

Strukturlösung mit experimentell bestimmten Tripletphasen am Beispiel des tetragonalen Lysozyms

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der Fakultät für Physik der Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.–Phys. Kerstin Susi Hölzer
aus Heilbronn

Tag der mündlichen Prüfung 5. Juni 1998

Referent

Prof. Dr. K. Hümmer

Korreferent

Prof. Dr. W. Prandl

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Grundlagen der dynamischen Beugungstheorie	7
2.1	Grundgleichung der dynamischen Theorie	7
2.2	Lösung der Grundgleichung	10
2.2.1	Eigenwertproblem	10
2.2.2	Randbedingungen	12
2.3	Experimentelle Phasenbestimmung durch Dreistrahlinterferenzen	12
2.3.1	Bethe-Näherung	13
2.3.2	Einfluß von Polarisierungseffekten	16
2.3.3	Einfluß der Beugungsgeometrie	17
2.3.4	Phasenunabhängige Effekte: Umweganregung und Aufhellung	18
3	Experimentelle Anordnung	19
3.1	Röntgenstrahlungsquellen	19
3.1.1	Drehanode	19
3.1.2	Synchrotronstrahlung	19
3.2	Bildplattensystem	21
3.3	Ψ -Kreisdiffraktometer	21
3.4	Ablauf eines Dreistrahlinterferenz-Experiments	22
3.5	Interpretation der Dreistrahlinterferenz-Profile	25
4	Experimentelle Bestimmung von Tripletphasen an Proteinkristallen	29
4.1	Tetragonales Lysozym	32
4.1.1	Intensitätsdatensammlung	33
4.1.2	Tripletphasen-Datensammlung	34
4.1.3	Strahlenschäden	37
4.2	Triklines Lysozym	40
4.3	β -Trypsin	42
4.4	Proteinase K	44
4.5	Nessellectin	45
5	Strukturlösung mit experimentell bestimmten Tripletphasen	49
5.1	Direkte Methoden	49
5.1.1	Grundbegriffe der Direkten Methoden	49
5.1.2	Experimentell bestimmte Tripletphasen und Direkte Methoden	52
5.2	Maximum-Entropie und statistische Auswerteverfahren	52
5.2.1	Grundbegriffe aus der Statistik	53
5.2.2	Likelihood	55
5.3	Maximum-Entropie-Verfahren für tetragonales Lysozym	56
5.3.1	Bewertung der Phasendatensätze durch Likelihood und Entropie	57
5.3.2	Verteilung der Reflexe mit bestimmter Strukturfaktorphase	60
5.3.3	Maximum-Entropie-Elektronendichtekarten	61
5.3.4	Zusammenfassung	65

5.4	Auswahlkriterien für die Tripletphasenbestimmung an tetragonalem Lysozym	66
5.5	Maximum–Entropie–Verfahren für Nessellectin	70
5.5.1	Bewertung der Phasensätze durch Likelihood und Entropie	70
5.5.2	Verteilung der Reflexe mit bestimmter Strukturfaktorphase	71
5.5.3	Maximum–Entropie–Elektronendichtekarten	72
5.5.4	Zusammenfassung	73
6	Strukturverfeinerung an tetragonalem Lysozym	75
6.1	Anpassung eines Startmodells an die Elektronendichtekarte	75
6.2	Ablauf einer Strukturverfeinerung	75
6.3	Konsistenzkriterien für Strukturmodelle	76
6.3.1	Stereochemie	76
6.3.2	R–Werte	76
6.3.3	Auftragung nach Ramachandran	78
6.3.4	Thermische Auslenkungsparameter	78
6.4	Verfeinerung des Startmodells aus der ME–Elektronendichtekarte	79
6.5	Vergleich der verfeinerten Strukturmodelle	84
6.6	Zusammenfassung	85
7	Beugungsexperimente hoher Auflösung zur Charakterisierung des Mosaikbaus	87
7.1	Mosaikverbreiterung bei schnellem Abkühlen	88
7.1.1	Tetragonales Lysozym	88
7.1.2	β –Trypsin	92
7.1.3	Proteinase K	93
7.2	Mosaikverbreiterung bei langsamen Abkühlen	94
7.3	Untersuchung zur Mosaikblockgröße– und Verspannungseffekten	97
8	Zusammenfassung und Ausblick	103
A	Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung

Die Röntgenstrukturanalyse bietet die Möglichkeit, den dreidimensionalen atomaren Aufbau kristalliner Substanzen zu bestimmen. Der Zusammenhang zwischen der in einem Beugungsexperiment gemessenen Intensität $I(\vec{h})$ eines reziproken Gitterpunktes \vec{h} und der Lage \vec{r}_j der Atome in der Elementarzelle wird durch den Strukturfaktor $F(\vec{h})$ beschrieben:

$$I(\vec{h}) \propto |F(\vec{h})|^2 \quad \text{mit} \quad F(\vec{h}) = \sum_j^N f_j(\vec{h}) e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}_j},$$

wobei $f_j(\vec{h})$ für den Atomformfaktor des j -ten Atoms in der Elementarzelle steht. Die Elektronendichte läßt sich durch Rücktransformation aus den Strukturfaktoren berechnen:

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\vec{h}} F(\vec{h}) e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}} \quad \text{mit} \quad F(\vec{h}) = |F(\vec{h})| e^{i\phi(\vec{h})}.$$

Die Strukturfaktoren sind die Fourierkoeffizienten der Elektronendichteverteilung innerhalb der Elementarzelle. Da die Strukturfaktorphasen nicht bekannt sind, ist eine direkte Rücktransformation der Meßwerte auf die Elektronendichteverteilung nicht möglich. Dies wird auch als *Phasenproblem der Kristallographie* bezeichnet. Insbesondere in der Proteinkristallographie ist das Phasenproblem eine entscheidende Hürde bei der Strukturlösung.

Das Enzym Urease war das erste Protein, das kristallisiert wurde (Sumner, 1926). Das geordnete Molekülgitter eines Kristalls kann sich nur dann bilden, wenn es aus identischen Moleküleinheiten aufgebaut ist. Es revolutionierte die Ansichten über Proteine, als gezeigt wurde, daß sogar große Proteine diskrete chemische Einheiten mit festgelegten räumlichen Strukturen sind.

1960 wurde für Myoglobin bei nahezu atomarer Auflösung (2,0 Å) ein dreidimensionales Modell bestimmt (Kendrew, Dickerson, Strandberg, Hart & Davis, 1960). Damit war nach 25 Jahren für das erste Proteine das Phasenproblem gelöst. Diese Strukturbestimmung brachte den Durchbruch beim Verständnis der Proteinstrukturen, da für die Klärung der Reaktionsmechanismen, an denen Proteine mitwirken, die genaue Kenntnis ihres dreidimensionalen Aufbaus erforderlich ist.

In der Proteinkristallographie werden die Strukturfaktorphasen einer vollständig unbekannt Proteinstruktur meistens mit Hilfe des mehrfachen isomorphen Ersatzes (engl.: „multiple isomorphous replacement“ MIR; Green, Ingram & Perutz, 1954) gelöst (Ramakrishnan & Biou, 1997). Bei dieser Methode werden Datensammlungen an Kristallen des *nativen* Proteins und an Kristallen verschiedener Schweratomderivate durchgeführt. Um Schweratomderivate zu erhalten, werden die Kristalle des nativen Proteins in Lösungen verschiedener Schweratomsalze getränkt. Die in den Proteinkristallen vorhandenen Kanäle ermöglichen den Schweratomsalzen, in die Kristalle zu diffundieren. Binden die Schweratome an ausgezeichneten Positionen des Proteinmoleküls, kann ihre Lage durch die Pattersonmethode bestimmt werden. Phaseninformationen können aus dem Unterschied der Strukturfaktorbeiträge des nativen Proteins und der Schweratomderivate berechnet werden.

Bei nicht-zentrosymmetrischen Strukturen führt der signifikante imaginäre Anteil des Atomstreu factors der meisten verwendeten Schweratome zu anomaler Streuung (AS), bei der das Friedelsche Gesetz ($F(\vec{h}) = F(-\vec{h})$ und $\phi(\vec{h}) = -\phi(-\vec{h})$) nicht mehr erfüllt ist. Die Bestimmung dieser sogenannten Bijvoet-Differenzen ist eine weitere Möglichkeit, Phaseninformationen zu erhalten. Die Methoden zur Strukturlösung aus MIR-Daten können daher Phaseninformationen aus den Intensitätsunterschieden durch isomorphen Ersatz und aus den Bijvoet-Differenzen der Schweratomderivate verwenden.

Die Schwierigkeit dieser Methode ist, ein geeignetes Schweratomderivat zu finden. Oft lagert sich kein Schweratom an eine geeignete Position in der Proteinstruktur an, oder das Schweratomderivat ist zur nativen Proteinstruktur nicht isomorph.

Die wachsende Verfügbarkeit von Synchrotronstrahlung fördert eine weitere Methode, um Strukturfaktorphasen *ab initio* zu bestimmen, die Methode der anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen (engl.: „multiwavelength anomalous dispersion“ MAD; Hendrickson, 1991). Dabei werden zwei oder mehr Intensitätsdatensammlungen bei Wellenlängen in der Nähe der Absorptionskante eines in der Proteinstruktur enthaltenen Schweratoms durchgeführt. In der Nähe der Absorptionskante tritt ein signifikanter Unterschied im Real- und Imaginärteil (f' und f'') des Atomformfaktors auf. Besonders der Austausch der Aminosäure Methionin durch Selenomethionin (K-Absorptionskante Selen: 0,98 Å), bei dem das Schwefelatom durch ein Selenatom ersetzt wird, ermöglicht viele Anwendungen von MAD.

Um die bei MAD auftretenden Intensitätsunterschiede von teilweise nur 5 % beobachten zu können, muß ein sehr guter Datensatz (R_{sym} , Vollständigkeit, Redundanz) aufgenommen werden. Bei durchschnittlichen Datensätzen liegen die Intensitätsunterschiede zum Teil im Bereich von nur $4\sigma(I)$ und damit bereits in der Nähe der statistischen Schwankungen.

Bei den *Direkten Methoden* (Hauptman & Karle, 1953) werden mit statistischen Methoden Aussagen über die Strukturfaktorphasen direkt aus den Strukturfaktorbeträgen abgeleitet, die bei Kleinmolekülstrukturen sehr effektiv sind. Die stete Weiterentwicklung dieser Methoden, der sogenannten *Shake-and-Bake*-Verfahren (Miller et al., 1993; Sheldrick & Gould, 1995), bei der alternierend eine Phasenverfeinerung im reziproken Raum und eine Suche nach Atomen im realen Raum durchgeführt wird, ermöglichen auch größere Strukturen zu lösen, wie beispielsweise die Struktur eines Metalloproteins mit über 2000 unabhängigen Atomen (Sheldrick, 1998). Diese *ab initio* Methode benutzt nur die nativen Daten, ohne zusätzliche Phaseninformation wie bei MIR oder MAD. Nachteilig wirken sich die erforderliche Intensitätsdatensammlungen bis zu atomarer Auflösung ($\sim 1,2$ Å) und die Rechenzeit-intensive Auswertung aus.

In dieser Arbeit wird eine Methode zur Phasenbestimmung an Proteinkristallen vorgestellt, bei der ebenfalls kein Schweratom in der Struktur erforderlich ist. Bereits 1949 wurde von Lipscomb vorgeschlagen, die Intensitätsänderung eines Reflexes während der Anregung eines weiteren Reflexes zu beobachten. In dieser Intensitätsänderung kann der Interferenzeffekt zweier Wellen beobachten werden. Da sich im Kristall neben dem einfallenden Strahl noch zwei abgelenkte Strahlen ausbreiten wird dies ein Dreistrahlinterferenz-Experiment genannt. Bei der Messung von Dreistrahlinterferenz-Profilen werden Phasenbeziehungen

zwischen Reflexen direkt bestimmt: die sogenannten Tripletphasen. Inzwischen ist es möglich, Dreistrahlinterferenz-Experimente an Kristallen kleiner Proteinstrukturen durchzuführen (Weckert & Hümmer, 1997). Voraussetzung für die experimentelle Bestimmung der Tripletphasen an Proteinkristallen ist eine geringe Mosaikverteilung der Kristalle. Für die Messungen der Dreistrahlinterferenz-Profile sind Synchrotronstrahlung und ein spezielles Ψ -Kreisdiffraktometer vorteilhaft.

In dieser Arbeit wird eine ab initio Strukturlösung mit experimentell bestimmten Tripletphasen am Beispiel des tetragonalen Lysozyms als Modellsubstanz aufgezeigt. Dazu wurden Intensitäts- und Tripletphasen-Datensammlungen an Lysozym durchgeführt.

Aus den experimentell bestimmten Tripletphasen lassen sich Strukturfaktorphasen ableiten. Dabei kann es erforderlich sein, symbolische Einzelphasen zu verwenden. Bei der Variation dieser symbolischen Einzelphasen nach dem *magic-integer*-Verfahren (Main, 1977) ergeben sich mehrere Phasendatensätze. Die Bewertung der verschiedenen Phasensätze erfolgt durch das Maximum-Entropie-Verfahren. Mit dem geeignetsten Phasendatensatz wird eine Maximum-Entropie-Elektronendichtekarte berechnet, an diese wird dann ein Startmodell angepaßt und verfeinert.

Der Einfluß der Reflexe mit bestimmten Strukturfaktorphasen auf die Qualität der ME-Elektronendichtekarten wurde untersucht, indem verschiedene Auswahlkriterien für die Strukturfaktorbeträge und den Auflösungsbereich ($|\vec{h}|^{-1}$) angewandt wurden.

An dem Protein Nessellectin, das mit herkömmlichen Methoden bisher nicht gelöst werden konnte, wurden die ersten Dreistrahlinterferenz-Profile aufgenommen. Basierend auf den 210 experimentell bestimmten Tripletphasen konnte eine Maximum-Entropie-Elektronendichtekarte berechnet werden. In dieser sind Proteinmolekül und Lösungsmittel bereits deutlich voneinander getrennt, jedoch ist eine Strukturbestimmung aufgrund der geringen Anzahl von experimentell bestimmten Strukturfaktorphasen noch nicht möglich.

Die Schädigung der Proteinstrukturen durch Röntgenstrahlungen kann durch Experimente bei tiefen Temperaturen reduziert werden. Um die Anwendbarkeit der Dreistrahlinterferenz-Experimente bei tiefen Temperaturen zu prüfen, wurden erste hochaufgelöste Untersuchungen des Mosaikbaus der Proteinkristalle im Temperaturbereich zwischen 100 und 130 K durchgeführt.

2 Grundlagen der dynamischen Beugungstheorie

Eine theoretische Beschreibung von Mehrstrahlinterferenz-Experimenten unter Betrachtung der gegenseitigen Phasenbeziehungen der beteiligten Wellen kann nur mit der dynamischen Beugungstheorie erklärt werden, die Ewald (1917) erstmals für eine dreidimensionale, periodische Anordnung von Dipoloszillatoren allgemein formulierte. Von Laue (1931) führte die dreidimensionale periodische Suszeptibilität ein. In dieser Formulierung wird die dynamische Theorie heute noch angewandt.

Verschiedene Autoren (Cruickshank et al., 1992; von Laue, 1960) beschreiben die Grundlagen der dynamischen Theorie im Zweistrahlfall. Bei diesem ist zum primären (einfallenden) Wellenfeld nur ein weiteres (sekundäres) Wellenfeld angeregt. Pinsker (1978) erläutert die dynamische Theorie unter Berücksichtigung von Mehrstrahlinterferenzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Grundlagen der dynamischen Beugungstheorie nur insoweit eingegangen, wie sich Einflüsse auf die Interpretierbarkeit der Dreistrahlinterferenzprofile an Proteinkristallen ergeben. Ausführlichere Darstellungen sind bei Weckert & Hümmer (1997) und Weckert (1997) gegeben.

2.1 Grundgleichung der dynamischen Theorie

Ein Kristall stellt eine dreidimensionale periodische Anordnung von Atomen dar, wobei die Periodizität in der Größenordnung der Wellenlänge von Röntgenstrahlung liegt. Die elektromagnetischen Wellen werden im wesentlichen an den Elektronen der Atome gestreut. Die elektrischen und magnetischen Felder in Materie werden durch die Maxwell'schen Gleichungen beschrieben. Für Materialien ohne spontane Polarisation gilt:

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E} \quad \text{und} \quad \vec{D} = \epsilon_0 (1 + \chi) \vec{E} = \epsilon_0 \epsilon \vec{E}. \quad (1)$$

Für die Berechnung der Suszeptibilität χ kann im Fall von Röntgenstrahlung die Eigenfrequenz der Elektronen gegenüber der der elektromagnetischen Welle vernachlässigt werden. Somit ergeben sich die Suszeptibilität χ und die dielektrische Funktion ϵ aus der Elektronendichte ρ_e zu:

$$\epsilon = 1 + \chi = 1 - \frac{e^2 \rho_e}{4\pi^2 \epsilon_0 m_e \nu^2} \quad \text{mit} \quad \chi = -\frac{e^2 \rho_e}{4\pi^2 \epsilon_0 m_e \nu^2}. \quad (2)$$

Der Wert der Suszeptibilität χ ist negativ und vom Betrag kleiner als 10^{-4} . Somit gilt näherungsweise:

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E} = \frac{\chi}{1 + \chi} \vec{D} \approx \chi \vec{D}. \quad (3)$$

Damit lautet die Wellengleichung für die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen in Materie (Pinsker, 1978):

$$\Delta \vec{D} + 4\pi^2 k^2 \vec{D} + \nabla \times (\nabla \times \chi \vec{D}) = 0 \quad \text{mit} \quad k = \frac{\nu}{c}. \quad (4)$$

Wegen der Periodizität der Elektronendichte $\rho_e(\vec{r})$ ist auch die Suszeptibilität $\chi(\vec{r})$ eine gitterperiodische Funktion und kann damit in eine Fourierreihe entwickelt werden, wobei über alle reziproken Gittervektoren \vec{h}_n summiert wird:

$$\chi(\vec{r}) = \sum_n \chi(\vec{h}_n) e^{-2\pi i \vec{h}_n \vec{r}}. \quad (5)$$

Die Fourierkoeffizienten $\chi(\vec{h}_n)$ sind mit den Struktur Faktoren $F(\vec{h}_n)$ über

$$\chi(\vec{r}) = -\Gamma F(\vec{h}_n) \quad \text{mit} \quad \Gamma = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2}{m_e c^2} \frac{\lambda^2}{\pi V_{EZ}} = r_e \frac{\lambda^2}{\pi V_{EZ}} \quad (6)$$

verbunden, wobei Γ eine dimensionslose Kopplungskonstante in der Größenordnung 10^{-6} bis 10^{-7} ist. Sie stellt ein Maß für die Wechselwirkung der elektromagnetischen Welle mit den Elektronen des Kristalls dar, mit dem Elementarzellvolumen V_{EZ} und dem klassischen Elektronenradius $r_e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2}{m_e c^2} = 2,8 \cdot 10^{-15}$ m.

Für die dielektrische Verschiebung im Kristall wird ein Ewald–Bloch–Wellenansatz¹ verwendet. Unter Berücksichtigung der Beugungsbedingungen $\vec{K}(\vec{h}_n) = \vec{K}(0) + \vec{h}_n$ ergibt sich für das Gesamtwellenfeld im Kristall:

$$\vec{D}(\vec{r}) = \sum_n \vec{D}(\vec{h}_n) e^{-2\pi i \vec{K}(\vec{h}_n) \vec{r}}. \quad (7)$$

Gleichungen (5) und (7) werden in die Wellengleichung (Gleichung (4)) eingesetzt, und durch Koeffizientenvergleich ergeben sich die *Grundgleichungen der dynamischen Theorie* (von Laue, 1960):

$$\vec{D}(\vec{h}_m) = \frac{\vec{K}^2(\vec{h}_m)}{\vec{K}^2(\vec{h}_m) - \vec{k}_0^2} \sum_n \chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n) \vec{D}(\vec{h}_n)_{[m]}, \quad (8)$$

$$\text{mit dem Resonanzterm} \quad R(\vec{h}_m) = \frac{\vec{K}^2(\vec{h}_m)}{\vec{K}^2(\vec{h}_m) - \vec{k}_0^2}. \quad (9)$$

\vec{k}_0 bezeichnet den Wellenvektor der einfallenden Welle im Vakuum. $\vec{D}(\vec{h}_n)_{[m]}$ ist die Komponente, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung $\vec{K}(\vec{h}_m)$ steht. Das gesamte Wellenfeld $\vec{D}(\vec{h}_m)$ ergibt sich aus der kohärenten Überlagerung aller im Kristall angeregten Bloch–Wellen, die sowohl durch eine geometrische Kopplung über die Projektion $\vec{D}(\vec{h}_n)_{[m]}$ als auch durch eine elektromagnetische Kopplung über die Suszeptibilitäten $\chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n)$ miteinander verknüpft sind. Die geometrische Kopplung ergibt sich aus dem vektoriellen Charakter der \vec{D} -Felder. Nur die zu $\vec{D}(\vec{h}_m)$ parallelen Komponenten von $\vec{D}(\vec{h}_n)$ liefern einen Beitrag. Die elektromagnetische Kopplung wird durch $\chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n)$, und damit durch die Struktur Faktoren der Differenzvektoren $\vec{h}_m - \vec{h}_n$, vermittelt. Dadurch beeinflussen die Phasen $\phi(\vec{h})$ und die Strukturfaktor beträge $F(\vec{h})$ die Amplituden der Welle.

¹Der Ansatz für die Wellenfelder im Kristall in dieser Form geht auf P.P.Ewald (1917) zurück. Später entwickelte F. Bloch für die Wellenfunktionen der Elektronen im Kristall einen ähnlichen Ansatz.

Die Amplitude der Welle $\vec{D}(\vec{h}_m)$ kann nur dann große Werte annehmen, wenn der zugehörige Wellenvektor $|\vec{K}(\vec{h}_m)|$ nahe bei $|\vec{k}_0|$ liegt, d. h. sich in der Nähe der Beugungsposition befindet, und somit der Resonanzterm $R(\vec{h}_m)$ signifikante Werte besitzt. Daher erlaubt der Resonanzterm, alle Wellen zu vernachlässigen, deren reziproke Gittervektoren nicht in der Nähe der Ewaldkugel liegen. Somit reduziert sich das ∞ -dimensionale Gleichungssystem der Gleichung (8) auf N Dimensionen (N-Strahlfall), wenn N Gittervektoren berücksichtigt werden müssen. Beim Durchgang durch die Ewaldkugel ändert der Resonanzterm und somit auch $\vec{D}(\vec{h}_m)$ das Vorzeichen, dies entspricht einer Phasenverschiebung $\Delta\phi$ von 180° .

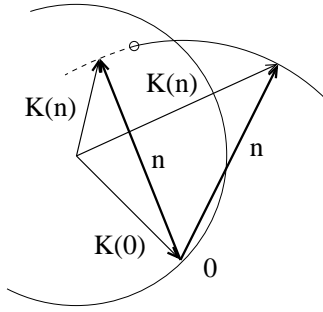


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bedeutung des Resonanzterms $R(\vec{n})$, $\vec{n} = \vec{h}, \vec{g}, \vec{h}_m$

Gleichung (8) kann daher in ein Eigenwertsystem umgeschrieben werden:

$$\frac{k_0^2 - \vec{K}^2(\vec{h}_m)}{\vec{K}^2(\vec{h}_m)} \vec{D}(\vec{h}_m) + \sum_n \chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n) \vec{D}(\vec{h}_n)_{[m]} = 0. \quad (10)$$

Die selbstkonsistente Lösung dieser Gleichung ergibt für eine einfallende Welle $\vec{D}(\vec{0})$ mit der Einstrahlrichtung \vec{k}_0 die im Kristall erlaubten Wellenvektoren $\vec{K}(\vec{h}_m)$ (Eigenwerte) und die dazugehörigen Amplitudenverhältnisse $\vec{D}(\vec{h}_m)$ (Eigenvektoren). Absolute Amplituden können durch das Anpassen der Randbedingungen berechnet werden. Der geometrische Ort der Anfangspunkte aller erlaubten \vec{K} -Vektoren wird Dispersionsfläche genannt.

Am einfachsten Beispiel, dem Zweistrahlfall, werden die Ergebnisse der Wellenoptik beschrieben. Der Energiefluß (Poyntingvektor) zeigt in Richtung der Normalen der Dispersionsfläche am Anregungspunkt (Ewald, 1958; Kato, 1958).

Die Dispersionsfläche im Zweistrahlfall besteht, vereinfacht dargestellt, aus zwei Dispersionskugeln um die reziproken Gitterpunkte 0 und H. Die Aufspaltung der Dispersionskugeln durch die Polarisation der Röntgenstrahlung ($\vec{\pi}$ -Polarisation: \vec{D} parallel zur Beugungsebene, $\vec{\sigma}$ -Polarisation: \vec{D} senkrecht zur Beugungsebene) wird vernachlässigt. Aufgrund der Wechselwirkung der beiden Wellen zu $\vec{K}(\vec{0})$ und $\vec{K}(\vec{h})$ wird die Entartung der Eigenwerte von Gleichung (8) auf dem Schnittkreis der beiden Kugeln aufgehoben. In Abbildung 2(a) ist die Aufspaltung der Dispersionsfläche nicht gezeigt, da das Verhältnis des Radius' der eingezeichneten Kugeln zum Effekt der Aufspaltung $1 : 10^{-5}$ ist.

Wegen der Stetigkeitsbedingung der Tangentialkomponente des \vec{E} -Feldes an der Eintrittsfläche können sich die $\vec{K}(\vec{0})$ -Vektoren im Kristall nur in der Komponente parallel zur Oberflächennormale unterscheiden. Durch die Richtung der einfallenden Strahlung und die Schnittpunkte der Oberflächennormale mit der Dispersionsfläche werden die Anregungspunkte auf der Dispersionsfläche festgelegt. In Abbildung 2(a) sind die Anregungspunkte

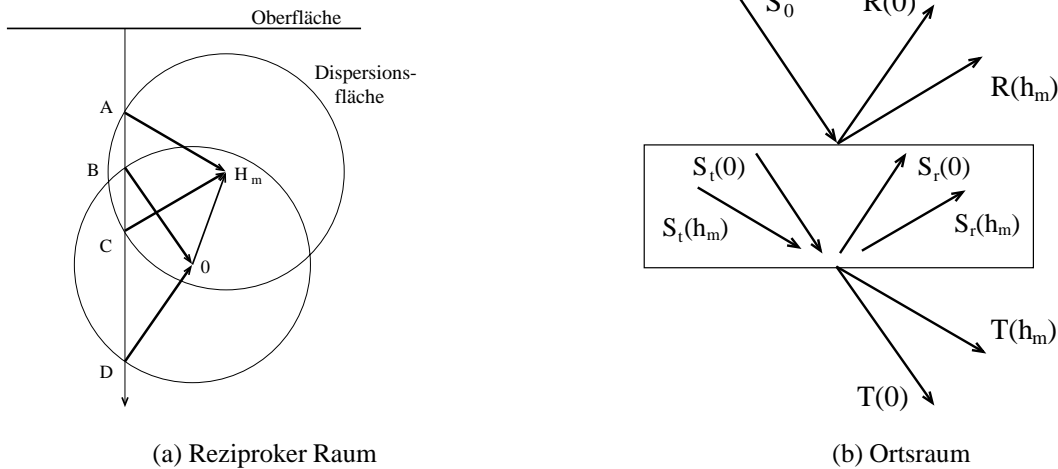


Abbildung 2: Poyntingvektoren möglicher Wellenfelder im Zweistrahlfall

mit A bis D gekennzeichnet. Im Kristall werden acht Wellenfelder angeregt, vier für jede Polarisationsrichtung. Innerhalb des Kristalls sind dies die transmittierten Wellenfelder $\vec{S}_t(\vec{0})$ und $\vec{S}_t(\vec{h}_m)$, sowie die reflektierten $\vec{S}_r(\vec{0})$ und $\vec{S}_r(\vec{h}_m)$. Unter der Annahme, der Kristall sei eine dünne planparallele Platte, werden auf beiden Seiten des Kristalls jeweils zwei Wellenfelder angeregt (s. Abb. 2(b)). Diese sind der einfallende Strahl \vec{S}_0 , der spiegelnd reflektierte Strahl $\vec{R}(\vec{0})$, der in Reflexion gebeugte Strahl $\vec{R}(\vec{h}_m)$, der transmittierte Strahl $\vec{T}(\vec{0})$, sowie der in Transmission gebeugte Strahl $\vec{T}(\vec{h}_m)$. Die Intensitätsverteilung der Wellenfelder hängt von der Beugungsgeometrie (s. Abb. 7) ab.

Bei einem N-Strahlfall befinden sich zusätzlich zum Ursprung des reziproken Gitters noch N-1 reziproke Gitterpunkte auf der Ewaldkugel. Liegen N reziproke Gitterpunkte in der Nähe der Ewaldkugel, werden 2N Anregungspunkte für jede Polarisationsrichtung, d. h. insgesamt 4N Anregungspunkte ausgewählt.

2.2 Lösung der Grundgleichung

2.2.1 Eigenwertproblem

Üblicherweise wird zur Lösung der dynamischen Grundgleichung der Resonanznenner (Gleichung (9)) linearisiert. Da sich die Beträge der Wellenvektoren im Kristall und im Vakuum in der Größenordnung 10^{-5} unterscheiden, kann folgende Näherung verwendet werden (Pinsker, 1978):

$$\frac{\vec{k}_0^2 - \vec{K}^2(\vec{h}_m)}{\vec{K}^2(\vec{h}_m)} + \chi(\vec{0}) \simeq \frac{2[K(\vec{0}) - K(\vec{h}_m)]}{k_0}, \quad (11)$$

$$\text{wobei } K(\vec{0}) = k_0 \left[1 + \frac{1}{2} \chi(\vec{0}) \right] \text{ gilt.} \quad (12)$$

$\vec{K}(\vec{0})$ ist der Wellenvektor der einfallenden Welle im Einstrahlfall, d. h. es sind keine weiteren Wellenfelder angeregt. Gleichung (11) wurde von Ewald als Resonanzfehler bezeichnet. Durch die Linearisierung wird die Zahl der Wellenfelder außerhalb des Kristalls halbiert. Generell wird der spiegelnd reflektierte Strahl $\vec{R}(\vec{0})$ vernachlässigt. Zusätzlich werden in der Bragg–Beugungsgeometrie der in Transmission gebeugte Strahl $\vec{T}(\vec{h}_m)$ und in der Laue–Beugungsgeometrie der in Reflexion gebeugte Strahl $\vec{R}(\vec{h}_m)$ nicht berücksichtigt.

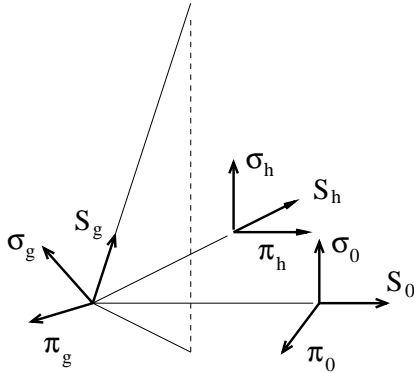


Abbildung 3: Definition der Polarisationsvektoren im Dreistrahlfall

Die dielektrischen Verschiebungsvektoren $\vec{D}(\vec{h}_n)$ stehen senkrecht zur Richtung des Wellenvektors $\vec{K}(\vec{h}_n)$, daher läßt sich das vektorielle Gleichungssystem (10) der Ordnung N in ein skalares Gleichungssystem der Ordnung $2N$ zerlegen. Für jede Welle werden drei zueinander senkrechte Vektoren $\vec{S}_n = \vec{K}(\vec{h}_n)/|\vec{K}(\vec{h}_n)|$, $\vec{\pi}_n$, $\vec{\sigma}_n$ eingeführt. In Abbildung 3 ist die relative Lage der Polarisationsvektoren dargestellt. In der von $\vec{K}(\vec{0})$ und $\vec{K}(\vec{h})$ aufgespannten Ebene liegen die $\vec{\pi}$ -Polarisationsvektoren aller Wellen und dazu senkrecht die $\vec{\sigma}$ -Polarisationsvektoren. Die Vektoramplituden $\vec{D}(\vec{h}_n)$ lassen sich durch

$$\vec{D}(\vec{h}_n) = D_{\pi}(\vec{h}_n)\vec{\pi}_n + D_{\sigma}(\vec{h}_n)\vec{\sigma}_n \quad (13)$$

ausdrücken. Daraus läßt sich Gleichung (10) als skalares Eigenwertssystem formulieren:

$$\left(\frac{k_0^2}{\vec{K}^2(\vec{h}_m)} - (1 - \chi(\vec{0})) \right) D_{\pi}(\vec{h}_m) + \sum_{n \neq m} \chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n) \left(D_{\pi}(\vec{h}_n)\vec{\pi}_n\vec{\pi}_m + D_{\sigma}(\vec{h}_n)\vec{\sigma}_n\vec{\pi}_m \right) = 0 \quad (14)$$

$$\left(\frac{k_0^2}{\vec{K}^2(\vec{h}_m)} - (1 - \chi(\vec{0})) \right) D_{\sigma}(\vec{h}_m) + \sum_{n \neq m} \chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n) \left(D_{\pi}(\vec{h}_n)\vec{\pi}_n\vec{\sigma}_m + D_{\sigma}(\vec{h}_n)\vec{\sigma}_n\vec{\sigma}_m \right) = 0. \quad (15)$$

Die elektromagnetische Kopplung zwischen den einzelnen Wellen wird durch die Suszeptibilitäten $\chi(\vec{h}_m - \vec{h}_n)$ vermittelt. Die geometrische Kopplung aufgrund der verschiedenen Richtungen (\vec{K} -Vektoren) der Wellen wird durch die Skalarprodukte der Polarisationsvektoren berücksichtigt. Eine nicht-triviale Lösung dieses Gleichungssystems ist nur bei einer Determinante der Koeffizientenmatrix ungleich null gegeben.

Jedem Eigenwert $K_j(\vec{0})$ $j = 1, 2, 3, \dots, 4N$ entspricht ein Anregungspunkt X_j der Dispersionsfläche. Von X_j gehen N ebene Wellen $\vec{D}_j(\vec{h}_n)$ mit $n = 1, 2, \dots, N$ aus, die sich aus den zugehörigen Eigenvektoren ergeben und das Wellenfeld des j -ten Anregungspunktes bilden.

Aus den Eigenvektoren werden die Amplituden nur relativ zueinander für jeden einzelnen Anregungspunkt bestimmt. Durch die Randbedingungen wird festgelegt, wie stark die von jedem einzelnen Anregungspunkt ausgehende Welle zum Gesamtwellenfeld beiträgt. Der vollständige dielektrische Verschiebungsvektor im Kristall wird durch

$$\vec{D}_{tot}(\vec{r}) = \sum_j^{4N} q_j \sum_n^N \vec{D}_j(\vec{h}_n) e^{-2\pi i \vec{K}_j(\vec{h}_n) \vec{r}} \quad (16)$$

ausgedrückt. Hierbei sind die $4N$ Faktoren q_j noch unbekannte, komplexe Koeffizienten, die durch die Randbedingungen festgelegt werden.

2.2.2 Randbedingungen

Die Stetigkeitsbedingung für elektromagnetische Wellen an einer Grenzfläche verlangt, daß die Tangentialkomponente des elektrischen Feldes \vec{E} und des magnetischen Feldes \vec{H} und die Normalkomponente der dielektrischen Verschiebung \vec{D} und der magnetischen Induktion \vec{B} konstant bleiben. Es ergeben sich vier skalare Gleichungen für die Tangentialkomponenten von \vec{E} und \vec{H} für jede Welle im Vakuum. Im Kristall existieren zu jedem Gittervektor \vec{h}_n von den $4N$ Anregungspunkten ausgehende, ebene Wellen mit dem Wellenvektor $\vec{K}_j(\vec{h}_n)$. Für die Wellen im Kristall lassen sich die elektrischen und magnetischen Feldvektoren \vec{E} und \vec{H} durch die dielektrischen Verschiebungsvektoren $\vec{D}_j(\vec{h}_n)$ ausdrücken. Die Randbedingungen werden in Abhängigkeit der Beugungsgeometrie formuliert und aus ihnen ergeben sich die $4N$ Faktoren q_j .

2.3 Experimentelle Phasenbestimmung durch Dreistrahlinterferenzen

Die Bestimmung von Strukturfaktorphasen aus Dreistrahlinterferenz-Experimenten wurde bereits von Lipscomb (1949) vorgeschlagen. Der Welle eines ersten Reflexes wird die zweimal gebeugte Welle (Umwegwelle) eines zweiten Reflexes überlagert. In der Intensitätsänderung eines Reflexes während der Anregung eines weiteren Reflexes zeigt sich der Interferenzeffekt, der von der Phasendifferenz der beiden Wellen abhängt. Dies ist ein sogenanntes Dreistrahlinterferenz-Experiment, da zusätzlich zur vorwärts gebeugten Welle zwei weitere Wellen angeregt werden.

Ein Dreistrahlfall wird im Experiment durch eine Ψ -Drehung realisiert. Zuerst wird der Kristall für den primären Reflex justiert. Um den reziproken Gittervektor des primären Reflexes wird nun eine Ψ -Drehung ausgeführt, dies entspricht einer Drehung um die Normale der entsprechenden Gitterebene, bis ein weiterer Reflex angeregt wird. Während der Ψ -Drehung wird die Intensitätsänderung des primären Reflexes durch die Anregung des sekundären Reflexes aufgenommen. Zur Vereinfachung ist in Abbildung 4 die geometrische Anordnung für einen koplanaren Dreistrahlfall dargestellt. Für die experimentelle Phasenbestimmung jedoch dürfen $\vec{K}(\vec{0})$, $\vec{K}(\vec{h})$ und $\vec{K}(\vec{g})$ nicht in einer Ebene liegen.

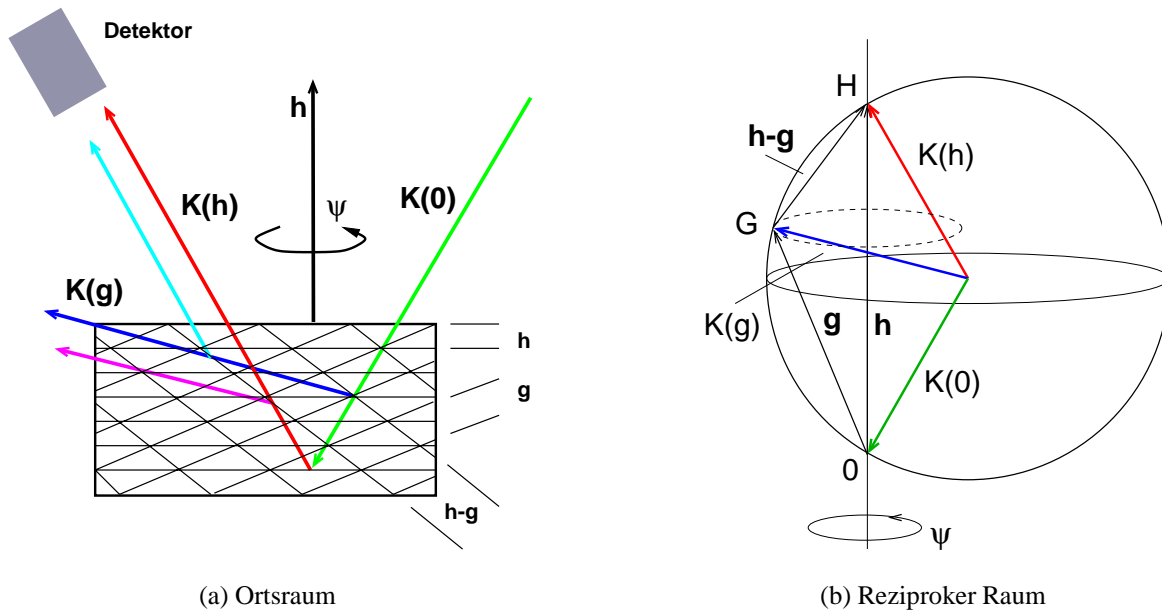


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Dreistrahlfalls im Ortsraum und im reziproken Raum mit dem primären Reflex \vec{h} und dem sekundären Reflex \vec{g} . Zur Vereinfachung sind die drei \vec{K} -Vektoren koplanar gezeichnet.

In der Nomenklatur der Dreistrahlinterferenz wird der reziproke Gittervektor zum primären Reflex mit \vec{h} , der zum sekundären Reflex mit \vec{g} bezeichnet, und der zugehörige Dreistrahlfall wird mit $\vec{h} / \vec{g} / \vec{h} - \vec{g}$ angegeben.

Wenn sich die Endpunkte von \vec{h} und \vec{g} auf der Ewaldkugel befinden, sind ebenfalls Anfangs- und Endpunkt des Differenzvektors $\vec{h} - \vec{g}$ auf der Ewaldkugel. Dies bedeutet, daß die Welle mit dem Wellenvektor $\vec{K}(\vec{g})$ teilweise an der Netzebene $\vec{h} - \vec{g}$ in Richtung $\vec{K}(\vec{h})$ und umgekehrt die Welle mit dem Wellenvektor $\vec{K}(\vec{h})$ teilweise an der Netzebene $\vec{g} - \vec{h}$ in Richtung $\vec{K}(\vec{g})$ gebeugt wird. In Richtung $\vec{K}(\vec{h})$ laufen somit zwei Wellen: die direkt an der Netzebene \vec{h} gebeugte Welle mit der Phase $\phi(\vec{h})$ und die an den Netzebenen \vec{g} und $\vec{h} - \vec{g}$ gebeugte Welle (Umwegwelle) mit der Phase $\phi(\vec{g}) + \phi(\vec{h} - \vec{g})$. Die resultierende Intensität aus der Interferenz der primär abgebeugten Welle mit der Umwegwelle hängt von deren Phasendifferenz ab:

$$\phi_{3\pm} = \pm[\phi(\vec{g}) + \phi(\vec{h} - \vec{g}) - \phi(\vec{h})], \quad \phi_{3+} = -\phi_{3-}. \quad (17)$$

Es zeigt sich, daß die Phasendifferenz $\phi_{3\pm}$ der Tripletphase ϕ_T entspricht. Die Tripletphase ist eine Strukturinvariante, d. h. sie ist unabhängig von der Wahl des Ursprungs, und somit eine meßbare Größe. Das bedeutet, daß Dreistrahlinterferenz-Experimente die experimentelle Bestimmung von Tripletphasen ermöglichen.

2.3.1 Bethe-Näherung

Durch die Verwendung der Bethe-Näherung können grundlegende Eigenschaften der Dreistrahlinterferenz-Profile und der Tripletphasen diskutiert werden.

