpie aus der Änderung der inneren Energie U und der geleisteten

2. Grundlagen

Volumenarbeit ($p \cdot V$)

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(pV) \quad [\text{Glg. 3}]$$

zusammen. Da die Faltung unter konstantem Druck und nahezu konstantem Volumen stattfindet, kann für die freie Energie

$$\Delta G = \Delta U - T\Delta S \quad [\text{Glg. 4}]$$

geschrieben werden.

2.3. Proteinreinigung

Für die Kristallisation von Proteinen benötigt man hochreine Proteinlösungen. Kristallisationsexperimente reagieren sehr sensitiv auf Schwankungen bei der Proteinreinheit. Bei der Reinigung von Proteinen versucht man durch gezieltes Ausnutzen von Proteineigenschaften, wie Oberflächenladung, Affinität zu bestimmten Materialien, Hydrophobizität oder Größe des Proteins das gewünschte Protein aus dem Zellysat mittels Chromatographieverfahren herauszufiltern.

Der Fortschritt einer Proteinreinigung läßt sich mit einer SDS-PAGE (Sodiumdodecyl Polyacrylamidgelelektrophorese) überprüfen.

2.4. Protein-DNA-Essay

Eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung der Komplexbildung von Protein-DNA-Komplexen ist der "electrophoretic mobility shift assay" (EMSA), im folgenden Gelretardierung oder Gelshift genannt. Hier wird die Eigenschaft ausgenutzt, daß DNA und Protein sowie der entsprechende Komplex aufgrund unterschiedlicher Ladung und Größe verschiedene Laufeigenschaften durch eine Gelmatrix in einem elektrischen Feld zeigen. Bei Einsatz von radioaktiv markierter DNA läßt sich prinzipiell die Bindungskonstante bestimmen.

Desweiteren kann eine Komplexbildung durch Gelfiltration getestet werden. Dabei wird die veränderte Größe des Komplexes im Vergleich zu den Einzelkomponenten ausgenutzt. Durch Detektion des Säulenlaufes mit den typischen Extinktionswellenlängen 280 nm für Protein und 254 nm für DNA ist eine zusätzliche Absicherung der Komplexbestimmung möglich.

2.5. Limitierte Proteolyse

Bei der Durchsicht von Kristallstrukturen zeigt sich, daß in der Regel kleine kompakte Bereiche - Domänen - einfacher zu kristallisieren sind als oligomere oder Multidomänproteine. Häufig

2. Grundlagen

findet man sehr bewegliche N- und C-Termini und flexible Linker zwischen den Domänen, die eine Kristallisation unmöglich machen oder stark einschränken.

Die limitierte Proteolyse ist eine leistungsfähige und klassische Methode, die Domänenstruktur eines Proteins zu bestimmen [Porter, 1973; Jovin et al., 1977; Roy et al., 1996; Nakagawa et al., 1997]. Sie beruht auf der Eigenschaft, daß Proteasen vorzugsweise ihre Schnittstellen in Solvens exponierten und unstrukturierten Bereichen suchen und nicht in den gut strukturierten Domänen, wo Schnittstellen schwerer zugänglich sind. Der Verdau mit spezifischen Proteasen führt zu einem Satz an Fragmenten, die stabile Domänen repräsentieren.

Diese Technik konnte mit großem Erfolg in der Kristallographie angewendet werden, um funktionelle Domänen zu identifizieren, zu kristallisieren und der Röntgenkristallstrukturanalyse zugänglich zu machen.

2.6. Kristallisation

Die Kristallisation ist der "bottle neck" bei der Strukturanalyse von biologischen Makromolekülen. Viele Punkte bei der Proteinkristallisation sind nicht verstanden, und es ist bisher nicht möglich für ein neues Protein Kristallisationsbedingungen vorherzusagen.

Im kristallinen Zustand sind die atomaren Bausteine (Atome, Ionen, Moleküle) in dreidimensional periodischer Weise angeordnet. Der kristalline Zustand ist mit einer Fernordnung der Atome verbunden.

Bei der Kristallisation von Proteinen vollzieht sich immer ein Übergang aus einer gelösten Phase in eine kristalline Phase. Thermodynamisch ist der Phasenübergang prinzipiell genauso zu behandeln wie bei anorganischen Substanzen wie z.B. Natriumchlorid. Die Kristallisation teilt sich in zwei Phasen:

- Keimbildung
- Wachstum.

Keimbildung

Eine chemische Reaktion kann ohne Energiezufuhr ablaufen, wenn dadurch die freie Energie G des Systems abnimmt. Die Änderung der freien Energie ΔG bei der Keimbildung setzt sich aus zwei Termen zusammen. Ein Term widerspiegelt die Grenzflächenenergie des Keims, der kugelförmig angenommen wird, zur umgebenden Lösung. Er ist proportional zur Oberfläche (r^2) des Keims und stets positiv. Der zweite Term ist proportional zur Stoffmenge (Volumen, r^3), der in die kristalline Phase übergeht und ist immer negativ.