Zur Vereinfachung sollen die $\vec{\pi}\vec{\sigma}$ -Skalarprodukte vernachlässigt werden, d. h. die Kopplung zwischen der Polarisationsrichtung $\vec{\pi}$ und $\vec{\sigma}$ ist aufgehoben. Im weiteren wird nur eine Polarisationsrichtung betrachtet. Das skalare Eigenwertsystem (Gleichung (14) und (15)) läßt sich somit vereinfachen zu:

$$\begin{pmatrix} R(\vec{0})^{-1} & \alpha_{0h}\chi(-\vec{h}) & \alpha_{0g}\chi(-\vec{g}) \\ \alpha_{0h}\chi(\vec{h}) & R(\vec{h})^{-1} & \alpha_{hg}\chi(\vec{h}-\vec{g}) \\ \alpha_{0g}\chi(\vec{g}) & \alpha_{hg}\chi(\vec{g}-\vec{h}) & R(\vec{g})^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \vec{D}(\vec{0}) \\ \vec{D}(\vec{h}) \\ \vec{D}(\vec{g}) \end{pmatrix} = 0 \quad (18)$$

mit dem Resonanzterm

$$R(\vec{h}_m)^{-1} = \left(\frac{k_0^2}{\vec{K}^2(\vec{h}_m)} - (1 - \chi(\vec{0})) \right) \approx \frac{\vec{K}^2(\vec{0}) - \vec{K}^2(\vec{h}_m)}{\vec{K}^2(\vec{h}_m)}. \quad (19)$$

Die α_{mn} sind geometrische Faktoren, die je nach Polarisation vom Skalarprodukt $\vec{\pi}_n\vec{\pi}_m$ oder $\vec{\sigma}_n\vec{\sigma}_m$ abhängen.

Um das Verhältnis $\vec{D}(\vec{h})/\vec{D}(\vec{0})$ zu bestimmen, wird der störungstheoretische Ansatz, die Bethesche–Potential–Methode (Bethe, 1928), verwendet. Die Amplitude $\vec{D}(\vec{g})$ läßt sich durch $\vec{D}(\vec{0})$ und $\vec{D}(\vec{h})$ ausdrücken. Durch Einsetzen der dritten Gleichung von Gleichung (18) in die zweite ergibt sich:

$$\frac{\vec{D}(\vec{h})}{\vec{D}(\vec{0})} = N^{-1}R(\vec{h}) \left(\alpha_{0h}\Gamma F(\vec{h}) + R(\vec{g})\alpha_{0g}\alpha_{hg}\Gamma^2 F(\vec{g})F(\vec{h}-\vec{g}) \right) = N^{-1}R(\vec{h})F_{\text{eff}} \quad (20)$$

$$\text{mit } N = 1 - \alpha_{hg}^2 (\Gamma F(\vec{h}-\vec{g}))^2 R(\vec{g})R(\vec{h}).$$

Gleichung (20) läßt sich folgendermaßen interpretieren: die Intensität im Dreistrahlfall ergibt sich aus der Intensität im Zweistrahlfall $\vec{D}_2(\vec{h})/\vec{D}(\vec{0}) = R(\vec{h})\alpha_{0h}\Gamma F(\vec{h})$ und einem Korrekturterm, der die Wechselwirkung mit dem Wellenfeld $\vec{D}(\vec{g})$ beschreibt.

Wenn $R(\vec{h})$ sehr klein ist, d. h. der reziproke Gittervektor \vec{h} erfüllt nicht die Beugungsbedingung, kann keine Intensität in Richtung von $K(\vec{h})$ beobachtet werden (selbst wenn ein weiteres Wellenfeld $D(\vec{g})$ angeregt ist), da die Beugungsbedingung von $\vec{K}(\vec{g})$ über $\vec{h}-\vec{g}$ in Richtung von $\vec{K}(\vec{h})$ nicht erfüllt ist. Daher ist es für die Beobachtung von Dreistrahlinterferenzen erforderlich, daß der reziproke Gittervektor \vec{h} während der Ψ -Drehung in der exakten Beugungsposition bleibt.

Der Resonanzterm $R(\vec{g})$ beschreibt die Amplitude und Phase der Umwegwelle und verursacht beim Durchgang des reziproken Gittervektors \vec{g} durch die Ewaldkugel einen Phasen Schub von 180° . In Abbildung 1 wird dies mit Hilfe der Ewald–Konstruktion gezeigt. Der Radius der Ewaldkugel ist gegeben durch $|\vec{K}(\vec{0})|$. Zu Beginn der Drehung liegt der Endpunkt von \vec{g} innerhalb der Ewaldkugel. Da $\vec{K}(\vec{g}) = \vec{K}(\vec{0}) + \vec{g}$ gilt, wird der Endpunkt des reziproken Gittervektors von innen nach außen durch die Ewaldkugel gedreht. Der Resonanzterm $R(\vec{g})$ ist positiv, solange $|\vec{K}(\vec{g})| < |\vec{K}(\vec{0})|$ erfüllt ist. Nähert sich \vec{g} der Ewaldkugel, wird der Nenner des Resonanzterms kleiner, der Resonanzterm und somit die Amplitude der Umwegwelle werden größer. Bei $|\vec{K}(\vec{g})| = |\vec{K}(\vec{0})|$, d. h. wenn der Endpunkt von \vec{g} auf der Ewaldkugel

liegt, erreicht die Amplitude den Maximalwert. Bei weiterer Ψ -Drehung entfernt sich der Endpunkt von \vec{g} von der Ewaldkugel nach außen, der Resonanzterm $R(\vec{g})$ und somit die Amplitude der Umwegwelle werden kleiner. Nun gilt $|\vec{K}(\vec{g})| > |\vec{K}(\vec{0})|$, der Resonanzterm $R(\vec{g})$ hat sein Vorzeichen geändert, dies entspricht dem Resonanzphasenschub von 180° . $R(\vec{g})$ ist eine Lorentzfunktion. Unter Berücksichtigung der Absorption sind die \vec{K} -Vektoren komplexe Größen. In Abbildung 5 sind die Amplitude und Phase des Resonanzterms $R(\vec{g})$ gezeigt.

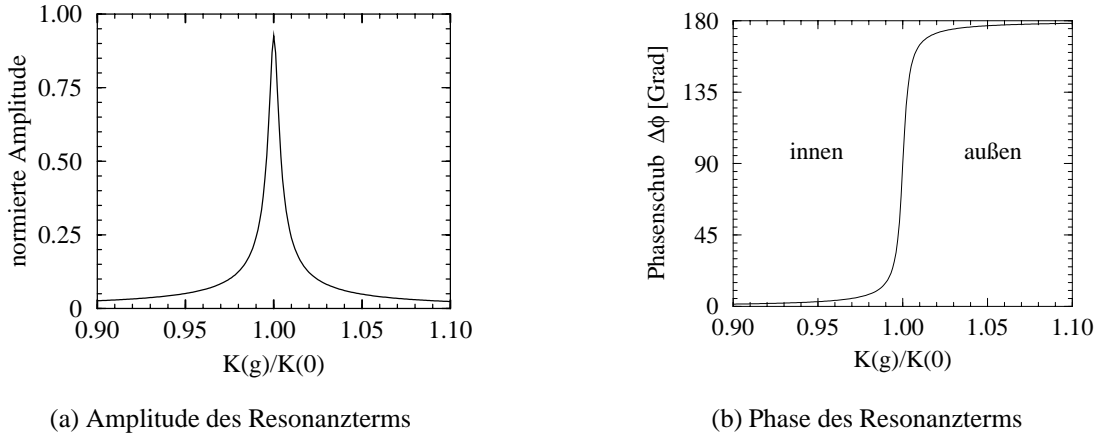


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Amplitude und Phase des Resonanzterms $R(\vec{g})$ beim Durchgang durch die Ewaldkugel.

Zur Nomenklatur: Dreistrahlintferenzprofile werden von „innen nach außen“ aufgetragen. $\Psi = 0$ entspricht der exakten geometrischen Dreistrahllage, für $\Psi < 0$ liegt der Endpunkt von \vec{g} innerhalb und für $\Psi > 0$ außerhalb der Ewaldkugel. Der Resonanzphasenschub $\Delta\phi$ geht dann von 0° nach 180° .

Die Eigenschaften der integrierten Dreistrahlintferenzprofile lassen sich aus Gleichung (20) ableiten. In erster Näherung, mit Ausnahme des Bereichs nahe der Dreistrahllage, kann $N \simeq 1$ angenommen werden (Juretschke, 1984). Näherungsweise ist die integrierte Intensität im Dreistrahlfall (F_{eff} : Definition siehe Gleichung (20)):

$$I_h(\Psi) \simeq |F_{\text{eff}}|^2. \quad (21)$$

Der Resonanzterm und die am Dreistrahlfall beteiligten Strukturfaktoren lassen sich zerlegen in Betrag und Phase:

$$R(\vec{g}) = |R_g(\Psi)| e^{i\Delta(\Psi)}, \quad (22)$$

$$F(\vec{h}_n) = |F(\vec{h}_n)| e^{i\phi(\vec{h}_n)} \quad \text{mit} \quad \vec{h}_n = \vec{h}, \vec{g}, \vec{h} - \vec{g}. \quad (23)$$

Die Intensität zweier interferierender Wellen mit den Amplituden A_1 und A_2 und den Phasen α_1 und α_2 wird durch den Kosinus von $\pm(\alpha_2 - \alpha_1)$ bestimmt:

$$I = |A_1 e^{i\alpha_1} + A_2 e^{i\alpha_2}|^2 = A_1^2 + A_2^2 + 2A_1A_2 \cos(\alpha_2 - \alpha_1). \quad (24)$$

Näherungsweise gilt für die integrierte Intensität im Dreistrahlfall:

$$I_h(\Psi) \simeq A_1^2 + A_2^2 + 2A_1A_2 \cos([\phi(\vec{g}) + \phi(\vec{h} - \vec{g}) + \Delta(\Psi)] - \phi(\vec{h})) \quad (25)$$

mit $A_1 = \alpha_{0h} \Gamma |F(\vec{h})|$, $A_2 = \alpha_{0h} \alpha_{hg} \Gamma^2 |R_g(\Psi)| |F(\vec{g})| |F(\vec{h} - \vec{g})|$.

Die Interferenz der primären Welle mit der Umwegwelle hängt somit von der gesamten Phasendifferenz $\phi_{tot}(\Psi) = \pm[\phi_{3+} + \Delta(\Psi)] = \mp[\phi_{3-} - \Delta(\Psi)]$ ab. Die integrierte Dreistrahlintensitat hängt also nicht nur vom Kosinus der Triplettphase, sondern auch vom Kosinus der gesamten Phasendifferenz $\phi_{tot}(\Psi)$ ab (Hümmer & Billy, 1982). Damit ist die integrierte Dreistrahlintensitat abhängig vom Vorzeichen von $|\phi_3|$ für $0 \leq |\phi_3| \leq 180^\circ$.

Die Resonanzphase $\Delta\phi(\Psi)$ wurde bei den Überlegungen von Lipscomb (1949) nicht berücksichtigt. Sie ist das Ergebnis der selbstkonsistenten, dynamischen Wechselwirkung. Der Resonanzphasenschub tritt auch im Zweistrahlfall auf, wenn der reziproke Gittervektor die Ewaldkugel durchläuft. Bragg-Beugung an einem Kristall entspricht einem räumlichen Resonanzphänomen (Ewald, 1917; Ewald, 1965). Der Resonanzterm gibt die Effizienz des Kristalls an, Energie von der einfallenden Welle $\vec{D}(\vec{0})$ zur abgebeugten Welle $\vec{D}(\vec{h})$ zu übertragen. Ist die Beugungsbedingung erfüllt, erreicht der Resonanzterm den Maximalwert. Dann stimmt die räumliche Periodizität der einfallenden Welle mit der räumlichen Periodizität des Kristallgitters überein.

Einige charakteristische Dreistrahlinterferenz-Profile sind in Abbildung 6 dargestellt. Diese wurden mit dem Programm *dreist* (Weckert & Hümmer, 1990) berechnet.

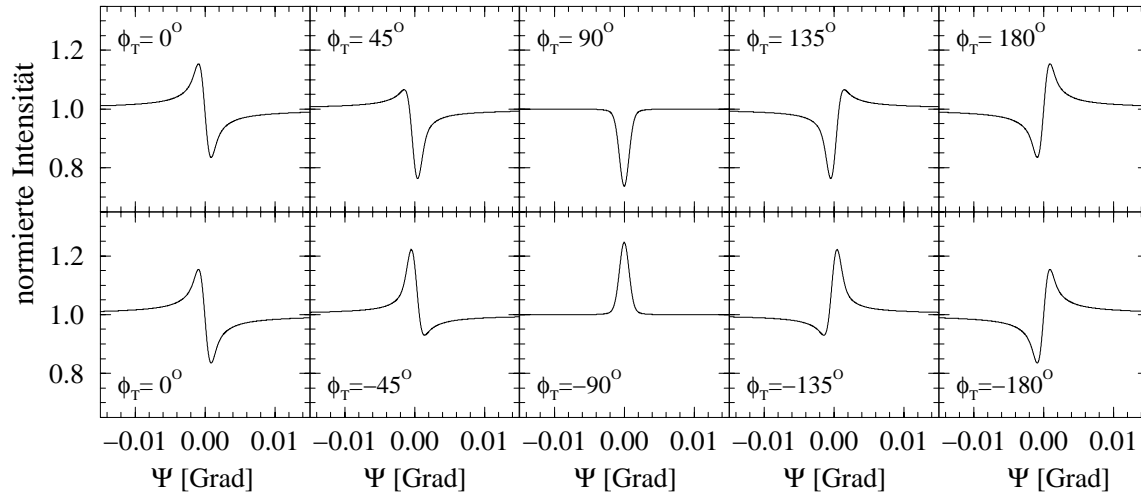


Abbildung 6: Verschiedene Dreistrahlinterferenz-Profile in Abhängigkeit von der Triplettphase; Zentrosymmetrisch korrelierte Dreistrahlfälle unterscheiden sich im Vorzeichen der Triplettphase ϕ_T .

2.3.2 Einfluß von Polarisierungseffekten

Die Wechselwirkung zwischen $\vec{\pi}$ - und $\vec{\sigma}$ -Polarisation wurde bisher vernachlässigt. Bei speziellen geometrischen Anordnungen kann durch Kopplung der Wellen verschiedener Pola-

risation ein weiterer Phasenschub um 180° auftreten (Schwegle, 1993). Dadurch wird die Asymmetrie der Dreistrahlintereferenz–Profile umgekehrt. Dieser Effekt wird als „anomale Asymmetrie“ bezeichnet.

Bei Proteinkristallen sind wegen der großen Gitterparameter die Beugungswinkel klein. Die Skalarprodukte $\vec{\pi}_0 \vec{\sigma}_h$ und $\vec{\sigma}_g \vec{\pi}_h$ der Kopplungsterme der Wellen mit verschiedener Polarisation sind beinahe gleich null, daher werden die Dreistrahlintereferenz–Profile nicht durch Polarisierungseffekte beeinflusst.

2.3.3 Einfluß der Beugungsgeometrie

Um eindeutige Interpretationen der experimentellen Dreistrahlintereferenz–Profile zu gewährleisten, muß der Einfluß der Beugungsgeometrie berücksichtigt werden. Der primäre sowie der sekundäre Reflex können sich sowohl in Bragg– als auch in Laue–Beugungsposition befinden (s. Abb. 7).

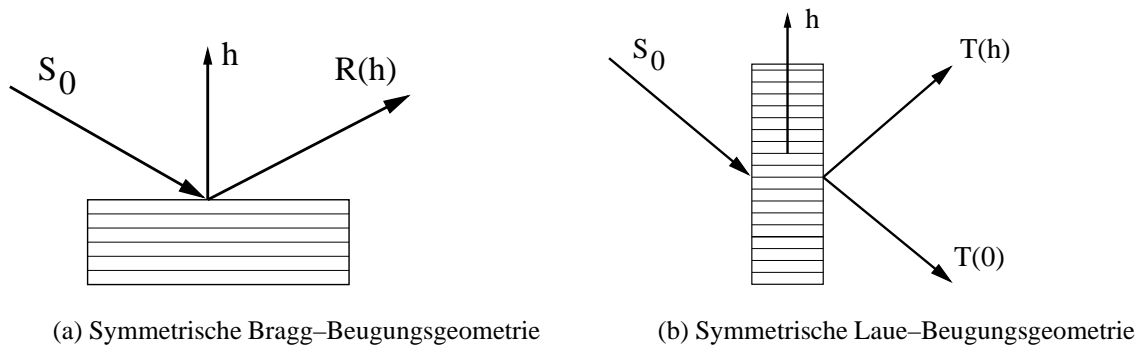


Abbildung 7: Zur Unterscheidung der beiden Beugungsgeometrien im Zweistrahlfall
Im Gegensatz zu Abbildung 2 sind nur die starken Wellenfelder eingezeichnet.

Wird der primäre Reflex in Bragg–Geometrie gebeugt, so ist der Einfluß der Beugungsgeometrie des sekundären Reflexes gering (Weckert, 1988). Wird der primäre Reflex in Laue–Geometrie gebeugt, so kann nur unter extremen geometrischen Bedingungen der sekundäre Reflex in Bragg–Geometrie gebeugt werden. Für Dreistrahlintereferenz–Experimente ist die Laue–Bragg–Beugungsgeometrie somit nicht relevant, es muß nur die Laue–Laue–Beugungsgeometrie berücksichtigt werden. In der Laue–Beugungsgeometrie wird das Dreistrahlintereferenz–Profil aufgrund der Pendellösungseffekte vom Verhältnis der Kristalldicke zur Extinktionslänge $\Lambda_B \approx \frac{2\pi}{k|\chi(\vec{h})|}$ beeinflusst. Diese Effekte treten nur auf, wenn die Kristalldicke größer als die Extinktionslänge ist.

Die Dreistrahlintereferenz–Experimente an Proteinkristallen werden aufgrund der kleinen Beugungswinkel meist in Laue–Beugungsgeometrie durchgeführt. Da bei Makromolekülkristallen die Strukturfaktorbeträge im Verhältnis zur Gesamtzahl der Elektronen pro Elementarzelle klein sind, liegt die Extinktionslänge in der Größenordnung von einigen Millimetern. Die untersuchten Proteinkristalle waren kleiner als $1,5 \times 1,5 \times 1,0 \text{ mm}^3$ und somit kleiner als die Extinktionslänge. Die Form der Interferenzprofile ist daher nahezu unabhängig von der Beugungsgeometrie und der Kristalldicke.

2.3.4 Phasenunabhängige Effekte: Umweganregung und Aufhellung

Der phasenunabhängige Energiefluß zwischen den Reflexen kann im Rahmen der kinematischen Theorie durch die Energie–Transfergleichungen (Moon & Shull, 1964; Zachariasen, 1967) unter Berücksichtigung der Energieerhaltung beschrieben werden. In der dynamischen Theorie sind diese Effekte durch die Randbedingungen selbstkonsistent enthalten (Weckert, 1988).

Unter Vernachlässigung von anomaler Dispersion unterscheiden sich zentrosymmetrische korrelierte Dreistrahlfälle nur im Vorzeichen der Tripletphase, die Strukturfaktorbeträge der beteiligten Reflexe sind gleich. Bei geeigneter Wahl von Strukturfaktoren, Wellenlänge, Kristalldicke und Beugungsgeometrie ergeben sich „Idealprofile“, bei denen sich die Interferenzeffekte des Dreistrahlfalls $I_h^{rel}(\Psi)_+$ und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $I_h^{rel}(-\Psi)_-$ gegenseitig aufheben (s. Abb. 6):

$$\Delta I(\Psi) = \frac{1}{2}[I_h^{rel}(\Psi)_+ + I_h^{rel}(-\Psi)_-] = 1 \quad (26)$$

Bei Mehrstrahlinterferenz–Experimenten können zusätzliche phasenunabhängige Effekte auftreten. $\Delta I(\Psi)$ ist dann nicht konstant. Ist $\Delta I(\Psi) < 1$, wird der Effekt *Aufhellung* genannt, bei $\Delta I(\Psi) > 1$ als *Umweganregung* bezeichnet.

Ist der Strukturfaktorbetrag des primären Reflexes \vec{h} kleiner als die Strukturfaktorbeträge des sekundären Reflexes \vec{g} und des Kopplungsreflexes $\vec{h} - \vec{g}$, wird ein Teil der Intensität des Reflexes \vec{g} über $\vec{h} - \vec{g}$ in den Reflex \vec{h} umgeleitet, und ein Anstieg der Intensität in Richtung von $K(\vec{h})$ ist zu beobachten. Der Effekt der Umweganregung wurde bereits von Renninger (1937) an Diamant nachgewiesen.

Umgekehrt wird bei einem primären Reflex \vec{h} , dessen Strukturfaktorbetrag größer ist als der Strukturfaktorbetrag des sekundären Reflexes \vec{g} , ein Teil der Intensität des Reflexes \vec{h} über $-(\vec{h} - \vec{g})$ in den Reflex \vec{g} umgeleitet. Der Intensitätsverlust des Reflexes \vec{h} kann nicht durch Intensität, die von \vec{g} über $\vec{h} - \vec{g}$ in den Reflex \vec{h} abgebeugt wird, ausgeglichen werden. Der Intensitätsverlust des Reflexes \vec{h} wird als *Aufhellung* bezeichnet, da sich bei Filmaufnahmen die Filmschwärzung des Reflexes \vec{h} verringert.

Jedes Dreistrahlinterferenz–Profil kann in ein phasenunabhängiges symmetrisches Profil (Umweganregungs– und Aufhellungseffekte) und ein „ideales Dreistrahlinterferenz–Profil“, das die Information über die Tripletphase enthält, zerlegt werden. Die Größe der Umweganregungs– oder Aufhellungseffekte für die zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfälle sind gleich, da die Strukturfaktorbeträge der beteiligten Reflexe gleich sind, sodaß eine Trennung der phasenabhängigen und phasenunabhängigen Beiträgen möglich ist. Im Experiment werden die beiden zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlinterferenz–Profile $(\vec{h} / \vec{g} / \vec{h} - \vec{g})$ und $(-\vec{h} / -\vec{g} / \vec{g} - \vec{h})$ aufgenommen, um Fehlinterpretationen der Tripletphase aufgrund der phasenunabhängigen Effekte auszuschließen.

3 Experimentelle Anordnung

3.1 Röntgenstrahlungsquellen

3.1.1 Drehanode

Am Institut für Kristallographie der Universität Karlsruhe steht eine Drehanode mit einer Kupfer- und einer Molybdänanode zur Verfügung. Der Fokus der Drehanode ist $0,3 \times 3 \text{ mm}^2$ und kann mit 5,4 kW belastet werden. Das Maximum der Röntgenstrahlung tritt unter einem Winkel von etwa 6° aus; dies führt zu einem effektiven Fokus von $0,3 \times 0,3 \text{ mm}^2$. Messungen werden mit der K_α -Linie des Röntgenspektrums durchgeführt. Die Drehanode dient als Röntgenstrahlungsquelle für ein Bildplattensystem und ein Ψ -Kreisdiffraktometer. Bei Messungen mit dem Diffraktometer wird die K_β -Linie, sowie ein Teil des Bremsspektrums mit Hilfe eines β -Filters (Mo-Anode: Zr-Filter; Cu-Anode: Ni-Filter) unterdrückt. Für Messungen mit dem Bildplattensystem wird ein Graphitmonochromator verwendet.

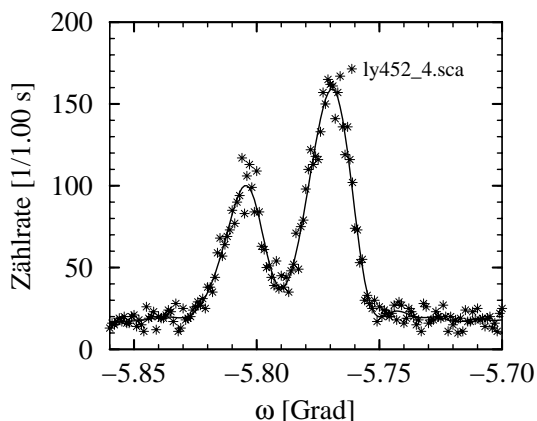
3.1.2 Synchrotronstrahlung

Die Synchrotronstrahlung zeichnet sich unter anderem durch ein kontinuierliches Wellenlängenspektrum aus, das eine freie Wahl der Wellenlänge ermöglicht. Die Brillanz² der Synchrotronstrahlung an einem Ablenkmagneten ist gegenüber der Strahlung einer Röntgenröhre etwa um den Faktor 1000 größer.

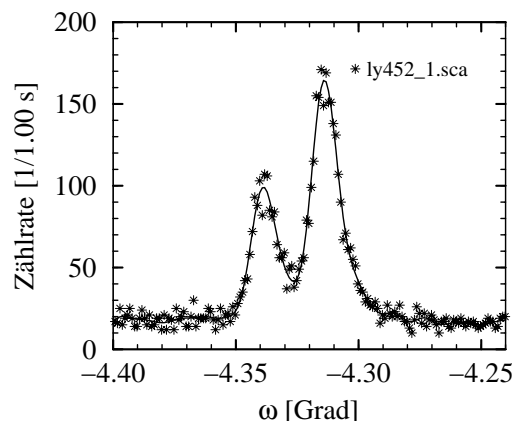
In den Jahren 1991/92 wurden bereits an dem Ablenkmagneten des Strahlrohrs C an DORIS II des Hamburger Synchrotron-Labors (HASYLAB) 74 Tripletphasen an Lysozymkristallen experimentell bestimmt (Weckert, Schwegle & Hümmer, 1993).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Messungen von Dreistrahlinterferenz-Profilen an Proteinkristallen an einem Ablenkmagneten am Schweiz.-Norwegischen Strahlrohr D1 (SNBL) der „European Synchrotron Radiation Facility“ (ESRF, Grenoble) durchgeführt. An diesem Strahlrohr befindet sich ein Zweikristallmonochromator mit fester Ausgangsstrahlhöhe. Als Monochromatorkristalle werden symmetrisch geschnittene Si(111)-Kristalle in nicht-dispersiver Anordnung verwendet. Die Halbwertsbreite des Elektronenstrahlquerschnitts an der ESRF beträgt etwa $0,3 \times 0,3 \text{ mm}^2$. Bei einem Abstand der Quelle zum Kristall von 47,5 m und einer Kristallgröße bzw. Primärstrahlblendengröße von 0,3 mm ergibt sich eine Divergenz von $0,0007^\circ \approx 2,6''$. Aus der intrinsischen Breite des Si(111)-Reflexes ergibt sich bei der Wellenlänge $\lambda = 1,0 \text{ \AA}$ die Energieauflösung zu $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 1,6 \cdot 10^{-4}$, sie beträgt etwas mehr als die Hälfte der natürlichen Breite der Cu K_α -Linie. Der zugängliche Wellenlängenbereich liegt zwischen 0,4 und 2,0 \AA . Die Einstellung der Wellenlänge erfolgt mit einer Genauigkeit kleiner als $1 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}$. Die Angabe der Wellenlänge bezieht sich auf einen Si-Eichkristall, der mit demselben Diffraktometer mit der Mo K_{α_1} - und Cu K_{α_1} -Linie geeicht wurde. Durch die geringe Divergenz und die hohe Energieauflösung kann die Breite der Reflexprofile bei einem perfekten Siliziumkristall kleiner als $0,001^\circ$ sein. Die Halbwertsbreite der untersuchten Proteinkristalle lagen im Bereich zwischen $0,002^\circ$ und $0,01^\circ$.

² $\left[\frac{\text{Photonen}}{(\text{s} \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{mrad}^2 \cdot \text{A} \cdot 0,1 \% \frac{\Delta\omega}{\omega})} \right]$

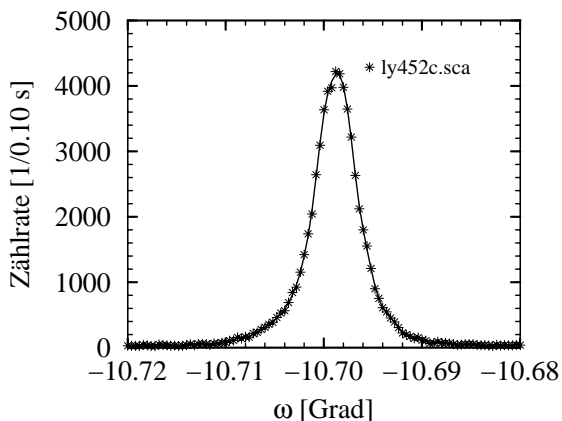


(a) Reflexprofil von (16 16 0)
Halbwertsbreite: $0,021^\circ$

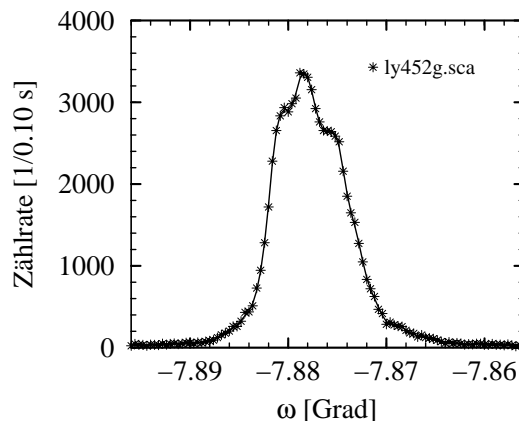


(b) Reflexprofil von (0 0 8)
Halbwertsbreite: $0,014^\circ$

Abbildung 8: ω -Reflexprofile von (16 16 0) und (0 0 8) des tetragonalen Lysozymkristalls ly452 gemessen an der Mo-Drehanode. Die Aufspaltung der Reflexe durch die K_{α_1} - und K_{α_2} -Linie ist zu beobachten.



(a) Reflexprofil von (16 16 0)
Halbwertsbreite: $0,0056^\circ$



(b) Reflexprofil von (0 0 8)
Halbwertsbreite: $0,0088^\circ$

Abbildung 9: ω -Reflexprofile von (16 16 0) und (0 0 8) des tetragonalen Lysozymkristalls ly452 gemessen an der ESRF bei der Wellenlänge $\lambda = 1,300 \text{ \AA}$. Die geringe Divergenz der Synchrotronstrahlung ermöglicht die Bestimmung der Mosaikverbreiterung auch bei nahezu perfekten Kristallen. Da Lysozymkristalle besserer Qualität ($\text{FWHM} = 0,003^\circ$) für die Dreistrahlinterferenz-Experimente zur Verfügung standen, wurden am Kristall ly452 nur 11 Tripletphasen bestimmt.

In Abbildung 8 sind zwei Reflexprofile vom Lysozymkristall ly452 gezeigt, die an der Mo–Drehanode gemessen wurden. Zum Vergleich sind in Abbildung 9 die entsprechenden Reflexprofile, die am Strahlrohr D1 ($\lambda = 1,300 \text{ \AA}$) aufgenommen wurden, dargestellt. Bei der Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen wird der Kristall auf das Maximum der abgebeugten Intensität positioniert. Voraussetzung für die Interpretierbarkeit der Dreistrahlinterferenz–Profile ist eine hohe Stabilität der gesamten Meßanordnung, da sonst eine Mittelung über die von zeitlichen Instabilitäten verursachten Schwankungen notwendig ist. Am Strahlrohr D1 zeigte sich, daß die Strahlungsquelle ausreichend stabil ist.

3.2 Bildplattensystem

Für die Intensitätsdatensammlung der Proteinkristalle stand ein Bildplattensystem der Firma *MAR–Research* mit der Steuerungs– und Auswertesoftware *marxds* (Kabsch, 1988) zur Verfügung. Die Bildplatte hat einen Durchmesser von 180 mm und eine Auflösung von 0,15 mm pro Bildpunkt. Der dynamische Bereich erstreckt sich über fünf Größenordnungen. Der Abstand Kristall–Detektor kann zwischen 70 und 430 mm variiert werden, die ϕ –Achse ist um 360° drehbar. Das Bildplattensystem ermöglicht eine schnelle Bestimmung der Orientierungsmatrix³ der Kristalle, bevor weitere Untersuchungen mit dem Ψ –Kreisdiffraktometer (an der Drehanode oder am Synchrotron) durchgeführt werden.

3.3 Ψ –Kreisdiffraktometer

Für die Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen ist ein Diffraktometer erforderlich, das eine Drehung um den Beugungsvektor, eine sogenannte Ψ –Drehung, mit hoher Genauigkeit ausführen kann. Mit einem 4–Kreis–Diffraktometer kann eine Ψ –Drehung nur aus Kombinationen der beiden Eulerwiegenkreise ϕ und χ und des ω –Kreises durchgeführt werden. Daher wurde ein spezielles Diffraktometer entwickelt, das durch die alleinige Drehung der Ψ –Achse eine Drehung um den Beugungsvektor ausführt. Am Institut für Kristallographie wurde für dieses Diffraktometer das Steuerprogramm *diff6* entwickelt (Weckert, Schroer, Hölzer, Zellner & Brennfleck, 1995).

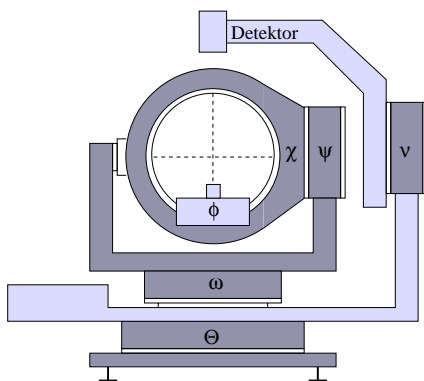


Abbildung 10: Ψ –Kreisdiffraktometer

Das Diffraktometer unterscheidet sich von einem 4–Kreisdiffraktometer durch die beiden zusätzlichen Kreise Ψ und v , die für die Untersuchung von Mehrstrahlinterferenzen erforderlich sind.

³Die Orientierungsmatrix beschreibt die Orientierung des Kristalls im Laborkoordinatensystem.

Bei der Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen wird zuerst mit den Eulerwiegenkreisen ϕ und χ der primäre reziproke Gittervektor \vec{h} auf die Ψ –Achse zentriert. Der Beugungswinkel ϑ_B wird mit dem ω –Kreis eingestellt. Durch Drehung des Ψ –Kreises wird auf die Ψ –Position des Dreistrahlfalls justiert. Die Beugungsebene des reziproken Gittervektors \vec{h} liegt in der horizontalen Ebene. Die beiden Detektorkreise Θ und ν stehen senkrecht zueinander. Um ein Reflexprofil von \vec{h} aufzunehmen, muß der Detektor mit Hilfe des Θ –Kreises auf die Beugungsposition gebracht werden. Während einer Ψ –Drehung um den reziproken Gittervektor \vec{h} ermöglichen die Kreise Θ und ν die Aufnahme eines Reflexprofils von \vec{g} . Am Detektorarm sind zwei Szintillationszähler angebracht. Für Zählraten bis zu 10^5 s^{-1} wird ein NaJ(Tl)–Szintillationszähler verwendet, für Zählraten bis zu 10^7 s^{-1} wird ein Plastikszintillationszähler (Zellner, 1996) eingesetzt.

Die Winkelauflösung der Kristallkreise ϕ und χ beträgt $0,0002^\circ$ (5000 Schritte/ 1°). Der ω –Kreis besitzt eine Winkelauflösung von $0,00005^\circ$ und der Ψ –Kreis von $0,0001^\circ$. Die Winkelauflösung der beiden Detektorkreise beträgt jeweils $0,001^\circ$.

3.4 Ablauf eines Dreistrahlinterferenz–Experiments

Für die Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen an Proteinkristallen ist aufgrund des geringen Streuvermögens und der Überlappung von Interferenzprofilen Synchrotronstrahlung erforderlich.

Die Strukturfaktorbeträge sind im Vergleich zur Gesamtzahl der Elektronen in einer Elementarzelle ($|F(\vec{h})|/F(\vec{0})$) klein. Bei tetragonalem Lysozym entsprechen die größten Strukturfaktorbeträge etwa 3 bis 5% des Gesamtstreuvermögens der Einheitszelle. Damit liegt die Extinktionslänge für die meisten Reflexe bei Proteinkristallen in der Größenordnung von Millimetern. Für die Dreistrahlinterferenz–Experimente an Proteinkristallen werden vor allem Reflexe mit großen Strukturfaktorbeträgen verwendet. Aufgrund des Formfaktorabfalls $f(\vec{h})$ und der bei Proteinkristallen großen Debye–Waller–Faktoren liegen diese Reflexe meistens im Bereich kleiner Beugungswinkeln. Daher werden die Dreistrahlinterferenz–Experimente an Proteinkristallen vorwiegend in Laue–Beugungsgeometrie durchgeführt.

Bedingt durch die großen Elementarzellen und die endliche apparative Auflösung kommt es zur Überlappung von Interferenzprofilen benachbarter Dreistrahlfälle. Daher muß durch geeignete Wahl der Wellenlänge der Einfluß von benachbarten Dreistrahlfällen minimiert werden. Dazu müssen bei der Messung des Interferenzprofils des Dreistrahlfalls ($\vec{h}/\vec{g}/\vec{h}-\vec{g}$) die Strukturfaktorbeträge $|F(\vec{g}')|$ und $|F(\vec{h}-\vec{g}')|$ aller reziproken Gittervektoren \vec{g}' und $\vec{h}-\vec{g}'$ für $\vec{g}' \neq \vec{g}$ klein gegenüber den Strukturfaktorbeträgen $|F(\vec{h})|$, $|F(\vec{g})|$ und $|F(\vec{h}-\vec{g})|$ der reziproken Gittervektoren \vec{h} und \vec{g} sein.

Zu Beginn eines Dreistrahlinterferenz–Experiments sind folgende Vorkenntnisse erforderlich.

- Möglichst kompletter Intensitätsdatensatz

Die Strukturfaktorbeträge aller Reflexe werden benötigt, um vor der Messung den Einfluß benachbarter Dreistrahlfälle ($\vec{h}/\vec{g}'/\vec{h}-\vec{g}'$) auf den zu messenden Dreistrahlfall

abzuschätzen. Da bei Intensitätsdatensammlungen mit Bildplattensystemen die Reflexe mit niedriger Auflösung ($10 \text{ \AA} < |\vec{h}|^{-1}$) oft im nicht zugänglichen Meßbereich liegen, müssen diese Reflexe mit einer Diffraktometermessung bestimmt werden.

- Gitterparameter

Die Ψ -Position der Dreistrahlfälle ist abhängig von Gitterparametern und Wellenlänge. Für die Berechnung der Ψ -Position des zu messenden Dreistrahlfalls und der Abstände von benachbarten Dreistrahlfällen muß die genaue Metrik bekannt sein. Bei Proteinen unterscheiden sich die Gitterparameter der Kristalle bei Verwendung unterschiedlicher Ausgangssubstanz deutlich.

- Orientierungsmatrix

Für Dreistrahlinterferenz-Experimente muß die exakte Richtung des primären Gittervektors \vec{h} bekannt sein. Der Aufwand zur Bestimmung der Richtung des primären Gittervektors \vec{h} wird durch eine genaue Orientierungsmatrix verringert.

Die Auswahl der geeigneten Wellenlänge für den zu messenden Dreistrahlfall sowie die Berechnung des Einflusses benachbarter Dreistrahlfälle (Abstand und normierte Amplitude der Umwegwelle q) erfolgen mit dem Programm `psiab` (Weckert, 1994) auf der Grundlage der Strukturfaktorbeträge und der Metrik.

- Der Einfluß von benachbarten Dreistrahlfällen kann vernachlässigt werden, wenn deren Ψ -Werte außerhalb des Intervalls $\Psi \pm \Delta\Psi$ liegen. Das Intervall $\Psi \pm \Delta\Psi$ ist abhängig von der Divergenz, dem Wellenlängenband der einfallenden Strahlung und der Mosaikverteilung des Proteinkristalls. Bei den durchgeführten Messungen am Strahlrohr D1 ergab sich für tetragonales Lysozym: $\Delta\Psi = \pm 0,02^\circ$.

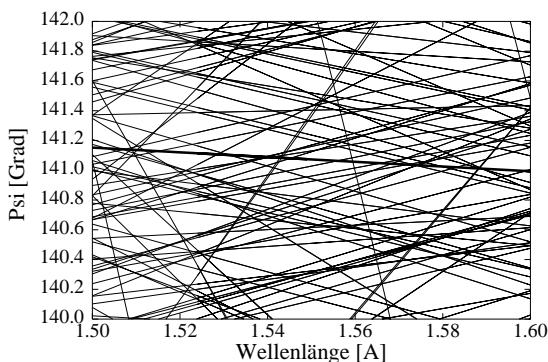


Abbildung 11: Dreistrahlpositionen als Funktion von ψ und λ für tetragonales Lysozym. Nur Dreistrahlfälle mit dem primären Gittervektor 470 und $q > 0,25$ sind eingezeichnet. Der Verlauf des Dreistrahlfalles $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ in Abhängigkeit der Wellenlänge wird durch die dicke Linie dargestellt.

- Innerhalb dieses Ψ -Intervalls kann der Effekt der benachbarten Dreistrahlfälle vernachlässigt werden, wenn für die normierte Amplitude der Umwegwelle q näherungsweise gilt:

$$q = \frac{|F(\vec{g}')| \cdot |F(\vec{h} - \vec{g}')|}{|F(\vec{g})| \cdot |F(\vec{h} - \vec{g})|} < 0,25. \quad (27)$$

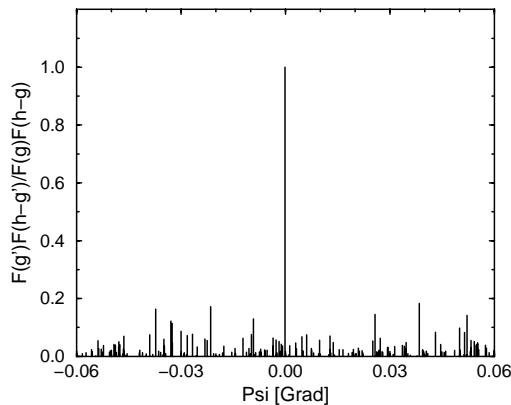


Abbildung 12: Normierte Amplituden der Umwegwelle q der benachbarten Dreistrahlfälle zum Dreistrahlfall $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ bei der Wellenlänge $\lambda = 1,3302 \text{ \AA}$ für tetragonales Lysozym aufgetragen über die Position. Bei der Berechnung der benachbarten Dreistrahlfälle wurden nur Reflexe bis zu einer maximalen Auflösung ($|\vec{h}|^{-1}$) von 2 \AA berücksichtigt.

- Phasenunabhängige Anteile (Umweganregung und Aufhellung) erschweren die Interpretation der Dreistrahlinterferenz–Profile, daher sollte das Verhältnis der Strukturformfaktorbeträge:

$$3 < \frac{|F(\vec{g})||F(\vec{h}-\vec{g})|}{|F(\vec{h})|^2} < 6 \quad (28)$$

entsprechen.

Die Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen wird vom Steuerungsprogramm `diff6` ausgeführt. Die einzelnen Schritte sind im folgenden aufgeführt.

- Die gewählte Wellenlänge wird am Monochromator eingestellt.
- Bestimmung der Beugungsposition für den primären Reflex \vec{h} beim Ψ –Wert des Dreistrahlfalls
Zentrierung des primären reziproken Gittervektors \vec{h} auf die Ψ –Achse mit den Kristallkreisen ϕ und χ . Mit dem ω –Kreis wird der reziproke Gittervektor \vec{h} in Beugungsposition gebracht. Ein Profil des primären Reflexes \vec{h} wird aufgenommen und gespeichert, und der Kristall wird auf das Maximum der abgebeugten Intensität zentriert.
- Bestimmung der Beugungsposition für den sekundären Reflex \vec{g}
Der Detektor wird mit den beiden Detektorkreisen θ und ν auf die Richtung des abgebeugten Strahls des sekundären Reflexes \vec{g} positioniert. Durch eine Ψ –Drehung um den Reflex \vec{h} wird das Maximum der abgebeugten Intensität bestimmt, dies entspricht der exakten Dreistrahlposition. Bei Kristallen mit ausgeprägtem Mosaikbau kann die Ψ –Abhängigkeit des Reflexprofils von \vec{g} das Dreistrahlinterferenz–Profil beeinflussen.
- Aufnahme des Dreistrahlinterferenz–Profils
Der Detektor wird wieder in die Richtung des abgebeugten Strahls des primären reziproken Gittervektors \vec{h} positioniert und die Intensität während der Ψ –Drehung um die zuvor bestimmte Dreistrahlposition aufgenommen. Das Ψ –Intervall hängt von Divergenz und Energieauflösung des Primärstrahls sowie vom Mosaikbau des Kristalls ab. Die Schrittweite für die Messung der Dreistrahlinterferenz–Profilen liegt zwischen $0,0001^\circ$ und $0,0005^\circ$.

- Um die phasenunabhängigen Beiträge Umweganregung und Aufhellung zu erkennen, wird das Dreistrahlinterferenz–Experiment für den zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfall $(-\vec{h} / -\vec{g} / \vec{g} - \vec{h})$ in gleicher Weise durchgeführt.

Bei der Auftragung der gemessenen Dreistrahlinterferenz–Profile ist zu den Meßpunkten eine Hilfslinie zur Orientierung eingezeichnet. Diese Linie ist die nach dem *generalized cross–validation*–Verfahren berechnete Glättungskurve (Craven & Wahba, 1979), die den wahrscheinlichsten Verlauf der experimentellen Daten darstellt.

3.5 Interpretation der Dreistrahlinterferenz–Profile

Vor allem bei nicht–zentrosymmetrischen Kristallstrukturen kann durch Umweganregungs– und Aufhellungseffekte die Interpretation der Dreistrahlinterferenz–Profile erheblich erschwert werden. Die phasenunabhängigen Effekte überlagern das Dreistrahlinterferenz–Profil. Der phasenabhängige Interferenzeffekt kann von den phasenunabhängigen Effekten getrennt werden, indem Messungen der Interferenzprofile der beiden zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfälle $(\vec{h} / \vec{g} / \vec{h} - \vec{g})$ und $(-\vec{h} / -\vec{g} / \vec{g} - \vec{h})$ durchgeführt werden.

Bei einer geeigneten Wahl der Strukturfaktorbeiträge, der Wellenlänge, des Kristallhabitus und der Beugungsgeometrie ist die in Kapitel 2.3.4 angegebene Gleichung (26) erfüllt:

$$\Delta I(\Psi) = \frac{1}{2}[I_h^{rel}(\Psi)_+ + I_h^{rel}(-\Psi)_+] = 1.$$

Da bei den Messungen von Dreistrahlinterferenzen an Proteinkristallen meist Bragg– und Laue–Beugungsgeometrien gleichzeitig auftreten, ist der exakte phasenunabhängige Beitrag zum Interferenzprofil nicht bestimmt. Eine quantitative Methode, die Tripletphase aus den Interferenzprofilen unter Einbeziehung der experimentellen Parameter zu bestimmen, wurde von Chang & Tang (1988) und Tang & Chang (1990) vorgeschlagen. Die Allgemeingültigkeit dieser Methode muß noch bewiesen werden.

Bei einem qualitativen Vergleich der Interferenzprofile zentrosymmetrisch korrelierter Dreistrahlfälle wird der Oktant der Tripletphase bestimmt. Dies entspricht einer Genauigkeit von 45° . Teilweise ermöglicht die Asymmetrie der Dreistrahlinterferenz–Profile eine genauere Einteilung. Um die gemessenen Dreistrahlinterferenz–Profile objektiv zu interpretieren, wurde das Programm *diff6triplet* (Hölzer, 1997) entwickelt. Für die Simulation der Interferenzprofile wird ein empirisches Modell gemäß Gleichung (29)

$$y = \frac{f \cdot h}{\frac{x^2}{b^2} + 1} \left[a - \sin\left(\arctan\left(\frac{4x}{b}\right) + \phi_T\right) \right]. \quad (29)$$

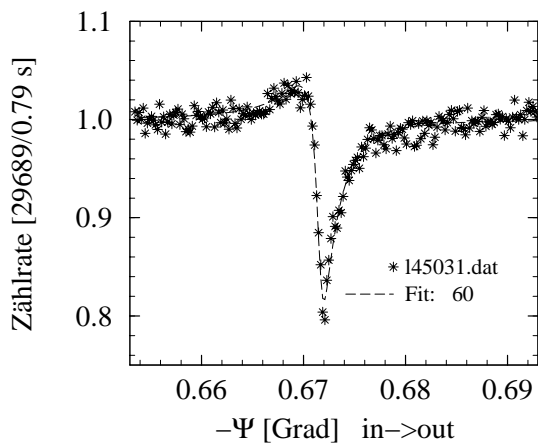
verwendet. Umweganregungs– oder Aufhellungseffekte werden im Parameter a berücksichtigt. Die Breite des Interferenzeffektes beschreibt der Parameter b . Den Maximalwert der Intensitätsänderung durch den Dreistrahlinterferenz–Effekt wird durch den Parameter h ausgedrückt. Es werden für die zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfälle die selben Werte für die Parameter a , b und h verwendet, der Faktor f beschreibt das Verhältnis der

Intensitätsänderung der beiden Dreistrahlfälle. Der Parameter x gibt die Ψ -Position der Dreistrahlinterferenz an. Ist der Kristall nicht exakt zentriert, kann die Ψ -Position der zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfälle unterschiedlich sein. Die Triplettphase ϕ_T wird in 15° -Schritten variiert, da das empirische Modell keine genauere Bestimmung der Triplettphase erlaubt. Darüber hinaus sollte der phasenunabhängige nicht wesentlich größer als der phasenabhängige Effekt sein. Grundsätzlich müssen für die experimentelle Bestimmung der Triplettphasen allzugroße phasenunabhängige Effekte vermieden werden. Die zu messenden Dreistrahlfälle wurden daher so ausgewählt, daß nur geringe Aufhellungs- oder Umweganregungseffekte auftraten.

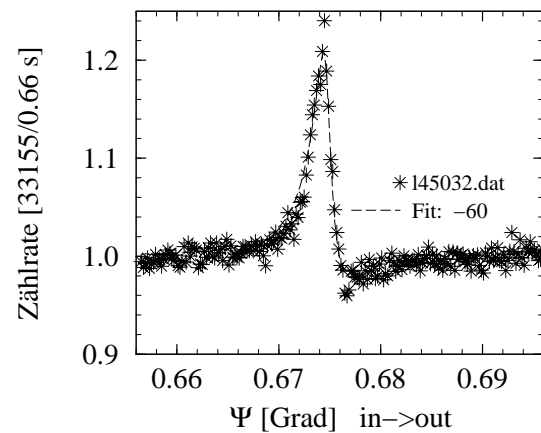
Das Programm `diff6triplet` liest die Meßdaten der beiden zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfälle ein, und Interferenzprofile werden unter Berücksichtigung beider Meßkurven angepaßt. Die Ergebnisse der Anpassung werden gespeichert. Auf diese Weise kann ein Liste mit Dateinamen und gegebenenfalls abgeschätzter Triplettphasen automatisch ausgewertet werden.

Für zwei Dreistrahlfälle sind in den Abbildungen 13 und 14 die experimentellen Dreistrahlinterferenzprofile an tetragonalem Lysozym und die zugehörigen simulierten Interferenzprofile (gestrichelte Linien) gezeigt. Bei bekannten Proteinstrukturen lassen sich aus Strukturmodellen der Protein-Datenbank (PDB; Bernstein et al., 1977) die Triplettphasen berechnen. Zur Berechnung der Triplettphasen von tetragonalem Lysozym wurde das PDB-Strukturmodell R193 (Vaney, Maignan, Riès-Kautt & Ducruix, 1996) verwendet.

Simulationen aller an Proteinkristallen gemessenen Dreistrahlinterferenzprofile wurden durchgeführt und die dabei erhaltenen Triplettphasen mit den durch visuelle Interpretation bestimmten Werten verglichen. Bei Abweichung von mehr als 30° zeigte sich bei einer Überprüfung der Dreistrahlinterferenzprofile beinahe immer eine fehlerhafte oder ungenaue visuelle Auswertung der Dreistrahlinterferenzprofile. In den übrigen Fällen konnte aufgrund des Mosaikbaus und der experimentellen Bedingungen (Stabilität des Primärstrahls, Oszillationen des Kristalls in der Kapillare) die Triplettphase nicht genauer bestimmt werden.

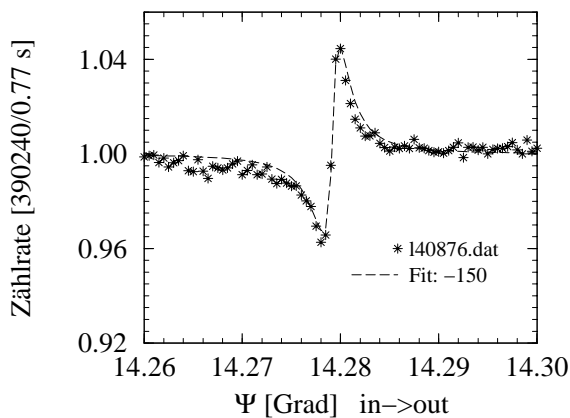


(a) Dreistrahlinterferenz–Profil von $15\bar{2}6/210/13\bar{3}6$ bei $\lambda = 1,2772 \text{ \AA}$

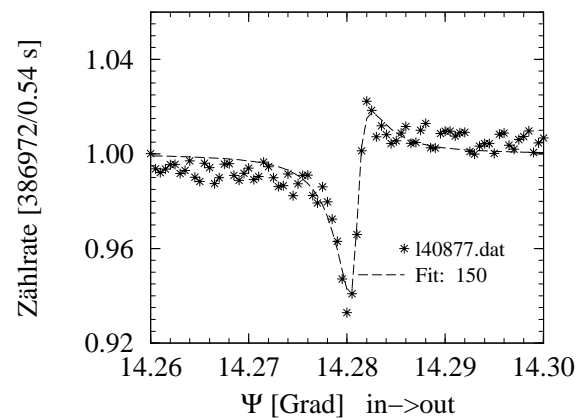


(b) Dreistrahlinterferenz–Profil von $\bar{1}526/2\bar{1}0/1\bar{3}36$ bei $\lambda = 1,2772 \text{ \AA}$

Abbildung 13: Interferenzprofil an tetragonalem Lysozym. Das simulierte Interferenzprofil ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Aus der Simulation ergibt sich die Tripletphase des Dreistrahlfalls $15\bar{2}6/210/13\bar{3}6$ zu $\phi_T = 60^\circ$. Die berechnete Tripletphase ist $\phi_T^{R193} = 68^\circ$.



(a) Dreistrahlinterferenz–Profil von $\bar{8}32/\bar{1}1\bar{1}/\bar{7}23$ bei $\lambda = 1,2934 \text{ \AA}$



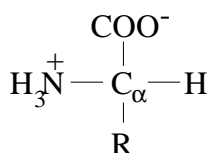
(b) Dreistrahlinterferenz–Profil von $8\bar{3}2/1\bar{2}1/7\bar{2}3$ bei $\lambda = 1,2934 \text{ \AA}$

Abbildung 14: Interferenzprofil an tetragonalem Lysozym. Aus der Simulation (gestrichelte Linie) ergibt sich die Tripletphase des Dreistrahlfalls $\bar{8}32/\bar{1}1\bar{1}/\bar{7}23$ zu $\phi_T = -150^\circ$. In diesem Dreistrahlinterferenz–Profil ist der Einfluß von Aufhellungseffekten zu sehen. Die berechnete Tripletphase ist $\phi_T^{R193} = -167^\circ$.

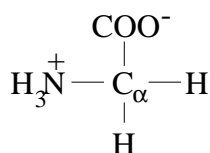
4 Experimentelle Bestimmung von Triplettphasen an Proteinkristallen

Proteine gehören zu den verbreitetsten biologischen Makromolekülen und sind an beinahe allen zellulären Prozessen beteiligt. Sie bauen Strukturen auf, katalysieren Reaktionen und erfüllen unzählige andere Aufgaben.

Alle Proteine sind aus nur 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, die kovalent zu charakteristischen linearen Sequenzen verbunden sind (Lehninger et al., 1994). Jede dieser proteinogenen Aminosäuren besitzt eine Carboxy- und eine Aminogruppe, die an das selbe Kohlenstoffatom (das α -Kohlenstoffatom) gebunden sind (s. Abb. 4). Sie unterscheiden sich durch ihre Seitenketten R (Reste), deren Struktur, Größe und elektrische Ladung variieren und damit u. a. auch ihre Wasserlöslichkeit. Wenn der Rest eine Kette mit zusätzlichen Kohlenstoffatomen enthält, werden diese, ausgehend vom α -Kohlenstoffatom, als β , γ , δ , etc., bezeichnet.



Aminosäure



Glycin

Abbildung 15: Allgemeine Struktur der proteinogenen Aminosäuren (links). Diese Struktur tritt bei allen Aminosäuren auf (mit Ausnahme von Prolin); sie unterscheiden sich nur in der Natur der Seitenkette R. Das α -Kohlenstoffatom ist im Zentrum der Aminosäure, R bezeichnet die Seitengruppe oder Seitenkette, die für jede Aminosäure spezifisch ist. Mit Ausnahme von Glycin (rechts), trägt das α -Kohlenstoffatom aller Aminosäuren vier verschiedene Substituenten.

Zur Unterscheidung von Aminosäuren, die nach dem Einbau in ein Protein modifiziert werden, sowie von vielen anderen Aminosäuren, die nicht in Proteinen vorkommen, sondern andere biologische Funktionen haben, werden die proteinogenen Aminosäuren auch Standard-, primäre oder normale Aminosäuren genannt. Den Standard-Aminosäuren wurden Drei-Buchstaben-Abkürzungen und Ein-Buchstaben-Symbole zugeordnet (siehe Tabelle 1). Mit dieser Kurzschrift werden Zusammensetzung und Sequenz von Proteinen angegeben.

Aminosäure	Abkürzungen	Aminosäure	Abkürzungen	Aminosäure	Abkürzungen
Glycin	Gly G	Serin	Ser S	Phenylalanin	Phe F
Alanin	Ala A	Threonin	Thr T	Tyrosin	Tyr Y
Valin	Val V	Cystein	Cys C	Tryptophan	Trp W
Leucin	Leu L	Methionin	Met M	Lysin	Lys K
Isoleucin	Ile I	Asparagin	Asn N	Arginin	Arg R
Prolin	Pro P	Glutamin	Gln Q	Histidin	His H
Glutamat	Glu E	Aspartat	Asp D		

Tabelle 1: Bezeichnung der 20 proteinogenen (Standard-)Aminosäuren

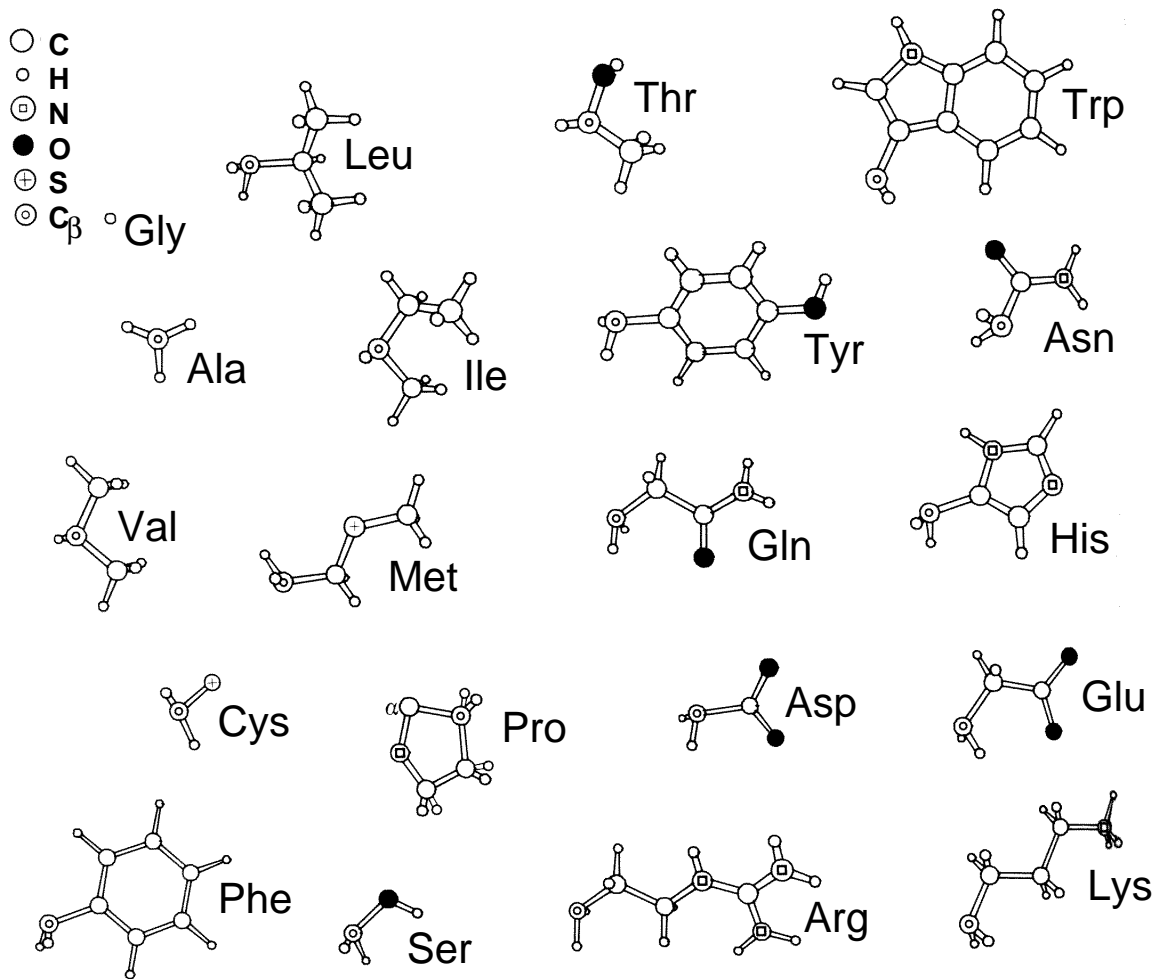


Abbildung 16: Die Reste R der 20 proteinogenen (Standard-) Aminosäuren (Giacovazzo et al., 1995)

Die Aminosäuren lassen sich in Klassen einteilen, die auf den Eigenschaften ihrer Seitenketten beruhen, insbesondere deren Polarität oder deren Tendenz, mit Wasser bei physiologischem pH-Wert (um pH 7,0) zu reagieren (Lehninger et al., 1994).

Unpolare, aliphatische Seitenketten: Die Kohlenwasserstoff-Seitenketten in dieser Klasse von Aminosäuren sind unpolar und hydrophob. Die unterschiedlich sperrigen Seitenketten von Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin sind für die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur wichtig. Glycin besitzt die einfachste Aminosäurestruktur. Ihr minimaler Raumbedarf ermöglicht in Proteinen größere strukturelle Flexibilität als andere Aminosäuren. Für Prolin gilt das Gegenteil, die sekundäre Aminogruppe wird in einer starren Konformation gehalten, die strukturelle Flexibilität des Proteins ist an dieser Stelle stark eingeschränkt.

Polare, ungeladene Seitenketten: Die Seitenketten von Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Asparagin und Glutamin sind wasserlöslicher bzw. hydrophiler als die der unpolaren Aminosäuren. Sie enthalten funktionelle Gruppen, die Wasserstoffbrückenbindungen mit

Wasser bilden können. Die Polarität von Serin und Threonin ist auf ihre Hydroxygruppe, die von Cystein und Methionin auf ihre Schwefelatome und die von Asparagin und Glutamin auf ihre Amidgruppe zurückzuführen. Cystein kann zu einer dimeren Form oxidieren, die als Cystin bezeichnet wird. In Cystin sind zwei Cysteinmoleküle durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Disulfidbrücken wirken stabilisierend auf die Proteinstruktur.

Aromatische Seitenketten: Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind mit ihren aromatischen Seitenketten relativ unpolar (hydrophob). Sie können an allen hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sein, die besonders stark sind, wenn die aromatischen Gruppen übereinander gestapelt vorliegen. Tryptophan, Tyrosin und in geringem Maß auch Phenylalanin absorbieren ultraviolettes Licht (280 nm).

Positiv geladene (basische) Seitenketten: Die Aminosäuren, deren Seitenketten bei pH 7,0 eine positive Nettoladung tragen, sind Lysin, mit einer zweiten Aminogruppe am ϵ -Kohlenstoffatom der aliphatischen Kette, Arginin, das eine positiv geladen Guanidino-Gruppe besitzt, und Histidin mit einer Imidazolgruppe.

Negativ geladene (saure) Seitenketten: Die Seitenketten von Aspartat und Glutamat tragen bei pH 7,0 eine negative Nettoladung. Jede trägt eine zweite Carboxylgruppe in der Seitenkette. Aspartat und Glutamat sind die Stammverbindungen von Asparagin bzw. Glutamin.

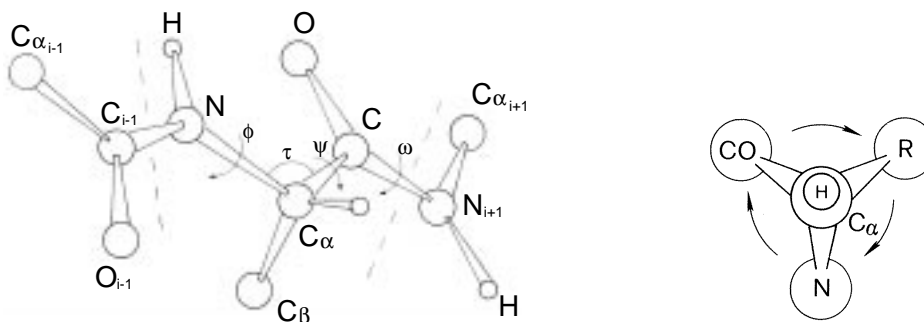


Abbildung 17: Schematischer Aufbau einer Polypeptidkette (Giacovazzo et al., 1995)

Die C_{α} -Atome sind in einer Polypeptidkette durch drei Bindungen voneinander getrennt (s. Abb. 17). Die $N-C_{\alpha}$ - und die $C_{\alpha}-C$ -Bindung besitzen Rotationsfreiheit, wobei die Rotation um diese Bindung mit den Winkeln ϕ und ψ gekennzeichnet ist. Die $C-N$ -Bindung der planaren Peptidgruppe hat keine Rotationsfreiheit. Die Rotationsfreiheit anderer Einfachbindungen kann, abhängig von Größe und Ladung des Restes R, ebenfalls behindert sein. Gemäß der Konvention sind die beiden Winkel ϕ und ψ als 0° definiert, wenn die beiden das C_{α} -Atom flankierenden Peptidbindungen in einer Ebene liegen. Diese Konformation ist aufgrund sterischer Behinderungen zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem α -Wasserstoff nicht möglich.

Die Beschreibung der Struktur von Proteinen läßt sich in vier Ebenen gliedern (Lehninger et al., 1994). Zur *Primärstruktur* gehören alle kovalenten Bindungen zwischen den Aminosäuren. Die Primärstruktur ist normalerweise durch die Sequenz der über Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren sowie durch die Lage der Disulfidbrücken definiert; sie gibt jedoch nicht die relative räumliche Anordnung der verbundenen Aminosäuren an. Polypeptidketten können nicht jede beliebige dreidimensionale Struktur einnehmen. Sterische Zwänge und viele schwache Wechselwirkungen bedingen, daß einige Anordnungen stabiler sind als andere. Unter der *Sekundärstruktur* werden regelmäßige, periodisch wiederkehrende räumliche Anordnungen benachbarter Aminosäurereste in einer Polypeptidkette verstanden. Die wichtigsten Typen von Sekundärstrukturen sind die α -Helix und die β -Faltblattstruktur. Als *Tertiärstruktur* wird die vollständige, dreidimensionale Struktur eines Polypeptids bezeichnet. Innerhalb der dreidimensionalen Struktur eines großen Proteins kommen häufig mehrere verschiedene Sekundärstrukturen vor. Proteine, die aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind, besitzen eine weitere Strukturebene, die sogenannte *Quartärstruktur*. Diese gibt die räumliche Anordnung der Polypeptidketten bzw. der Untereinheiten innerhalb des Proteins wieder.

4.1 Tetragonales Lysozym

Lysozym, ein in Eiweiß und in menschlichen Tränen vorkommendes Enzym, katalysiert die hydrolytische Spaltung von Polysacchariden in den schützenden Zellwänden einiger Bakterienfamilien (Lehninger et al., 1994). Lysozym trägt diesen Namen, weil es in der Lage ist, Bakterienzellwände zu lysieren, also abzubauen, und somit bakterizide Wirkung besitzt. 40 % seiner 129 Aminosäurereste liegen als α -helicale Abschnitte und ein geringer Anteil in β -Faltblatt-Konformation vor. Vier Disulfidbrücken tragen zur Stabilität der Struktur bei.

Kristallographische Daten:

- Raumgruppe $P4_32_12$
- $a = 79,1 \text{ \AA}$, $c = 37,9 \text{ \AA}$
- 1 Molekül pro asymmetrischer Einheit

Moleküldaten:

- Molekulargewicht⁴ 14,6 kDa
- 129 Aminosäuren
- 1001 Nicht-Wasserstoffatome

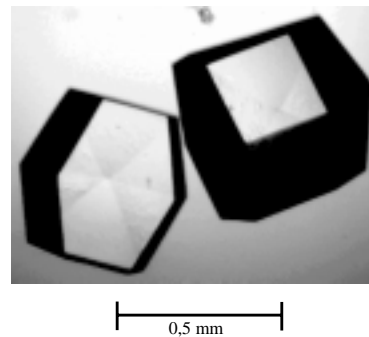


Abbildung 18: Tetragonale Lysozymkristalle

Bereits im Jahre 1946 wurden die ersten tetragonalen Lysozymkristalle von Alderton und Fevold gezüchtet. Die ersten Röntgenstrukturbestimmungen von Hühnereiweiß-Lysozym wurden an Kristallen des tetragonalen Kristallsystems durchgeführt (Blake et al., 1965).

⁴Das Molekulargewicht wird in Dalton angegeben. Ein Dalton entspricht dem Molekulargewicht eines Wasserstoffatoms $1 \text{ Da} = 1,6604 \cdot 10^{-24} \text{ g}$.

Darauf folgten Strukturbestimmungen an Kristallen von triklinen, monoklinen oder orthorhombischen Kristallsystemen mit unterschiedlicher Auflösung und bei verschiedenen Temperaturen und Drücken. In der Proteinkristallographie werden bei methodischen Untersuchungen oft Lysozymkristalle in den verschiedenen Modifikationen als Modellsubstanz verwendet.

Tetragonales Lysozym wurde gewählt, um an einem kleinen Protein eine Strukturbestimmung mit experimentell bestimmten Triplettphasen ab initio durchzuführen. Die Lysozymkristalle wurden nach dem *Hanging-Drop*-Verfahren gezüchtet ohne Aufreinigung der Proteinsubstanz (SIGMA, 1997, Cat. No L-6876, lot 64H7025). Die Größe der untersuchten Kristalle lag zwischen $0,7 \times 0,3 \times 0,2 \text{ mm}^3$ und $1,5 \times 1,0 \times 0,9 \text{ mm}^3$. Für die Messung von Dreistrahlinterferenz-Profilen müssen die Kristalle in eine luftdicht verschlossene Kapillare mit Mutterlösung gebracht werden.

4.1.1 Intensitätsdatensammlung

Ein möglichst vollständiger Intensitätsdatensatz wird benötigt, um den Einfluß der benachbarten Dreistrahlfälle auf den zu messenden Dreistrahlfall abzuschätzen. Daher wurden Datensätze mit unterschiedlichen Auflösungsbereichen aufgenommen (s. Tab. 2).

Ein Datensatz für den Auflösungsbereich von 19,8 bis 2,60 Å wurde am Institut für Kristallographie mit dem MAR-Research Bildplattensystem mit Cu K_{α} -Strahlung der Drehanode bei Raumtemperatur aufgenommen. Bei der Mittelung über symmetrisch äquivalente Reflexe ergeben sich aus den 54055 gemessenen Reflexen 3991 unabhängige Reflexe. Der interne R-Wert (s. Kap. 6.3.2) bezogen auf F^2 ergibt sich zu 2,5 %.

Die Datensätze bei niedriger Auflösung (lyso_3.hkl: 39,6 bis 6,79 Å; lyso_12.hkl: 55,5 bis 4,0 Å) wurden bei Raumtemperatur mit dem Ψ -Kreisdiffraktometer mit Mo K_{α} -Strahlung der Drehanode aufgenommen. Die Reflexprofile wurden nach dem Lehmann-Larsen-Verfahren (Lehmann & Larsen, 1974) ausgewertet. Dafür wurde das Programm `diff6xmgr` (Schroer, 1995) durch die Routine `leh-lar` (Hölzer, 1996) erweitert. Der Datensatz am Kristall lyso_3 umfaßt 1612 Reflexe. Der R_{int} -Wert der 187 unabhängigen Reflexe ist 2,7 %. Am Kristall lyso_12 wurde mehrmals eine Vollkugel des reziproken Raumes gemessen, um mögliche Fehler zu minimieren. Aus den insgesamt 17674 Reflexen ergeben sich 1060 unabhängige Reflexe mit einem R_{int} -Wert von 1,9 %.

Für den Auflösungsbereich von 1,34 bis 14,7 Å wurde von Vaney et al. (1996) der Intensitätsdatensatz R193LSF freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieser Datensatz wurde bei 279 K an dem Strahlrohr W32, LURE (Orsay) bei einer Wellenlänge von 0,901 Å mit dem MAR-Research Bildplattensystem aufgenommen. Der Datensatz setzt sich aus drei Teildatensätze (low, high und cusp) zusammen und umfaßt insgesamt 212432 gemessene Reflexe. Der Datensatz R193LSF enthält 24111 symmetrisch unabhängige Reflexe mit einem R_{int} -Wert von 4,9 %.

Bei der Mittelung über die verschiedenen Datensätze ergibt sich der Datensatz lyso_merge.hkl mit 24314 unabhängigen Reflexen und einem R_{int} -Wert von 9,2 % und R_{σ} -Wert von 6,5 %. Verschiedene Kristallisationsbedingungen für den Kristall des Datensatzes

R193LSF und die Kristalle lyso_1, lyso_3 und lyso_12 können Unterschiede in der Kristallstruktur bewirken. Des weiteren wurden die Datensätze bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen, die thermischen Auslenkungsparameter sind daher verschieden. Dies beides kann den großen R_{int} -Wert erklären.

Datensatz	Experimentelle Bedingungen			R_{max} [Å]	R_{min} [Å]	Anzahl der Reflexe		R_{int} [%]
						gemessen	unabhängig	
lyso_1.hkl	Cu K_{α}	IP	RT	19,8	2,60	54055	3991	2,5
lyso_3.hkl	Mo K_{α}	D6	RT	39,6	6,79	1612	187	2,7
lyso_12.hkl	Mo K_{α}	D6	RT	55,5	4,00	17674	1060	1,9
R193LSF	0,901 Å	IP	279 K	14,7	1,34	212432	24111	4,6
low				14,6	1,8	79862	10818	4,9
high				15,0	1,3	89323	22485	3,7
cuspl				14,6	1,3	43247	20543	3,5
lyso_merge.hkl				55,5	1,34		24314	9,2

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Datensätze. Die Datensätze lyso_1.hkl, lyso_3.hkl und lyso_12.hkl wurden an der Drehanode gemessen. Der Datensatz R193LSF wurde am Synchrotron aufgenommen (Vaney, Maignan, Riès-Kautt & Ducruix, 1996). Er setzt sich aus den Teildatensätze low, high und cuspl zusammen. IP steht für Bildplattensystem und D6 für das Ψ -Kreisdiffraktometer. RT kennzeichnet Messungen bei Raumtemperatur. Der Datensatz lyso_merge.hkl ergibt sich aus der Mittelung aller Datensätze.

4.1.2 Tripletphasen-Datensammlung

Die ersten Dreistrahlinterferenz-Profilen an tetragonalem Lysozym wurden bereits 1991 am HASYLAB aufgenommen (Weckert, Schwegle & Hümmel, 1993). Für die Strukturlösung, basierend auf experimentell bestimmten Tripletphasen, wurden insgesamt 847 Tripletphasen an 23 verschiedenen Kristallen bestimmt, davon an der ESRF 775 Tripletphasen an 17 Kristallen. Eine Aufstellung der Anzahl der Tripletphasen pro Kristall und der Gitterparameter der einzelnen Kristalle ist in Tabelle 3 gegeben.

Die Kristalle lassen sich aufgrund ihrer Gitterparameter in drei Gruppen einteilen. Das Kristallwachstum ist von der Proteinsubstanz abhängig. Die erste Gruppe bilden die Kristalle, die bis 1994 gezüchtet wurden. Das Kristallvolumen und der Gitterparameter a sind kleiner, der Gitterparameter c jedoch größer. Eine Ausnahme bildet der Kristall ly29, dessen Gitterparameter eine Einteilung in die zweite Gruppe erfordern. Die nach 1994 gezüchteten Kristalle, mit Ausnahme von lsg2 und lsg3, bilden die zweite Gruppe. Geringe Unterschiede der Gitterparameter innerhalb der Gruppe sind mit verschiedenen Lieferungen der Proteinsubstanz korreliert. Die dritte Gruppe bilden die Kristalle lsg2 und lsg3, die unter Mikrogravitation gezüchtet wurden (Snell et al., 1995). Die Proteinsubstanz und die Kristallisationsbedingungen sind unterschiedlich. Obwohl die Gitterparameter a und c Unterschiede aufzeigen, stimmt das Kristallvolumen mit den Kristallen der zweiten Gruppe überein.

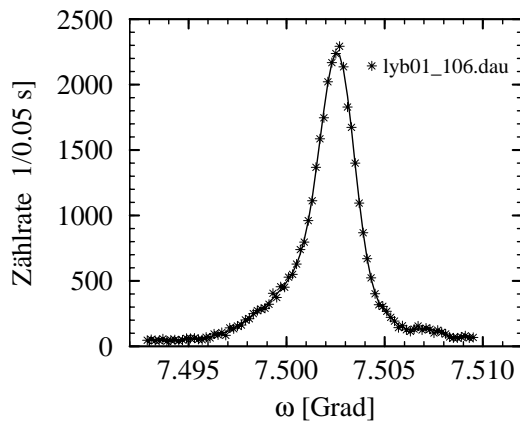
	a [Å]	c [Å]	V [Å ³]	Anzahl der ϕ_T	Größe [mm ³]		
ly19	78,883	38,060	236829	25		11/91	HASYLAB
ly20	78,883	38,054	236792	6		11/91	HASYLAB
ly29	79,224	37,924	238028	11		11/91	HASYLAB
ly32	78,903	38,019	236694	15		07/92	HASYLAB
ly25	78,731	38,233	236990	4		11/92	HASYLAB
ly30	78,865	38,041	236603	13		11/92	HASYLAB
ly419	79,165	37,977	238006	9	-	12/94	ESRF
ly408	79,182	37,979	238120	60	1,1×0,7×0,6	01/95	ESRF
lsg2 (MG)	79,101	38,013	237846	14	1,2×1,0×0,6	01/95	ESRF
lsg3 (MG)	79,070	38,051	237897	16	1,0×0,9×0,6	01/95	ESRF
ly450	79,181	37,948	237920	51	-	07/95	ESRF
ly451	79,255	37,926	238227	39	1,0×0,8×0,6	07/95	ESRF
ly452	79,216	37,931	238024	11	1,0×0,8×0,4	07/95	ESRF
ly457	79,199	37,963	238122	68	1,2×0,9×0,3	07/95	ESRF
ly461	79,197	37,959	238085	3	1,0×0,6×0,4	07/95	ESRF
ly465	79,203	37,956	238102	32	0,7×0,3×0,2	07/95	ESRF
ly490	79,245	37,884	237903	70	-	11/95	ESRF
ly491	79,239	37,881	237848	148	-	11/95	ESRF
ly4a	79,212	37,949	238113	20	1,5×1,0×0,9	02/96	ESRF
ly4b	79,187	37,940	237906	88	-	05/96	ESRF
ly4c3	79,217	37,929	238017	50	0,5×0,3×0,3	02/97	ESRF
ly4c7	79,160	37,985	238026	51	1,0×0,8×0,2	02/97	ESRF
ly4c8	79,170	37,990	238117	45	0,7×0,4×0,3	02/97	ESRF

Tabelle 3: Verteilung der gemessenen Tripletphasen pro Kristall

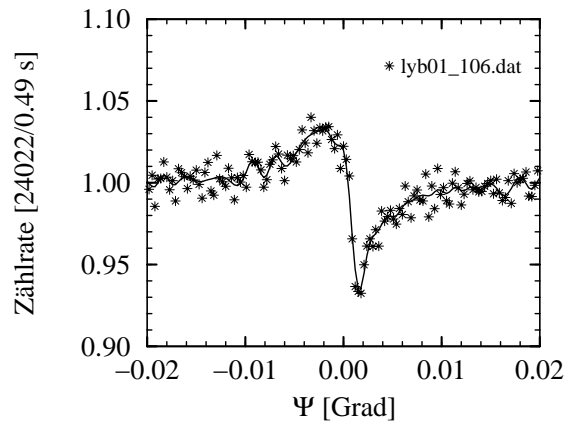
Die Gitterparameter können mit einer Genauigkeit besser als 0,02 Å bestimmt werden. Die Abweichung der Gitterparameter ist auf unterschiedliche Proteinsubstanz zurückzuführen. Deutlich ist der Unterschied zwischen den Kristallen, die bis 1992 und denen, die anschließend gezüchtet wurden. Die unter Mikrogravitation (MG) gezüchteten Kristalle lsg2 und lsg3 zeigen unterschiedliche Gitterparameter a und c, während das Kristallvolumen unverändert ist. Ohne die MG-Kristalle ergeben sich die Mittelwerte der Gitterparameter der Kristalle, die an der ESRF gemessen wurden, zu $\bar{a} = 79,202(29)$ Å, $\bar{c} = 37,946(33)$ Å und $\bar{V} = 238036(105)$ Å³.

In Abbildung 19 sind experimentelle Dreistrahlinterferenz–Profile von tetragonalen Lysozymkristallen dargestellt. Um Einflüsse von Umweganregung oder Aufhellung zu erkennen, müssen für die experimentelle Bestimmung der Tripletphase die Interferenzprofile der beiden zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfälle verglichen werden. Die tetragonalen Lysozymkristalle sind nahezu perfekte Kristalle, dies spiegelt sich in den geringen Halbwertsbreiten der Reflexprofile (0,003°) wider.

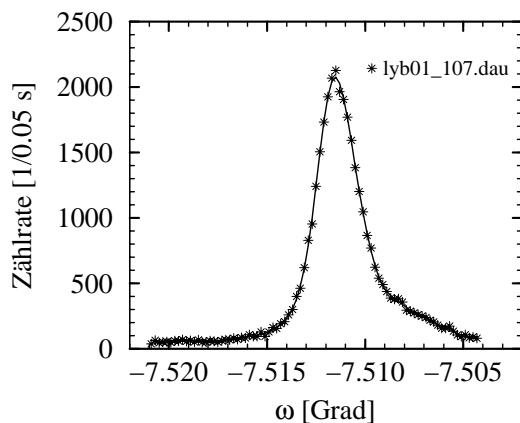
Zu Beginn der Messungen war die Halbwertsbreite der Reflexprofile der verwendeten Kristalle zwischen 0,002° und 0,01°. Im Laufe der Messungen nahm durch den Einfluß der Strahlenschäden die Halbwertsbreite zu (s. Kap. 4.1.3) und die erforderliche Meßzeit pro interpretierbarem Dreistrahlinterferenz–Profil stieg an. Unter günstigen Bedingungen können



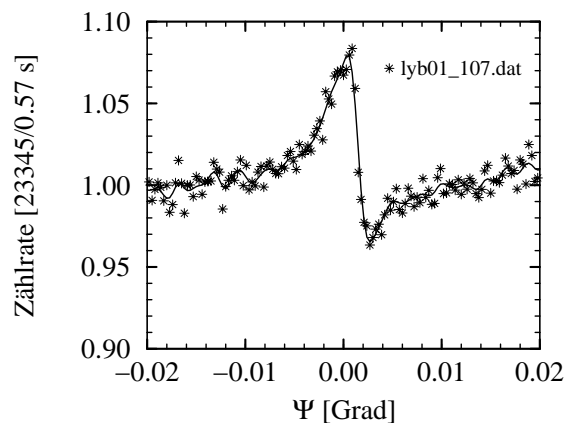
(a) Reflexprofil von $(\bar{7}96)$
Halbwertsbreite: $0,0024^\circ$



(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $\bar{7}96/521/275$ bei $\lambda = 1,2104 \text{ \AA}$



(c) Reflexprofil von (796)
Halbwertsbreite: $0,0026^\circ$



(d) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $796/521/275$ bei $\lambda = 1,2104 \text{ \AA}$

Abbildung 19: Interferenzprofile an tetragonalem Lysozym vom Dreistrahlfall $\bar{7}96/521/275$ und vom zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfall $796/521/275$, sowie Reflexprofile von $(\bar{7}96)$ und (796) . Die Tripletphase von $\bar{7}96/521/275$ ist auf $\phi_T = 45^\circ$ abgeschätzt. Die berechnete Tripletphase ergibt sich zu $\phi_T^{R193} = 20^\circ$ (Vaney, Maignan, Riès-Kautt & Ducruix, 1996).

an einem Lysozymkristall fünf Tripletphasen pro Stunde und etwa 150 Tripletphasen pro Kristall bestimmt werden.

Die mittlere Tripletphasendifferenz zum Strukturmodell R193 aus der Protein-Datenbank (PDB) beträgt $19,9^\circ$. Teilweise treten Abweichungen zwischen den gemessenen und berechneten Tripletphasen bis zu 180° auf. Vor allem Dreistrahlfälle, an denen Reflexe mit niedrigem Strukturfaktorbetrag oder niedriger Auflösung beteiligt sind, zeigen große Differenzen zwischen den experimentell bestimmten und den berechneten Werten der Tripletphase. Bereits die Tripletphasen der verschiedenen PDB-Strukturmodelle des tetragonalen

Lysozymben zeigen untereinander Tripletphasendifferenzen bis zu 180° . Interferenzprofile einiger Dreistrahlfälle wurden an verschiedenen Kristallen gemessen. Beim Vergleich dieser Interferenzprofile ergeben sich Abweichungen von maximal $\pm 20^\circ$. Damit zeigt sich, daß die Dreistrahlinterferenz–Profile an Proteinkristallen nahezu unabhängig von der Beugungsgeometrie und der Kristallgröße sind.