Verfolgt man ΔG als Funktion des Keimradius r , so überwiegt bei kleinem r der Oberflächenterm, d.h. bei der Bildung eines kleinen Keims wird die freie Energie des Systems erhöht, und es muß Arbeit - die Keimbildungsarbeit - geleistet werden. Die Funktion durchläuft

2. Grundlagen

ein Maximum bei r^* , dem kritischen Keimradius. Erst wenn ein Keim unter Aufwendung der Keimbildungsarbeit ΔG^* diese kritische Größe erreicht hat, wird durch sein weiteres Wachstum die freie Energie des Systems wieder verringert, der Keim ist stabil und wird weiter wachsen. Durch Überschreiten einer Gleichgewichtsgrenze bildet sich nicht sofort und spontan eine neue Phase, sondern die Ausgangsphase bleibt zunächst in einem metastabilen Zustand der Übersättigung erhalten. Zur Keimbildung muß das thermodynamische Gleichgewicht überschritten werden. Eine Potentialdifferenz muß als Triebkraft aufgebaut werden, um Energie für die Formierung der Phasengrenzfläche zu gewinnen. Die Keimbildung der neuen Phase setzt nur in der instabilen Phase und nicht am Phasengleichgewicht ein.

Wachstum

Das Wachstum eines Kristalls ist sowohl abhängig vom Zustand der Kristalloberfläche als auch vom Zustand der molekularen Bausteine. So besteht zunächst ein grundlegender Unterschied zwischen dem Wachstum an atomar rauhen und atomar glatten Phasengrenzen.

An der atomar rauhen Phasengrenze gibt es eine statistisch gleichmäßige Verteilung von Anlagerungsplätzen. Bei einer Überschreitung des Gleichgewichts kommt es deshalb zu einer gleichmäßigen, kontinuierlichen Anlagerung von Bausteinen. Bei der atomar glatten Phasengrenze gibt es nur wenige Plätze, die für die Anlagerung energetisch günstig sind. Die Anlagerung erfolgt an vorhandenen Stufen der Oberfläche. Auf einer glatten Kristallfläche ohne Störungen können Wachstumsstufen nur durch die Bildung hinreichend großer Cluster, sogenannter Flächenkeime entstehen, wofür analog zur dreidimensionalen Keimbildung eine Keimbildungsarbeit erforderlich ist. Dieser Vorgang ist ausgeprägt anisotrop und führt zur Ausbildung von ebenen Kristallflächen. Wachstumsstufen werden im allgemeinen durch die Realstruktur der Kristallfläche vorgegeben, beispielweise durch eine Schraubenversetzung. Eine Schraubenversetzung stellt eine kontinuierliche Quelle von Wachstumsstufen dar. Werden an diesen Stufe Bausteine angelagert, dann wandert die Stufe nicht einfach zum Kristallrand, sondern windet sich zu einer Spirale auf. Damit bleiben auch während des Wachstums ständig Stufen erhalten, und es bedarf keiner (energetisch gehemmten) Flächenkeimbildung.

Die Kristallisation von Proteinen ist dadurch gekennzeichnet, daß der Wachstumsvorgang in den meisten Fällen an atomar glatten Phasengrenzen stattfindet. Infolgedessen entstehen idiomorphe Kristallkörper mit (mehr oder weniger) ebenen Flächen.

Wenn bei der Kristallisation von einer spontanen Keimbildung ausgegangen wird, gibt es eine Reihe von Problemen. Zunächst muß eine relativ große, überkritische Übersättigung vorhanden sein. Die Keimbildung setzt dann meist sehr vehement und mit einer unerwünscht großen Anzahl von Keimen ein, die sich schwer steuern läßt. Als weitere Folge der großen Überschreitung des Gleichgewichtes kommt es zu einem sehr raschen Kristallwachstum, das oft mit Störungen in der Realstruktur verbunden ist.

Kristallisation von Proteinen

Die Kristallisation von Proteinen stellt ein multivariablen Problem dar. Die Anzahl an Faktoren (wie z. B. Temperatur, Konzentration von Fällungsmittel und Protein, Ionenstärke, pH, Art des Fällungsmittels, Additive usw.), die die Kristallisation von biologischen Makromolekülen beeinflussen ist sehr groß und würde bei vollständigem systematischen Abarbeiten zu einer unendlichen Anzahl an Experimenten führen. Es gibt zwei Wege dieses Problem zu überwinden.

1. Ausgehend von biochemischen Erkenntnissen und Erfahrungen aus dem Umgang mit dem Protein können Startbedingungen definiert und anschließend variiert werden.
2. Verschiedene Bedingungen werden zufällig gewählt und dann anhand der Beobachtungen weitere Variationen vorgenommen. Dabei hat sich ein Ansatz etabliert, bei dem gleichzeitig viele Bedingungen wie Art und Konzentration des Fällungsmittels, pH-Wert, Puffer und verschiedene Salze sowie andere Additiva über einen groben Raster variiert werden. Hierzu gibt es zwei kommerziell erhältliche Screens mit insgesamt 98 Bedingungen [Jancarik & Kim, 1991; Cudney et al., 1994]. Zusätzlich wurden spezielle Screens z.B. für Nukleinsäuren und Nukleinsäure-Proteinkomplexe [Scott et al., 1995] entwickelt. Im wesentlichen wird dazu die Methode der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen verwendet.

Dampfdiffusion

Bei diesem Verfahren wird versucht, die Keimbildungszone durch Equilibrieren eines Tropfens gegen ein größeres Volumen (Reservoir) zu erreichen. Der Tropfen ist ein Gemisch von Reservoir- und konzentrierter Proteinlösung in einem Verhältnis von in der Regel 1:1. Das Reservoir enthält das Fällungsmittel. Die Triebkraft für die Equilibrierung stammt aus dem Konzentrationsgradienten zwischen Reservoir und Tropfen und wird über die Dampfphase ausgeglichen.