4.1.3 Strahlenschäden

Seit Beginn der Proteinkristallographie ist die Schädigung der Kristallstruktur durch Röntgenstrahlung ein Problem, trotzdem gibt es hierzu nur wenige systematische Untersuchungen.

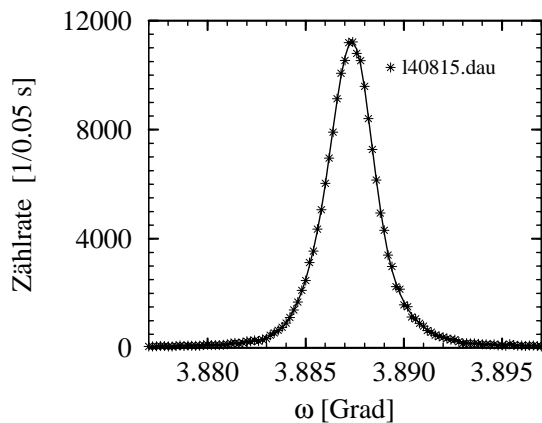
Untersuchungen bei Raumtemperatur haben gezeigt, daß für die Strahlenschäden der Proteinkristalle zwei Komponenten verantwortlich sind (Garman & Schneider, 1997). Die einfallenden Röntgenphotonen setzen Elektronen frei und schädigen unmittelbar die Moleküle, indem sie chemische Reaktionen auslösen. Dies ist die dosisabhängige Komponente der Strahlenschädigung. Bei einer Energie von 8 keV ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) werden pro absorbiertem Photon schätzungsweise 100 Elektronen freigesetzt (Henderson, 1990).

Die zeitabhängige Komponente steht im Zusammenhang mit dem relativ hohen Anteil von Wasser in Kristallen biologischer Makromoleküle (Matthews, 1968). Dieses „Kristallwasser“ ist die Quelle der Radikale, die entweder direkt aus der Spaltung der Wassermoleküle oder durch Reaktionen der Wassermoleküle mit den freien Radikalen hervorgehen. Diese Radikale (Hydroxyl, Hydroperoxyl und Sauerstoff) reagieren mit den Proteinmolekülen. Ihre Reaktion kann von lokaler Schädigung bis zur vollständigen Zersetzung des Proteinmoleküls reichen. Das „Kristallwasser“ erleichtert zusätzlich die Diffusion der Radikale und schädigt selbst entfernte Bereiche des Kristalls. Durch die intensive Röntgenstrahlung wird der Kristall erwärmt, die Diffusionsgeschwindigkeit erhöht sich und die Strahlenschädigungsrate steigt an. Die Erzeugung der Radikale und die Diffusionsgeschwindigkeit variieren bei jedem System, daher ist keine Vorhersage für die Schädigungsrate verschiedener Kristalle möglich (Garman & Schneider, 1997).

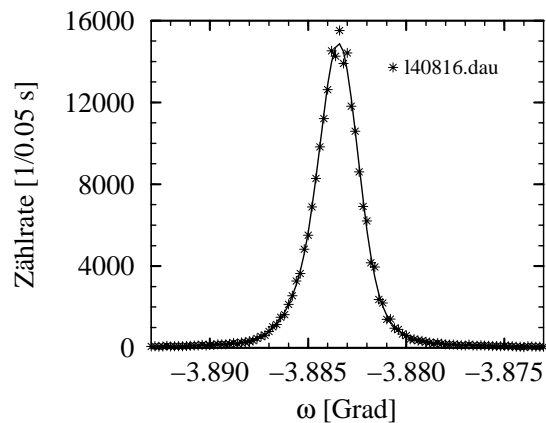
Bei Röntgenstrukturuntersuchungen können die primären Strahlenschäden, erzeugt durch die einfallenden Photonen, nicht vermieden werden. Die sekundären Strahlungsschäden können reduziert werden, indem die Beugungsexperimente bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden, da sich bei niedriger Temperatur die Diffusionsgeschwindigkeit verringert. In Kapitel 7 werden Experimente mit Proteinkristalle bei tiefen Temperaturen vorgestellt.

Im Beugungsexperiment zeigen sich die Strahlenschäden in abnehmender Integralintensität verbunden mit einer Verbreiterung der Reflexprofile. Die Auswirkungen auf die Reflexprofile sind in den Abbildungen 20 und 21 verdeutlicht.

Bei den Dreistrahlinterferenz–Experimenten, die hohe Anforderung an die Kristallqualität stellen, macht sich die Schädigung in der Größe des Interferenzeffektes bemerkbar. Die Größe des Interferenzeffektes reagiert auf die geschädigte Kristallstruktur empfindlicher als die Breite der Reflexprofile. Der Einfluß der Strahlenschäden ist an einem Referenzdreistrahlfall in den Abbildungen 22 und 23 gezeigt. Innerhalb von 36 Stunden hat sich die Größe des Interferenzeffektes um 50 % verringert. Um die Kristallqualität zu

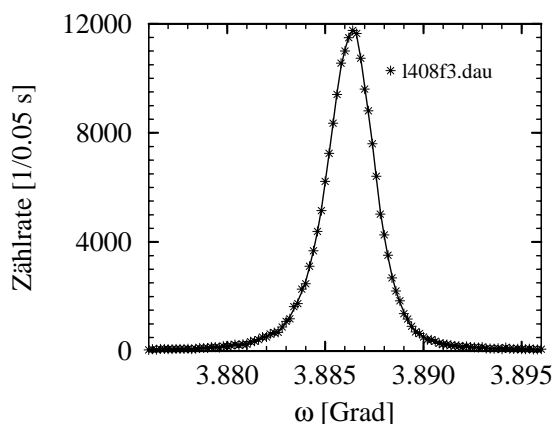


(a) Reflexprofil von $(\bar{7}40)$:
 Halbwertsbreite: $0,003^\circ$,
 normierte maximale Zählrate: 11200/0,05 s,
 normierte Integralintensität: 26500

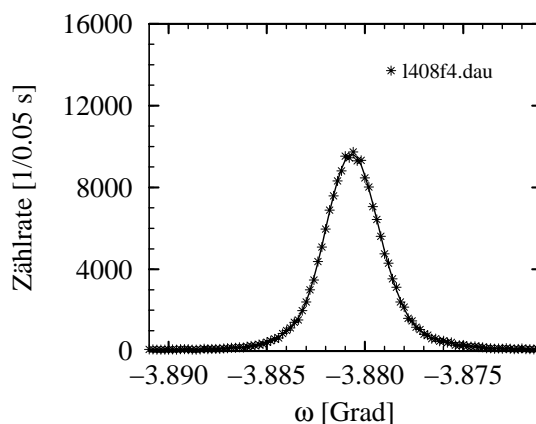


(b) Reflexprofil von $(7\bar{4}0)$:
 Halbwertsbreite: $0,0026^\circ$,
 normierte maximale Zählrate: 14800/0,05 s,
 normierte Integralintensität: 31500

Abbildung 20: Zu Beginn der Messungen: Reflexprofile von $(\bar{7}40)$ und $(7\bar{4}0)$. Die Intensität wurde auf die Monitorzählrate normiert.

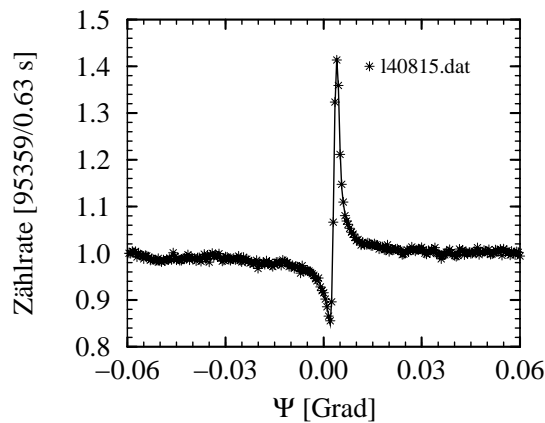


(a) Reflexprofil von $(\bar{7}40)$:
 Halbwertsbreite: $0,003^\circ$,
 normierte maximale Zählrate: 9200/0,05 s,
 normierte Integralintensität: 21300

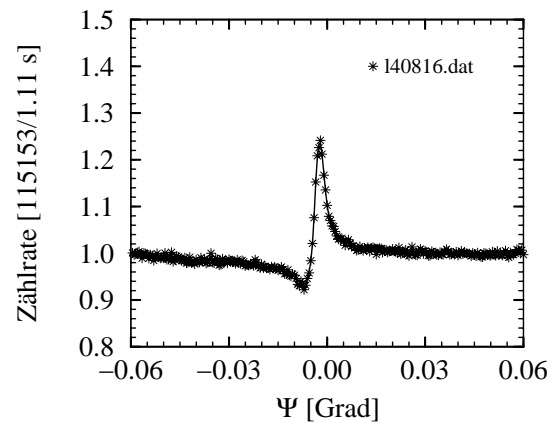


(b) Reflexprofil von $(7\bar{4}0)$:
 Halbwertsbreite: $0,0036^\circ$,
 normierte maximale Zählrate 7500/0,05 s,
 normierte Integralintensität 20100

Abbildung 21: Nach 36 Stunden Bestrahlung: Reflexprofile von $(\bar{7}40)$ und $(7\bar{4}0)$. Die Intensität wurde auf die Monitorzählrate normiert. Eine Verbreiterung des Reflexprofils von $(7\bar{4}0)$ ist zu beobachten. Durch die Strahlenschäden nimmt die Breite der Mosaikverteilung zu, und die normierte Integralintensität wird kleiner.

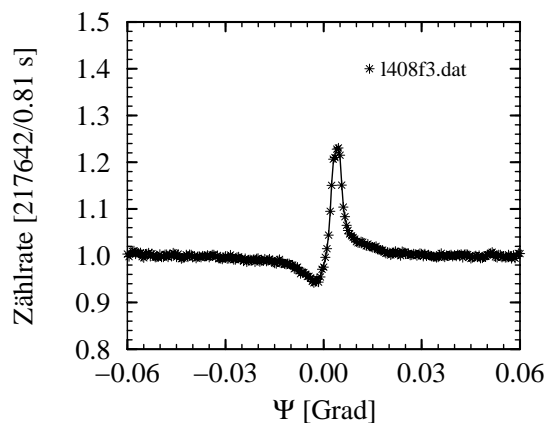


(a) Dreistrahlinterferenz-Profil von $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ bei $\lambda = 1,3302 \text{ \AA}$. Die Intensitätsänderung durch den Interferenzeffekt beträgt etwa 60 %.

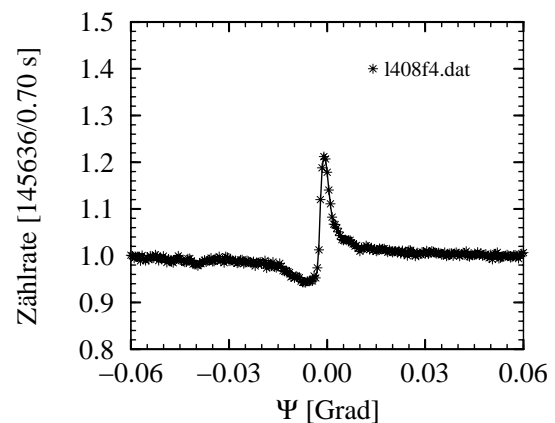


(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von $7\bar{4}0/5\bar{2}\bar{1}/2\bar{2}1$ bei $\lambda = 1,3302 \text{ \AA}$. Die Intensitätsänderung durch den Interferenzeffekt beträgt etwa 35 %.

Abbildung 22: Zu Beginn der Messungen: Interferenz-Profil des Dreistrahlfalls $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $7\bar{4}0/5\bar{2}\bar{1}/2\bar{2}1$. Die Tripletphase von $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ ist unter Berücksichtigung von Umweganregung auf $\phi_T = 180^\circ$ abgeschätzt. Die berechnete Tripletphase ergibt sich zu $\phi_T^{R193} = 173^\circ$



(a) Dreistrahlinterferenz-Profil von $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ bei $\lambda = 1,3302 \text{ \AA}$. Die Intensitätsänderung durch den Interferenzeffekt beträgt nur noch 30 %.



(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von $7\bar{4}0/5\bar{2}\bar{1}/2\bar{2}1$ bei $\lambda = 1,3302 \text{ \AA}$. Die Intensitätsänderung durch den Interferenzeffekt beträgt nur noch 28 %.

Abbildung 23: Nach 36 Stunden Bestrahlung: Interferenzprofil des Dreistrahlfalls $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $7\bar{4}0/5\bar{2}\bar{1}/2\bar{2}1$. Der Interferenzeffekt beim Dreistrahlfall $\bar{7}40/\bar{5}21/\bar{2}2\bar{1}$ nimmt innerhalb von 36 Stunden um 50 % ab.

überprüfen, wird bei Triplettphasen–Datensammlungen in bestimmten Zeitabständen ein Referenzdreistrahlfall gemessen. Am Strahlrohr D1 der ESRF konnten Triplettphasen–Datensammlungen an Lysozym maximal 48 Stunden pro Kristall durchgeführt werden.

4.2 Triklines Lysozym

Im Jahr 1959 gelang Steinrauf die Züchtung von Lysozymkristallen der triklinen Modifikation. Ausgehend vom Strukturmodell der tetragonalen Modifikation wurde eine Röntgenstrukturverfeinerung der triklinen Modifikation durchgeführt (Hodsdon, Brown, Sieker & Jensen, 1990).

Kristallographische Daten:

- Raumgruppe P 1
- $a = 27,5 \text{ \AA}$, $b = 32,1 \text{ \AA}$, $c = 34,4 \text{ \AA}$
 $\alpha = 88^\circ$, $\beta = 109^\circ$, $\gamma = 111^\circ$
- 1 Molekül pro asymmetrischer Einheit

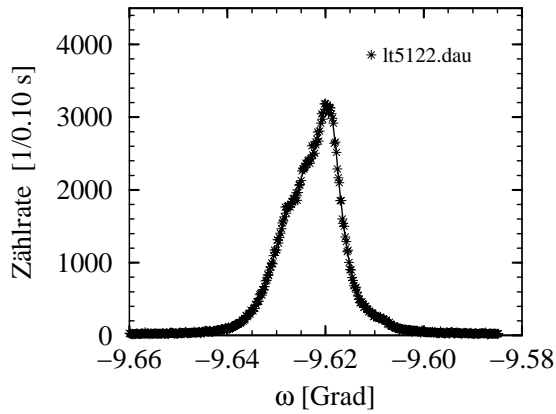
Moleküldaten:

- Molekulargewicht 14,3 kDa
- 129 Aminosäuren
- 1001 Nicht–Wasserstoffatome

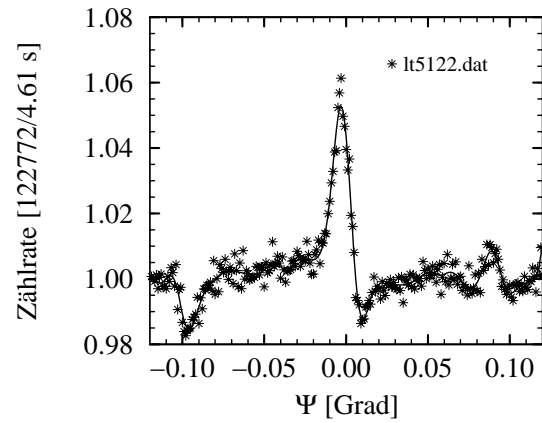
Die isotropen Temperaturfaktoren der triklinen Modifikation von Lysozym sind in etwa 50% kleiner als die der tetragonalen Modifikation (Hodsdon, Brown, Sieker & Jensen, 1990). Im Bereich höherer Auflösung sind die Strukturfaktorbeiträge für die triklone Modifikation größer als die der tetragonalen. Die triklone Form enthält weniger Wasser, das Zellvolumen pro Molekül ist kleiner. Die Elementarzelle der triklinen Modifikation ist also um mehr als den Faktor acht kleiner als die der tetragonalen Modifikation, daher ist die Dichte der benachbarten Dreistrahlfälle geringer. An der triklinen Form konnten Dreistrahlinterferenz–Experimente durchgeführt werden, an denen Reflexe mit einer Auflösung bis zu 2 \AA beteiligt sind (Masson-Fauchier, 1995). Für Kristalle von tetragonalem Lysozym konnte nur eine maximale Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ erreicht werden. Bei der triklinen Modifikation sind die Halbwertsbreiten der Reflexprofile deutlich größer ($> 0,01^\circ$) als bei der tetragonalen Modifikation.

In Abbildung 24 sind experimentelle Dreistrahlinterferenz–Profile von triklinem Lysozym dargestellt. Die Intensitätsänderung, verursacht durch den Interferenzeffekt, beträgt für diesen Dreistrahlfall etwa 8%. Die Meßzeit pro Punkt betrug 4,61 s bzw. 4,88 s. Beim Kristall lt51 betrug die Halbwertsbreite der Reflexprofile $0,0122^\circ$. In den Interferenzprofilen (s. Abb. 24(b) und 24(d)) sind benachbarte Interferenzprofile ($\vec{h} / \vec{g}' / \vec{h} - \vec{g}'$) bei $\Delta\psi = \pm 0,1^\circ$ zu erkennen. Die Triplettphase der benachbarten Interferenzprofile kann in der Regel nicht bestimmt werden. Diese Dreistrahlinterferenzen sind nicht durch die Wahl der Wellenlänge optimiert und sind wiederum durch benachbarte Dreistrahlfälle stark beeinflusst.

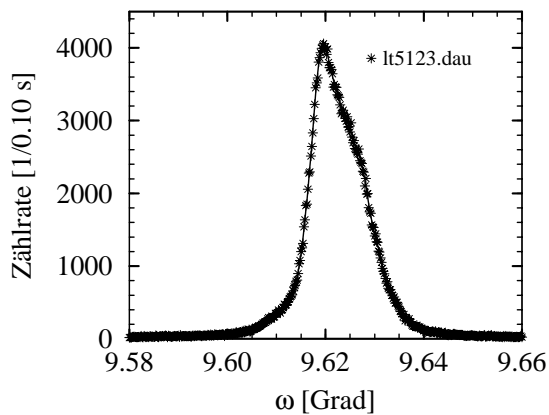
An triklinem Lysozym wurden insgesamt 50 Triplettphasen bestimmt. Die Reflexe, die an den Dreistrahlinterferenz–Experimenten beteiligt sind, haben eine Auflösung zwischen 30 und 2 \AA . Das Maximum der Verteilung liegt bei 4 \AA . Die mittlere Phasendifferenz der experimentell bestimmten Triplettphasen zu denen aus dem PDB–Eintrag 1LZT (Hodsdon, Brown, Sieker & Jensen, 1990) berechneten Triplettphasen beträgt 20° .



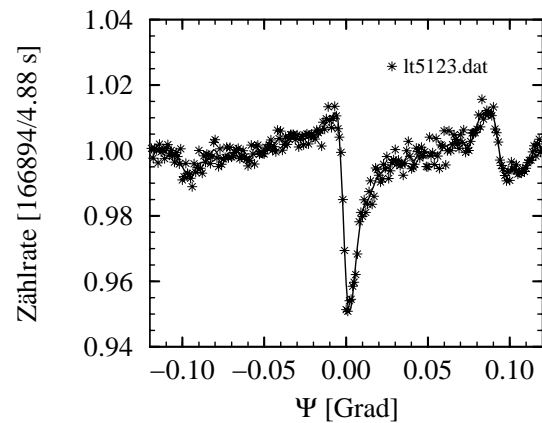
(a) Reflexprofil von $(\bar{7}4\bar{5})$
Halbwertsbreite: $0,0122^\circ$



(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $\bar{7}4\bar{5}/0\bar{1}\bar{1}/\bar{7}\bar{3}\bar{6}$ bei $\lambda = 1,2454 \text{ \AA}$



(c) Reflexprofil von $(\bar{7}45)$
Halbwertsbreite: $0,0122^\circ$



(d) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $\bar{7}45/0\bar{1}\bar{1}/\bar{7}\bar{3}\bar{6}$ bei $\lambda = 1,2454 \text{ \AA}$

Abbildung 24: Interferenzprofil an triklinem Lysozym des Dreistrahlfalls $\bar{7}4\bar{5}/0\bar{1}\bar{1}/\bar{7}\bar{3}\bar{6}$ und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $\bar{7}45/0\bar{1}\bar{1}/\bar{7}\bar{3}\bar{6}$ sowie Reflexprofile von $(\bar{7}4\bar{5})$ und $(\bar{7}45)$. Die Tripletphase von $\bar{7}4\bar{5}/0\bar{1}\bar{1}/\bar{7}\bar{3}\bar{6}$ ist auf $\phi_T = -60^\circ$ abgeschätzt. Die berechnete Tripletphase ergibt sich zu $\phi_T^{LZT} = -52^\circ$ (Hodsdon, Brown, Sieker & Jensen, 1990).

4.3 β -Trypsin

Trypsin wird in den Zellen des Pankreas produziert. Es ist ein Enzym, das zur Familie der Serin-Proteinasen gehört, die durch die Existenz eines außergewöhnlich reaktiven Serin-Restes gekennzeichnet sind. Ihre bekanntesten Vertreter sind die Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Elastase.

Die Züchtungsbedingungen für Trypsinkristalle (Stroud, Kay & Dickerson, 1974) sowie die Struktur von Trypsin (Bode & Schwager, 1975) sind bekannt. Trypsinkristalle zeichnen sich durch geringen Mosaikbau bei Raumtemperatur und 100 K aus (Bartunik, 1996).

Kristallographische Daten:

- Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$
- $a = 54,8 \text{ \AA}$, $b = 58,4 \text{ \AA}$, $c = 67,6 \text{ \AA}$
- 1 Molekül pro asymmetrischer Einheit

Moleküldaten:

- Molekulargewicht 24 kDa
- 223 Aminosäuren
- 1630 Nicht-Wasserstoffatome

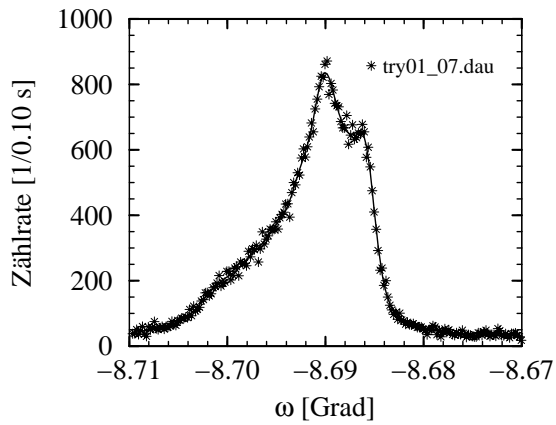


0,25 mm

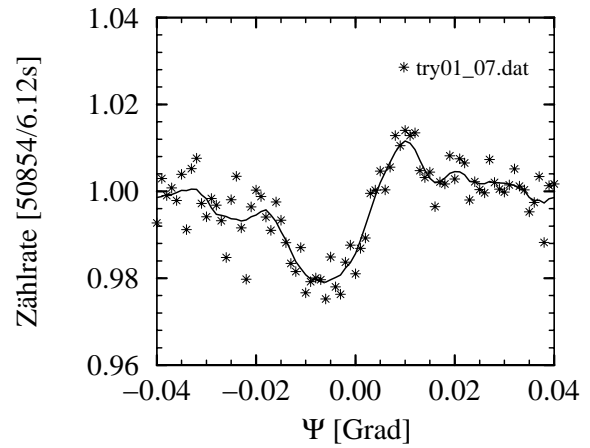
Abbildung 25: Orthorhombische Kristalle der β -Modifikation von Rindertrypsin. Die nadelförmigen Kristalle sind etwa $0,1 \times 0,1 \times 0,5 \text{ mm}^3$ groß.

Das Volumen der Elementarzelle von β -Trypsin entspricht etwa dem des tetragonalen Lysozims, jedoch kristallisiert β -Trypsin in einer niedrigsymmetrischen Raumgruppe. Kristalle des β -Trypsin wurden freundlicherweise von Stuhrmann (1997) zur Verfügung gestellt. Bei Raumtemperatur wurden Dreistrahlinterferenz-Profile an β -Trypsin aufgenommen. Die Experimente bei tiefen Temperaturen werden in Kapitel 7.1.2 vorgestellt.

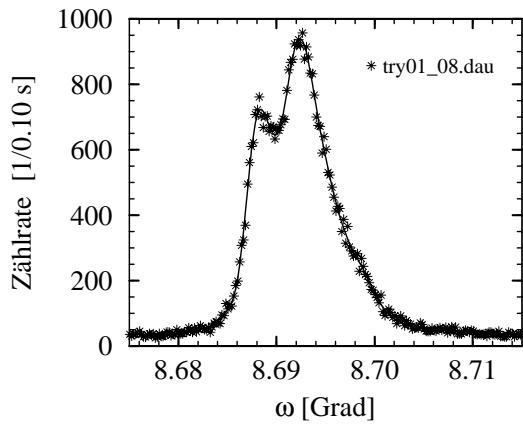
In Abbildung 26 sind experimentelle Dreistrahlinterferenz-Profile von β -Trypsin dargestellt. Die Intensitätsänderung – verursacht durch den Interferenzeffekt – beträgt für diesen Dreistrahlfall etwa 4 %. Die Meßzeit pro Punkt betrug 6,12 s bzw. 4,90 s. Beim Kristall try01 betrug die Halbwertsbreite der Reflexprofile $0,0088^\circ$, verschiedene Mosaikblöcke tragen zum Reflexprofil bei. Der nadelförmige Habitus der Kristalle erhöht die Streustrahlung. Um die Tripletphase zu interpretieren, ist daher eine längere Meßzeit erforderlich. Die Kristalle befanden sich bereits ein Jahr in der Stabilisierungslösung. Vermutlich läßt sich auch durch den Alterungsprozeß das geringe Streuvermögen erklären.



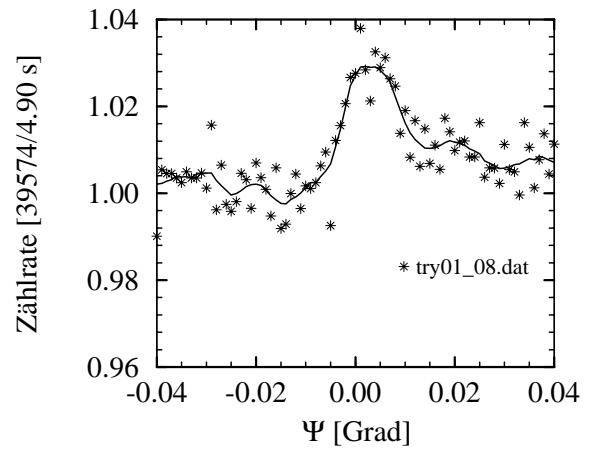
(a) Reflexprofil von $(1\bar{1}75)$
Halbwertsbreite: $0,0088^\circ$



(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $1\bar{1}75/\bar{2}50/3\bar{1}25$ bei $\lambda = 1,0050 \text{ \AA}$



(c) Reflexprofil von $(\bar{1}175)$
Halbwertsbreite: $0,0088^\circ$



(d) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $\bar{1}175/250/3\bar{1}25$ bei $\lambda = 1,0050 \text{ \AA}$

Abbildung 26: Interferenzprofil an β -Trypsin des Dreistrahlfalls $1\bar{1}75/\bar{2}50/3\bar{1}25$ und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $\bar{1}175/250/3\bar{1}25$ sowie Reflexprofile von $(1\bar{1}75)$ und $(\bar{1}175)$. Die Tripletphase von $1\bar{1}75/\bar{2}50/3\bar{1}25$ ist auf $\phi_T = 135^\circ$ abgeschätzt. Die berechnete Tripletphase ergibt sich zu $\phi_T^{ITPO} = 124^\circ$ (Marquart, Walter, Deisenhofer, Bode & Huber, 1983).

4.4 Proteinase K

Proteinase K wird aus Fungus *Tritirachium album* Limber gewonnen und wird nach ihrer Fähigkeit, Keratin zu verdauen, benannt (Dattagupta et al., 1975). Das Enzym ist eine Serin Proteinase und hydrolysiert wie das α -Chymotrypsin Proteine am Carboxyl-Rest von hydrophoben Aminosäuren.

Die Züchtungsbedingungen für Kristalle von Proteinase K (Dattagupta et al., 1975), sowie die Struktur von Proteinase K (Pähler et al., 1984), sind bereits bekannt. Kristalle von Proteinase K sind ebenfalls durch ihren geringen Mosaikbau für Experimente bei tiefen Temperaturen geeignet (Betzel, 1995).

Kristallographische Daten:

- Raumgruppe $P4_32_12$
- $a = 68,2 \text{ \AA}$, $c = 108,3 \text{ \AA}$
- 1 Molekül pro asymmetrischer Einheit

Molekül Daten:

- Molekulargewicht 28,8 kDa
- 279 Aminosäuren
- 2020 Nicht-Wasserstoffatome

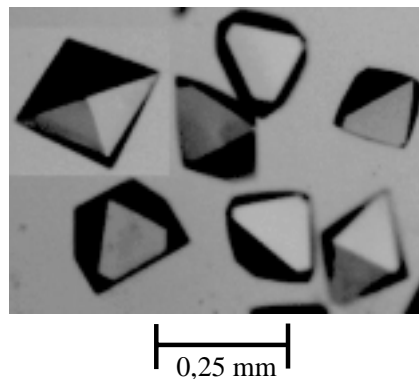
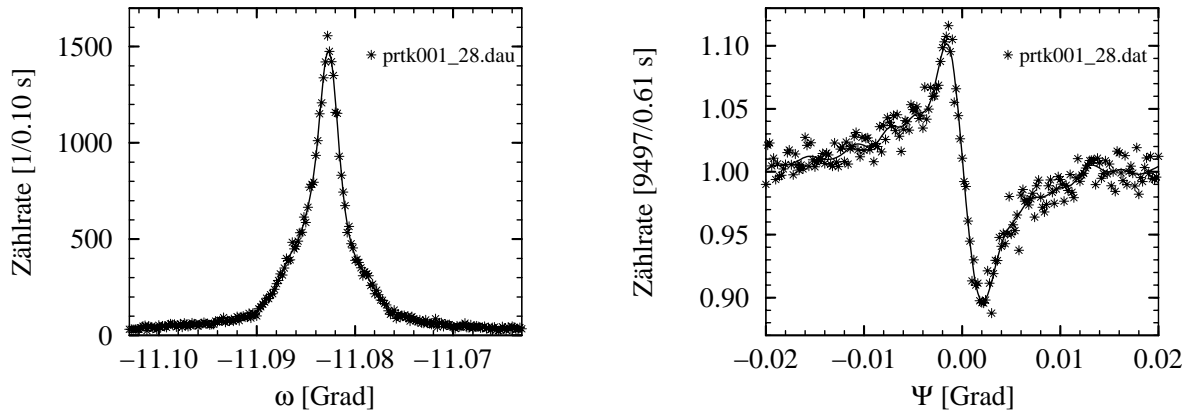


Abbildung 27: Proteinase K kristallisiert in tetragonalen Bipyramiden. Die Größe der Kristalle ist in etwa $0,2 \times 0,2 \times 0,1 \text{ mm}^3$.

Proteinase K kristallisiert in der Raumgruppe $P4_32_12$ mit einem Elementarzellvolumen von $5 \times 10^5 \text{ \AA}^3$, dies entspricht dem doppelten Elementarzellvolumen des tetragonalen Lysozims. Mit zunehmender Molekülgröße wird die mittlere Reflexintensität im Vergleich zum Streuvermögen der gesamten Elementarzelle kleiner. Bei gleicher Molekülgröße ist bei höhersymmetrischen Raumgruppen das reziproke Gitter dichter. Dreistrahlinterferenz-Profile ohne den Einfluß störender Nachbarn zu messen, wird daher schwieriger. Daher begrenzt die Molekülgröße bzw. Elementarzellgröße die Möglichkeit, Dreistrahlinterferenz-Profile zu messen.

In Abbildung 28 ist ein experimentelles Dreistrahlinterferenz-Profil von Proteinase K dargestellt. Die Intensitätsänderung, verursacht durch den Interferenzeffekt, beträgt für diesen Dreistrahlfall etwa 25 %. Die Meßzeit pro Punkt betrug 0,61 s. Beim Kristall prtk001 betrug die Halbwertsbreite des Reflexprofils $0,0034^\circ$. Für Dreistrahlfälle, bei denen nur seminvariante Reflexe beteiligt sind, ist die Triplettphase entweder 0° oder 180° . In diesen Fällen ist für die Bestimmung der Triplettphase die Messung eines Dreistrahlinterferenz-Profiles ausreichend. An diesem Kristall konnten etwa drei Triplettphasen pro Stunde bestimmt werden. Die Experimente bei tiefen Temperaturen werden in Kapitel 7.1.3 vorgestellt.



(a) Reflexprofil von $(00\bar{3}6)$
Halbwertsbreite: $0,0034^\circ$

(b) Dreistrahlinterferenz–Profil von
 $00\bar{3}6/11\bar{2}/\bar{1}\bar{1}\bar{3}4$ bei $\lambda = 1,1572 \text{ \AA}$

Abbildung 28: Interferenzprofil an Proteinase K des Dreistrahlfalls $00\bar{3}6/11\bar{2}/\bar{1}\bar{1}\bar{3}4$ und des Reflexprofils $(00\bar{3}6)$. Die Tripletphase von $00\bar{3}6/11\bar{2}/\bar{1}\bar{1}\bar{3}4$ ist auf $\phi_T = 0^\circ$ abgeschätzt. Die berechnete Tripletphase ergibt sich zu $\phi_T^{2PRK} = 0^\circ$ (Betzel, Pal & Saenger, 1988).

4.5 Nessellectin

In Zusammenarbeit mit I. Zegers (Vrije Universiteit Brüssel) konnten zum ersten Mal Dreistrahlinterferenz–Profile an einer bisher ungelösten Proteinstruktur, Lectin der Brennessel oder Nessellectin (Peumans, De Ley & Broekaert, 1984), durchgeführt werden. Die Kristalle von Nessellectin wurden am Instituut voor Moleculaire Biologie & Biotechnologie an der Vrije Universiteit Brüssel gezüchtet (Loris, Dao-Thi, Lisgarent & Wyns, 1993).

Lectine sind Proteine, die ein oder mehrere (meist zwei) aktive Zentren für die Bindungen zu Kohlenhydraten aufweisen. Lectine kommen häufig in Pflanzen vor und können bis zu 10% des Gesamtstickstoffgehalts im Samen ausmachen. Wegen der Vielzahl potentieller Anwendungen in der Pharmakologie, in der Immunitätsforschung, in der Krebstherapie und in der Landwirtschaft sind Lectine von großem Interesse, wie das insektizide Lectin des Weizenkeims oder das antifungale Lectin der Brennessel. Lectine dienen auch als Modellsystem für die Analyse der Protein–Kohlenhydrat–Wechselwirkung, einer zentralen Wechselwirkung vieler biologischer Systeme, die bisher noch nicht vollständig geklärt ist.

Um die spezifischen Eigenschaften von Nessellectin zu verstehen, muß die räumliche Proteinstruktur bekannt sein. Zur Strukturlösung ist jedoch die Kenntnis einiger Strukturphasen erforderlich, die mit herkömmlichen Methoden (Molekularer Ersatz, MIR) bisher nicht bestimmt werden konnten. Die Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen bietet hier eine Alternative zu den etablierten Methoden, Strukturphasen zu bestimmen.

Kristallographische Daten:

- Raumgruppe $P2_12_12_1$
- $a = 37,6 \text{ \AA}$, $b = 49,0 \text{ \AA}$, $c = 57,3 \text{ \AA}$
- 1 Molekül pro asymmetrischer Einheit

Moleküldaten:

- Molekulargewicht 8,5 kDa
- 89 Aminosäuren

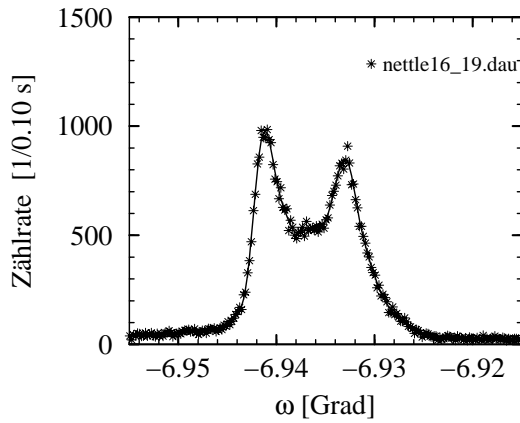
Intensitätsdatensammlung: Der verwendete Intensitätsdatensatz des Auflösungsbereichs von 1,65 bis 49 Å mit insgesamt 13313 unabhängigen Reflexen und einem R_{int} -Wert von 6,6% ergibt sich aus der Mittelung zweier Datensätze.

Der Datensatz für den Auflösungsbereich von 1,65 bis 25 Å wurde am Institut für Kristallographie mit dem MAR-Research Bildplattensystem mit $\text{Cu K}\alpha$ -Strahlung der Drehanode bei Raumtemperatur aufgenommen. Bei der Mittelung über die symmetrisch äquivalenten Reflexe ergeben sich 13282 unabhängige Reflexe.

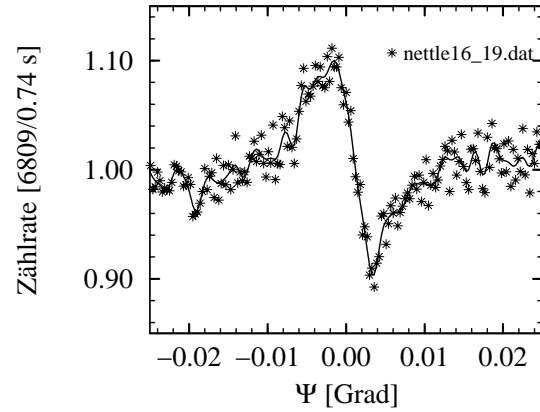
Der Datensatz bei niedriger Auflösung (7 bis 49 Å) wurde bei Raumtemperatur mit dem Ψ -Kreisdiffraktometer am Strahlrohr D1, ESRF bei einer Wellenlänge von 1,026 Å aufgenommen. Bei der Mittelung über die symmetrisch äquivalenten Reflexe ergeben sich aus den 497 gemessenen Reflexen 185 unabhängige Reflexe mit einem R_{int} von 4,4%.

Tripletphasen-Datensammlung: Innerhalb von 2,5 Tagen Strahlzeit wurden insgesamt 210 Tripletphasen an zwei Kristallen experimentell bestimmt. Die Reflexprofile zeigten eine deutliche Verbreiterung gegenüber den Reflexprofilen des tetragonalen Lysozyms. Teilweise sind einzelne Mosaikblöcke deutlich voneinander getrennt (s. Abb. 29(a) und 29(c)), dennoch lassen sich die Dreistrahlinterferenz-Profile interpretieren. In den Abbildungen 29 und 30 sind experimentelle Dreistrahlinterferenz-Profile an Nessellectin dargestellt. Die Intensitätsänderung durch den Interferenzeffekt beträgt jeweils etwa 20% und die Zeiten pro Meßpunkt weniger als 1 s.

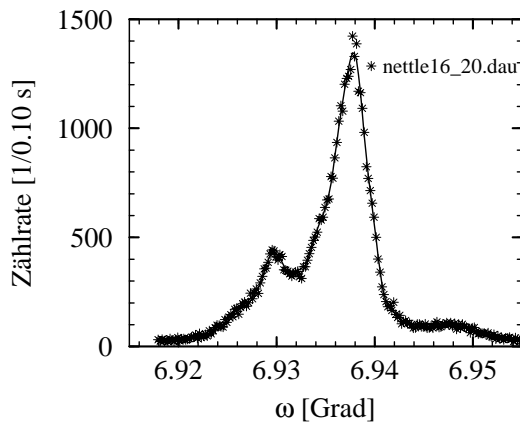
Von den etwa 20 Kristallen von Nessellectin entsprachen nur die beiden verwendeten Kristalle den hohen Anforderungen von Dreistrahlinterferenz-Experimenten an die Kristallqualität. Die beiden Kristalle waren etwa $0,1 \times 0,1 \times 0,5 \text{ mm}^3$ groß.



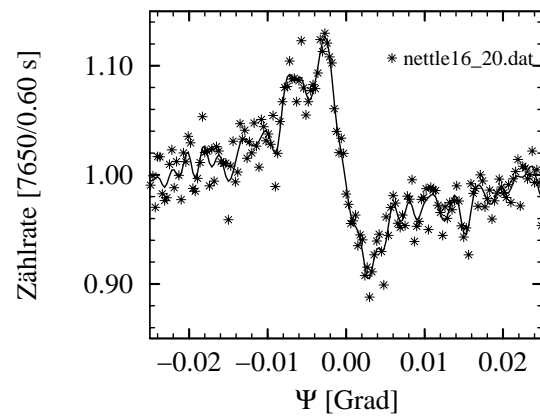
(a) Reflexprofil von (0 10 8)
Halbwertsbreite: $0,0114^\circ$



(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von
0108/0 $\bar{1}$ 1/0117 bei $\lambda = 0,9763 \text{ \AA}$

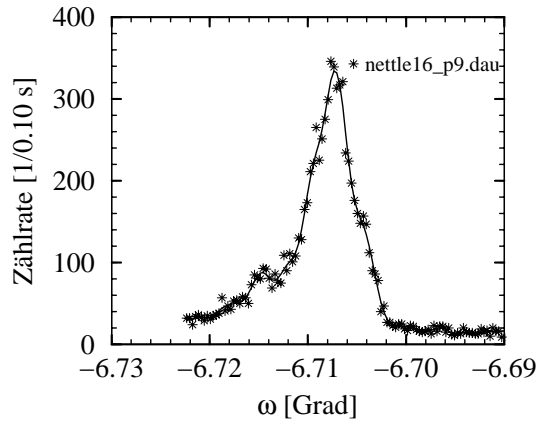


(c) Reflexprofil von (0 $\bar{1}0\bar{8}$)
Halbwertsbreite: $0,0046^\circ$

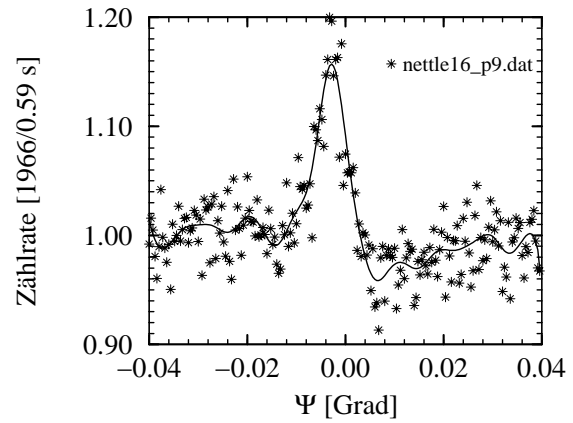


(d) Dreistrahlinterferenz-Profil von
 $0\bar{1}0\bar{8}/01\bar{1}/0117$ bei $\lambda = 0,9763 \text{ \AA}$

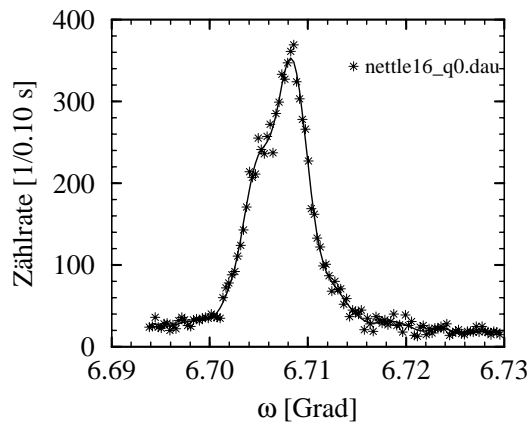
Abbildung 29: Interferenzprofil an Nessellectin des Dreistrahlfalls 0108/0 $\bar{1}$ 1/0117 und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $0\bar{1}0\bar{8}/01\bar{1}/0117$ sowie Reflexprofile von (0 10 8) und (0 $\bar{1}0\bar{8}$). Die Tripletphase von 0108/0 $\bar{1}$ 1/0117 ist auf $\phi_T = 0^\circ$ abgeschätzt.