Verwendet wurden Gewebekulturschalen, die 24 getrennte zylindrische Kammern mit einem Fassungsvermögen von ca. 2 ml enthalten. 0,5 ml Reservoirlösung wurden in die Kammern pipettiert und der obere Rand mit Silikonfett eingefettet. Auf ein vorher silikonisiertes (Erhöhung der Oberflächenspannung) Deckglas wurden Proteinlösung und Reservoirlösung in gleichen Anteilen (in der Regel je 1 μ l) pipettiert. Das Deckglas wird auf die Kammer gelegt und leicht angedrückt bis ein durchgehender luftdichter Fettfilm entstanden ist.

Im Unterschied zum oben beschriebenen Verfahren des hängenden Tropfens wird beim sitzenden Tropfen auf eine in die Vertiefungen passende Kunststoffbrücke Reservoir- und Proteinlösung pipettiert und analog luftdicht verschlossen. Bei dieser Anordnung sind größere Volumina möglich.

2. Grundlagen

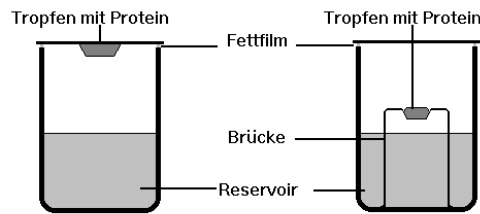


Abb. 2) Skizze der Versuchsanordnungen des hängenden (links) und sitzenden Tropfens (rechts)

Die beiden Varianten der Dampfdiffusion zeichnen sich aus durch:

- geringen Materialverbrauch
- Möglichkeit der guten visuellen Beobachtung des Kristallisationsverlaufs
- geringen experimentellen Aufwand
- für alle Ansätze vergleichbare äußere Bedingungen
- gute Vergleichbarkeit parallel angesetzter variiertter Bedingungen.

Betrachtet man die Methode des hängenden Tropfens unter den Aspekten, die vorher für die Keimbildung und das Wachstum diskutiert wurden, ergibt sich im Idealfall folgendes Bild:

Durch die Equilibrierung des Tropfens gegen das Reservoir steigt die Proteinkonzentration bis über die Phasengrenze hinaus in einen metastabilen Bereich. In Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen können Keime entstehen. Diese wachsen dann bis zum Erreichen der Gleichgewichtskonzentration zwischen gelöstem und kristallinem Protein weiter.

2.7. Röntgenbeugungsexperiment

Für das Beugungsexperiment gibt es einige zu berücksichtigenden Einschränkungen. So sind Proteinkristalle in Raumluft nicht stabil und müssen vor dem Austrocknen geschützt werden. Zweitens absorbieren die Kristalle einen Teil der Röntgenstrahlung. Dies führt zu Bindungsbrüchen und setzt Radikale frei, die im Kristall frei diffundieren und zu weiteren Schäden führen. Besonders bei Synchrotronstrahlung tritt dieses Problem auf und der Kristall verliert nach wenigen Aufnahmen seine Beugungseigenschaften.

2. Grundlagen

Kristallmontage

Bei der klassischen Methode wird der Kristall mit etwas Reservoirlösung in eine Kapillare aufgenommen. Anschließend wird der Kristall "trocken" gelegt, d.h. die den Kristall umgebende Lösung wird mit Kapillaren und Filterpapier entfernt. Danach wird die Kapillare luftdicht mit Wachs verschlossen, so daß der Kristall nicht austrocknen kann.

Um die Strahlschäden zu verringern, werden Kryotechniken angewendet. Eine kontinuierliche Wärmeabführung der absorbierten Strahlung ist durch eine Kühlung mit einem Stickstoffstrom auf etwa 90 bis 110 K möglich. Hierbei wird auch die Diffusion von freien Radikalen weitestgehend unterbunden. Zweitens ist es möglich, diskrete Konformationen auszufrieren [Walsh et al., 1998]. Dadurch können Atomgruppen (meistens Seitenketten) mit hoher thermischer Beweglichkeit mehrere definierte Positionen annehmen, die sonst nicht beobachtbar wären.

Schwierig ist das Herausfinden von geeigneten Bedingungen für die Kryotechniken, denn die Kristalle müssen in einer Lösung schockgefroren werden - quasi eingekastet werden. Oft sind die Kristalle in Bedingungen gewachsen, die ein solches Schockgefrieren nicht direkt erlauben. Sie müssen daher in einen Stabilisierungspuffer umgesetzt werden. Als praktikabel hat es sich erwiesen, eine Lösung zu verwenden, die eine höhere Konzentration an Fällungsmittel und zusätzlich ein Kryoprotektant ($\geq 25\%$ PEG 400, $\geq 20\%$ Glycerin, $\geq 20\%$ Ethylenglykol) enthält, der das Auskristallisieren von Wasser oder Salzen verhindert. Zum Schockgefrieren wird der Kristall mit einer Schlaufe aus Nylon "gefischt" und unmittelbar in flüssigen Stickstoff getaucht oder in den Stickstoffstrom gehalten.

Datensammlung

Grundlage aller Röntgenbeugungsexperimente an einem Kristall ist das Gesetz von Bragg

$$2d_{hkl} \sin \Theta = n\lambda. \quad \text{[Glg. 5]}$$

Die Datensammlung erfolgte ausschließlich nach dem Prinzip der Rotationsmethode bei Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung. Dabei wird der Kristall um eine Achse senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl um ein Winkelinkrement φ gedreht. Die Reflexe der durch die Drehbewegung in Reflexion gebrachten Netzebenen, werden von einem Flächendetektor aufgenommen, der Intensität und Lage des Reflexes registriert. Um einen vollständigen redundanten Datensatz zu erhalten, muß der Kristall um einen seiner Symmetrie entsprechenden Betrag gedreht werden. Die Anzahl N der unabhängigen Reflexe kann dabei nach folgender Formel abgeschätzt werden

$$N = \frac{4\pi}{3} \frac{V}{d^3 m} \quad \text{[Glg. 6]}$$

2. Grundlagen

Mit V - Volumen der Einheitszelle, d - der maximalen Auflösung und m - der Multiplizität der Lauegruppe.

Die Intensität des Diffraktionsmusters eines Kristalls ist proportional zum Kristallvolumen und umgekehrt proportional zum Volumen der kristallographischen Einheitszelle.

Datenevaluierung

Bei der Auswertung der Beugungsdaten wird nach folgendem Schema verfahren:

- Autoindizierung zur Bestimmung der Lage des Kristalls bezüglich der Laborkoordinaten
- Festlegung des Bravaisgitters
- Bestimmung von experimentell bedingten Detektorparametern, Kristall- und Strahleigenschaften

Des Weiteren werden Reflexprofile erstellt, die die Bestimmung des Rausch- Untergrundverhältnisses ermöglichen. Diese Startwerte werden dann auf den gesamten Datensatz angewendet und schrittweise angepaßt. So entsteht ein Datensatz, der für jeden möglichen Reflex die integrierte Reflexintensität, der Standardabweichung der Intensität, die Millerschen Indizes und die Angabe ob vollständig oder unvollständig gemessen enthält.

Im nächsten Schritt werden diese Daten zusammengefaßt. Dabei werden unvollständig gemessene Reflexe zusammenaddiert, mehrfach gemessene Reflexe gemittelt und daraus ein Datensatz, der nur noch unabhängige Reflexe enthält, gebildet. Als Ergebnis wird ein Qualitätsindex R_{sym} berechnet.

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl}(i) - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl}(i)} \quad [\text{Glg. 7}]$$

Er kann als wichtiger Indikator für die Qualität des Datensatzes angesehen werden. Für gute Datensätze wird ein Wert von deutlich unter 0,10 erwartet.

Packungsdichte

Aus der Größe der Einheitszelle und der Masse des Proteins läßt sich die Anzahl an Molekülen in der asymmetrischen Einheit abschätzen nach folgender Formel

$$V_M = \frac{V}{nm} \quad [\text{Glg. 8}]$$

Mit V dem Volumen der Einheitszelle, m der Multiplizität der Raumgruppe, n Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit und m der Masse des Proteins. Der als

2. Grundlagen

Matthews-Koeffizient V_M [Matthews 1968] bekannte Wert hat normalerweise eine Größe von 1,6 bis 3,6 Å³/Da und damit läßt sich dann n - die Anzahl der Moleküle - abschätzen.

2.8. Lösung des kristallographischen Phasenproblems

Die vom Kristall ausgehenden gebeugten Röntgenstrahlen sind durch Amplitude und Phase bestimmt. Die Strukturamplitude kann dabei über die Intensität der beobachteten Schwärzung bestimmt werden. Sie ist

$$I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2 \quad \text{[Glg. 9]}$$

und meßbar. Die Information über den Phasenwinkel α im Strukturfaktor

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} \quad \text{[Glg. 10]}$$

geht verloren. Somit ist es nicht möglich eine Elektronendichte

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad \text{[Glg. 11]}$$

zu berechnen. Die Bestimmung des experimentell nicht direkt ermittelbaren Phasenwinkels α_{hkl} ist durch folgende methodische Ansätze möglich.

Methode	Voraussetzung
Multipler isomorpher Ersatz (MIR)	≥ 2 isomorphe Schweratomderivate
Anomale Dispersion (MAD)	≥ 1 anomaler Streuer, Datensammlung bei drei verschiedenen Wellenlängen
Multipler isomorpher Ersatz mit anomaler Dispersion (M(S)IRAS)	Kombination aus obigen Methoden, meist nur Daten einer Wellenlänge
Molekularer Ersatz (MR)	Strukturmodell mit RMSD ≤ 1 Å für Hauptkettenatome
Direkte Methoden	Beugungsdaten mit Auflösung ≤ 1 Å

2. Grundlagen

Die verwendeten Methoden zur Lösung der Strukturen von KorB-C und *Bc*-Csp-Mutanten MIRAS und MR seien hier im kurzen vorgestellt.