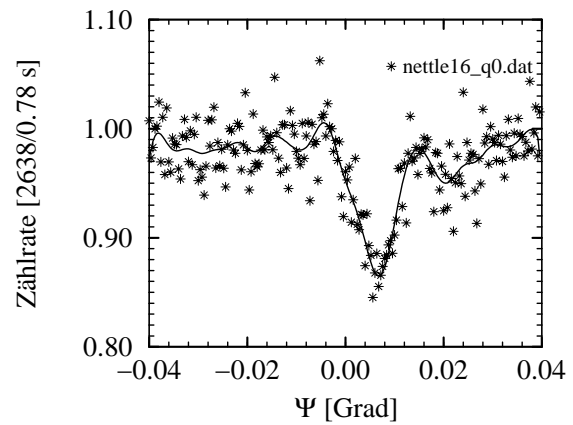
(a) Reflexprofil von $(\bar{5}49)$ mit einer Halbwertsbreite von $0,0051^\circ$



(b) Dreistrahlinterferenz-Profil von $\bar{5}49/1\bar{1}0/\bar{6}59$ bei $\lambda = 1,0544 \text{ \AA}$



(c) Reflexprofil von $(5\bar{4}\bar{9})$
Halbwertsbreite: $0,0069^\circ$



(d) Dreistrahlinterferenz-Profil von $5\bar{4}\bar{9}/\bar{1}10/\bar{6}5\bar{9}$ bei $\lambda = 1,0544 \text{ \AA}$

Abbildung 30: Interferenzprofil an Nessellectin des Dreistrahlfalls $\bar{5}49/1\bar{1}0/\bar{6}59$ und des zentrosymmetrisch korrelierten Dreistrahlfalls $5\bar{4}\bar{9}/\bar{1}10/\bar{6}5\bar{9}$ sowie Reflexprofile von $(\bar{5}49)$ und $(5\bar{4}\bar{9})$. Die Tripletphase von $\bar{5}49/1\bar{1}0/\bar{6}59$ ist auf $\phi_T = -60^\circ$ abgeschätzt.

5 Strukturlösung mit experimentell bestimmten Triplettphasen

Die experimentell bestimmten Triplettphasen können bei verschiedenen Strukturlösungsmethoden verwendet werden. Die *Direkten Methoden* und das *Maximum-Entropie-Verfahren* (ME) ermöglichen es, die experimentell bestimmten Triplettphasen in den Prozeß der Strukturlösung einzubringen. Diese beiden Verfahren werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

5.1 Direkte Methoden

Der Name *Direkte Methoden* steht für eine Reihe von Methoden zur Strukturlösung, die aus statistischen Betrachtungen die Strukturfaktorphasen *ab initio* aus der Verteilung der Strukturfaktorbeträge abschätzen (Hauptman & Karle, 1953). Einige Grundbegriffe der Direkten Methoden, die für das Verständnis der folgenden Abschnitte notwendig sind, werden vorgestellt. Für weitergehende Literatur wird beispielsweise auf Giacovazzo (1980) und Woolfson & Fan (1995) verwiesen.

5.1.1 Grundbegriffe der Direkten Methoden

Die Abschätzung der Strukturfaktorphasen ist von den Beträgen der Strukturfaktoren abhängig. Da der Atomformfaktor $f_j(\vec{h})$ bei größeren $|\vec{h}|$, abnimmt, können die Beträge der Strukturfaktoren bei verschiedenen Beugungswinkeln nicht unkorrigiert verglichen werden.

Unitäre Strukturfaktoren: Um den Abfall des Formfaktors auszugleichen, wird der unitäre Strukturfaktor $U(\vec{h})$ eingeführt:

$$U(\vec{h}) := \frac{F(\vec{h})}{\sum_{j=1}^N f_j(\vec{h})}. \quad \text{Aus } |F(\vec{h})| \leq \sum_{j=1}^N f_j(\vec{h}) \quad \text{folgt } |U(\vec{h})| \leq 1. \quad (30)$$

Nur für den vorwärtsbeugten Strahl $\vec{0}$ ist $|U| = 1$ erfüllt.

Normierte Strukturfaktoren: Bei normierten Strukturfaktoren $E(\vec{h})$ erfolgt die Korrektur der Winkelabhängigkeit durch die Normierung mit dem Erwartungswert des Strukturfaktorbetrags. Somit ergibt sich:

$$|E(\vec{h})|^2 := \frac{|F(\vec{h})|^2}{\sum_{j=1}^N f_j(\vec{h})^2} \quad (31)$$

$$E(\vec{h}) = \sum_{j=1}^N v_j(\vec{h}) e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}} \quad \text{mit } v_j(\vec{h}) = \frac{f_j(\vec{h})}{\sqrt{\sum_{k=1}^N f_k(\vec{h})^2}}. \quad (32)$$

Der Erwartungswert der Quadrate der normierten Strukturfaktoren ist gleich eins.

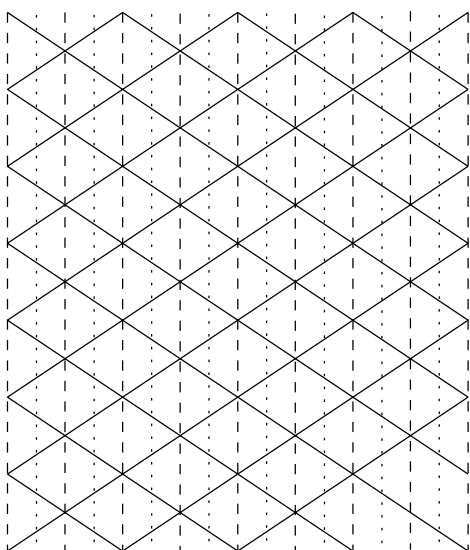
Sowohl die unitären als auch die normierten Strukturformfaktoren repräsentieren das Beugungsbild von Punktstreuern und nicht mehr das von ausgedehnten Atomen.

Für eine Struktur aus N gleichen Atomen ist folgende Vereinfachung möglich:

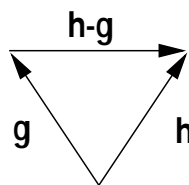
$$v = \frac{f}{\sqrt{N f^2}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \rightarrow E(\vec{h}) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{j=1}^N e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}_j}. \quad (33)$$

Triplettbeziehung: Eine exakte Ableitung der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Tripletphasen als Funktion der normierten Strukturformfaktorbeträge wird von Giacovazzo (1980) gegeben. Im folgenden wird der zugrunde liegende Gedanke qualitativ vorgestellt.

Wenn zwei Reflexe \vec{h} und \vec{g} einen großen normierten Strukturformfaktor haben, entspricht dies einer im Ortsraum periodischen Lokalisierung der Atompositionen in Richtungen senkrecht zu \vec{h} bzw. \vec{g} mit der Periodenlänge von $|\vec{h}|^{-1}$ bzw. $|\vec{g}|^{-1}$. In Abbildung 31 ist dies schematisch dargestellt. Wenn $E(\vec{h})$ und $E(\vec{g})$ gleichzeitig große Werte annehmen, müssen die Atompositionen in der Nähe der Schnittpunkte der durchgezogenen Linien liegen. Ist der normierte Strukturformfaktor $E(\vec{h} - \vec{g})$ ebenfalls größer als der Erwartungswert, so ist die wahrscheinlichste Lage der Maxima der Dichtewelle in der Nähe der Schnittpunkte, die mit $E(\vec{h})$ und $E(\vec{g})$ ausgezeichnet sind.



(a) Maxima der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Atome im Ortsraum



(b) Die dazugehörigen Richtungen im reziproken Raum

Abbildung 31: Die Maxima der Elektronendichte, die durch den Anteil von $E(\vec{h})$ und $E(\vec{g})$ hervorgerufen werden, sind durch die durchgezogenen Linien dargestellt. Ist der normierte Strukturformfaktor $E(\vec{h} - \vec{g})$ ebenfalls groß, so entspricht die wahrscheinlichste Lage der gestrichelten Linie. Die punktierte Linie entspricht der Lage mit der geringsten Wahrscheinlichkeit.

Die Elektronendichteverteilung spiegelt den atomaren Aufbau der Struktur wider. An den Orten der Atome sind ausgeprägte Maxima der Elektronendichte und in den Zwischenräumen ist nur geringe Elektronendichte zu erwarten. Daher ist es wahrscheinlich, daß die Einflüsse der drei Reflexe mit großen normierten Strukturformfaktoren sich nicht gegenseitig aufheben, sondern daß die Maxima zusammenfallen. Die Summe der drei Phasen $\phi(\vec{h})$, $\phi(\vec{g})$, $\phi(\vec{h} - \vec{g})$ ist in diesem Fall gleich null. Diese Abschätzung der Tripletphase auf null hängt nur vom Betrag der normierten Strukturformfaktoren ab. Die Tripletbeziehung (Cochran, 1955) läßt sich

zusammenfassen zu: Je größer das Produkt der normierten Strukturaktoren

$$G_T \sim \frac{1}{\sqrt{N}} |E(\vec{h})| |E(\vec{g})| |E(\vec{h} - \vec{g})| \quad (34)$$

ist, mit umso größerer Wahrscheinlichkeit gilt:

$$\phi_T = -\phi(\vec{h}) + \phi(\vec{g}) + \phi(\vec{h} - \vec{g}) = 0. \quad (35)$$

Sayre–Gleichung: Bereits im Jahre 1952 wurde von Sayre eine allgemeine Gleichung abgeleitet, mit der in zentrosymmetrischen Strukturen Phasenbeziehungen für Reflexe zu erhalten sind. Die Herleitung von Gleichung (36) basiert auf der Annahme einer gleichatomigen Struktur; sie läßt sich aber auch bei Strukturbestimmungen azentrischer nichtgleichatomiger Strukturen erfolgreich anwenden.

$$E(\vec{h}) = \text{const.} \sum_g E(\vec{g}) E(\vec{h} - \vec{g}) \quad (36)$$

Aus der Sayre–Gleichung folgt, daß jeder Strukturfaktor aus dem Produkt aller anderen Strukturaktoren ausgedrückt werden kann. Die Summation kann nach einem Summanden abgebrochen werden, wenn die Summe im wesentlichen durch diesen bestimmt ist. Somit ist die Tripletbeziehung (Gleichung (35)) ein Spezialfall von Gleichung (36).

Tangensformel: Die Tangensformel (Karle & Hauptman, 1956) ist der Quotient aus Imaginär– und Realteil der Sayre–Gleichung:

$$\tan \phi(\vec{h}) = \frac{\sum_{\vec{g}} |E(\vec{g})| |E(\vec{h} - \vec{g})| \sin(\phi(\vec{g}) + \phi(\vec{h} - \vec{g}))}{\sum_{\vec{g}} |E(\vec{g})| |E(\vec{h} - \vec{g})| \cos(\phi(\vec{g}) + \phi(\vec{h} - \vec{g}))} \quad (37)$$

Um den genauen Wert von $\phi(\vec{h})$ zu berechnen, muß über eine unendliche Anzahl von Gliedern summiert werden, da bei den normierten Strukturaktorbeträgen kein Formfaktorabfall für große $|\vec{h}|$ auftritt. Eine gute Abschätzung von $\phi(\vec{h})$ ist möglich, wenn die Phasen einiger Reflexe mit überdurchschnittlich großem normierten Strukturaktorbetrag bekannt sind. Die Tangensformel ist selbstkonsistent und kann mehrmals hintereinander angewandt werden. Die bereits bekannten Phasen werden in der Summation verwendet, wodurch sich bisher unbekannte Phasen bestimmen und bereits bestimmte Phasen verfeinern lassen.

Für die Berechnung einer Elektronendichtekarte werden Strukturaktorphasen (Einzelphasen) benötigt. Für die Wahl des Ursprungs einer Kristallstruktur müssen je nach Raumgruppe bis zu drei Strukturaktorphasen ausgewählter Reflexe festgelegt werden, bei nichtzentrosymmetrischen Strukturen legt die Strukturaktorphase eines weiteren ausgewählten Reflexes die Enantiomorphie der Kristallstruktur fest.

Ausgehend von den festgelegten Einzelphasen (Startphasen) werden durch Verknüpfung mit den Tripletphasen weitere Einzelphasen abgeleitet. Damit alle abgeschätzten Tripletphasen verwendet werden können, ist meist die Einführung symbolischer Einzelphasen für einige Reflexe notwendig. Diese symbolischen Einzelphasen werden nach dem *magic–integer–Verfahren* (Main, 1977) variiert. Die daraus erhaltenen Phasensätze werden mit verschiedenen Gütekriterien bewertet, um mit dem geeignetesten Phasensatz eine Elektronendichtekarte zu berechnen.

5.1.2 Experimentell bestimmte Tripletphasen und Direkte Methoden

Anstelle der statistisch abgeschätzten Tripletphasen können experimentell bestimmte Tripletphasen bei der Verknüpfung der Startphasen sowie in der Tangensformel verwendet werden. Im Vergleich mit den statistisch abgeschätzten Tripletphasen haben die experimentell bestimmten Tripletphasen eine höhere Genauigkeit, in der Tangensformel muß dies durch unterschiedliche Gewichtung berücksichtigt werden. Desweiteren kann die Konsistenz verschiedener Phasendatensätze anhand der experimentell bestimmten Tripletphasen überprüft werden.

Die Direkten Methoden verwenden für die Abschätzung Reflexe mit großen normierten Strukturfaktoren (E -Werte), jedoch sind für die Messung von Dreistrahlinterferenz-Profilen nur Reflexe mit großen Strukturfaktoren (F -Werte) zugänglich. In Abbildung 32 ist am Beispiel des tetragonalen Lysozyms die Verteilung der jeweils 2000 Reflexe mit den größten $|F(\vec{h})|$ - bzw. $|E(\vec{h})|$ -Werten gezeigt. In der Schnittmenge befinden sich die Reflexe, deren Phase experimentell bestimmt und die auch in den Direkten Methoden verwendet werden können. Ein Großteil der experimentell bestimmten Tripletphasen kann somit nicht verwendet werden, da die Direkten Methoden auf Reflexe mit großen E -Werte angewiesen sind.

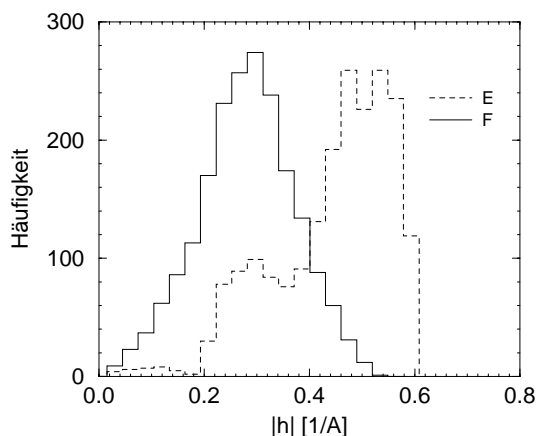


Abbildung 32: Häufigkeitsverteilung von 2000 Reflexen mit den größten $|F(\vec{h})|$ - bzw. $|E(\vec{h})|$ -Werten von tetragonalem Lysozym in Abhängigkeit der Auflösung

Die Möglichkeiten, experimentell bestimmte Tripletphasen und Direkte Methoden zu kombinieren, werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. C. Giacovazzo (Universität Bari) untersucht.

5.2 Maximum-Entropie und statistische Auswerteverfahren

Zur Berechnung einer Elektronendichteverteilung wird eine Fouriertransformation mit den Strukturfaktoren als Fourierkoeffizienten durchgeführt. Die Auflösung der berechneten Elektronendichtekarte ist von der Anzahl der Strukturfaktoren des entsprechenden Beugungswinkels 2ϑ abhängig. Meist ist nur für eine geringe Anzahl von Reflexen die Strukturfaktorphase bekannt. Die fehlenden Fourierkoeffizienten werden bei der Fouriertransformation willkürlich auf null gesetzt, dies führt zu sogenannten Abbrucheffekten. Solange die Beträge der fehlenden Strukturfaktoren in der Nähe von null sind, wird das Ergebnis der Fourier-

transformation nur gering beeinflußt, während das Fehlen von Struktur Faktoren mit großen Beträgen die Elektronendichteverteilung deutlich verfälscht.

Eine Verringerung der Abbrucheffekte bietet das Maximum–Entropie–Verfahren. Bei diesem wird eine möglichst gleichverteilte Elektronendichtekarte (maximale Entropie) unter der Nebenbedingung berechnet, daß die berechneten mit den gemessenen Struktur Faktoren übereinstimmen.

Einige Grundbegriffe des Maximum–Entropie–Verfahrens, die für das Verständnis der folgenden Abschnitte notwendig sind, werden vorgestellt. Für die weitergehende Literatur sei auf Bricogne (1984, 1997a, 1997b) und Buck & Macaulay (1991) verwiesen. Für die Berechnung nach dem Maximum–Entropie–Verfahren stand das Programm memnew zur Verfügung, eine Beschreibung der Grundlagen und verwendeten Algorithmen befindet sich bei Weckert (1997).

5.2.1 Grundbegriffe aus der Statistik

Bayesscher Satz: Die Darstellung der Bayesschen Theorie wurde aus Buck & Macaulay (1991) entnommen. Die gemeinsame Wahrscheinlichkeit zweier Ereignisse ist das Produkt aus der Wahrscheinlichkeit eines der beiden und der Wahrscheinlichkeit, daß das andere unter der Voraussetzung des einen eintritt:

$$P(X, Y) = P(X)P(Y|X) = P(Y)P(X|Y). \quad (38)$$

In der Kristallographie steht X für die Meßdaten D (Strukturfaktor beträge und –phasen) und Y für die Elektronendichteverteilung E , so gilt:

$$P(E, D) = P(E)P(D|E) = P(D)P(E|D). \quad (39)$$

$P(E, D)$ ist die gemeinsame Wahrscheinlichkeit der Elektronendichteverteilung E und der Meßdaten D .

$P(E)$ ist die a priori Wahrscheinlichkeit der Elektronendichteverteilung.

$P(D|E)$ ist die Wahrscheinlichkeit der Daten bei einer vorgegebenen Elektronendichteverteilung. Die sogenannte *Likelihood*, ist die Wahrscheinlichkeit mit der eine bestimmte Hypothese zutrifft.

$P(D)$ ist die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Datensatz zu messen. Im Falle einer Strukturbestimmung sind die Daten festgelegt, daher kann $P(D)$ als Skalierungsfaktor betrachtet werden.

$P(E|D)$ ist die Wahrscheinlichkeit der Elektronendichteverteilung E bei gegebenen Meßdaten D .

Die beste Approximation der Kristallstruktur ist die Elektronendichteverteilung, bei der $P(E|D)$ maximal ist. Gleichung (39) kann umgeformt werden zu:

$$P(E|D) = P(E) \frac{P(D|E)}{P(D)} \sim P(E)P(D|E). \quad (40)$$

Der Satz von Bayes zeigt, daß das Ergebnis nicht nur durch die Messung festgelegt wird, sondern auch durch die a priori Wahrscheinlichkeit der Elektronendichteverteilung $P(E)$.

Maximum–Entropie: Zur Bestimmung von $P(E)$ wird die Elementarzelle in M gleichgroße Raumbereiche eingeteilt. N Einheitsportionen von Elektronendichte werden statistisch darauf verteilt, wobei die Vorabwahrscheinlichkeit für jede Portion in jedem Raumbereich gleich ist. Die Wahrscheinlichkeit für die Verteilung mit p_i Portionen im Raumbereich i ist gegeben durch:

$$P(E) = \frac{N!}{\prod_{i=1}^M p_i!}. \quad (41)$$

Die Wahrscheinlichkeit erreicht daher ihr Maximum, wenn die Elektronendichte gleichverteilt ist. Da zur Lösung der Struktur das Produkt $P(E)P(D|E)$ zu maximieren ist, geht jede Abweichung von der Gleichverteilung von E auf $P(D|E)$ zurück.

Die Entropie S einer gegebenen Verteilung berechnet sich aus der Wahrscheinlichkeit nach:

$$S = k \ln P(E). \quad (42)$$

Die wahrscheinlichste Verteilung der Elektronendichte auf die Elementarzelle ist also diejenige mit der größten Entropie. Mit der Stirlingschen Formel $\ln N! \approx N \ln N - N$ (für große N) kann die Entropie S ausgedrückt werden durch:

$$S = -k \sum_i p_i \ln p_i + const. \quad (43)$$

Die p_i können kontinuierliche Werte annehmen. Die Bezeichnung p_i wurde anstelle von ρ_i gewählt, da es sich um die Fouriertransformierte der unitären Strukturfaktoren handelt und nicht um die Elektronendichteverteilung. Die Wahrscheinlichkeit $P(E)$ berechnet sich nach Gleichung (42) zu:

$$P(E) = e^{\alpha S}. \quad (44)$$

Die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(D|E)$, die unitären Strukturfaktoren $U^{exp}(\vec{h}_j)$ bei einer Elektronendichteverteilung der Quasipunktatome $\rho(\vec{r})$ – unter der Annahme einer Gaußverteilung – zu messen, ergibt sich zu:

$$P(D|E) \sim \prod_j e^{\frac{-[U^{exp}(\vec{h}_j) - U^{ber}(\vec{h}_j)]^2}{2\sigma^2}}. \quad (45)$$

σ ist die Standardabweichung der normierten Strukturfaktorbeiträge. Die normierten Strukturfaktoren $U^{ber}(\vec{h}_j)$ werden aus der Verteilung p_i berechnet:

$$U^{ber}(\vec{h}_j) = \sum_i p_i e^{2\pi i \vec{h}_j \vec{r}_i}. \quad (46)$$

Für die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(D|E)$ (Gleichung (45)) wird die χ^2 -Statistik angesetzt:

$$P(D|E) \sim e^{\frac{1}{2}\chi^2} \quad \text{mit} \quad \chi = \sqrt{\sum_j \frac{[U^{exp}(\vec{h}_j) - U^{ber}(\vec{h}_j)]^2}{\sigma^2}}. \quad (47)$$

Nach dem Satz von Bayes (Gleichung (40)) und den Gleichungen (44) und (47) ergibt sich die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(E|D)$ zu:

$$P(E|D) = e^{\alpha S - \frac{1}{2}\chi^2}. \quad (48)$$

Die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(E|D)$ ist zur Lösung der Struktur zu maximieren. Dies entspricht einer Maximierung des Exponenten von Gleichung (48).

$$\max \left(\alpha S - \sum_j \frac{[U^{exp}(\vec{h}_j) - U^{ber}(\vec{h}_j)]^2}{2\sigma^2} \right) \quad (49)$$

Die Konstante α kann willkürlich gewählt werden. Meist wird sie so gewählt, daß χ^2 gleich der Anzahl der Meßdaten ist, da dies der Erwartungswert einer χ^2 -Verteilung ist.

5.2.2 Likelihood

Die Menge aller Reflexe wird in zwei Untermengen geteilt. Im Basisdatensatz B befinden sich die Reflexe, deren Betrag und Phase des normierten Strukturfaktors $U(\vec{h})$ bekannt sind. Im zweiten Datensatz NB befinden sich Reflexe, für die nur der Betrag des normierten Strukturfaktors $|U(\vec{k})|$ bekannt ist. Die Dimension des Datensatzes NB sei k .

Es wird angenommen, daß für alle $\vec{h} \in B$ die normierten Strukturfaktoren $U(\vec{h})$ des Basisdatensatzes B den Erwartungswerten der ME-berechneten normierten Strukturfaktoren $U^{ME}(\vec{h}) = \langle e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}} \rangle$ entsprechen: $U(\vec{h}) = U^{ME}(\vec{h})$. Die bedingte Wahrscheinlichkeitsverteilung für die normierten Strukturfaktoren $U(\vec{k})$, unter der Annahme $U(\vec{h}) = U^{ME}(\vec{h})$,

$$P(U(\vec{k})|U(\vec{h}) = U^{ME}(\vec{h})) \propto e^{-\frac{1}{2}N(U(\vec{k}) - U^{ME}(\vec{k}))^T Q^{-1}(U(\vec{k}) - U^{ME}(\vec{k}))} \quad (50)$$

$$\text{mit } U(\vec{k}) = (U(\vec{k}_1), U(\vec{k}_2), \dots, U(\vec{k}_k))^T$$

entspricht einer k -dimensionalen Gaußverteilung um den Punkt $U^{ME}(\vec{k})$ (Bricogne, 1984). $(U(\vec{k}) - U^{ME}(\vec{k}))$ entspricht dem k -dimensionalen Differenzvektor von $U(\vec{k})$ und den Erwartungswerten $U^{ME}(\vec{k})$. N ist die Anzahl der Atome. Q entspricht der Kovarianzmatrix mit den Elementen q_{ij} ,

$$q_{ij} = \langle e^{2\pi i(\vec{k}_i + \vec{k}_j) \vec{r}} \rangle - \langle e^{2\pi i \vec{k}_i \vec{r}} \rangle \langle e^{2\pi i \vec{k}_j \vec{r}} \rangle. \quad (51)$$

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung, die sich aus der Null-Hypothese ($U(\vec{h}) = 0$) ergibt, ist eine Gaußverteilung um den Ursprung:

$$P(U(\vec{k})|U(\vec{h}) = 0) \propto e^{-\frac{1}{2}NU(\vec{k})^T \epsilon_{kk}^{-1}U(\vec{k})}. \quad (52)$$

ϵ_{kk} entspricht der Diagonalmatrix der statistischen Gewichte der Reflexe (Wilson-Verteilung).

Der Datensatz B kann auch Reflexe mit unbekannter Phase enthalten, beispielsweise symbolische Einzelphasen, die nach dem magic–integer–Verfahren variiert werden. Aus Gleichung (50) läßt sich die bedingte Wahrscheinlichkeit für den Betrag $|U(\vec{k})|$ der normierten Strukturfaktoren des Datensatzes NB berechnen. Da die Beträge der normierten Strukturfaktoren $|U(\vec{k})|$ bekannt sind, kann $P(|U(\vec{k})| | U(\vec{h}) = U^{ME}(\vec{h}))$ als Funktion der unbekannt Phasen der Reflexe aus B maximiert werden. Die Konsistenz der unbekannt Strukturfaktorphasen aus dem Datensatz B kann somit durch die Beträge der Reflexe aus NB überprüft werden. Als Gütezahl („figure of merit“) wird der Logarithmus des Quotienten

$$\frac{\Lambda(U^{ME}(\vec{h}))}{\Lambda(\vec{0})} = \frac{P(|U(\vec{k})| | U(\vec{h}) = U^{ME}(\vec{h}))}{P(|U(\vec{k})| | U(\vec{h}) = \vec{0})} \quad (53)$$

bestimmt. Λ wird als *Likelihood* bezeichnet und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine bestimmte Hypothese zutrifft.

Somit wird für jede Variation des Basisdatensatzes B eine Maximum–Entropie–Verteilung berechnet. Anhand der log–Likelihood–Abschätzung des Basisdatensatzes B und aufgrund der bekannten Strukturfaktorbeträge $|U(\vec{k})|$ des Datensatzes NB , wird der wahrscheinlichste Phasensatz ausgewählt. Für den Phasensatz mit dem größten Wert für Entropie und Likelihood wird eine Maximum–Entropie–Elektronendichtekarte berechnet.

Aus Gleichung (50) läßt sich auch die bedingte Wahrscheinlichkeit für die Phase $\phi(\vec{k})$ eines Strukturfaktors aus dem Datensatz NB für den gegebenen Betrag $|U(\vec{k})|$ berechnen. Jedoch werden nur die Phasen der Reflexe, deren normierte Strukturfaktorbeträge $|U(\vec{k})|$ und $|U^{ME}(\vec{k})|$ groß sind, mit einer guten Wahrscheinlichkeit abgeschätzt. Somit kann $U^{ME}(\vec{k})$ als Information über $U(\vec{k})$ interpretiert werden, die bereits durch $U(\vec{h}) \in B$ in die Verteilung eingebracht wurde.

Um eine deutliche Verbesserung der Elektronendichtekarte zu erreichen, müssen die Strukturfaktorphasen von Reflexen aus dem Datensatz NB bestimmt werden, die bei der Extrapolation durch das Maximum–Entropie–Verfahren große Abweichungen von $||F^{exp}(\vec{k})| - |F^{ME}(\vec{k})||$ aufzeigen (Carter Jr, 1995; Weckert, 1997).

5.3 Maximum–Entropie–Verfahren für tetragonales Lysozym am Beispiel verschiedener Tripletphasen–Datensätze

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, läßt sich mit dem Maximum–Entropie–Verfahren aus den verschiedenen Phasendatensätzen der geeignetste auswählen und die dazugehörige Maximum–Entropie–Elektronendichtekarte berechnen.

In diesem Kapitel wird an vier Abschnitten gezeigt, wie sich mit der Anzahl der experimentell bestimmten Tripletphasen die Korrelation zwischen Likelihood, Entropie und der mittleren gewichteten Phasendifferenz verändert und die Qualität der ME–Elektronendichtekarten verbessert.

5.3.1 Bewertung der Phasendatensätze durch Likelihood und Entropie

Für die Berechnung einer Maximum–Entropie–Elektronendichtekarte mit dem Programm *memnew* (Weckert, 1997) werden Strukturfaktorphasen (Einzelphasen) benötigt.

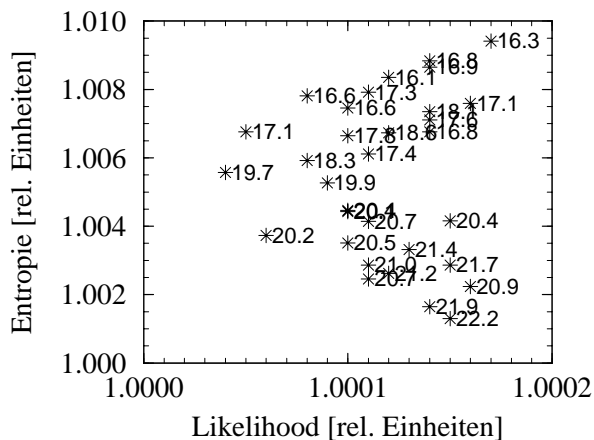
Für die Wahl des Ursprungs müssen bei tetragonalem Lysozym die Strukturfaktorphasen zweier ausgewählter Reflexe festgelegt werden. Die Strukturfaktorphase seminvarianter Reflexe kann direkt aus einem Dreistrahlinterferenz–Profil bestimmt werden, da die beteiligten Reflexe über Symmetriebeziehungen miteinander verknüpft sind. Aus diesem „Startphasensatz“ von Einzelphasen werden durch Verknüpfung mit den Tripletphasen weitere Einzelphasen abgeleitet. Jede Einzelphase ist von maximal drei oder bei Strukturfaktorphasen spezieller Reflexe von vier Tripletphasen abhängig. Um alle Tripletphasen berücksichtigen zu können, müssen den Strukturfaktorphasen einiger Reflexe Symbole zugeordnet werden. Diese symbolischen Strukturfaktorphasen werden nach dem magic–integer–Verfahren (Main, 1977) variiert, und für jeden Phasendatensatz wird eine Maximum–Entropie–Verteilung berechnet. Die Bewertung der Phasendatensätze durch Likelihood und Entropie ist in Abbildung 33 dargestellt.

Bei den weiteren Messungen werden Dreistrahlfälle ausgewählt, die sich durch die Verknüpfung zweier Reflexe bekannter Strukturfaktorphasen mit einem Reflex unbekannter Strukturfaktorphase ergeben. So kann mit jedem weiteren Dreistrahlinterferenz–Profil die Strukturfaktorphase eines Reflexes bestimmt werden.

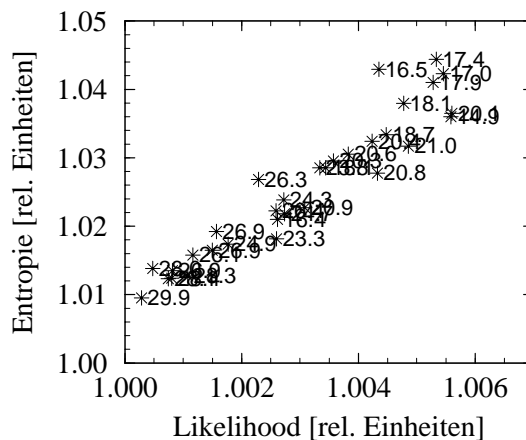
375 Tripletphasen: Nach der Bestimmung von 375 Tripletphasen wurde die erste Elektronendichtekarte mit Hilfe eines Maximum–Entropie–Verfahrens (ME) berechnet.

In diesem Tripletphasen–Datensatz befinden sich 15 Strukturfaktorphasen seminvarianter Reflexe. Diese bilden, zusammen mit den für die Wahl des Ursprungs festgelegten Strukturfaktorphasen zweier Reflexe den Startphasensatz. Mit diesem Startphasensatz lassen sich aus den 375 Tripletphasen 322 Strukturfaktorphasen ableiten. Vier Strukturfaktorphasen, die aufgrund der Verknüpfung nicht festgelegt sind, werden Symbole zugeordnet. Drei dieser Symbole sind sogenannte *spezielle Symbole*, das bedeutet, die Strukturfaktorphase ist durch die Kristallsymmetrie bis auf $\pm 180^\circ$ festgelegt. Es ergeben sich durch Variationen der symbolischen Strukturfaktorphasen 32 Phasendatensätze. Von der Variation sind nur 16 Strukturfaktorphasen betroffen.

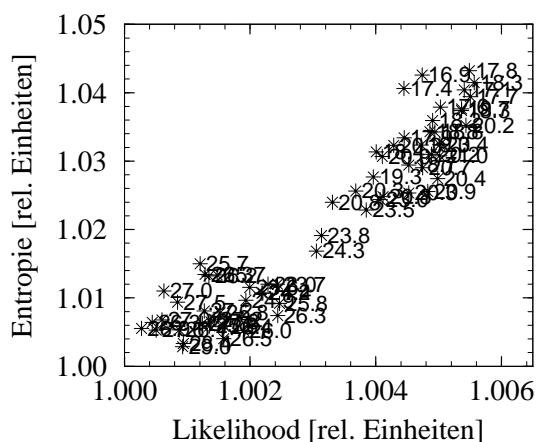
In Abbildung 33(a) ist der Zusammenhang von Likelihood und Entropie aufgetragen. Bei der geringen Anzahl von Strukturfaktorphasen ist noch keine Korrelation zu erkennen, d. h., die Entscheidung für den Datensatz mit der größten Entropie und Likelihood ist nicht eindeutig. Die Entropie scheint allerdings ein besseres Kriterium als die Likelihood zu sein, da die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz mit der Entropie korreliert ist. Für die Berechnung der ME–Elektronendichtekarte wurde der Phasendatensatz mit der größten Entropie (Nummer 28) ausgewählt. Die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz zum Strukturmodell 193L (Vaney, Maignan, Riès–Kautt & Ducruix, 1996) beträgt $16,3^\circ$.



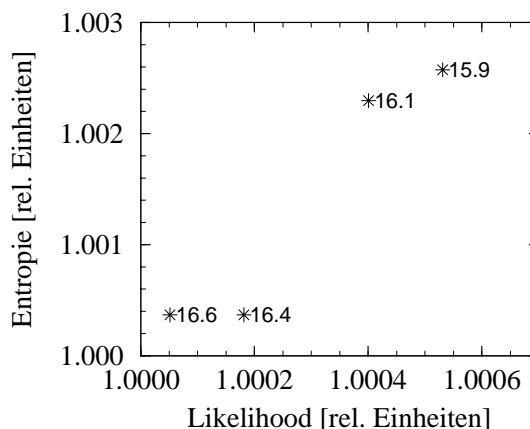
(a) 322 Einzelphasen / 32 Phasendatensätze



(b) 595 Einzelphasen / 32 Phasendatensätze



(c) 626 Einzelphasen / 64 Phasendatensätze



(d) 752 Einzelphasen / 4 Phasendatensätze

Abbildung 33: Jeder Phasendatensatz wird durch Entropie und Likelihood bewertet. An jedem Datenpunkt ist die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz zu 193L angegeben.

Stand:	07/95	11/95	05/96	02/97
Anzahl der Tripletphasen	375	592	701	847
Anzahl der Reflexe mit Phase	322	535	626	752
Seminvarianten	15	16	24	26
Symbole (davon spezielle)	4(3)	4(-)	5(1)	2(2)
Davon abhängige Einzelphasen	16	44	48	4
Anzahl der Phasendatensätze	32	32	64	4
Nummer des verwendeten Phasendatensatzes	28	19	56	3
Strukturfaktorphasen–Differenz des verwendeten Phasendatensatzes zu 193L [°]	16,3	17,4	17,8	15,9

Tabelle 4: Zusammenfassung der verschiedenen Phasendatensätze

592 Tripletphasen: Die Zahl der seminvarianten Reflexe hat sich im Startphasensatz auf 16 erhöht. 535 Strukturfaktorphasen lassen sich aus diesem Tripletphasen–Datensatz ableiten. Darunter befinden sich vier Strukturfaktorphasen, denen Symbole zugeordnet sind. Von den somit erforderlichen 32 Variationen sind 44 Strukturfaktorphasen betroffen.

In Abbildung 33(b) ist nun, bei einer größeren Anzahl von Tripletphasen, die Korrelation zwischen Entropie und Likelihood, sowie der mittleren gewichteten Strukturfaktorphasen–Differenz deutlich zu erkennen. Der Phasendatensatz mit maximaler Entropie und Likelihood wurde für die Berechnung der ME–Elektronendichtekarte (Nummer 19) ausgewählt. Die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz zum Strukturmodell 193L beträgt $17,4^\circ$.

701 Tripletphasen: Durch Dreistrahlinterferenz–Experimente wurden die Strukturfaktorphasen von 24 seminvarianten Reflexen direkt bestimmt. Aus dem Tripletphasen–Datensatz können 626 Strukturfaktorphasen abgeleitet werden. Darunter sind fünf Strukturfaktorphasen, denen Symbole zugeordnet sind (davon ein spezielles Symbol). Von den erforderlichen 64 Variationen sind 48 Strukturfaktorphasen betroffen.

In Abbildung 33(c) ist wiederum die Korrelation zwischen Likelihood und Entropie, sowie der mittleren gewichteten Strukturfaktorphasen–Differenz deutlich zu erkennen. Im Bereich der maximalen Entropie und Likelihood (Bereich A) ist die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz deutlich kleiner als im unteren linken Bereich des Diagramms. Die in dieser Arbeit dargestellte ME–Elektronendichtekarte wurde aus dem Phasendatensatz mit der Nummer 56 (maximale Entropie und Likelihood) berechnet, die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz zum Strukturmodell 193L beträgt $17,8^\circ$.

Mit diesem Phasendatensatz wurde eine Extrapolation von Strukturfaktorphasen mit dem Maximum–Entropie–Verfahren durchgeführt. Die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz steigt deutlich an (bis zu 40°). Beim visuellen Vergleich der ME–Elektronendichtekarten mit unterschiedlicher Anzahl extrapolierter Strukturfaktorphasen ist keine Verbesserung zu beobachten, die das Anpassen eines Startmodells an die Elektronendichtekarte vereinfachen würde.

Beim Vergleich der ME–Elektronendichtekarten verschiedener Phasendatensätze aus dem Bereich A zeigten sich im inneren Bereich des Proteinmoleküls nur vernachlässigbare Unterschiede. An der Oberfläche des Proteinmoleküls ist die Elektronendichte in allen ME–Elektronendichtekarten, basierend auf 626 Strukturfaktoren, schlecht definiert, und eine vollständige Interpretation dieser Karten ist nicht möglich. Da sich die Phasendatensätze des Bereiches A nur um maximal 8° in der mittleren gewichteten Strukturfaktorphasen–Differenz unterscheiden, ist auch nur ein geringer Einfluß auf die ME–Elektronendichtekarten zu erwarten.

847 Tripletphasen: Im Startphasensatz befinden sich nun 26 Strukturfaktorphasen seminvarianten Reflexe. 752 Strukturfaktorphasen können aus dem Tripletphasen–Datensatz abgeleitet werden. Darunter befinden sich nur zwei Strukturfaktorphasen, denen speziellen Symbole zugeordnet sind. Von den vier erforderlichen Variationen sind nur vier Struk-

turfaktorphasen betroffen. In Abbildung 33(d) sind wiederum zwei Bereiche zu erkennen. Die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz ist nahezu gleich, so daß auch die ME–Elektronendichtekarten beim visuellen Vergleich nahezu identisch sind. Die abgebildete ME–Elektronendichtekarte wurde aus dem Phasendatensatz Nummer 3 berechnet, die mittlere gewichtete Strukturfaktorphasen–Differenz zum Strukturmodell 193L beträgt $15,9^\circ$ und die mittlere Tripletphasendifferenz $19,9^\circ$. Der Unterschied entsteht dadurch, daß die Strukturfaktorphasen teilweise von mehreren Dreistrahlfälle abhängen, und somit durch Mittelung die Abweichungen der Strukturfaktorphasen zu R193 verringert werden.

5.3.2 Verteilung der Reflexe mit bestimmter Strukturfaktorphase

322 Einzelphasen: Die an den 375 Dreistrahlinterferenzen beteiligten Reflexe sind in Abbildung 34 in Abhängigkeit von der Auflösung und des Strukturfaktorbetrags aufgetragen. Für die Messungen der ersten Dreistrahlinterferenz–Profile wurden vor allem Reflexe niedriger Auflösung mit hohem Strukturfaktorbetrag ausgewählt, da diese große Interferenzeffekte zeigen und geringe Meßzeiten erforderlich sind.

Die Messungen der Dreistrahlinterferenz–Profile, an denen Reflexe mit einer Auflösung besser als $2,5 \text{ \AA}$ oder einem Strukturfaktorbetrag kleiner als 100 beteiligt sind, zeigen die Grenzen der experimentellen Bestimmung von Tripletphasen an tetragonalem Lysozym.

535 Einzelphasen: Die Reflexe der zusätzlichen 213 Strukturfaktorphasen liegen vor allem im Auflösungsbereich zwischen 3 und 6 \AA , dem Bereich der Sekundärstruktur des Proteinmoleküls. Ihre Strukturfaktorbeträge sind größer als 500 (s. Abb. 34).