Multipler isomorpher Ersatz mit anomaler Dispersion

Die Voraussetzung für diese Methode ist das Vorhandensein geeigneter isomorpher Derivate. Dazu müssen leichte Atome gegen schwere ersetzt oder schwere Atome an definierten Stellen in die Struktur eingefügt werden, so daß es sich genaugenommen um eine isomorphe Addition handelt. Derivate werden üblicherweise durch Tränken (soaken) mit Schweratomlösungen hergestellt. Es ist aber auch möglich gezielt Atome in den Molekülen zu substituieren, wie die Substitution von Brom oder Jod für Wasserstoff in DNA oder Selen für Schwefel in der Aminosäure Methionin. Die vom nativen und derivatisierten Kristall aufgenommen Datensätze werden aufeinander skaliert und ein R_{iso} -Faktor, der eine Aussage über die Isomorphie des Derivats macht, berechnet

$$R_{iso} = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{Deriv}| - |F_{nativ}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{nativ}|}. \quad \text{[Glg. 12]}$$

Dieser sollte zwischen 0.15 und 0.30 liegen. Kleine Werte bedeuten, daß kein Schweratom gebunden hat und große, daß der Einbau des Schweratoms zu größeren Änderungen in der Struktur geführt hat, die eine Strukturlösung als unwahrscheinlich erscheinen lassen. Als weiteres Beurteilungsmerkmal für die Isomorphie gilt, daß die Änderung der Zellkonstanten nicht größer als 1 % sein sollte. Desweiteren sollte der Verlauf des R-Faktors im Bereich von 10 bis 3 Å nur langsam ansteigend sein.

Unter der Voraussetzung der Isomorphie gilt für den Strukturfaktor

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_P + \vec{F}_H \quad \text{[Glg. 13]}$$

und die beiden Strukturen unterscheiden sich nur durch den eingeführten Beitrag des Schweratoms. Dieser Zusammenhang läßt sich auch in der folgenden vektoriellen Darstellung verdeutlichen.

2. Grundlagen

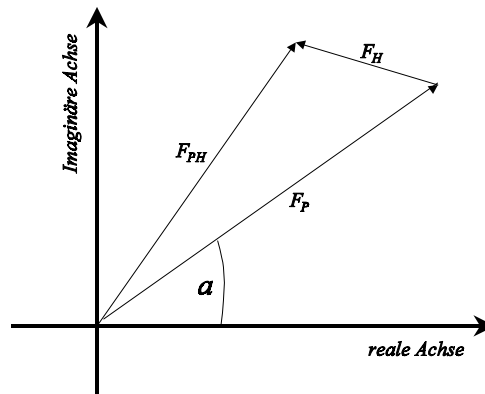


Abb. 3) Darstellung der Beziehung zwischen F_P , F_{PH} und F_H im Argand-Diagramm unter der Voraussetzung perfekter Isomorphie

Die Lage der Schweratome läßt sich mit Hilfe der Differenz-Pattersonfunktion P_{uvw} (Glg. 14) bestimmen, die aus dem gemessenen derivatisierten und nativen Datensatz berechnet wird.

$$P_{uvw} = \frac{2}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_{PH} - F_P|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad [\text{Glg. 14}]$$

Mit V dem Volumen der Elementarzelle.

Mit den bekannten Schweratomlagen läßt sich F_H bestimmen. Folgende Konstruktion nach Harker erlaubt dann die Bestimmung mit den bekannten Beträgen von F_P und F_{PH} .

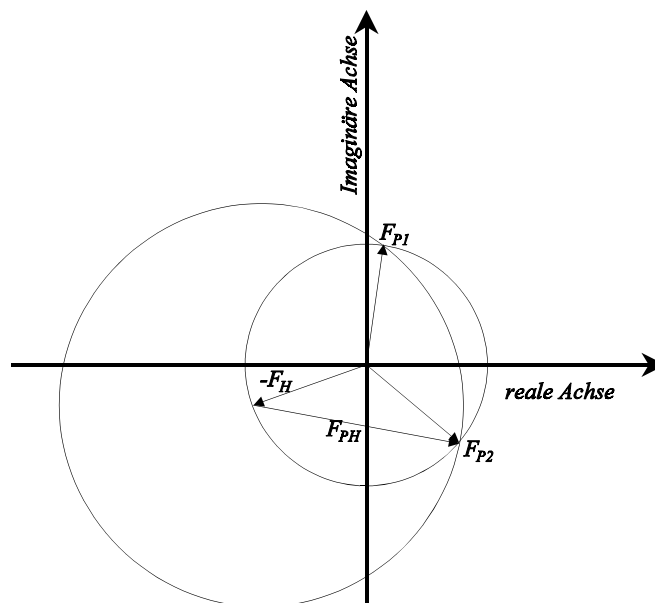


Abb. 4) Harkerkonstruktion für ein Schweratomderivat

2. Grundlagen

Die Harkerkonstruktion, hier für ein Schweratomderivat, liefert zwei Lösungen. Um diese Phasenambiguität zu überwinden, benötigt man zusätzliche experimentelle Informationen, die man durch weitere Schweratomderivate erhält. Hierfür lassen sich gleiche Konstruktionen erstellen. Im Idealfall stimmt dann je eine Lösung aus den Derivaten überein. Oder man verwendet anomale Streudaten. Dabei wird ein Effekt ausgenutzt, der an der Absorptionskante eines Atoms am stärksten auftritt und bewirkt, daß das Friedelsche Gesetz, nachdem $F_{hkl} = F_{-h-l-k}$ ist, verletzt wird. Hierbei wird der atomare Streufaktor zu einer komplexen Größe, die sich so darstellen läßt

$$fj = fj' + i\Delta fj'' \quad [\text{Glg. 15}]$$

fj atomarer Streufaktor

fj' realer Anteil von fj

fj'' imaginärer Anteil von fj .

Somit läßt sich Gleichung 13 in folgender Form ausdrücken

$$\begin{aligned} F_{PH}(+) &= F_H(+) + iF_H''(+) + F_P(+) \\ F_{PH}(-) &= F_H(-) + iF_H''(-) + F_P(-) \end{aligned} \quad [\text{Glg. 16}]$$

wobei (+) für hkl und (-) für $-h-k-l$ steht. Die vektorielle Umsetzung der Gleichung 16 führt zu folgender Darstellung (Abb 5).

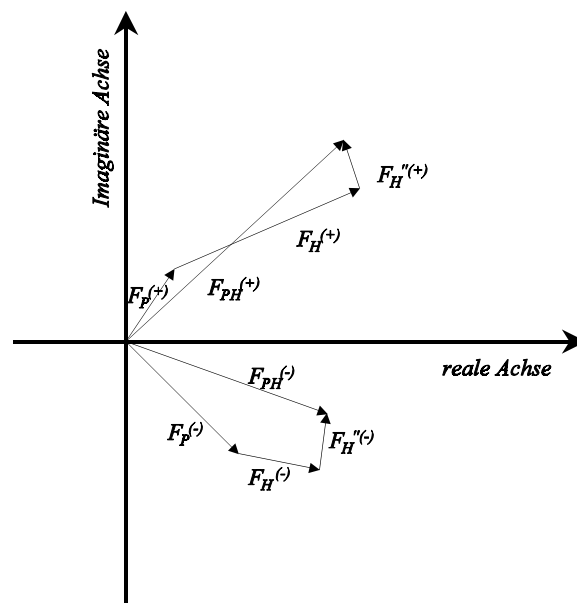


Abb. 5) Argand-Diagramm für die anomale Beugung

2. Grundlagen

Setzt man das anomale Signal wie ein zweites Derivat ein, läßt sich die Phasenambiguität überwinden. Diese Lösung wird durch den Schnittpunkt der drei Kreise repräsentiert. Die Harkerkonstruktion sieht dann wie folgt aus:

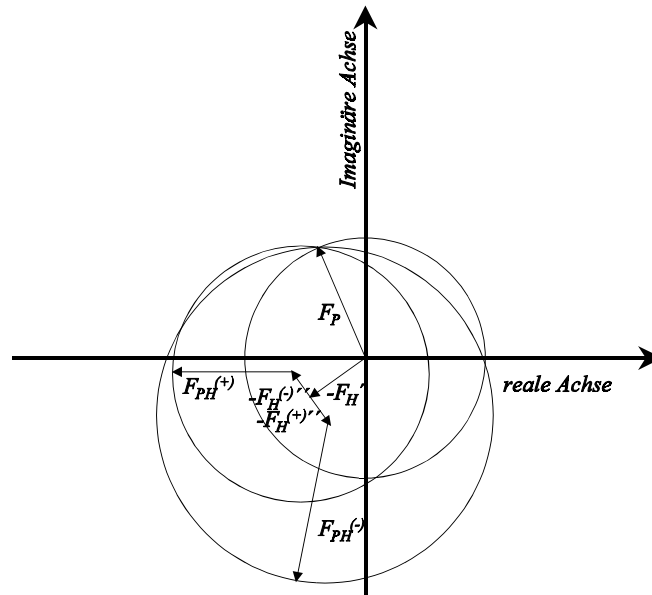


Abb. 6) Harkerkonstruktion für die SIRAS-Methode

Die Differenz in der vorhin erwähnten Differenz Pattersonfunktion $|F_{PH}-F_P|$ läßt sich auch durch die anomale Differenz ersetzen $|F_{PH} (+)-F_{PH}(-)|$. Ein Vorteil dieser anomalen Differenz-Pattersonfunktion ist, daß keine Isomorphieunterschiede auftreten. Nachteilig ist, daß die anomale Differenz sehr klein ist.

Die Beurteilung der Qualität der Phasen und ihrer Verfeinerung läßt sich mit folgenden Werten durchführen:

Bei idealer Isomorphie wird das Dreieck aus den Vektoren von $F_P+F_H=F_{PH}$ geschlossen. Normalerweise ist das nicht der Fall, und die berechneten und gemessenen Werte für $|F_{PH}|$ differieren um den "lack of closure error" (E). Die "Phasing Power" P setzt die berechneten F_H in Bezug zum lack of closure error [Drenth, 1994].

$$P = \left[\frac{\sum_n |F_H|^2}{\sum_n |E|^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{mit} \quad \sum_n |E|^2 = \sum_n \{ |F_{PH}|(obs) - k_n |F_{PH}|(calc) \}^2 \quad \text{[Glg. 17]}$$

Die Phasing Power ist auflösungsabhängig und indiziert, welcher Auflösungsbereich des Derivats zur Phasierung beiträgt. Weiter sei der Cullis R-Faktor R_c zu erwähnen.

$$R_c = \frac{\sum_N ||F_{PH} \pm F_P| - F_H(calc)|}{\sum_N |F_{PH} - F_P|} \quad \text{[Glg. 18]}$$

Die "Figure of Merit" (m) [Drenth, 1994]

$$m = \frac{|F_{hkl, best}|}{|F_{hkl}|} \quad \text{mit} \quad F_{hkl, best} = \frac{\sum_{\alpha=0} P(\alpha) F_{hkl}(\alpha)}{\sum_{\alpha} P(\alpha)} \quad \text{[Glg. 19]}$$

ist ein integrales Maß der Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(\alpha)$ der Phasen α . Es kann gezeigt werden, daß die Figure of Merit das gewichtete Mittel des Cosinus der Abweichung des Phasenwinkels von α_{best} ist.