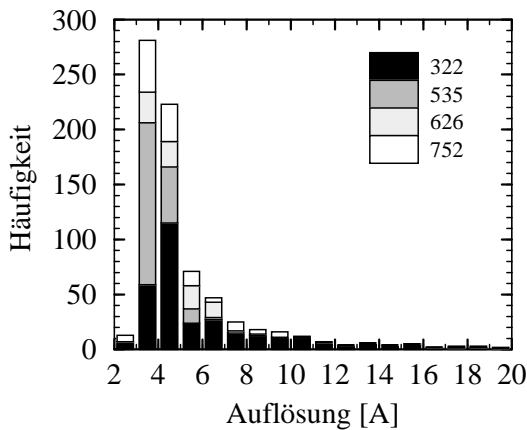
Die ausgewählten Reflexe versprechen einerseits große Interferenzeffekte und geringe Meßzeit und andererseits durch die großen Strukturfaktorbeträge auch großen Einfluß auf die Elektronendichteverteilung im Auflösungsbereich der Sekundärstruktur.

626 Einzelphasen: Die weiteren 75 Reflexe, deren Strukturfaktorphasen bestimmt wurden, liegen ebenfalls im Auflösungsbereich zwischen 3 und 6 \AA , jedoch liegen die Strukturfaktorbeträge im Bereich zwischen 300 und 600 (s. Abb. 34).

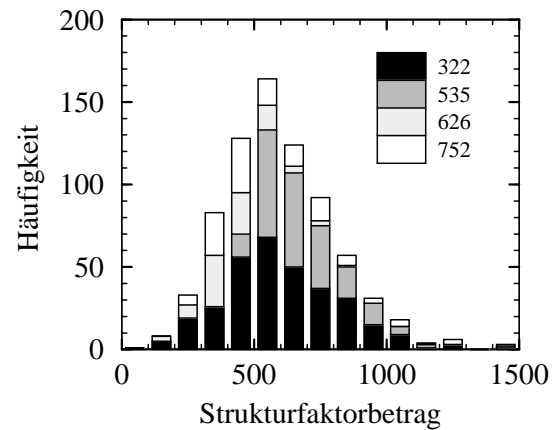
Die geringe Verbesserung der Elektronendichtekarte ist auf die wenigen neu bestimmten Tripletphasen und deren kleine Strukturfaktorbeträge zurückzuführen.

752 Einzelphasen: Die zusätzlichen 136 Reflexe, deren Strukturfaktorphasen bestimmt wurden, liegen hauptsächlich im Auflösungsbereich zwischen 3 bis 10 \AA mit Strukturfaktorbeträgen zwischen 300 und 1500.

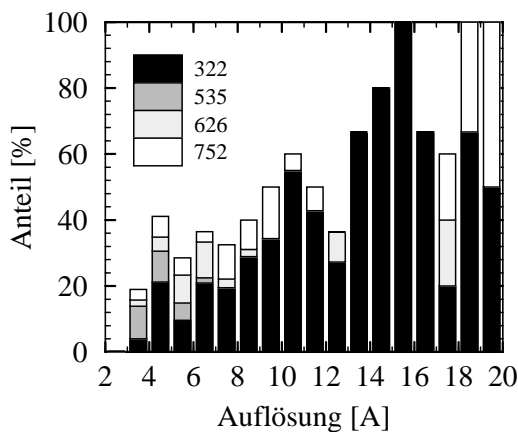
Bei dieser Messung wurden vor allem die Strukturfaktorphasen von Reflexen bestimmt, deren Strukturfaktorbeträge eine große Abweichung zwischen den gemessenen und den aus der ME–berechneten Werten aufweisen. Dies waren teilweise Reflexe mit sehr großen Strukturfaktorbeträgen. Dieses Auswahlkriterium führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Elektronendichtekarte.



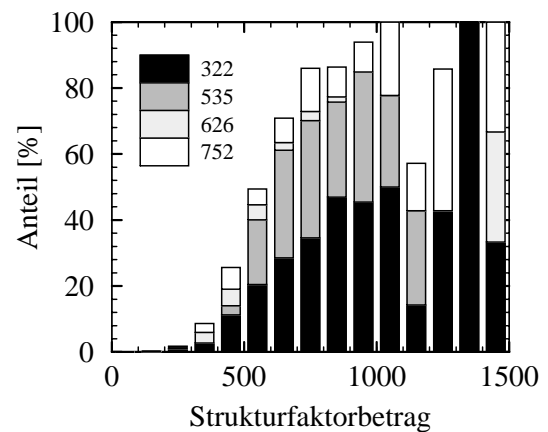
(a) Häufigkeit der Reflexe in Abhängigkeit von der Auflösung



(b) Häufigkeit der Reflexe in Abhängigkeit vom Strukturfaktorbetrag



(c) Anteil der Reflexe des Datensatzes lyso_merge.hkl (s. Kap. 4.1.1 Tabelle 2), deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit von der Auflösung.



(d) Anteil der Reflexe des Datensatzes lyso_merge.hkl, deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit vom Strukturfaktorbetrag.

Abbildung 34: Verteilung der Reflexe, deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde.

5.3.3 Maximum-Entropie-Elektronendichtekarten

Um die Verbesserung der Elektronendichtekarten in Abhängigkeit der Tripletphasenanzahl zu verdeutlichen, wurden die Elektronendichtekarten mit dem Strukturmodell 193L verglichen. Bei der Interpretation einer Elektronendichtekarte muß eine durchgehende C_{α} -Kette bestimmt werden. Schwierigkeiten ergeben sich, wenn die Elektronendichte unterbrochen ist, ein sogenannter Kettenbruch (engl: chain break), und somit der Weg in einer „Sackgasse“ endet oder wenn durch viele zusätzliche Verbindungen zwischen den Seitenketten und/oder der Hauptkette Mehrfachverzweigungen auftreten.

322 Einzelphasen: Die Elektronendichtekarte basierend auf 322 Struktur Faktoren ist in den Abbildungen 35(a) und 36(a) dargestellt. Sie zeigt eine deutliche Trennung zwischen den Bereichen des Proteinmoleküls und des Lösungsmittels. Die Elektronendichte ist in der Nähe des Strukturmodells akkumuliert. Allerdings ist keine Sekundärstruktur in dieser Elektronendichtekarte zu erkennen. Viele Kettenbrüche und zusätzliche Verbindungen erlauben es nicht, zusammenhängende Fragmente an die Elektronendichte anzupassen. Teilweise ist im Randbereich des Proteinmoleküls keine Elektronendichte vorhanden. Eine Interpretation der Elektronendichtekarte ist nicht möglich (Betzel, 1995).

535 Einzelphasen: Die Elektronendichtekarte basierend auf 535 Struktur Faktoren ist in den Abbildungen 35(b) und 36(b) dargestellt. In dieser Elektronendichtekarte ist die Sekundärstruktur von α -Helices zu sehen. Die etwa 20 Kettenbrüche und die mehrfach auftretenden Vielfachverzweigungen verhindern die Bestimmung einer C_{α} -Kette über die Länge von mehreren Aminosäuren.

626 Einzelphasen: Die Elektronendichtekarte basierend auf 626 Struktur Faktoren ist in den Abbildungen 35(c) und 36(c) dargestellt. Sie zeigt neben Sekundärstrukturen auch einige charakteristische Seitenketten. Im Zentrum des Proteinmoleküls lassen sich bereits Fragmente über die Länge einiger Aminosäuren an die Elektronendichte anpassen. Die Anzahl der Kettenbrüche ist gegenüber der vorhergehenden Elektronendichtekarte beinahe unverändert, aber die Anzahl der Vielfachverzweigungen ist deutlich geringer. Somit können an diese Elektronendichtekarte bereits einige Fragmente einer zusammenhängenden C_{α} -Kette angepaßt werden. Eine vollständige Interpretation ist jedoch nicht möglich (Koepeke, 1996).

752 Einzelphasen: Die Elektronendichtekarte basierend auf 752 Struktur Faktoren ist in den Abbildungen 35(d) und 36(d) dargestellt. Diese Elektronendichtekarte weist nur noch acht Kettenbrüche auf, die Anzahl der Vielfachverzweigungen hat sich nochmals verringert. Teilweise ist trotz eines Kettenbruchs der Verlauf der C_{α} -Kette deutlich zu erkennen, zum Beispiel beim Kettenbruch Met 12–Lys 13 in der α -Helix (s. Abb. 37(a)). An diese Elektronendichtekarte lassen sich direkt große Fragmente anpassen (Koepeke, 1997). In den Bereichen Trp 63, Pro 70–Glu 71 und Asn 74–Asn 77 ist die Elektronendichtekarte schlecht definiert, dies stimmt mit Konformationsänderungen der Residuen Pro 70–Leu 75 überein (Vaney, Maignan, Riès-Kautt & Ducruix, 1996). Die Fragmente können durch eine C_{α} -Kette verbunden werden, eine Strukturverfeinerung kann beginnen.

Vergleich der ME-Elektronendichtekarten: Die Verbesserung der Elektronendichtekarten in Abhängigkeit der Anzahl der experimentell bestimmten Tripletphasen wird an zwei Beispielen gezeigt.

Das erste Beispiel (s. Abb. 35) zeigt das Zentrum des Proteinmoleküls (Strukturmodell 193L). In Abbildung 35(a) akkumuliert sich die Elektronendichte in der Nähe des Strukturmodells, eine Sekundärstruktur ist nicht zu erkennen. In Abbildung 35(b) umgibt die Elektronendichte das Strukturmodell in beinahe allen Bereichen, in der unteren Bildhälfte zeigen sich Mehrfachverzweigungen bei Ser 91. Im Zentrum des Proteinmoleküls wird die

(a) ME-Elektronendichtekarte basierend auf 322
Strukturfaktoren

(b) ME-Elektronendichtekarte basierend auf 535
Strukturfaktoren

(c) ME-Elektronendichtekarte basierend auf 626
Strukturfaktoren

(d) ME-Elektronendichtekarte basierend auf 752
Strukturfaktoren

Abbildung 35: Die ME-Elektronendichtekarten basieren auf einer unterschiedlichen Anzahl von Strukturfaktoren. Zum Vergleich ist das Strukturmodell R193 gelb eingezeichnet. Der gezeigte Bereich liegt im Zentrum des Proteinmoleküls. Bereits mit 535 Strukturfaktoren wird das Zentrum des Proteinmoleküls durch die ME-Elektronendichtekarte gut wiedergegeben. Weitere Erläuterungen siehe Text.

(a) ME–Elektronendichtekarte basierend auf 322
Strukturfaktoren

(b) ME–Elektronendichtekarte basierend auf 535
Strukturfaktoren

(c) ME–Elektronendichtekarte basierend auf 626
Strukturfaktoren

(d) ME–Elektronendichtekarte basierend auf 752
Strukturfaktoren

Abbildung 36: Die ME–Elektronendichtekarten basieren auf einer unterschiedlichen Anzahl von Strukturfaktoren. Zum Vergleich ist das Strukturmodell R193 gelb eingezeichnet. In der rechten Bildhälfte ist eine α –Helix zu erkennen, die Elektronendichtekarte basierend auf 535 Strukturfaktoren zeigt bereits deren Sekundärstruktur. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Struktur bereits durch die ME–Elektronendichtekarte basierend auf 535 Struktur Faktoren gut wiedergegeben. In Abbildung 35(c) hat sich die Mehrfachverbindung bei Ser 91 bereits aufgelöst, die Elektronendichtekarte weist eine deutlichere Struktur auf (Glu 35). Die Elektronendichtekarte ist im ganzen Bereich der Abbildung 35(d) deutlich strukturiert. Der Bereich der Elektronendichte der Trp 28–Seitenkette ist nun auch mit demjenigen der Hauptkette verbunden.

Im zweiten Beispiel (s. Abb. 36) ist in der rechten Bildhälfte eine α –Helix zu erkennen. In der linken Bildhälfte ist die Verbesserung der Elektronendichtekarte in Abhängigkeit der Anzahl der Tripletphasen sehr gut zu beobachten. Wie bereits im ersten Beispiel ist auch in Abbildung 36(a) die Elektronendichte um das Strukturmodell grob lokalisiert. Eine strukturierte Elektronendichtekarte ist in Abbildung 36(b) zu sehen. Es treten Kettenbrüche in der C_α –Helix bei Lys 97 und in der linken Bildhälfte bei His 15 und Tyr 20 auf. Eine zusätzliche Verbindung zwischen His 15 und Val 92 ist zu beobachten. In Abbildung 36(c) ist der Bereich der Elektronendichte der Lys 96–Seitenkette auch mit demjenigen der Hauptkette verbunden. Nur noch ein Kettenbruch ist bei His 15 zu beobachten, die zusätzliche Verbindung His 15 und Val 92 bleibt erhalten. In der Elektronendichtekarte der Abbildung 36(d) sind alle Kettenbrüche geschlossen, und auch die Verbindung His 15 und Val 92 hat sich aufgelöst. An diese Elektronendichtekarte läßt sich eine C_α –Kette anpassen.

5.3.4 Zusammenfassung

Das Maximum–Entropie–Verfahren ermöglicht, aus den verschiedenen Phasendatensätzen den geeignetsten anhand Entropie und Likelihood auszuwählen. Ab einer gewissen Anzahl von Struktur faktorphasen (etwa 500) ist die Korrelation zwischen Entropie und Likelihood, sowie der mittleren gewichteten Struktur faktorphasen–Differenz zu R193 deutlich zu erkennen.

In den gezeigten Beispielen ist nur im Fall von 703 experimentell bestimmten Tripletphasen (s. Abb. 33(c)) eine größere Anzahl von Struktur faktorphasen von der Variation betroffen. Entscheidende Unterschiede in der Qualität von ME–Elektronendichtekarten sind bei Abweichungen der mittleren gewichteten Struktur faktorphasen–Differenz von maximal 8° nicht zu beobachten.

Eine Extrapolation der Struktur faktorphasen erbrachte keine Verbesserung der ME–Elektronendichtekarten.

Die Elektronendichtekarten, die sich bei der direkten Fouriertransformation der bestimmten Struktur faktorphasen und –beträge ergeben, entsprechen in etwa der Qualität der ME–Elektronendichtekarten. Bei der großen Anzahl der zur Verfügung stehenden Struktur faktoren mit bekannter Phase ergibt sich bei der Verwendung der ME–Methode in Bereichen hoher Elektronendichte keine entscheidende Verbesserung der Elektronendichtekarten.

Die Bestimmung der Struktur faktorphasen von Reflexen, deren Struktur faktorbeträge große Abweichung zwischen den gemessenen und den aus der ME–berechneten Werten aufweisen, ergab eine wesentliche Verbesserung der Elektronendichtekarte. Darunter befand sich eine große Anzahl von Reflexen mit sehr großen Struktur faktorbeträgen.

Erst die Qualität der ME–Elektronendichtekarte basierend auf 752 Struktur faktoren ermöglichte es, ein vollständiges Startmodell direkt an die Elektronendichte anzupassen.

5.4 Auswahlkriterien für die Triplettphasenbestimmung an tetragonalem Lysozym

Da die Maximum–Entropie–Elektronendichtekarte basierend auf 752 Strukturfaktorphasen interpretierbar ist, stellt sich die Frage: Welche Strukturfaktoren sind für die Berechnung einer ME–Elektronendichtekarte entscheidend?

Dazu wurden nach dem Maximum–Entropie–Verfahren Elektronendichtekarten berechnet, bei denen die Reflexe, deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit der maximalen Auflösung und/oder des Strukturfaktorbetrags eingeschränkt sind. In Tabelle 5 sind die verschiedenen Auswahlkriterien für die Elektronendichtekarten zusammengefaßt.

Elektronen– dichtekarten	Strukturfaktor		Auflösung		Anzahl der Reflexe	Abbildungen
	min.	max.	min.	max.		
I	70	1435	55,5	2,5	752	37(a) und 38(a)
II	360	1435	55,5	2,5	670	37(b) und 38(b)
III	70	1435	55,5	3,5	617	37(d) und 38(d)
IV	360	1435	55,5	3,5	548	37(c) und 38(c)

Tabelle 5: Zusammenfassung der Auswahlkriterien für die Elektronendichtekarten.

Vergleich der ME–Elektronendichtekarten: Die Auswirkungen der verschiedenen Einschränkungen auf die Elektronendichtekarten wird an zwei Beispielen gezeigt.

Im ersten Beispiel (s. Abb. 37) ist eine α –Helix dargestellt. In Abbildung 37(a) zeigt die Elektronendichtekarte I viele Details der Struktur, z. B. ist in der α –Helix ein Kettenbruch bei Lys 13 zu sehen. Die Elektronendichtekarte II in Abbildung 37(b) zeigt große Übereinstimmungen mit der Elektronendichtekarte I. In der unteren, linken Bildhälfte löst sich eine „falsche“ Verbindung zwischen Glu 7–Ala 10 auf (die Beschriftung Glu 7 ist nicht mehr in der Abbildung enthalten). Die Elektronendichtekarte III in Abbildung 37(c) ist gleichförmiger, sie zeigt weniger Details, der Kettenbruch hat sich geschlossen. Die Elektronendichtekarte IV in Abbildung 37(d) zeigt große Übereinstimmungen mit der Elektronendichtekarte III, auch hier ist der Kettenbruch geschlossen.

Für das zweite Beispiel (s. Abb. 38) wurde ein Bereich des Proteinmoleküls gewählt, in dem die Elektronendichte schlechter definiert ist. In Abbildung 38(a) sind in der Elektronendichtekarte I einerseits sehr viele Details der Struktur zu erkennen, andererseits wird die Interpretation durch Mehrfachverzweigungen (Asp 66, Cys 64, Pro 70) und fehlende Verbindungen zwischen der Elektronendichte der Seitenketten (Trp 62, Trp 63) und der Elektronendichte der Hauptkette erschwert. Die Elektronendichtekarte II in Abbildung 38(b) ist gegenüber der Elektronendichtekarte I nahezu unverändert. In Abbildung 38(c) ist die Elektronendichtekarte III wieder gleichförmiger, Mehrfachverbindungen haben sich aufgelöst (Cys 64, Pro 70) oder sind deutlich als falsche Verbindungen zu erkennen (Asp 66). Die Elektronendichte der Seitenketten (Trp 62, Trp 63) ist mit derjenigen der Hauptkette verbunden, dagegen löst sich die Elektronendichte der Seitenkette Arg 61 von der Elektronendichte der Hauptkette. Die Elektronendichtekarte IV in Abbildung 38(d) zeigt wieder große Übereinstimmungen mit der Elektronendichtekarte III. Die Elektronendichtekarte ist übersichtlich und kann daher gut interpretiert werden.

(a) ME–Elektronendichtekarte I basierend auf 752 Strukturfaktoren

(b) ME–Elektronendichtekarte II basierend auf 670 Strukturfaktoren mit Strukturfaktorbeträgen größer als 360

(c) ME–Elektronendichtekarte III basierend auf 617 Strukturfaktoren und einer maximalen Auflösung von 3,5 Å

(d) ME–Elektronendichtekarte IV basierend auf 548 Strukturfaktoren mit Strukturfaktorbeträgen größer als 360 und einer maximalen Auflösung von 3,5 Å

Abbildung 37: Am Beispiel dieser α –Helix werden die Veränderung der ME–Elektronendichtekarten durch Einschränkung des Strukturfaktorbetrags und der maximalen Auflösung gezeigt. Zum Vergleich ist das Strukturmodell R193 gelb eingezeichnet. Weitere Erläuterungen siehe Text.

(a) ME–Elektronendichtekarte I basierend auf 752 Struktur Faktoren

(b) ME–Elektronendichtekarte II basierend auf 670 Struktur Faktoren mit Struktur Faktor beträgen größer als 360

(c) ME–Elektronendichtekarte III basierend auf 617 Struktur Faktoren und einer maximalen Auflösung von 3,5 Å

(d) ME–Elektronendichtekarte IV basierend auf 548 Struktur Faktoren mit Struktur Faktor beträgen größer als 360 und einer maximalen Auflösung von 3,5 Å

Abbildung 38: Die Veränderung der ME–Elektronendichtekarten durch Einschränkung des Struktur faktor betrags und der maximalen Auflösung kann in diesem Bereich mit schlecht definierter Elektronendichte beobachtet werden. Zum Vergleich ist das Strukturmodell R193 gelb eingezeichnet. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Einschränkungen des Strukturfaktorbetrags: Die Elektronendichtekarte II, die aus 670 Strukturfaktoren mit einem Strukturfaktorbetrag größer als 360 berechnet wurde, zeigt nur wenige, unbedeutende Veränderungen gegenüber der Elektronendichtekarte I. Der Einfluß der 82 Reflexe mit kleinem Strukturfaktorbetrag ist bei der Berechnung der Elektronendichtekarte gering.

Bei einer restriktiveren Einschränkung des Strukturfaktorbetrags wächst die Zahl der Mehrfachverzweigungen sprunghaft an, die Zahl der Kettenbrüche bleibt nahezu konstant, eine Interpretation dieser Elektronendichtekarten ist nicht mehr möglich.

Elektronendichtekarten, bei denen eine obere Grenze für den Strukturfaktorbetrag vorgegeben wurde, sind nicht interpretierbar. Sie zeigen viele Mehrfachverzweigungen und Kettenbrüche, teilweise ist die Elektronendichte über mehrere Residuen nicht definiert.

Einschränkungen des Auflösungsereichs: Die Elektronendichtekarte III, die aus 670 Strukturfaktoren mit einer maximalen Auflösung von 3,5 Å berechnet wurde, zeigt weniger Details als die unbeschränkte Elektronendichtekarte. Die Zahl der Kettenbrüche hat sich auf elf erhöht, allerdings ist die Zahl der Mehrfachverzweigungen zurückgegangen. Die Elektronendichtekarte III ist dadurch übersichtlicher, und die Interpretation hat sich vereinfacht.

Bei einer restriktiveren Einschränkung der maximalen Auflösung steigt die Zahl der Kettenbrüche an, die Elektronendichtekarte verliert die Information der Sekundärstruktur, und eine Interpretation ist nicht mehr möglich.

Elektronendichtekarten, bei denen eine Grenze für die minimale Auflösung vorgegeben wird, weisen zu viele Kettenbrüche auf, als daß eine Interpretation möglich wäre.

Einschränkungen des Auflösungsereichs und des Strukturfaktorbetrags : Die Elektronendichtekarte IV, die sich aus den Einschränkungen Strukturfaktorbetrag größer als 360 und maximale Auflösung von 3,5Å ergibt, ist noch interpretierbar. Die Zahl der Kettenbrüche hat sich auf 12 erhöht, aber nur wenige Mehrfachverzweigungen sind zu beobachten. Aufgrund der Auswahlkriterien sind 204 Reflexe ausgeschlossen, von denen nur 13 Reflexe beide Ausschlußkriterien erfüllen. Um diesen Satz von 548 Strukturfaktorphasen zu erhalten, müssen etwa 620 Triplettphasen bestimmt werden.

Zusammenfassung: Diese Einschränkungen zeigen, daß für die Interpretation einer Elektronendichtekarte Reflexe mit großen Strukturfaktorbeträgen und bis zu einer Auflösung von etwa 3,5 Å entscheidend sind. Diese Reflexe sind auch besonders für die experimentelle Bestimmung von Triplettphasen geeignet, da sie große Interferenzeffekte zeigen und geringe Meßzeiten erforderlich sind.

Wurden bei der Berechnung der ME–Elektronendichtekarte Reflexe mit sehr großen Strukturfaktorbeträgen nicht berücksichtigt, so konnte diese fehlende Information nicht durch das

Maximum–Entropie–Verfahren extrapoliert werden. Reflexe mit kleinem Strukturfaktorbeitrag zeigen nur geringen Einfluß auf die Elektronendichtekarten.

Reflexe mit höherer Auflösung erschweren die Interpretation, wenn nicht die Strukturfaktorphase von mindestens 30 % der Reflexe in diesem Auflösungsbereich bestimmt wurde.

Bei der Auswahl der zu messenden Dreistrahlfälle sollten vor allem Strukturfaktorphasen von Reflexen bestimmt werden, die folgende Kriterien erfüllen:

- Gemessene und aus der ME–berechneten Strukturfaktorbeiträge unterscheiden sich deutlich;
- Reflexe mit großen Strukturfaktorbeiträgen;
- Reflexe mit einer maximalen Auflösung von etwa 3,5 Å.

5.5 Maximum–Entropie–Verfahren für Nessellectin

5.5.1 Bewertung der Phasensätze durch Likelihood und Entropie

An Nessellectin wurden insgesamt 210 Tripletphasen experimentell bestimmt. Im Startphasensatz befindet sich neben den Strukturfaktorphasen dreier ausgewählter Reflexe (für die Wahl des Ursprungs) die Phase eines seminvarianten Reflexes. Damit können aus dem Tripletphasen–Datensatz 188 Strukturfaktoren abgeleitet werden. Darunter befinden sich sieben Phasen, die aufgrund der Verknüpfung nicht festgelegt und daher Symbolen (davon zwei spezielle Symbole) zugeordnet werden. In diesem Fall sind 170 Strukturfaktorphasen von den symbolischen Einzelphasen abhängig. Die Variationen der symbolischen Strukturfaktorphasen ergeben 200 Phasendatensätze, für die jeweils eine Entropiemaximierung durchgeführt wird.

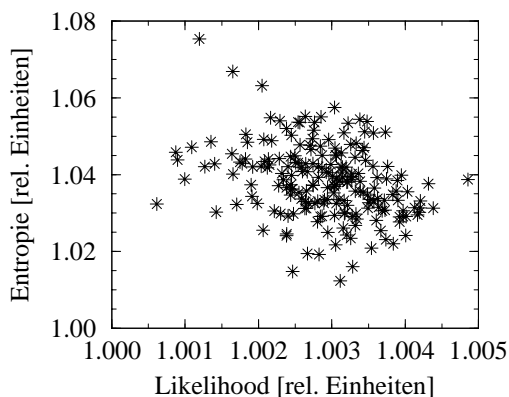


Abbildung 39:

188 Einzelphasen / 200 Phasendatensätze

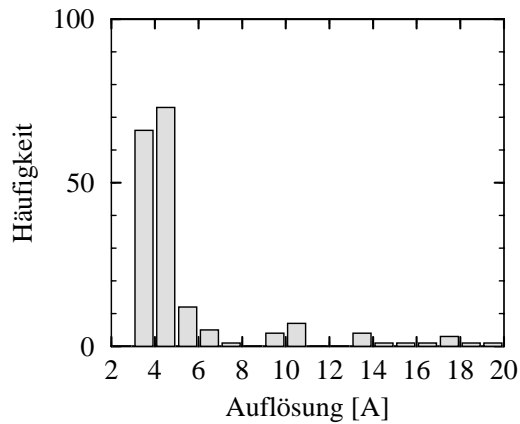
Bei dieser geringen Anzahl von Strukturfaktorphasen ist noch keine Korrelation zwischen Entropie und Likelihood zu erkennen.

Bei der großen Anzahl der von symbolischen Phasen abhängigen Einzelphasen ist die Bewertung der Phasendatensätze durch Entropie und Likelihood entscheidend für die Berechnung einer Elektronendichtekarte. In Abbildung 39 ist zu erkennen, daß bei der geringen Anzahl von Strukturfaktorphasen noch keine Korrelation zwischen Entropie und Likelihood vorhanden ist. Wie aus Abbildung 33(a) bekannt ist, ist im Fall einer geringen Anzahl von Strukturfaktorphasen die Entropie das bessere Kriterium für die Auswahl

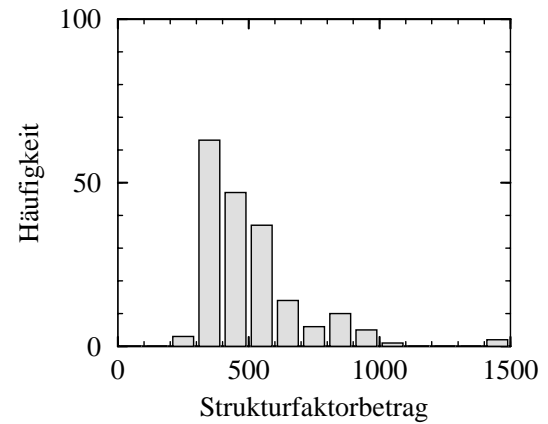
der Phasendatensätze mit geringer Strukturfaktorphasen-Differenz. Für die Berechnung der ME-Elektronendichtekarte wurde daher der Phasendatensatz mit der größten Entropie ausgewählt.

5.5.2 Verteilung der Reflexe mit bestimmter Strukturfaktorphase

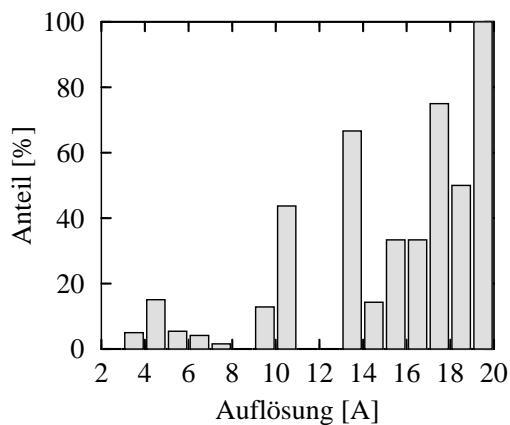
Die an den 210 Tripletphasen beteiligten Reflexe sind in Abbildung 40 in Abhängigkeit der Auflösung und des Strukturfaktorbetrags aufgetragen.



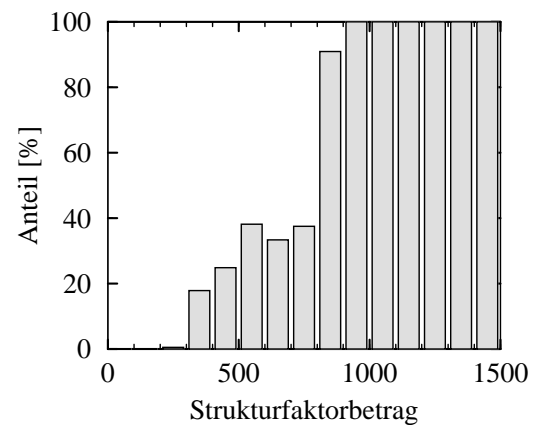
(a) Häufigkeit der Reflexe in Abhängigkeit von der Auflösung



(b) Häufigkeit der Reflexe in Abhängigkeit vom Strukturfaktorbetrag



(c) Anteil der Reflexe des Datensatz nettle.hkl (s. Kap. 4.5), deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit von der Auflösung.



(d) Anteil der Reflexe des Datensatz nettle.hkl, deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit vom Strukturfaktorbetrag

Abbildung 40: Verteilung der Reflexe, deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde.

Die Reflexe liegen im Auflösungsbereich zwischen 3,15 und 37,25 Å und besitzen Strukturfaktorbeträge zwischen 260 und 1500. In Abbildung 40(c) ist der Anteil der Reflexe des Intensitätsdatensatz *nettle.hkl* (s. Kap. 4.5), deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit von der Auflösung aufgetragen. Die meisten Strukturfaktorphasen wurden von Reflexen im Auflösungsbereich von 3 bis 5 Å bestimmt. Im Auflösungsbereich von 6 bis 9 Å und 11 bis 13 Å wurden nur von wenigen Reflexen die Strukturfaktorphasen bestimmt. Dadurch ist in diesem Auflösungsbereich der ME–Elektronendichtekarte kaum Strukturinformation enthalten.

In Abbildung 40(d) ist der Anteil der Reflexe des Intensitätsdatensatz *nettle.hkl*, deren Strukturfaktorphase bestimmt wurde, in Abhängigkeit vom Strukturfaktorbetrag aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß die Strukturfaktorphase der Reflexe mit großen Strukturfaktorbeträgen bereits bestimmt ist.

5.5.3 Maximum–Entropie–Elektronendichtekarten

In Abbildung 41 ist die ME–Elektronendichtekarten basierend auf 188 Struktur Faktoren gezeigt. Die Abtrennung zwischen Proteinmolekül und Lösungsmittel ist deutlich zu erkennen (Zegers, 1997). In der ME–Elektronendichtekarte berechnet aus dem Phasendatensatz mit der größten Likelihood, ist die Trennung von Proteinmolekül und Lösungsmittel weniger ausgeprägt.

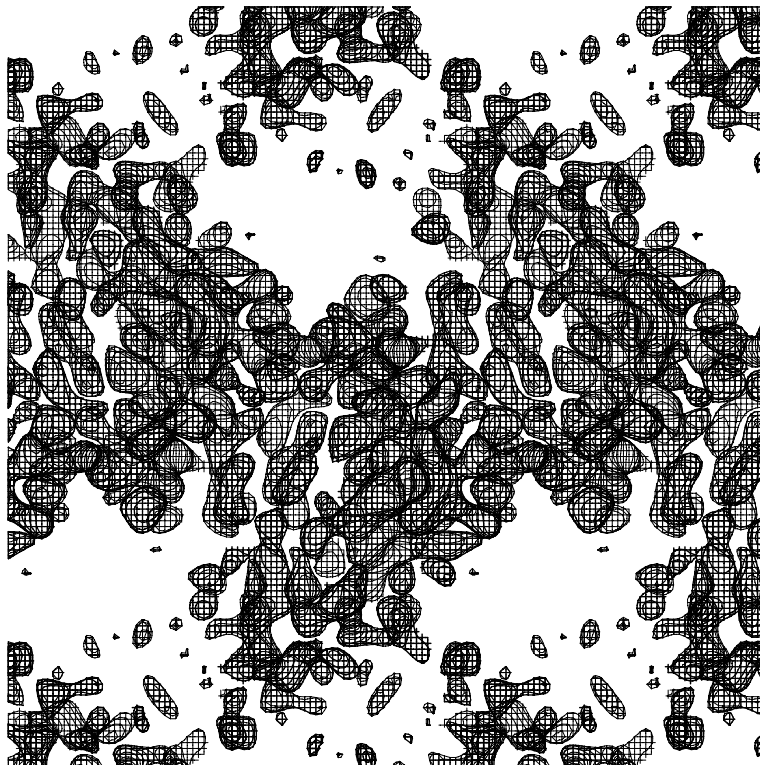


Abbildung 41: Die ME–Elektronendichtekarten basierend auf 188 Struktur Faktoren. Die „einwickelnde Elektronendichte“ (engl.: envelope) des Proteinmoleküls entspricht der zu erwartenden Größe.

5.5.4 Zusammenfassung

Da in diesem Fall 170 Strukturfaktorphasen von symbolischen Einzelphasen abhängen, kann durch das Maximum–Entropie–Verfahren der geeignete Phasensatz ausgewählt werden. Die Anzahl der experimentell bestimmten Tripletphasen ist zu gering, um eine Korrelation zwischen Entropie und Likelihood zu erhalten. Der Phasensatz mit der größten Entropie zeigt die gleichförmigste Elektronendichteverteilung. Da nur wenige Strukturfaktorphasen von Reflexen im Auflösungsbereich von 5 bis 13 Å bestimmt wurden, ist in der ME–Elektronendichte nur wenig Strukturinformation dieses Auflösungsbereichs enthalten. Aus der Erfahrung bei tetragonalem Lysozym läßt sich folgern, daß voraussichtlich weitere 200 Tripletphasen benötigt werden, um eine direkt interpretierbare ME–Elektronendichtekarte zu erhalten.

In Zusammenarbeit mit I. Zegers (Universität Brüssel) wird versucht, ausgehend von der Einhüllenden ein Startmodell an diese Elektronendichtekarte anzupassen. Weitere Messungen von Dreistrahlinterferenz–Profilen an Nessellectin sind in Vorbereitung, wurden aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

6 Strukturverfeinerung an tetragonalem Lysozym

6.1 Anpassung eines Startmodells an die Elektronendichtekarte

Das Programm XtalView (McRee, 1993) ist ein Programmpaket zur Lösung makromolekularer Kristallstrukturen mittels isomorphen Ersatzes. Aus diesem Programmpaket wurde das Programm xfit verwendet, um die Elektronendichtekarten und Modelle darzustellen. Es bietet die Möglichkeit, selbsttätig Strukturmodelle zu verändern oder sie an die Elektronendichtekarten anpassen zu lassen, unter Berücksichtigung der Bindungswinkel und -abstände.

Der „Bau“ eines Strukturmodells erfolgt in drei Schritten. Zuerst werden nur einzelne Fragmente der C_{α} -Atompositionen an die Elektronendichtekarte angepaßt, die anschließend über die Bereiche mit schlecht definierter Elektronendichte zu einer durchgehenden C_{α} -Kette zusammengesetzt werden. Ausgehend von den C_{α} -Positionen wird zuerst eine Ala-Kette an die Elektronendichtekarte angepaßt, die dann durch die bekannte Sequenz der Aminosäuren ersetzt wird. Dieses Strukturmodell wird als Startmodell für die anschließende Strukturverfeinerung verwendet.

6.2 Ablauf einer Strukturverfeinerung

Eine Proteinstruktur kann nicht gelöst werden, indem das Startmodell mit allen Daten (einschließlich der Daten bei hoher Auflösung) verfeinert wird, bis das Strukturmodell konvergiert. Da sich das Startmodell deutlich vom verfeinerten Strukturmodell unterscheidet (s. Abb. 43, 46 und 47), würde eine solche Verfeinerung in einem lokalen Minimum enden. Zu Beginn der Verfeinerungen werden nur die Meßdaten mittlerer Auflösung berücksichtigt, anschließend werden schrittweise Daten höherer Auflösung hinzugenommen. In jedem Verfeinerungsschritt müssen die R-Werte konvergieren. Die Datenmenge kann vergrößert werden, wenn die R-Werte den Erwartungswerten dieses Auflösungsbereiches entsprechen. Bei zu hohen R-Werten ist eine Korrektur des Strukturmodells mit Hilfe der Differenz-Elektronendichtekarten ($2|F_o| - |F_c|$ und $|F_o| - |F_c|$) erforderlich. In den Differenz-Elektronendichtekarten sind die Abweichungen der Elektronendichte aus den gemessenen Daten und der des verfeinerten Modells mit „positiver“ und „negativer“ Elektronendichte gekennzeichnet. Die $2|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte ist eine mit der $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte modulierte $|F_o|$ -Elektronendichtekarte, die fehlerhafte Stellen deutlicher zeigt als eine $|F_o|$ -Elektronendichtekarte. Nach der Korrektur des Strukturmodells wird die Verfeinerung fortgeführt. Dabei werden sich die R-Werte zunächst erhöhen, um dann auf kleinere Werte als vor der Korrektur zu konvergieren.

Werden für die Verfeinerung die Daten des Auflösungsbereiches zwischen 2,5 und 2,1 Å verwendet, können individuelle thermische Auslenkungsparameter für die verschiedenen Atome verfeinert werden.

Bei der Verwendung von Daten mit einer Auflösung besser als 2,0 Å und R-Werten kleiner als 25 % können die Wassermoleküllagen bestimmt und verfeinert werden. Maxima der Differenz-Elektronendichtekarte, die mit keinem existierenden Atom übereinstimmen, geben Hinweise auf die Wassermoleküllagen. Jedoch ist eine Überprüfung der Abstände

von Wassermolekülen zu den benachbarten Atomen erforderlich. Die Zahl der verfeinerten Parameter erhöht sich bei Verfeinerung der Wassermoleküllagen, wodurch die R-Werte deutlich kleiner werden. Das Strukturmodell wird durch die Verfeinerung der Wassermoleküllagen nur verbessert, wenn die Maxima derselben eindeutig in der Differenz-Elektronendichtekarte zu bestimmen sind. Bei den anschließenden Verfeinerungen werden weitere Wassermoleküllagen in den Differenz-Elektronendichtekarten sichtbar.

Die Strukturverfeinerung ist abgeschlossen, wenn in den Differenz-Elektronendichtekarten keine Bereiche mehr zu erkennen sind, die auf eine Korrektur des Strukturmodells oder auf noch nicht bestimmte Lösungsmittel hinweisen.

Während und am Ende der Strukturverfeinerung muß das Strukturmodell auf Konsistenz geprüft werden (Dodson, Kleywegt & Wilson, 1996). Eine Auswahl der Konsistenzkriterien für Strukturmodelle wird im nächsten Abschnitt gegeben.

6.3 Konsistenzkriterien für Strukturmodelle

6.3.1 Stereochemie

Die Untersuchung von Proteinstrukturen, die mit hoher Auflösung gemessen wurden, erlaubt genaue Angaben über die räumliche Anordnung der Atome in Proteingruppen. Mit Hilfe der daraus berechneten idealen Bindungsabstände, Bindungswinkel, Torsionswinkel und Van-der-Waals-Bindungsabstände können Abweichungen des verfeinerten Strukturmodells zur idealen Stereochemie aufgezeigt werden.

Die geringe Auflösung der Elektronendichtekarten führt zu Abweichungen des Strukturmodells von den Idealwerten der Stereochemie. Darüber hinaus sind die Bindungen, die für die Sekundärstruktur der Proteinmoleküle verantwortlich sind, nur schwach und daher flexibel, so daß die Elektronendichtekarte nur das zeitliche und räumliche Mittel der Proteinstruktur darstellt. In vielen Fällen sind Aufspaltungen der Atompositionen von Seitenketten und Schlaufen der Hauptkette in der Elektronendichtekarte zu beobachten. Oft ist die Aufspaltung der Atompositionen nur gering und die einzelnen Atompositionen können in der Elektronendichtekarte nicht unterschieden werden. Die Fehlordnung fällt nur durch größere thermische Auslenkungsparameter auf. Die zu erwartende Genauigkeit der Bindungslängen beträgt zwischen 0,03 und 0,05 Å und für die Bindungswinkel etwa 3° (McRee, 1993).

6.3.2 R-Werte

Die R-Werte geben ein Maß für die Übereinstimmung der gemessenen und berechneten Intensitäten an. Sie zeigen die Verbesserung des Strukturmodells und geben Anhaltspunkte für die Übereinstimmung des verfeinerten Modells mit der Elektronendichtekarte. Als alleiniges Kriterium für die Genauigkeit des verfeinerten Strukturmodells können die R-Werte nicht verwendet werden, da sie kein absolutes Maß für die Güte der Strukturverfeinerung sind. Sie sind abhängig von der Vollständigkeit, dem Auflösungsbereich und der Qualität des gemessenen Datensatzes. Für den Verlauf der R-Werte bei der Strukturverfeinerung eines Proteinmoleküls sind die folgenden Anhaltspunkte gegeben (McRee, 1993). Zu Beginn

einer Strukturverfeinerung sind die R–Werte üblicherweise zwischen 45 % und 40 %. Je nach Güte des Startmodells verringern sich die R–Werte auf 35 % bis 25 %, bevor das Strukturmodell mit Hilfe der Differenz–Elektronendichtekarten korrigiert werden muß. Die R–Werte verringern sich, je höher der Auflösungsbereich der verwendeten Daten ist. Ist die Auflösung der gemessenen Daten höher als 2,0 Å und sind die R–Werte kleiner als 20 %, so ist das verfeinerte Strukturmodell essentiell richtig. Proteinstrukturen mit einem R–Wert kleiner als 17 % gelten als gut verfeinert. R–Werte kleiner als 12 % sind eher die Ausnahme.