Infolge der Bestimmung der Schweratomlagen ist es möglich, die Phasen zu bestimmen und eine Elektronendichte nach Gleichung 11 zu berechnen. Die Elektronendichte kann nachträglich durch Dichtemodifikation [Wang, 1985, Schuller, 1996] verbessert werden. Dabei ist es möglich den Kontrast zwischen niedrigkonturierten Bereichen, die oft das Lösungsmittel repräsentieren, und höherkonturierten Bereichen zu erhöhen. Dieser Prozeß wird in einigen Zyklen wiederholt. Nützlich dabei erweist sich die Angabe des Lösungsmittelgehalts oder die Nutzung einer Maske, die die Proteindichte von der Lösungsmitteldichte trennt. Eine weitere leistungsfähige Methode die Elektronendichte zu verbessern, ist das Überlagern von Bereichen, die durch nichtkristallographische Symmetrien zusammenhängen [Bricogne, 1974; Zhang & Main, 1990a+b]. Die dafür notwendigen Operatoren müssen oft empirisch bestimmt werden. Erste Anhaltspunkte liefert das Ergebnis der Selbstrotationsfunktion.

Molekularer Ersatz

Der Molekulare Ersatz ist eine leistungsfähige Methode zur Lösung von Kristallstrukturen, wenn eine geeignete Modellstruktur vorhanden ist. Das Modell wird zur Bestimmung der Position und Orientierung des Moleküls in der Elementarzelle benutzt. Die Orientierung und Positionierung des Modells stellt ein sechsdimensionales Problem dar, das sich in eine Rotations- und eine Translationsfunktion zerlegen läßt. Dadurch läßt sich der Rechenaufwand erheblich verringern.

2. Grundlagen

Kreuzrotationsfunktion

Die Rotationssuche hat das Ziel, die Orientierung des Moleküls im Kristall zu bestimmen. Dazu werden die Pattersonfunktionen des Modells und der gemessenen Röntgenbeugungsdaten durch die Kreuzrotationsfunktion R innerhalb eines bestimmten Integrationsvolumens U überlagert. Dieses liefert die Rotationswinkel zur Orientierung des Modells im Kristall. Problematisch kann sich dabei die Wahl der zu berücksichtigenden Länge der Pattersonvektoren darstellen, da man nach Möglichkeit nur intramolekulare Vektoren betrachten will. Dies gilt besonders für nicht globuläre Strukturen, wie zum Beispiel DNA-Doppelstränge.

$$R(C) = \int_U P_{cryst}(X_{cryst})P_{mod}(X_{mod})dX_{mod} \quad \text{[Glg. 20]}$$

Translationsfunktion

Mit der Translationsfunktion wird die genaue Lage des Moleküls im Kristall bestimmt. Dabei beschreibt die Translationsfunktion T die Überlagerung der Pattersonfunktion des Modelles $P(u,t)$ mit derjenigen des Beugungsmusters $P(u)$.

$$T(t) = \int P(u)P(u,t)du \quad \text{[Glg. 21]}$$

Die Qualität der Lösung kann durch einen Korrelationskoeffizienten C und den kristallographischen R -Faktor bewertet werden.

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad \text{[Glg. 22]}$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}| - |\overline{F_{obs}}|) \times (|F_{calc}| - |\overline{F_{calc}}|)}{\sqrt{\sum_{hkl} (|F_{obs}| - |\overline{F_{obs}}|)^2 \times (|F_{calc}| - |\overline{F_{calc}}|)^2}} \quad \text{[Glg. 23]}$$

2.9. Verfeinerung des Modells

Ziel der Verfeinerung ist die Minimierung der Differenz zwischen F_{calc} und F_{obs} , d.h. die beste Anpassung des Modells an die gemessenen Daten zu bestimmen. Als Qualitätsindex kann hierfür der kristallographische R-Faktor (Glg. 22) herangezogen werden. Verändert sich dieser Wert bei weiteren Verfeinerungszyklen nicht mehr, ist die Verfeinerung konvergiert. Die Einführung des freien R-Wertes R_{free} [Brünger, 1992b] stellt ein weitaus besseres Konvergenzmerkmal dar. Hier wird unter Beachtung von Reflexen mit ähnlichem Beugungswinkel [Kleywegt & Jones, 1995] eine zufällige Auswahl an Reflexen vorgenommen, ca 5 bis 10 %. Dieser Teildatensatz wird nicht in die eigentliche Verfeinerung mit einbezogen. Dieser Wert stellt ein empfindliches Kriterium dar, um eine Überfittung der Struktur zu verhindern.