Hinweise auf die Güte der Verfeinerung sind aus der Auftragung der R–Werte in Abhängigkeit von der Auflösung der gemessenen Daten zu erhalten. Bei niedriger Auflösung (etwa 10 Å) sind die Strukturfaktoren wesentlich durch das Lösungsmittel beeinflusst, und die R–Werte sind groß. Zwischen 5,0 und 2,5 Å sind die R–Werte am kleinsten, bei höherer Auflösung vergrößern sie sich wieder.

Folgende Definitionen der R–Werte sind aus dem Handbuch des Programmpaketes zur Strukturverfeinerung SHELX-97 (Sheldrick, 1997) entnommen⁵.

- Interner R–Wert R_{int}

Für die Berechnung des internen R–Wertes wird über die F_o^2 –Werte symmetrisch äquivalenter Reflexe gemittelt. Mit F_o^2 werden die experimentellen Daten bezeichnet. R–Werte, die auf der Basis von F^2 berechnet werden, sind mindestens um den Faktor zwei größer als die auf F basierenden R–Werte.

$$R_{int} = \frac{\sum(|F_o^2 - F_o^2(\text{Mittelwert})|)}{\sum F_o^2} \quad (54)$$

- Kristallographischer R–Wert R_{krist}

Um die R–Werte unterschiedlicher Strukturverfeinerungsprogramme zu vergleichen, die meistens R–Werte auf der Basis von F angeben, wird der kristallographische R–Wert berechnet. Zusätzlich kann das Abschneidekriterium $F_o > 4\sigma(F_o)$ für die Berechnung des R_{krist} verwendet werden. Mit F_c werden die berechneten Strukturfaktorbeträge bezeichnet.

$$R_{krist} = \frac{\sum(|F_o| - |F_c|)}{\sum |F_o|} \quad (55)$$

- Gewichteter R–Wert wR

Der gewichtete R–Wert wird auf der Basis von F^2 berechnet mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gewichtungsschema w :

$$w = \frac{1}{\sigma^2(F_o^2) + (0,1 \cdot F_c^2)^2} \quad (56)$$

$$wR = \sqrt{\frac{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{\sum w(F_o^2)^2}} \quad (57)$$

⁵In diesem Abschnitt werden daher mit F_o^2 die gemessenen und mit F_c^2 die berechneten Strukturfaktorbeträge bezeichnet.

- Goodness of Fit GooF

Der Goodness of Fit wird ebenfalls auf der Basis von F^2 berechnet. N_n bezeichnet die Zahl der unabhängigen Reflexe, N_p die Zahl der Parameter.

$$GooF = \sqrt{\frac{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{(N_n - N_p)}} \quad (58)$$

- R_{free} -Wert (Brünger, 1992)

Für die Berechnung des R_{free} -Wertes wird der gesamte Datensatz in einen „Arbeitsdatensatz“ (90–95% der Reflexe) und einen „Referenzdatensatz“ (5–10% der Reflexe) unterteilt. Die Auswahl der Reflexe erfolgt zufällig. Jede Verfeinerung und auch jede Berechnung der Elektronendichtekarten wird nur mit dem Arbeitsdatensatz durchgeführt. Das Strukturmodell soll unabhängig vom Referenzdatensatz sein. Mit R_{free} wird der aus dem Referenzdatensatz berechnete R_{krist} bezeichnet. Der R_{free} -Wert ist somit ein objektiveres Kriterium für die Güte der Verfeinerung. Mit Hilfe des R_{free} -Wertes kann unterschieden werden, ob die Erhöhung der Parameterzahl das Strukturmodell verbessert oder nur die R-Werte verkleinert.

6.3.3 Auftragung nach Ramachandran (Phi–Psi–Auftragung)

Jede Sekundärstruktur von Proteinen läßt sich vollständig durch die beiden Bindungswinkel ϕ und ψ beschreiben (s. Abb. 17). Mögliche Kombinationen für ϕ und ψ können durch einfache Auftragung von ϕ gegen ψ graphisch dargestellt werden. Man bezeichnet das entstehende Diagramm als Ramachandran–Diagramm (Ramachandran, Ramakrishnan & Sasi-sekharan, 1963). Die Bereiche der theoretisch erlaubten Konformationen von Peptiden sind jeweils angegeben.

Ramachandran–Diagramme sind geeignet, um die Güte einer Verfeinerung zu beurteilen. Die Torsionswinkel der Hauptkette der Proteinstruktur sollten alle in den erlaubten Bereichen des Ramachandran–Diagramms liegen. Glycin, das keine Seitenkette besitzt, bildet eine Ausnahme. Bei mehreren Abweichungen von den theoretisch erlaubten Konformationen ist eine Korrektur des Strukturmodells mit Hilfe der Differenz–Elektronendichtekarte erforderlich.

6.3.4 Thermische Auslenkungsparameter

Eine Analyse der thermischen Auslenkungsparameter (B–Werte) ermöglicht, Fehler im Strukturmodell zu erkennen (s. Abb. 45). In einer gut bestimmten Proteinstruktur variieren die B–Werte zwischen benachbarten Atomen wenig. Abweichungen davon deuten auf mögliche Fehler im Strukturmodell hin. Sind die B–Werte zu klein ($< 2 \text{ \AA}^2$) oder zu groß ($> 35 \text{ \AA}^2$), liegt in diesem Bereich möglicherweise ein Fehler im Strukturmodell vor. Zu kleine B–Werte sind physikalisch sinnlos, da sich dann ein Atom an einer Position befindet, die in der Differenz–Elektronendichtekarte eine große Abweichung aufweist. Die Ursache kann sein, daß diese Position mit einem Atom mit zu niedriger Ordnungszahl besetzt ist, oder daß Fehler in den Strukturfaktorphasen einen Anstieg der Elektronendichte am Ort dieses Atoms verursachen. Für die Entscheidung, ob das Strukturmodell korrigiert werden muß, ist die Analyse der thermischen Auslenkungsparameter allein nicht ausreichend.

6.4 Verfeinerung des Startmodells aus der ME–Elektronendichtekarte

Die Verfeinerung wurde mit dem Programm SHELXL (Sheldrick, 1997) durchgeführt. Für die Überprüfung und Diagnose der Strukturmodelle unter Berücksichtigung der exakten Bindungswinkel und –abstände nach Engh und Huber (1991) und die Berechnung der Differenz–Elektronendichtekarten stand das Programm SHELXPRO (Sheldrick, 1997) zur Verfügung.

Der zur Strukturverfeinerung verwendete Datensatz wurde vom Vaney et al. (1996) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieser Datensatz, basierend auf F, enthält 24111 symmetrisch unabhängige Reflexe, davon haben 19013 Reflexe Strukturfaktorbeträge mit $F_0 > 4\sigma(F_0)$. Für den R_{free} –Test wurden daraus 5 % der Reflexe ausgewählt, dies entspricht 1208 Reflexen (davon 966 Reflex mit Strukturfaktorbeträgen $F_0 > 4\sigma(F_0)$). Iterativ wurde das Strukturmodell mit der konjugierten–Gradienten–Methode (Hendrickson & Konnert, 1980) verfeinert und anschließend mit Hilfe der Differenz–Elektronendichtekarten ($2|F_o| - |F_c|$ und $|F_o| - |F_c|$) korrigiert. Wassermoleküllagen konnten in den Differenz–Elektronendichtekarten lokalisiert und mit dem Strukturmodell verfeinert werden. Nach weiteren Verfeinerungen konnten je eine Na^+ – und eine Cl^- –Atomposition des Lösungsmittels lokalisiert und verfeinert werden. Eine Verfeinerung der anisotropen Temperaturfaktoren konnte aufgrund des Verhältnisses von Anzahl unabhängiger Reflexe zu Anzahl der Parameter nicht durchgeführt werden. Die Analyse der Differenz–Elektronendichtekarte zeigte eine Fehlordnung der Seitenketten von Asn 59 und Val 109. Die R–Werte sind für einige Schritte der Verfeinerung in Tabelle 6 angegeben.

	N_p	N_r	R_{free}^+ [%]	R_{krist}^+ [%]	R_{free} [%]	R_{krist} [%]	wR [%]	GooF	GooF _r
Startmodell	4007	4122	40,3	35,9	41,9	37,2	73,3	8,39	7,74
Strukturmodell korrigiert	4007	4107	25,8	22,6	27,1	23,7	55,3	5,14	4,80
100 H ₂ O	4403	4118	22,0	17,3	23,6	19,0	45,3	4,02	3,77
SK korrigiert insg. 109 H ₂ O	4471	4147	20,7	16,6	22,1	17,7	43,4	3,83	3,59
Aufspaltung: Asn 59, Val 109	4487	4174	20,3	16,3	21,6	17,2	44,4	2,20	2,06
L.S.–Zyklus insg. 114 H ₂ O	4487	4175	20,1	16,3	21,4	17,2	44,3	2,20	2,06
L.S.–Zyklus vollst. Datensatz	4487	4175	–	16,5	–	17,4	45,1	2,22	2,10

Tabelle 6: Ergebnisse der Auswertung

N_p ist die Anzahl der Parameter und N_r Anzahl der „Restrains“. Für die Berechnung von R_{free}^+ und R_{krist}^+ wurden nur Reflexe mit $F_o > 4\sigma(F_o)$ verwendet. Mit GooF_r wird der „Goodness of Fit“ unter Berücksichtigung der Restrains bezeichnet.

Um die Standardabweichungen der Atompositionen und Bindungslängen zu berechnen, wurde der letzte Verfeinerungszyklus ohne Veränderungen der Strukturparameter mit der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt⁶. Die Standardabweichung der Bindungslängen beträgt $0,03 \text{ \AA}$, die Standardabweichung des Chiralvolumens ist $0,07 \text{ \AA}^3$.

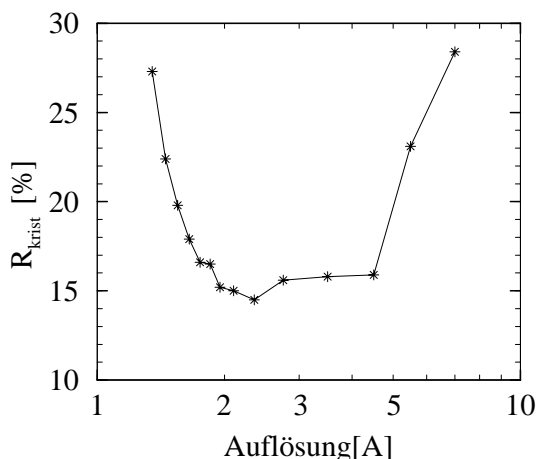


Abbildung 42: Für verschiedene Auflösungsbereiche der kristallographische R-Wert aufgezeichnet. Bei einer Auflösung niedriger als 6 \AA weisen die hohen R-Werte auf Defizite bei der Bestimmung von Lösungsmittel hin, während bei hoher Auflösung ($>1,5 \text{ \AA}$) die Einflüsse von Fehlordnung (anisotrope Debye-Waller-Faktoren) sichtbar werden. Jedoch muß berücksichtigt werden, daß die Qualität der Meßdaten bei $|\vec{h}|^{-1} < 1,5 \text{ \AA}$ oder $|\vec{h}|^{-1} > 10 \text{ \AA}$ deutlich abnimmt.

In Abbildung 43 sind die Abweichungen der Atomkoordinaten pro Residuum beim Vergleich des Startmodells mit dem verfeinerten Strukturmodell dargestellt. Es zeigt sich, daß die Atompositionen der Hauptkette des Startmodells bereits im wesentlichen mit denen des verfeinerten Strukturmodells übereinstimmen. Jedoch unterscheiden sich vor allem die großen, beweglichen Seitenketten deutlich vom verfeinerten Strukturmodell.

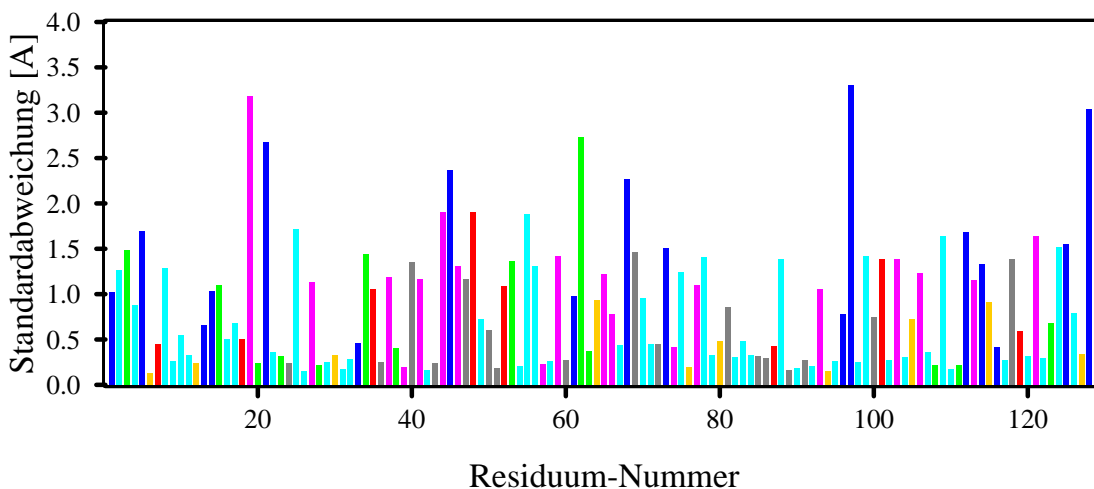


Abbildung 43: Standardabweichung der Atomkoordinaten pro Residuum beim Vergleich des Startmodells mit dem verfeinerten Strukturmodell.

Die mittlere Standardabweichung beträgt $1,20 \text{ \AA}$. Abweichungen größer als 2σ treten nur für Atompositionen der Seitenketten auf.

⁶Für diesen Verfeinerungszyklus wurde die SHELXL-Option L.S. („full-Matrix“-Methode) verwendet.

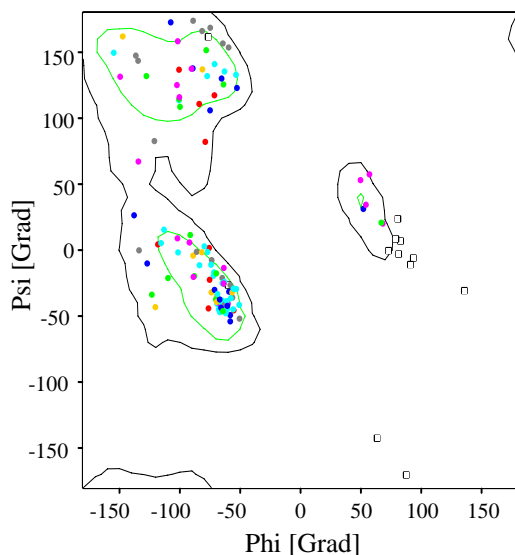
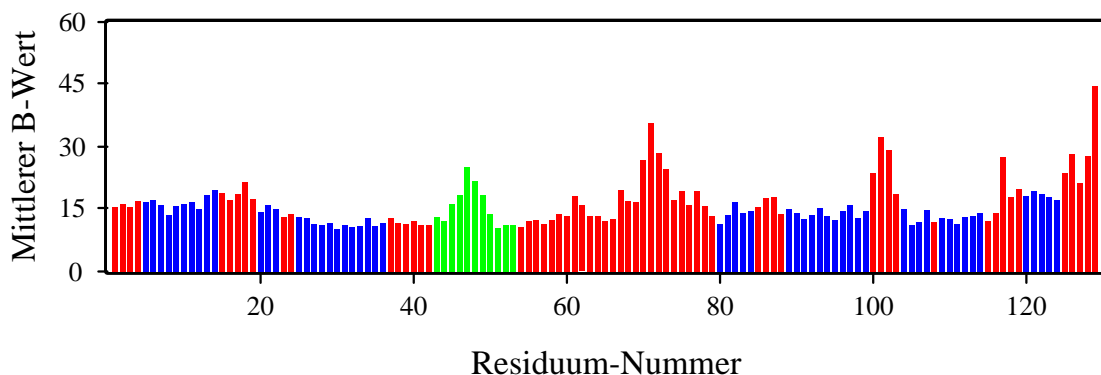


Abbildung 44: Das Ramachandran-Diagramm des verfeinerten Strukturmodells zeigt die theoretisch erlaubten Konformationen der Aminosäuren. Sie sind durch die Werte ϕ und ψ definiert. Die Aminosäuren sind in verschiedenen Grautönen dargestellt, Glycin wird durch offene Quadrate dargestellt. 115 der Aminosäuren (Glycin ausgeschlossen) befinden sich in der Kernregion, 90 davon sogar in der inneren Kernregion. Das verfeinerte Strukturmodell zeigt für keine der Aminosäuren Abweichungen von den theoretisch erlaubten Konformationen.

Für die Atome der Haupt- und Seitenketten ist jeweils der mittlere thermische Auslenkungsparameter berechnet. In Abbildung 45(a) sind die mittleren thermischen Auslenkungsparameter (B-Werte) der Atome der Hauptkette in Abhängigkeit des Residuums aufgetragen. Residuen, die an der Bildung von α -Helices beteiligt sind, besitzen einen B-Wert von etwa 15 \AA^2 . Die an der Bildung des β -Faltblattes beteiligten Residuen besitzen größere B-Werte, da diese Sekundärstruktur flexibler ist. Residuen mit B-Werten größer als 25 \AA^2 treten in den Bereichen Thr 69–Arg 74, Ser 100–Asn 103 und Arg 125–Leu 129 auf. Das Strukturmodell R193 zeigt entlang der Hauptkette Fehlordnungen im Bereich Thr 69–Arg 74 (Vaney, Maignan, Riès-Kautt & Ducruix, 1996). Die Seitenketten der Residuen Ser 100–Asn 103 und Arg 125–Leu 129 liegen an der Oberfläche des Proteinmoleküls. Die schlecht definierte Elektronendichte weist auf Fehlordnungen hin, die jedoch nicht als getrennte Positionen verfeinert werden konnten. Die Unordnung der Atome in der Seitenkette, die sich in den großen B-Werten widerspiegelt, beeinflusst die Atome der Hauptkette und deren mittlere thermische Auslenkungsparameter.

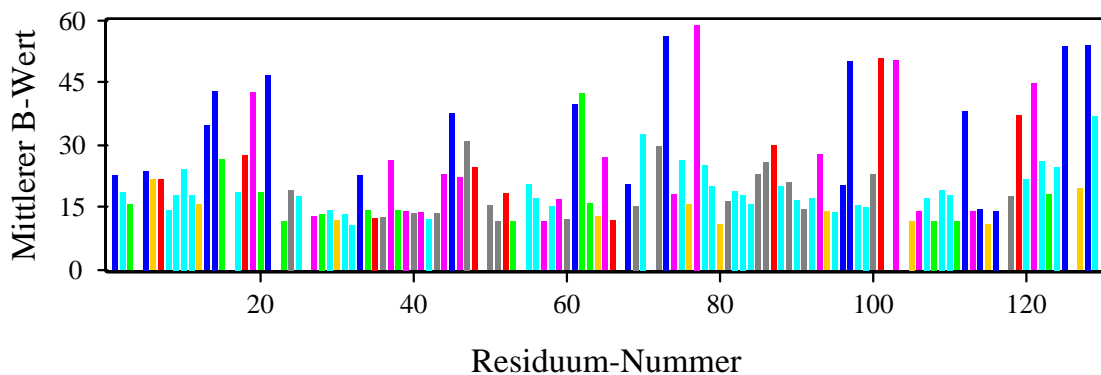
In Abbildung 45(b) sind die mittleren thermischen Auslenkungsparameter der Atome der Seitenkette in Abhängigkeit des Residuums aufgetragen. Der mittlere B-Wert von Atomen der Seitenkette ist größer. Atome von flexiblen Seitenketten (Arg, Lys, Gln) besitzen größere B-Werte. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, sind die Seitenketten Arg 13, Arg 14, Arg 21, Arg 73, Asn 77, Lys 97, Asp 101, Asn 103, Arg 112, Asp 119, Gln 121, Arg 125, Arg 128 und Leu 125 an der Oberfläche des Proteinmoleküls. Die schlecht definierte Elektronendichte weist auf Fehlordnungen hin, die sich ebenfalls in den großen B-Werten der Atome der Seitenketten widerspiegeln.

In den Abbildungen 46 und 47 sind die Veränderungen vom Startmodell bis zum verfeinerten Strukturmodell gezeigt.



(a) Mittlere thermische Auslenkungsparameter der Atome der Hauptkette

Die Residuen Arg 5–Arg 14, Tyr 20–Gly 22, Leu 25–Ser 36, Cys 80–Leu 84, Thr 89–Val 99, Gly 104–Ala 107, Val 109–Arg 114, Val 120–Ile 124 sind an den α -Helices beteiligt, ihre mittleren B-Werte sind klein und nahezu konstant. An der Bildung des β -Faltblattes sind die Residuen Thr 43–Tyr 53 beteiligt, deren B-Werte sind größer. Auffallend sind die hohen B-Werte bei den Residuen Thr 69–Arg 73. Die Hauptkette ist in diesem Bereich fehlgeordnet. Im Bereich Ser 100–Asn 103 und Arg 125–Leu 129 sind deutliche Fehlordnungen der Seitenketten in der Elektronendichtekarte zu beobachten. Dies beeinflusst die B-Werte der Atome in der Hauptkette und deren mittlere thermische Auslenkungsparameter.



(b) Mittlere thermische Auslenkungsparameter der Atome der Seitenketten

Die Seitenketten sind in verschiedenen Grautöne dargestellt. Auffallend sind die hohen B-Werte der Residuen Arg 13, Arg 14, Arg 21, Arg 73, Asn 77, Lys 97, Asp 101, Asn 103, Arg 112, Asp 119, Gln 121, Arg 125, Arg 128 und Leu 125. Diese Residuen befinden sich alle an der Oberfläche des Proteinmoleküls. Die Elektronendichte ist in diesen Bereichen schlecht definiert und weist auf Fehlordnungen hin.

Abbildung 45: Mittlere thermische Auslenkungsparameter der Atome in Abhängigkeit des Residuums

(a) Startmodell und ME–Elektronendichtekarte basierend auf 752 Strukturfaktoren

(b) Verfeinertes Strukturmodell und die dazugehörige Elektronendichtekarte

Abbildung 46: Veränderung vom Startmodell zum verfeinerten Strukturmodell

Die Atompositionen werden bei der Strukturverfeinerung verändert. Die Seitenkette Val 109 ist fehlgeordnet, es konnten zwei Positionen verfeinert werden. Das Einschnüren der Elektronendichte im Benzolring der Seitenkette Trp 108 ist ebenfalls zu beobachten.

(a) Startmodell und ME–Elektronendichtekarte basierend auf 752 Strukturfaktoren

(b) Verfeinertes Strukturmodell und die dazugehörige Elektronendichtekarte

Abbildung 47: Die Atompositionen der Residuen, die die α –Helix bilden, sind bereits im Startmodell gut zu bestimmen. Die Veränderung der Atompositionen im Laufe der Verfeinerung ist hier deutlich in den Seitenkette zu sehen.

6.5 Vergleich der verfeinerten Strukturmodelle

Das Strukturmodell 193L wurde von Vaney et al. (1996) mit dem Programmpaket X-PLOR (Brünger, 1987) mit einem R-Wert von 18,4% und einem R_{free} -Wert von 22,6% verfeinert. Es wurden insgesamt 142 Wassermoleküllagen und jeweils zwei Konformationen der Seitenketten von Lys 1, Asn 59, Ser 86 und Val 109 bestimmt. Die mittlere Differenz der experimentell bestimmten Tripletphasen zu den aus dem Strukturmodell R193 berechneten beträgt $19,9^\circ$.

In dieser Arbeit wurde die Strukturverfeinerung mit demselben Datensatz, aber mit dem Programmpaket SHELXL-97 durchgeführt. Für das Strukturmodell wurde mit dem vollständigen Datensatz ein R_{krist} -Wert von 17,4% und aus dem Referenzdatensatz ein R_{free} -Wert von 21,4% berechnet. Insgesamt konnten 114 Wassermoleküllagen verfeinert werden. In den Differenz-Elektronendichtekarten konnten nur für die Seitenketten Asn 59 und Val 109 zwei Konformationen bestimmt und verfeinert werden. Die mittlere Differenz der experimentell bestimmten Tripletphasen zu den aus dem verfeinerten Modell berechneten beträgt $19,5^\circ$, die Übereinstimmung mit den Tripletphasen hat sich somit nur geringfügig verbessert.

Für beide Strukturmodelle konnte jeweils eine konsistente Differenz-Elektronendichtekarte berechnet werden. Als Referenz wurde eine Verfeinerung des Strukturmodells R193 mit SHELXL-97 durchgeführt (R_{krist} -Wert 17,5%; R_{free} -Wert 21,3%), die keine wesentlichen Veränderungen des Strukturmodells R193 ergab. Strukturverfeinerungen auf der Basis von $|F|^2$ (SHELXL-97) oder auf der Basis von $|F|$ (X-PLOR) mit verschiedenen Programmpaketen können geringe Unterschiede der Strukturmodelle und der R-Werte ergeben. Da in manchen Bereichen die Elektronendichte sehr schlecht definiert ist, kann je nach Startmodell die Verfeinerung in einem lokalem Minimum enden, so daß Unterschiede in den verfeinerten Modellen auftreten können.

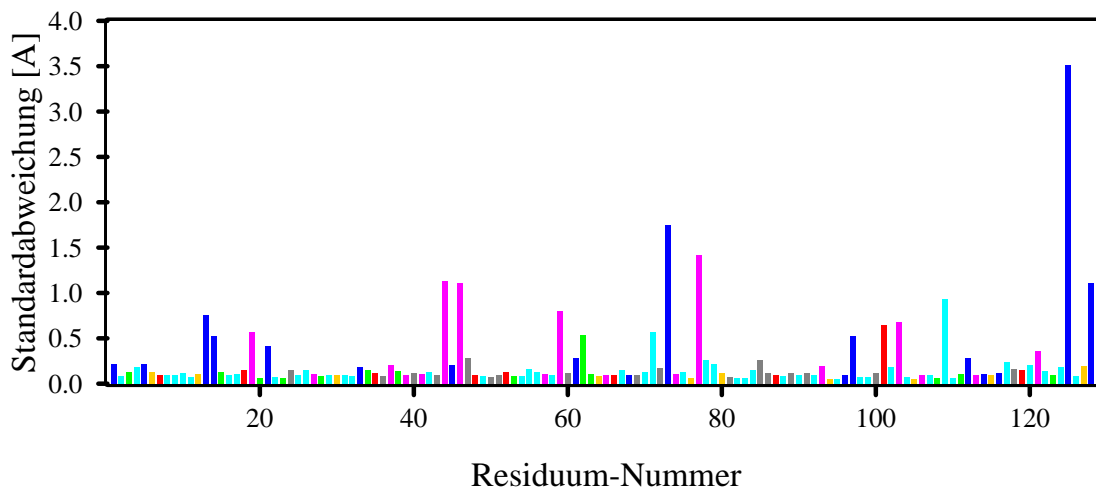


Abbildung 48: Standardabweichung der Atomkoordinaten pro Residuum beim Vergleich des verfeinerten Strukturmodells mit dem Strukturmodell 193L

Die mittlere Standardabweichung beträgt $0,54 \text{ \AA}$. Abweichungen größer als 2σ treten nur für Atompositionen der Seitenketten auf (s. Tab. 7). Der Verlauf der Seitenkette Arg 125 ist in den Differenz-Elektronendichtekarten beider Strukturmodelle nicht eindeutig zu erkennen, da die Elektronendichtekarte in diesem Bereich kaum definiert ist.

Bezeichnung des Atoms	[Å]	Bezeichnung des Atoms	[Å]	Bezeichnung des Atoms	[Å]	Bezeichnung des Atoms	[Å]
NZ_Lys 13	1,91	ND2_Asn 59	1,52	CG1_Val 109	2,46	NE_Arg 128	1,50
CG_Arg 14	1,24	CD_Arg 73	1,75	CG_Arg 125	2,32	CZ_Arg 128	1,53
ND2_Asn 19	1,13	NE_Arg 73	1,24	CD_Arg 125	3,60	NH1_Arg 128	1,14
OD1_Asn 44	2,30	CZ_Arg 73	2,46	NE_Arg 125	3,89	NH2_Arg 128	2,31
ND2_Asn 44	2,20	NH1_Arg 73	4,36	CZ_Arg 125	5,31	C_Leu 129	1,73
OD1_Asn 46	2,18	CE_Lys 97	1,34	NH1_Arg 125	6,32	CD1_Leu 129	2,47
ND2_Asn 46	2,24	ND2_Asn 103	1,61	NH2_Arg 125	5,78	CD2_Leu 129	2,69
OD1_Asn 59	1,64						

Tabelle 7: Atome, deren Differenz der Atompositionen des verfeinerten Strukturmodells zu denen des Strukturmodells 193L größer als 2σ ist (s. Abb. 48).

In Abbildung 48 sind die Standardabweichungen der Atomkoordinaten pro Residuum beim Vergleich des verfeinerten Strukturmodells mit dem Strukturmodell 193L aufgetragen. Die mittlere Standardabweichung der Atomkoordinaten pro Residuum beträgt $0,54 \text{ \AA}$. In Tabelle 7 sind die Atome aufgeführt, deren Standardabweichung pro Residuum größer als 2σ ist. Die beiden Modelle unterscheiden sich nur in den Seitenketten Lys 13, Arg 14, Asn 19, Arg 73, Lys 97, Asp 103, Val 109, Arg 125, Arg 128 und Arg 129. Diese Seitenketten, die sich an der Oberfläche des Protein befinden, sind fehlgeordnet. Die Elektronendichte beider Strukturmodelle ist in diesen Bereichen schlecht definiert. Der Verlauf dieser Seitenketten ist teilweise nicht in den Differenz-Elektronendichtekarten zu erkennen. Da die gemessenen Intensitäten keine Information über diesen Bereich enthalten, sind die verfeinerten Atompositionen vom Startmodell abhängig. Bei den Seitenketten Asn 44, Asn 46 und Asn 59 sind jeweils die Positionen der Sauerstoff- und Stickstoffatome vertauscht.

6.6 Zusammenfassung

Die Qualität der Maximum-Entropie-Elektronendichtekarte basierend auf 752 Strukturfaktoren ermöglichte, ausgehend von einzelnen Fragmenten einer C_α -Kette, ein vollständiges Startmodell direkt an die Elektronendichte anzupassen. Der Verlauf der Hauptkette war im wesentlichen in der ME-Elektronendichtekarte zu erkennen, ebenso viele charakteristische Seitenketten (Cys, Trp, Tyr, ...). An der Oberfläche des Proteinmoleküls konnten einige Seitenketten des Startmodells kaum an die in diesen Bereichen schlecht definierte Elektronendichtekarte angepaßt werden.

Ausgehend von diesem Startmodell und dem Strukturfaktor-Datensatz R193LSF wurde eine Strukturverfeinerung mit dem Programm SHELXL-97 durchgeführt. Im Laufe der Verfeinerung wurde anhand der Differenz-Elektronendichtekarten das Strukturmodell und die Lagen von Wassermolekülen bestimmt und mehrmals korrigiert. Das verfeinerte Strukturmodell wurde mit verschiedenen Konsistenzkriterien überprüft. Es stimmt bis auf einige Seitenketten an der Oberfläche des Proteinmoleküls, in den Bereichen mit schlecht definierter Elektronendichte, mit dem Strukturmodell R193 überein. Die Strukturverfeinerung ergab einen R_{krist} -Wert von 17,4 % und einem R_{free} -Wert von 21,4 %.

Zur Strukturverfeinerung konnten die experimentell bestimmten Tripletphasen nicht verwendet werden, da bisher kein Strukturverfeinerungsprogramm Tripletphasen berücksichtigt.

Somit konnte gezeigt werden, daß ausgehend von der ME-Elektronendichtekarte basierend auf 752 Struktur Faktoren, eine Strukturbestimmung ab initio an tetragonalem Lysozym durchgeführt werden konnte.

7 Beugungsexperimente hoher Auflösung zur Charakterisierung des Mosaikbaus von Proteinkristallen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Möglichkeit geprüft, Dreistrahlinterferenz-Experimente bei tiefen Temperaturen durchzuführen. Dazu wurden die ersten Beugungsexperimente hoher Auflösung zur Charakterisierung des Mosaikbaus von Proteinkristallen bei Temperaturen unter 130 K durchgeführt. Der unter Kryobedingungen erforderliche experimentelle Aufbau (gefrorener Kristall in einer Reyonschleife, Kaltluftstrom-Apparatur) erwies sich auch für Dreistrahlinterferenz-Experimente als geeignet. Die untersuchten Proteinkristalle zeichneten sich durch geringe Mosaikverbreiterung bei Intensitätsdatensammlungen mit Bildplattensystemen aus (Young, Dewan, Nave & Tilton, 1993; Bartunik, 1996; Betzel, 1995). Unter Verwendung von Synchrotronstrahlung ermöglichen die mit einem Diffraktometer hoher Winkelauflösung aufgenommenen Reflexprofile genauere Aussagen über die Mosaikverteilung als Bildplattensysteme. Es zeigte sich, daß die Halbwertsbreiten der Reflexprofile bei den untersuchten Proteinstrukturen alle in der selben Größenordnung liegen. Daher wurden nur an Lysozymkristallen weiter Untersuchungen zum Verständnis der höheren Mosaizität bei tiefen Temperaturen durchgeführt.

Intensitätsdatensammlungen bei tiefen Temperaturen: Die Anzahl der Röntgenstrukturbestimmungen an Proteinkristallen, die bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden, nimmt ständig zu. Inzwischen werden Beugungsexperimente an Proteinkristallen an Synchrotronstrahlungsquellen sowie an Laborröntgenquellen bei tiefen Temperaturen routinemäßig durchgeführt (Garman & Schneider, 1997).

Experimente an Proteinkristallen bei Temperaturen unter 130 K zeigen für die herkömmliche Intensitätsdatensammlung mehrere Vorteile. Der wichtigste ist die Verringerung der Röntgenstrahlungsschäden an den Proteinkristallen bei tiefen Temperaturen. Wie bereits in Kapitel 4.1.3 erwähnt, sind die Proteinkristalle durch ihren hohen Anteil an Wasser in der Kristallstruktur und dessen Diffusionsmöglichkeiten für Strahlenschäden besonders anfällig. Bei Temperaturen unter 130 K ist durch die verringerte Diffusionsgeschwindigkeit in vielen Fällen die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes an nur einem Kristall möglich. Zusätzlich sind die thermischen Bewegungen der Atome bei tiefen Temperaturen verringert, wodurch die Aufnahme von Datensätzen mit höherer Auflösung möglich ist. Für Experimente bei tiefen Temperaturen werden die Kristalle nicht in Kapillaren gebracht, sondern mit einer Reyonschleife aus der Flüssigkeit „gefischt“ und sofort abgekühlt. Die Vermeidung von Streuung an der Quarzglaskapillare und Mutterlösung zeigt sich in einem verbesserten Verhältnis von Signal zu Untergrund. Ein weiterer Vorteil zeigt sich in den Präparationstechniken für Experimente bei tiefen Temperaturen, die weniger Manipulation an den Kristallen erfordern.

Präparation der Kristalle: Wird der Kristall eines biologischen Makromoleküls unbehandelt auf Temperaturen unter 170 K abgekühlt, treten Kristallschäden durch mechanische Verspannung auf, die durch die 9-prozentige Vergrößerung des spezifischen Volumens bei der Umwandlung von Wasser zu hexagonalem Eis verursacht werden. Da die Eisbildung in Pro-

teinkristallen sehr kompliziert ist, wurden Untersuchungen zur Eisbildung an reinem Wasser und binären Lösungen durchgeführt (Angell & Trucker, 1980). Daraus ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, die Eisbildung in den Proteinkristallen zu verhindern.

Ein Übergang von flüssigem Wasser zu einer festen ungeordneten glasartigen Phase kann erreicht werden, wenn die Zeit für das Abkühlen deutlich kleiner ist als die der Kristallisation. Diese Forderung wird durch sogenanntes „Schockgefrieren“ erfüllt, indem die Kristalle in flüssigen Stickstoff oder Propan (Haas & Rossmann, 1970; Thomanek, Parak & Wintergerst, 1977) getaucht werden. Darüber hinaus können die Proteinkristalle durch Hinzufügen sogenannter „Kryoprotektoren“ geschützt werden (Petsko, 1975; Sousa, 1995). Die Kryoprotektoren müssen für jede Proteinart individuell gewählt werden. Die Kristalle zeigen Schäden durch die Wechselwirkung mit dem Kryoprotektor und durch das Abkühlen in der Mosaikverbreiterung der Reflexprofile und in der Verringerung des Beugungsvermögens. Für weitergehende Literatur siehe Rodgers (1994) oder Garman & Schneider (1997).

7.1 Mosaikverbreiterung bei schnellem Abkühlen

7.1.1 Tetragonales Lysozym

Literaturangaben: Bisher wurden nur wenige systematische Untersuchungen der Mosaikverbreiterung von Proteinkristallen durchgeführt, daher werden im folgenden zwei Arbeiten zu tetragonalem Lysozym vorgestellt.

Bei einer Temperatur von 100 K wurde bereits eine Röntgenstrukturbestimmung an tetragonalem Lysozym durchgeführt (Young, Dewan, Nave & Tilton, 1993). Als Kryoprotektor wurde dabei unverdünntes Paratone-N-Öl verwendet (Hope, 1988) und der Kristall wurde direkt im Kaltluftstrom abgekühlt. An diesem Kristall wurde unter Verwendung einer Drehanode (Cu K_α) mit einem Bildplattensystem ein vollständiger Datensatz mit einer Auflösung von 1,9 Å aufgenommen. Die Autoren konnten am Kristall keine nachteiligen Auswirkungen des Abkühlens beobachten.

Von Kurinov & Harrison (1995) wurden im Temperaturbereich von 95 bis 295 K Strukturuntersuchungen an tetragonalem Lysozym durchgeführt. Die Kristalle zerbrachen im Kryoprotektor 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) (Petsko, 1975). Daher wurden die Kristalle ohne Kryoprotektor mit Epoxyd-Harz auf einem Glasfaden befestigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kristalle wurden im Kaltluftstrom gemessen. An diesen Kristallen wurde unter Verwendung einer Drehanode (Cu K_α) mit einem Bildplattensystem ein Datensatz mit einer Auflösung bis zu 1,7 Å aufgenommen. Die Kristalle zeigten eine Mosaikverbreiterung bis zu 1° .

Einfluß von Kryoprotektoren: Kryoprotektoren sollen die Eisbildung des Wassers im Kristall und an der Kristalloberfläche während des Abkühlens verhindern. Geeignete Kryoprotektoren zeichnen sich dadurch aus, daß die auf 100 K abgekühlte Kryoprotektorlösung klar ist und sich keine kristallinen Ausscheidungen gebildet haben. Bei Raumtemperatur zeigt sich die Verträglichkeit der Proteinkristalle und der Kryoprotektorlösung dadurch, daß die

Kristalle in der Kryoprotektorlösung optisch perfekt sind, d. h. es sind keine Risse an der Kristalloberfläche oder Trübung der Kristalle zu beobachten. Die verwendeten Kryoprotektoren sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

C_R : Reservoirlösung	Rodgers, 1994
C_{RG} : C_R + 10–25% Glycerin	Rodgers, 1994
C_A : 1M (NH ₄)Ac, pH = 4,7	Petsko, 1975
C_{AG} : C_A + 25% Glycerin, pH = 4,7	Petsko, 1975

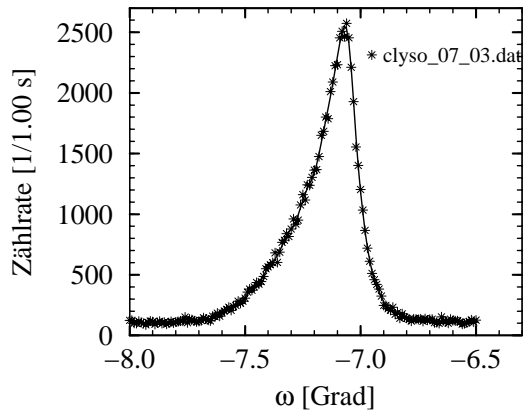
Tabelle 8: Zusammenstellung der verschiedenen Kryoprotektoren für tetragonales Lysozym

Einfluß der Kristallgröße: Um die Eisbildung des „Kristallwassers“ zu verhindern, ist eine hohe Abkühlrate erforderlich, die von der Wärmeleitfähigkeit im Kristall und dem Verhältnis Kristalloberfläche zu Kristallvolumen (S/V) abhängt. Die Wärmeleitfähigkeit im Kristall ist vom Verhältnis Lösungsmittel zu Proteinmolekül, Dichte der Struktur, Zusammensetzung der Mutterlösung, etc. abhängig. Kristalle mit größerem S/V-Verhältnis haben eine größere Abkühlrate. Bei Kristallen mit kleinerem S/V-Verhältnis treten große Temperaturgradienten zwischen Kristalloberfläche und der Kristallmitte auf, die zu thermischen Verspannungen führen. Daher wurden Kristalle verschiedener Größen und Habitus untersucht.

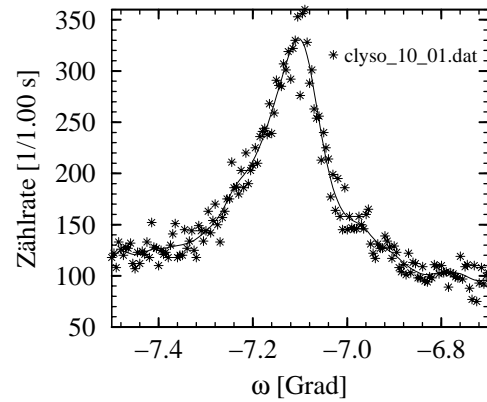
Einfluß der Abkühlmethode: Die Kristalle wurden entweder direkt im Kaltluftstrom bei 100 K (Oxford Cryosystem), oder in flüssigem Stickstoff (Schmelzpunkt 63 K, Siedepunkt 78 K) oder in flüssigem Propan⁷ (Schmelzpunkt 86 K, Siedepunkt 231 K) abgeschreckt. Die experimentelle Bestimmung der effektiven Abkühlrate ist schwierig und führt zu kontroversen Diskussionen (Hope, 1996; Plattner & Bachmann, 1982). Die Abkühlrate im Kaltluftstrom ist durch die geringe Wärmekapazität des gasförmigen Stickstoffs am geringsten. Beim Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bilden sich um die Probe isolierende Bläschen, die das Abkühlen verlangsamen. Bei kleinen Proben, wie Proteinkristallen, hat dieses möglicherweise keine Bedeutung (Hope, 1996). Propan besitzt einen großen Temperaturunterschied zwischen Schmelzpunkt und Siedepunkt, daher bilden sich beim Schockgefrieren keine Bläschen. Allerdings bildet sich in einem Behälter mit flüssigem Propan ein Temperaturgradient zwischen Oberfläche und Boden aus.