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}}|} \quad \text{[Glg. 24]}$$

Im Rahmen der Strukturverfeinerung werden neben den Positionen der Atome auch sogenannte *B*-Faktoren - atomare Auslenkungsfaktoren (ADP) - iterativ verfeinert. Die *B*-Faktoren, ursprünglich auch Temperaturfaktoren genannt, sind ein Maß für die mittlere quadratische Auslenkung eines Atoms innerhalb eines sphärischen Volumens aus der Ruhelage.

$$B = 8\pi^2 \bar{u}^2 \quad \text{[Glg. 25]}$$

Diese Gleichung beschreibt nur für mittlere Auflösungen die Auslenkung aus der Ruhelage gut. Bei hochaufgelösten Strukturen ist klar zu erkennen, daß diese Auslenkung nicht isotrop ist und von den benachbarten Atomen beeinflusst wird. Die Beweglichkeit gebundener Atome ist immer anisotrop [Pratt et al., 1971; Jameson, 1982]. Bei hochaufgelösten Strukturen läßt sich das *B*-Faktormodell anisotrop beschreiben. Dadurch wird in Gleichung 25 \mathbf{u} durch eine symmetrische Matrix ersetzt.

$$B = 8\pi^2 \begin{pmatrix} \langle u_x u_x \rangle & \langle u_x u_y \rangle & \langle u_x u_z \rangle \\ \langle u_x u_y \rangle & \langle u_y u_y \rangle & \langle u_y u_z \rangle \\ \langle u_x u_z \rangle & \langle u_y u_z \rangle & \langle u_z u_z \rangle \end{pmatrix} \quad \text{[Glg. 26]}$$

2. Grundlagen

Durch die Einführung der Matrix erhöht sich die Anzahl der zu verfeinernden Parameter pro Atom von 4 auf 9. Da das Daten-Parameter-Verhältnis für eine Verfeinerung stets besser als zwei sein sollte, beschränkt sich die Verwendung anisotroper B -Faktoren auf hochaufgelöste Strukturen (besser 1,4 Å).

Um ein günstiges Daten-Parameter-Verhältnis zu erhalten, werden für die Verfeinerung zusätzliche "Informationen" eingeführt. Solche "restraints" sind Werte von Standardgeometrien, die aus einer großen Menge von hochaufgelösten Kristallstrukturen resultieren [Engh & Huber, 1991]. Die Beschränkungen der Geometrie lassen sich gegenüber den experimentellen Daten abhängig von ihrer Qualität wichten.

Zur Verfeinerung der Strukturen wurden die Programme X-PLOR 3.8 [Brünger 1992A], SHELXL-97 [Sheldrick & Schneider 1997] und REFMAC [Murshudov et al., 1997] verwendet. Alle drei Programme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zugrunde liegenden mathematischen Methoden. SHELXL benutzt im Gegensatz zu den beiden anderen Programmen Intensitäten (I_{obs} und σI_{obs}) anstelle von Amplituden (F_{obs} und σF_{obs}). Dies hat Vorteile bei der Abschätzung des Fehlers für kleine I_{obs} . REFMAC und SHELXL-97 bieten die Möglichkeit, die B -Faktoren anisotrop zu verfeinern. Zusätzlich ist es in SHELXL-97 möglich, die Besetzungsdichte von alternativ besetzten Resten zu verfeinern unter der Bedingung, daß die Summe aller Anteile alternativer Konformationen eins ist. Die verwendete XPLOR-Version arbeitet auf der Grundlage eines "least squares"-Ansatzes [Brünger 1992a] und hat eine Energiefunktion als Zielfunktion, die minimiert wird. Daher eignet sich XPOLR auch gut zur Verfeinerung niedrig aufgelöster Strukturen. SHELXL [Sheldrick & Schneider 1997] verfeinert alle Parameter gleichzeitig in einer Matrix. REFMAC arbeitet auf der Basis der "Maximum likelihood"-Methode [Murshudov et al., 1997].

Die Verfeinerung von Strukturen erfolgt in einem zyklischen Prozeß. Die Modelle eines Verfeinerungsschrittes werden mit Hilfe eines Graphikprogramms, zum Beispiel O [Jones et al., 1991], überprüft. Dazu werden Elektronendichtekarten berechnet. Verwendet wurde eine $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ und eine $(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ -Dichte (Glg. 27 und 28), die folgendermaßen generiert werden.

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l (2F_{\text{obs}_{hkl}} - F_{\text{calc}_{hkl}}) e^{-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{\text{calc}}} \quad \text{[Glg. 27]}$$

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l (F_{\text{obs}_{hkl}} - F_{\text{calc}_{hkl}}) e^{-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{\text{calc}}} \quad \text{[Glg. 28]}$$

2. Grundlagen

Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Dichte gibt ein Abbild der Elektronendichte im Kristall wieder. Die $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Dichte spiegelt dagegen direkt die Differenzen zwischen beobachteter und berechneter Dichte wider. Idealerweise sollte sie am Ende der Verfeinerung gegen Null gehen. Positive Bereiche deuten auf fehlende Teile in der Modellstruktur hin. Negative Dichte heißt, daß die Dichte überinterpretiert ist, d.h. sich zu viele Elektronen in diesem Volumensegment befinden. Dies kann durch einen falschpositionierten Rest oder durch eine Fehlinterpretation von Wasserlagen, die eigentlich Ionen darstellen, bedingt sein.

Die Elektronendichtekarten lassen sich durch Wichtung mit dem experimentellen Fehler verbessern. Bei solchen SigmaA-gewichteten Dichtekarten wird F_{obs} wie auch F_{calc} mit dem abgeschätzten experimentellen Fehler gewichtet.