Auswertung der Reflexprofile: Um den Einfluß der verschiedenen Abkühlmethoden auf die Mosaikverteilung der Kristalle zu untersuchen, wurden an der ESRF Reflexprofile bei tiefen Temperaturen aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt, und einige Reflexprofile unterschiedlich behandelter Kristalle sind in Abbildung 49 dargestellt. Zum Vergleich wurden an Lysozymkristallen derselben Züchtung bei Raumtemperatur Reflexprofile mit Halbwertsbreiten von 0,003° aufgenommen. Die Stabilität der experimentellen Anordnung war für die Messung der Reflexprofile bei Temperaturen unter 130 K ausreichend. Es zeigte sich, daß in Abhängigkeit von Kryoprotektor, Abkühlmethode und Kristallgröße keine signifikanten Unterschiede in den Halbwertsbreiten der Reflexprofile

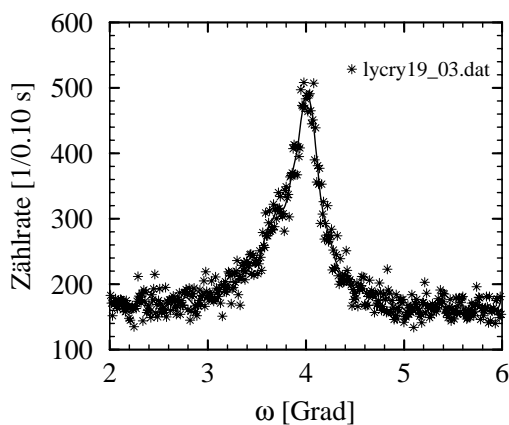
⁷Die Experimente wurden freundlicherweise von Prof. J. C. Fontecilla-Champs und Herrn X. Vernede (IBS, Grenoble) unterstützt.



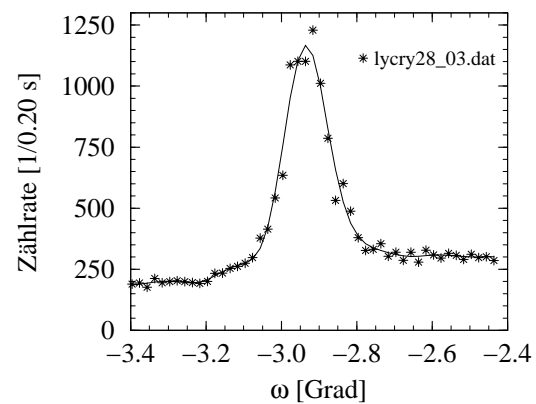
(a) Halbwertsbreite: $0,21^\circ$
Kryoprotektor: C_{AG} ; fl. Stickstoff



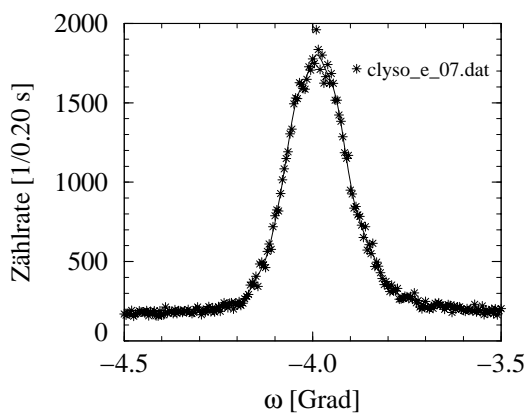
(b) Halbwertsbreite: $0,15^\circ$
Kryoprotektor: C_{RG} ; fl. Stickstoff



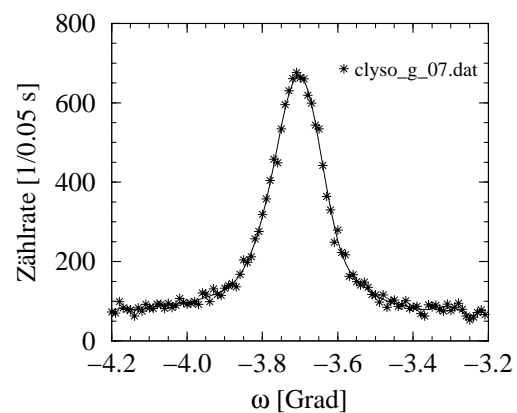
(c) Halbwertsbreite: $0,36^\circ$
Kryoprotektor: C_A, C_{AG} ; fl. Stickstoff



(d) Halbwertsbreite: $0,17^\circ$
Kryoprotektor: C_A, C_{AG} ; Kaltluftstrom



(e) Halbwertsbreite: $0,18^\circ$
kein Kryoprotektor; fl. Propan



(f) Halbwertsbreite: $0,17^\circ$
Kryoprotektor: C_A, C_{AG} ; fl. Propan

Abbildung 49: Bei tiefen Temperaturen wurden an den Lysozymkristallen keine Orientierungsmatrizen bestimmt, daher wurden Reflexprofile mit unbekannter Indizierung aufgenommen.

	Größe [mm ³]	FWHM [°]	T [K]	Kühlbedingungen
lycryob	-	0,18	130	C _{AG} -
lycryoc	-	0,16	130	C _{AG} -
lycryod	0,7×0,5×0,5	0,09 – 0,28	130	C _{AG} -
clyso_00	-	0,28	100	C _{AG} N
clyso_01	-	0,67	100	C _{AG} N
clyso_02	-	0,37	100	C _{AG} , K
clyso_04	-	0,34 – 0,76	130	C _A N
clyso_05	-	0,68 – 0,74	130	C _{AG} K
clyso_06	-	0,26 – 0,58	130	C _{AG} N
clyso_07	-	0,21 – 0,56	130	C _{AG} N
clyso_08	1,0×0,7×0,7	0,60	130	C _{RG} N
clyso_09	0,5×0,5×0,3	0,80	130	C _{RG} N
clyso_10	0,5×0,5×0,3	0,15 – 0,21	130	C _{RG} 30 s N
clyso_11	-	0,54	130	C _{RG} 30 s N
clyso_12	-	0,68 – 0,86	130	C _{RG} 30 s N
clyso_13	0,05×0,05×0,025	0,62	130	C _{RG} 900 s N
clyso_14	-	0,15	130	- N
clyso_15	-	0,25 – 0,44	130	- N
clyso_16	-	0,26	130	- N
clyso_17	-	0,38 – 0,42	130	C _{RG} N
clyso_18	-	0,50	130	C _{RG} N
lycry3	-	2,60 – 3,30	100	C _A , C _{AG} je 60 s N
lycry4	-	1,80 – 2,70	100	C _A , C _{AG} je 120 s N
lycry5	-	2,50	100	C _A , C _{AG} N
lycry8	-	3,20	100	C _A 60 s, C _{AG} 1 s K
lycry9	-	1,28		Parafinöl K
lycry12	0,5	0,56 – 2,56	100	C _A , C _{AG} je 60 s K
lycry14	0,3	0,42	100	C _A 60 s, C _{AG} 1 s K
lycry15	0,3	1,44	100	C _A 60 s, C _{AG} 1 s K
lycry16	0,5	3,68	100	- K
lycry17	0,5	0,42	130	- K
lycry18	0,5	0,92 – 2,65	130	C _A N
lycry19	0,5	0,27 – 0,60	130	C _A 1 s, C _{AG} 1 s N
lycry21	0,4	0,49 – 0,81	130	C _A 1 s, C _{AG} 1 s N
lycry25	-	0,31	130	C _A 1 s, C _{AG} 1 s N
lycry26	-	0,34 – 0,56	130	Parafinöl N
lycry28	-	0,16 – 0,38	130	C _A 1 s, C _{AG} 1 s K
clyso_a	1,0×1,0×0,3	0,18 – 0,66	130	- P
clyso_b	0,8×0,8×0,4	0,08 – 0,31	130	- P
clyso_d	1,5×1,5×1,0	0,26 – 1,34	130	C _A , C _{AG} P
clyso_e	1,5×0,8×0,8	0,18 – 0,37	130	- P
clyso_g	-	0,17 – 0,86	130	C _A , C _{AG} P

Tabelle 9: Kristalle, die unter verschiedenen Bedingungen abgekühlt wurden.

K, N und P bezeichnen die Abkühlmethode: Kaltluftstrom, fl. Stickstoff oder fl. Propan.

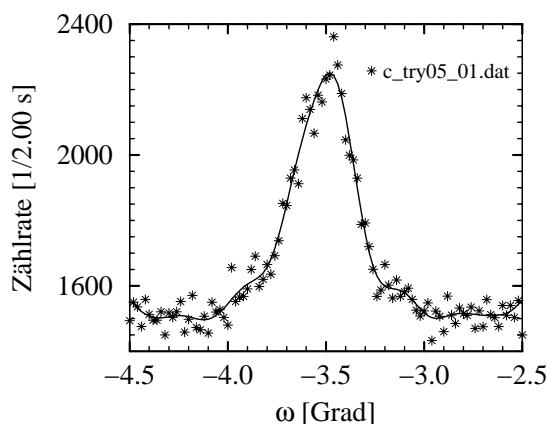
zu beobachten sind. Bei Temperaturen unter 130 K konnten mit unterschiedlichen Abkühlmethoden Halbwertsbreiten von $0,2^\circ$ erreicht werden (s. Abb. 49). Diese sind kleiner als die Literaturwerte (Kurinov & Harrison, 1995). Dreistrahlinterferenz-Experimente an Proteinkristallen mit Halbwertsbreiten der Reflexprofile von $0,2^\circ$ sind jedoch nicht möglich.

Die Versuchsbedingungen beim Schockgefrieren der Kristalle in flüssigem Propan waren am besten zu reproduzieren. Die präparierten Kristalle befinden sich in einem Behälter, gefüllt mit flüssigem Propan. In diesem Zustand können die Kristalle aufbewahrt werden, indem die Propanbehälter in einen Dewar, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, gebracht werden, wodurch sich das Propan verfestigt. Da die Proben in dieser Form gelagert und transportiert werden können, kann die Präparation der Kristalle bereits vor Beginn der Meßzeit erfolgen.

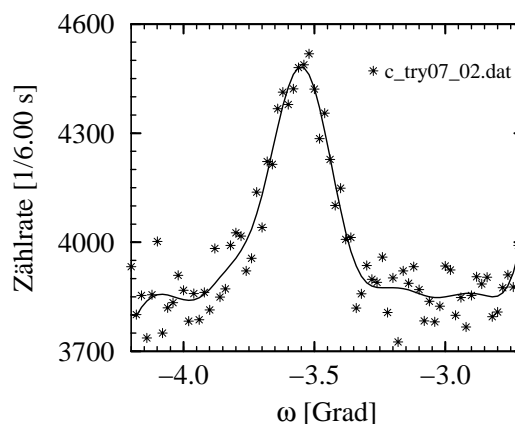
7.1.2 β -Trypsin

Literaturangaben: Von Stuhmann (1997) wurde an der β -Modifikation des Rindertrypsins bei 110 K eine MAD-Strukturbestimmung in der Nähe der K-Absorptionskante von Schwefel (zwischen 4,992 und 5,033 Å) mit einem Bildplattensystem durchgeführt. Verwendet wurde als Kryoprotektor C_T : 8g Phytohistol in 1 ml Ethylenglykol mit Stabilisierungslösung auf 10 ml aufgefüllt. Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Weder bei Stuhmann (1997) noch bei Earnest et al. (1991) wurde Angaben zur Mosaikverbreiterung bei tiefen Temperaturen gemacht.

Präparation der Kristalle: Für die Qualitätsuntersuchungen an Proteinkristallen bei tiefen Temperaturen wurden freundlicherweise Kristalle und die optimierten Kryobedingungen von Stuhmann (1997) zur Verfügung gestellt.



(a) Halbwertsbreite: $0,38^\circ$
Kryoprotektor: C_T ; fl. Stickstoff; 95 K



(b) Halbwertsbreite: $0,28^\circ$
Kryoprotektor: C_T ; fl. Stickstoff; 95 K

Abbildung 50: Bei tiefen Temperaturen wurden an den β -Trypsinkristallen keine Orientierungsmatrizen bestimmt, daher wurden Reflexprofile mit unbekannter Indizierung aufgenommen.

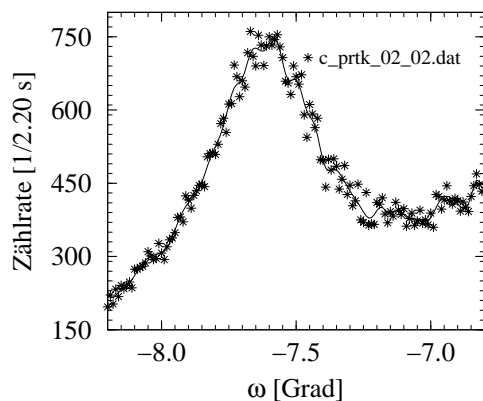
	Größe [mm ³]	FWHM [°]	T [K]
cryo_try01	–	0,36 – 0,48	115
cryo_try02	–	0,85	115
cryo_try03	0,1 × 0,1 × 1,0	0,85	90
cryo_try04	0,1 × 0,1 × 0,7	0,65 – 0,75	90
cryo_try05	0,1 × 0,1 × 0,5	0,26 – 0,38	95
cryo_try06	–	1,76	95
cryo_try07	–	0,28	95
cryo_try08	–	0,24	95

Tabelle 10: Halbwertsbreiten der Reflexprofile der β -Trypsinkristalle bei tiefen Temperaturen

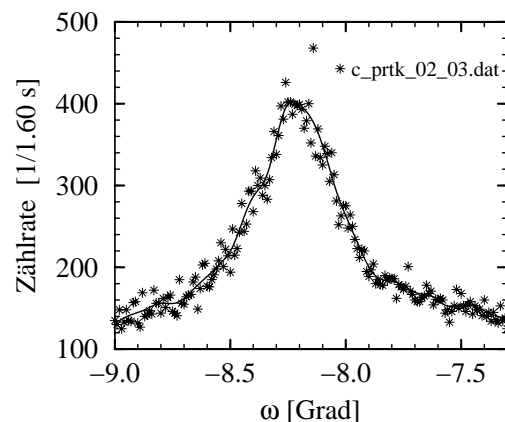
Auswertung der Reflexprofile: Bei Raumtemperatur besitzen die Reflexprofile Halbwertsbreiten zwischen $0,005^\circ$ und $0,02^\circ$ (s. Kap. 4.3). Bei Temperaturen zwischen 90 und 115 K wiesen die Reflexprofile Halbwertsbreiten größer als $0,2^\circ$ auf. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt, und in Abbildung 50 sind Reflexprofile an β -Trypsinkristallen bei 95 K gezeigt. Die Halbwertsbreiten liegen in der Größenordnung der Lysozymkristalle bei tiefen Temperaturen. Bei Messungen mit Bildplattensystemen ist diese Verbreiterung der Reflexprofile kaum zu beobachten. Dreistrahlinterferenz-Experimente an β -Trypsinkristallen bei 100 K sind nicht möglich.

7.1.3 Proteinase K

Präparation der Kristalle: Für Experimente bei tiefen Temperaturen an Kristallen von Proteinase K wurden freundlicherweise von Betzel (1995) die Kryobedingungen zur Verfügung gestellt. Als Kryoprotektor C_{RG} wurde die Reservoirlösung mit einer Beimischung von 10 bis 20% Glycerin verwendet. Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.



(a) Halbwertsbreite: $0,38^\circ$
Kryoprotektor: C_{RG} ; fl. Stickstoff; 120 K



(b) Halbwertsbreite: $0,42^\circ$
Kryoprotektor: C_{RG} ; fl. Stickstoff; 120 K

Abbildung 51: Bei 120 K wurden an den Kristallen von Proteinase K keine Orientierungsmatrizen bestimmt, daher wurden Reflexprofile mit unbekannter Indizierung aufgenommen.

	Größe [mm ³]	FWHM [°]	T [K]
c_prtk_01	0,2×0,2×0,1	0,34 – 0,72	120
c_prtk_02	0,2×0,2×0,1	0,38 – 0,43	120
c_prtk_03	0,2×0,2×0,1	0,52	120

Tabelle 11: Halbwertsbreiten der Reflexprofile der Kristalle von Proteinase K bei 120 K

Auswertung der Reflexprofile: Bei Raumtemperatur besitzen die Reflexprofile Halbwertsbreiten zwischen $0,006^\circ$ und $0,014^\circ$ (s. Kap. 4.4). Bei 120 K wurden insgesamt acht Kristalle untersucht, wobei nur an drei Kristallen die Aufnahme von Reflexprofilen möglich war. Die Halbwertsbreiten der Reflexprofile an Kristallen von Proteinase K sind bei 120 K größer als $0,3^\circ$. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt und in Abbildung 51 sind Reflexprofile an Kristallen von Proteinase K bei 120 K gezeigt. Auch hier zeigt es sich, daß Dreistrahlinterferenz-Experimente an Kristallen von Proteinase K bei tiefen Temperaturen nicht möglich sind.

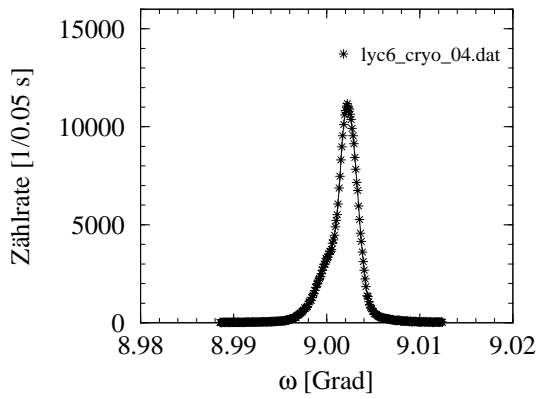
7.2 Mosaikverbreiterung bei langsamen Abkühlen

Bereits durch die Messung von Proteinkristallen bei Temperaturen von 273 K bis zu Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes der Mutterlösung können Schäden der Kristallstruktur durch Röntgenstrahlung reduziert werden.

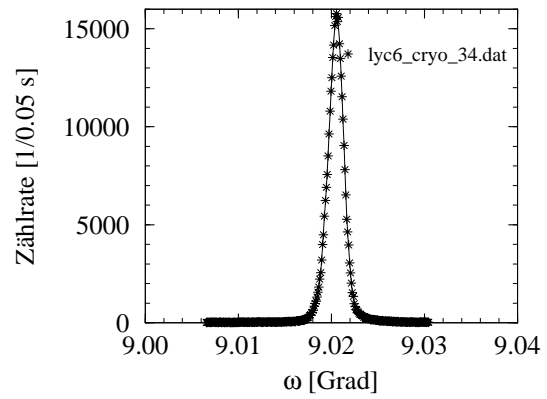
Um den Einfluß der Temperatur auf Lysozymkristalle zu untersuchen, wurde beginnend bei 292 K der Kristall lyc6 mit einer Rate von 1 K pro Minute abgekühlt und dabei Profile des Reflexes (16 160) aufgenommen. Der Kristall befand sich vor dem Austrocknen geschützt in einer Kapillare, und es wurde kein Kryoprotektor verwendet.

Aus den Profilen des Reflexes (16 160) wurden die Halbwertsbreite und die normierte Integralintensität in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt, die in Abbildung 53 dargestellt sind. Reflexprofile bei ausgewählten Temperaturen sind in Abbildung 52 gezeigt.

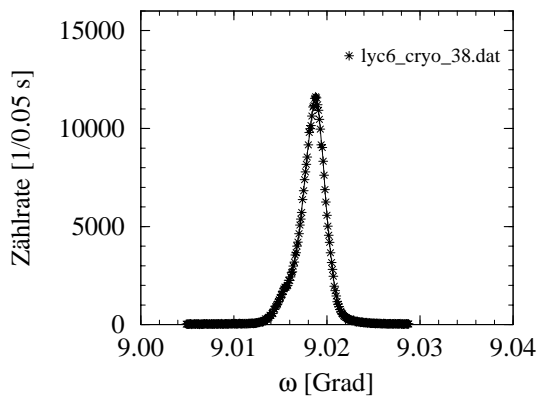
Bei 292 K zeigt das Reflexprofil Abweichungen vom Idealprofil (s. Abb. 52(a)). Der Kristall wurde schnell auf 292 K abgekühlt und befand sich vermutlich noch nicht im thermischen Gleichgewicht, daher treten thermische Verspannungen auf. Der Kristall wurde nun langsamer (1 K pro Minute) abgekühlt und für 30 min konstant auf 278 K gehalten, damit sich ein thermisches Gleichgewicht einstellen kann. Bei 273 K hat sich im thermischen Gleichgewicht die Halbwertsbreite des Reflexprofils auf $0,0019^\circ$ verkleinert und gleichzeitig erhöht sich die maximale Intensität. In Abbildung 52(b) ist das Reflexprofil bei 272,8 K dargestellt, es weist auf einen nahezu perfekten Kristall hin. Bei dieser Temperatur sind die thermischen Bewegungen der Atome eingeschränkt. Bei niedrigeren Temperaturen erhöhen sich durch die thermischen Verspannungen die Halbwertsbreiten bis auf $0,004^\circ$ und die maximale Intensität fällt ab. Die Reflexprofile ähneln Lorentzfunktionen, und die Ausläufer der Reflexprofile erstrecken sich über einen größeren Winkelbereich (s. Abb. 52(c) bis 52(e)). Der Anteil der diffusen Streuung nimmt zu. Gleichzeitig ist ein geringer Anstieg der Integralintensität zu beobachten. Durch die Verspannungen im Kristall kann ein größeres Wellenlängenintervall



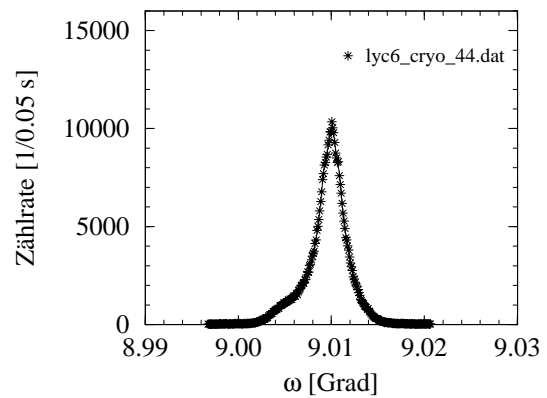
(a) Temperatur: 292,3 K; FWHM: 0,0025°;
normierte Integralintensität: 1,0000



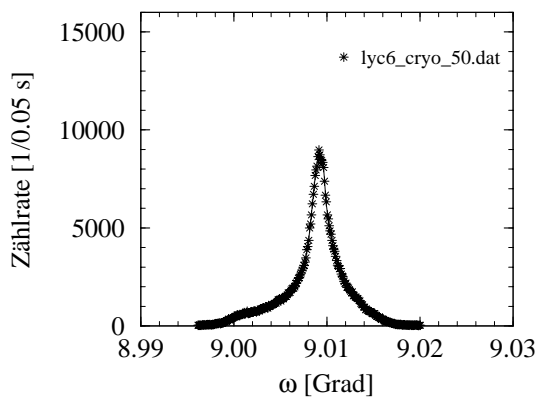
(b) Temperatur: 272,8 K; FWHM: 0,0019°;
normierte Integralintensität: 0,9873



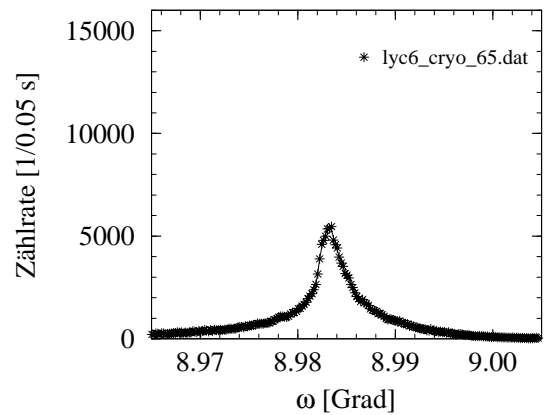
(c) Temperatur: 268,8 K; FWHM: 0,0028°;
normierte Integralintensität: 1,0991



(d) Temperatur: 263,3 K; FWHM: 0,0029°;
normierte Integralintensität: 1,1601

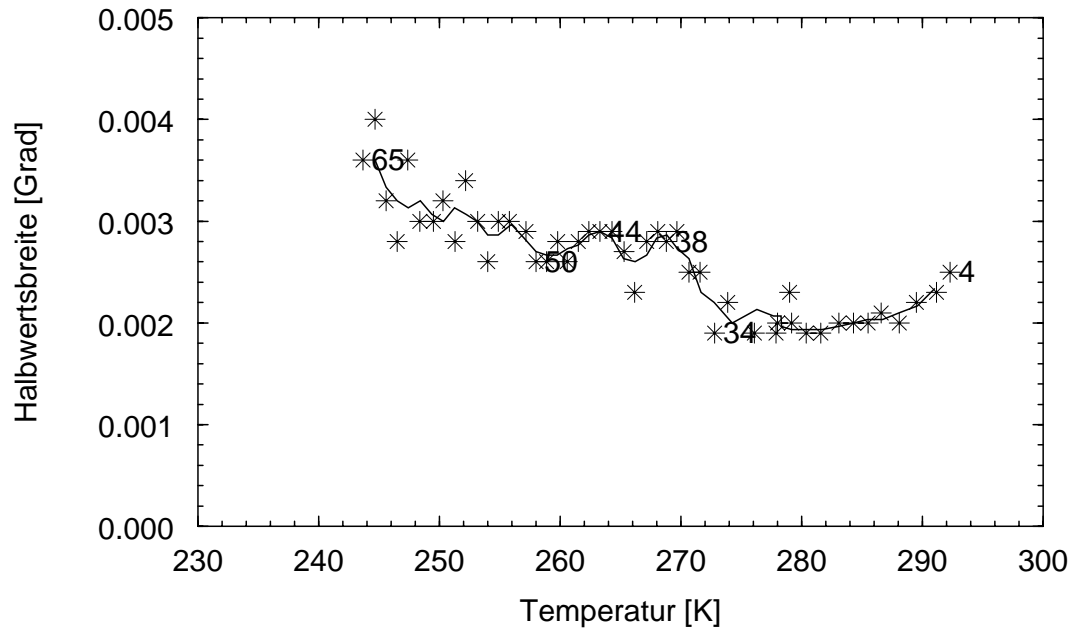


(e) Temperatur: 258,0 K; FWHM: 0,0026°;
normierte Integralintensität: 0,8908

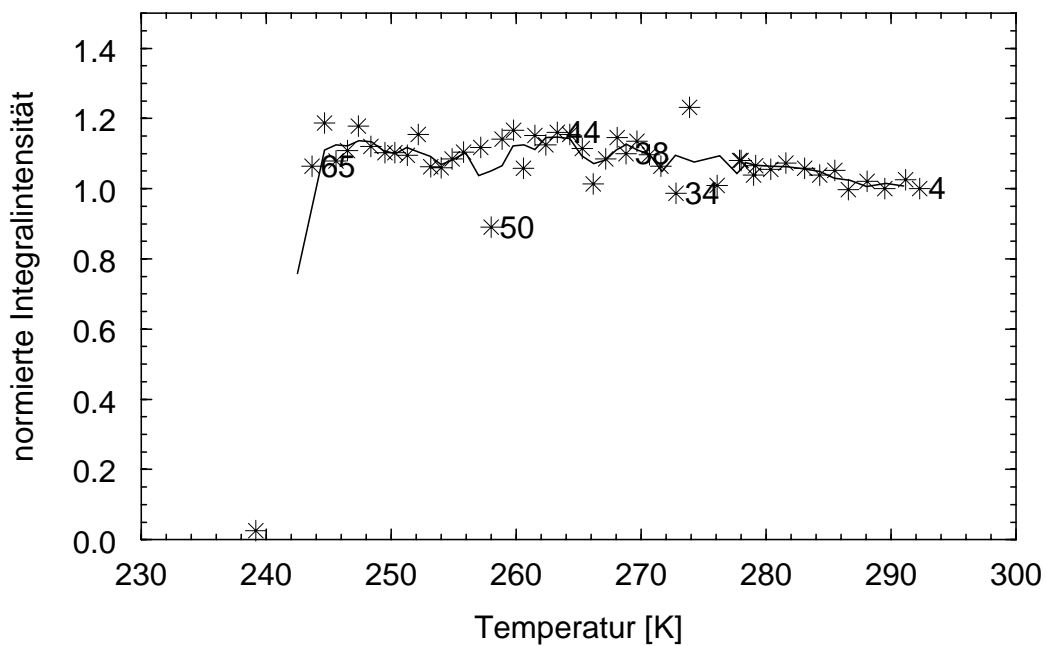


(f) Temperatur: 243,7 K; FWHM: 0,0036°;
normierte Integralintensität: 1,0643

Abbildung 52: Während der Abkühlung des Kristalls lyc6 wurden Profile vom Reflex (16 16 0) aufgenommen. Weitere Erläuterungen siehe Text.



(a) Halbwertsbreite des Reflexprofils (16 160) in Abhängigkeit von der Temperatur



(b) Integralintensität des Reflexes (16 160) in Abhängigkeit von der Temperatur

Abbildung 53: Während der Abkühlung des Kristalls lyc6 wurden Profile vom Reflex (16 160) aufgenommen. Daraus wurde die Integralintensität und die Halbwertsbreite der Reflexprofile bestimmt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

akzeptiert werden, daher werden die Reflexprofile breiter. Bei 243 K setzt die Eisbildung ein und zerstört den Kristall vollständig.

Bis zur Temperatur von 244 K war der Lysozymkristall lyc6 für Dreistrahlinterferenz–Experimente geeignet.

7.3 Untersuchung zur Mosaikblockgröße– und Verspannungseffekten

Um den Einfluß von Verspannungs– und Teilchengrößeneffekten bei tiefen Temperaturen zu untersuchen, wurde an Lysozymkristallen die Ausdehnung der reziproken Gitterpunkte in Richtung des Beugungsvektors bei Raumtemperatur und bei 130 K aufgenommen.

Die hochaufgelösten Untersuchungen wurden mit einem Analysator durchgeführt, der in Abbildung 54 schematisch dargestellt ist. Die Anordnung besteht aus dem Monochromatorkristall (Si 1 1 1), dem Probenkristall (Lysozymkristall) und dem Analysatorkristall (Si 1 1 1), wobei der Analysatorkristall in nicht–dispersiver Anordnung bezüglich des Probenkristalls in der Beugungsebene reflektiert. Der Analysator ist am θ –Kreis des Diffraktometers (s. Abb. 10) befestigt und wird durch eine θ –Drehung in Beugungsposition gebracht. Die Auflösung des Analysatordrehkreises beträgt $0,00005^\circ$, die Auflösung der $\omega/2\theta$ –Drehung ist durch die Auflösung des θ –Drehkreises auf $0,0005^\circ$ beschränkt. Für die Messungen bei Raumtemperatur wurde ein Untersetzungsgetriebe mit einem Faktor fünf in den θ –Drehkreis eingebaut.

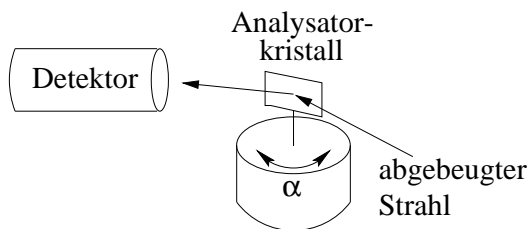


Abbildung 54: Schematischer Aufbau des Analysators, der am θ –Drehkreis befestigt ist

Der Einfluß von Mosaikblockgrößen und Verspannungen auf die Reflexprofile kann experimentell bestimmt werden (Müller, 1998). Die Halbwertsbreite der Reflexprofile ist von der Auflösung der Apparatur und der Qualität der untersuchten Probe abhängig.

Theoretische Grundlagen:

- Verbreiterung der Reflexprofile durch die Auflösung der Apparatur:

Die Verbreiterung des reziproken Gitterpunktes durch die Auflösung der Apparatur ergibt sich aus der Faltung des aufgrund der Wellenlängendispersion verbreiterten Reflexprofils mit der Divergenz der Primärstrahlung und mit der Auflösungsfunktion des Analysators a_{ana} .

– Dispersion der Primärstrahlung

Aus der Bragg'schen Gleichung folgt für die Verbreiterung des reziproken Gitterpunktes durch die Wellenlängendispersion $\frac{\Delta\lambda}{\lambda}$:

$$\Delta\vartheta = \frac{\Delta\lambda}{\lambda} \tan \vartheta. \quad (59)$$

Am Strahlrohr D1 (ESRF) beträgt die Wellenlängendispersion $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 1,6 \cdot 10^{-4}$.

– Divergenz der Primärstrahlung δ

Die horizontale Divergenz beträgt am Strahlrohr D1 $\delta = 0,0006^\circ$.

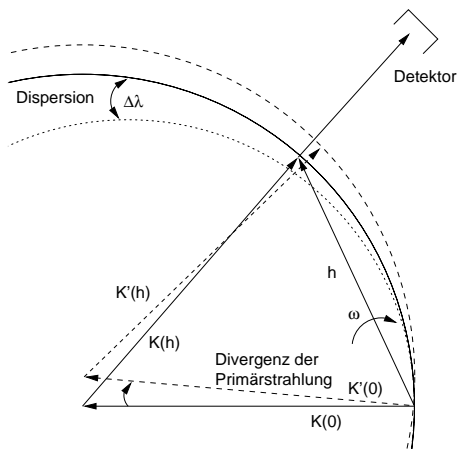


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Verbreiterung des Reflexprofils aufgrund von Wellenlängendispersion und Divergenz der Primärstrahlung

– Auflösung des Analysators

Die Auflösungsfunktion des Analysators a_{ana} hängt von der dynamischen Breite B_{dyn} und dem Beugungswinkel ϑ_{ana} des Analysatorkristalls ab, die wiederum von der Wellenlänge abhängen. Aufgrund der Wellenlängendispersion besitzt ein Reflex eines perfekten Analysatorkristalls ein Reflexprofil mit endlicher Halbwertsbreite. Die Auflösungsfunktion a_{ana} ergibt sich zu:

$$a_{ana} = \sqrt{B_{dyn}^2 + \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \tan \vartheta_{ana} \right)^2} \quad (60)$$

$$\text{mit } B_{dyn} = \frac{\lambda^2}{\sin 2\vartheta_{ana}} \frac{p e^2}{4\pi^2 \epsilon_0 m_e c^2 V_{EZ}} |F(\vec{h})|.$$

Die Verbreiterung der Reflexprofile durch den verwendeten (Si 111)–Analysatorreflex ergibt $a_{ana} = 0,0009^\circ$.

Für eine $\omega/2\theta$ –Drehung ergibt sich damit die Verbreiterung des reziproken Gitterpunktes zu:

$$\Delta\vartheta = \frac{\sqrt{\delta^2 + \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \tan \vartheta \right)^2 + a_{ana}^2}}{2}. \quad (61)$$

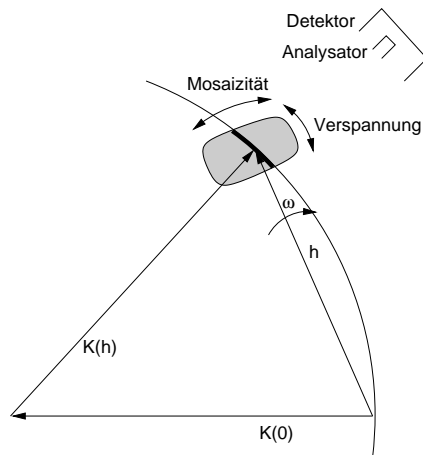


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Verbreiterung des Reflexprofils aufgrund von Verspannung und Mosaizität



(a) ω -Drehung mit Analysator

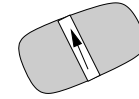


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Wirkungweise des Analysators bei einem verbreiterten Reflexprofil

- Verbreiterung der Reflexprofile durch den untersuchten Kristall
 - Dynamische Reflexbreite
Die dynamische Breite der Lysozymreflexe ist vernachlässigbar klein gegenüber der instrumentellen Verbreiterung.
 - Verspannungen im Kristall
Durch Verspannungen im Kristall treten Abweichungen in den Gitterparametern auf. Aus der Bragg'schen Gleichung folgt für die Verbreiterung des reziproken Gitterpunktes durch Änderungen der Gitterparameter $\frac{\Delta d}{d}$:

$$\Delta\vartheta = \frac{\Delta d}{d} \tan \vartheta. \quad (62)$$

- Endliche Mosaikblockgröße
Bei einem endlichen Kristall wird die Gitterfunktion mit der Formfunktion gefaltet. Die Fouriertransformierte dieser Faltung besitzt Punkte endlicher Ausdehnung. Näherungsweise ist die Verbreiterung der Reflexprofile der Abstand der ersten Nullstelle dieser Funktion zum Ursprung. Für die Verbreiterung des Reflexprofils aufgrund endlicher Mosaikblockgröße b ergibt sich (Wölfel, 1972):

$$\Delta\vartheta = \frac{\lambda}{2b}. \quad (63)$$

Die Verbreiterung der Reflexprofile durch den Mosaikbau wird mit steigendem Beugungswinkel größer. Sie ist unabhängig von der Elementarzellengröße.

Die gesamte Verbreiterung der Reflexprofile berechnet sich, unter Verwendung von Gauß-Funktionen, aus der Faltung der verschiedenen Funktionen zu:

$$\Delta\vartheta = \sqrt{\left(\frac{\lambda}{2b}\right)^2 + \left[\left(\frac{\Delta d}{d}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2\right] \tan^2 \vartheta + \delta^2 + a_{ana}^2}. \quad (64)$$

Messungen: Bei Raumtemperatur wurde am Lysozymkristall clyso_rt und bei 130 K am Lysozymkristall lycry28 (s. Tab. 9) jeweils eine Orientierungsmatrix bestimmt und Profile von Reflexen verschiedener Ordnung mit und ohne Analysator aufgenommen.

Um den genauen ω -Beugungswinkel zu bestimmen, wurde ein Reflexprofil ohne Analysator (ω -Drehung) aufgenommen. Der Analysatorkristall wird bei diesem ω -Winkel auf die maximale Intensität justiert (α -Drehung). Mit Analysator wurde je ein Reflexprofil senkrecht zur Richtung von \vec{h} (ω -Drehung) und ein Reflexprofil entlang der Richtung von \vec{h} ($\omega/2\theta$ -Drehung) aufgenommen (s. Abb. 57).

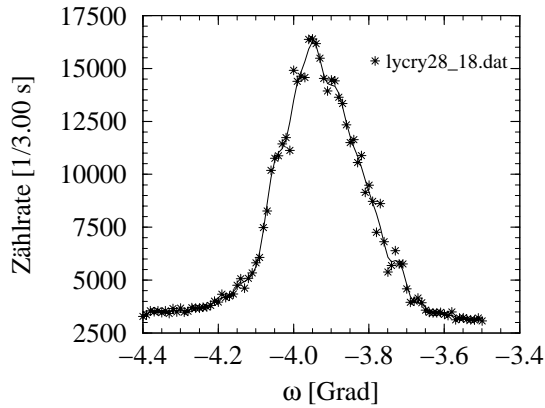
Reflex	ϑ_B	mit Analysator		
		α -Drehung	ω -Drehung	$\omega/2\theta$ -Drehung
(4 4 0)	2,047°	0,0016°	0,0030°	0,0009°
(7 7 0)	3,584°	0,0017°	0,0031°	0,0009°
(12 12 0)	6,152°	0,0016°	0,0033°	0,0009°
(15 15 0)	7,699°	0,0016°	0,0031°	0,0009°
(16 16 0)	8,205°	0,0017°	0,0027°	0,0010°

Tabelle 12: Lysozymkristall clyso_rt bei Raumtemperatur: Halbwertsbreiten der Reflexe entlang eines Beugungsvektors mit Analysator gemessen.

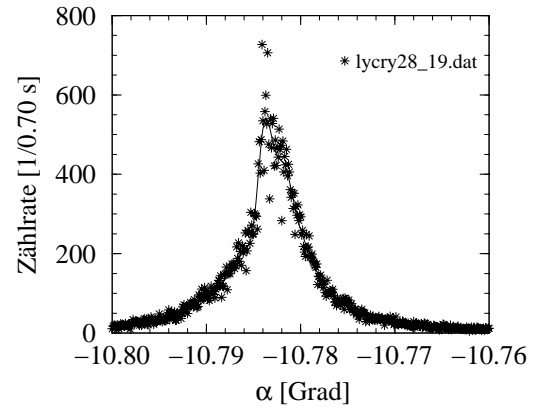
Reflex	ϑ_B	mit Analysator			ohne Analysator
		α -Drehung	ω -Drehung	$\omega/2\theta$ -Drehung	ω -Drehung
(4 4 0)	2,270°	0,0020°	0,21°	0,0025°	0,26°
(7 7 0)	3,962°	0,0048°	0,19°	0,0035°	0,26°
(12 12 0)	6,780°	0,0070°	0,18°	0,0050°	0,24°
(15 15 0)	8,479°	0,0095°	0,17°	0,0060°	
(16 16 0)	9,053°	0,0088°	0,16°	0,0055°	0,24°

Tabelle 13: Lysozymkristall lycry28 bei 130 K: Halbwertsbreiten der Reflexe entlang eines Beugungsvektors mit und ohne Analysator gemessen.

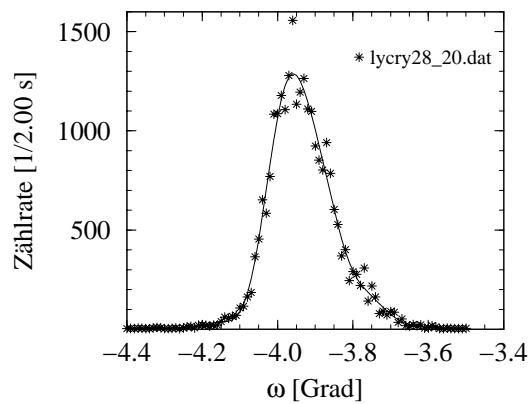
In Abbildung 59 sind für den Kristall lycry28 die verschiedenen Profile des Reflexes (7 7 0) gezeigt. Die Halbwertsbreiten der Reflexprofile sind für die Messung bei Raumtemperatur und bei 130 K in Tabelle 12 und 13 zusammengestellt. Die ω -Drehung mit Analysator zeigt, daß eine breite Winkelverteilung der Mosaikblöcke vorliegt, die im wesentlichen zur Verbreiterung der Reflexprofile führt.



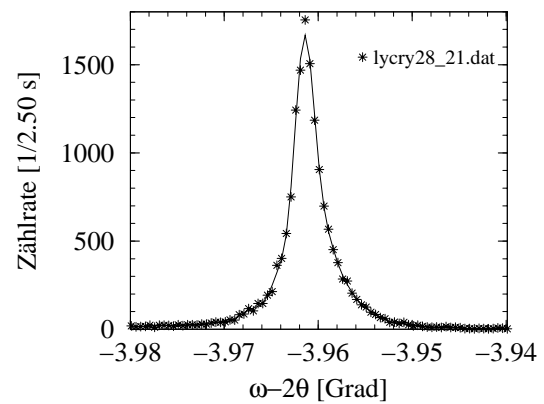
(a) Profil des Reflexes (770) an tetragonalem Lysozym bei 130 K (ohne Analysator)



(b) α -Drehung im Maximum des Reflexprofils der ω -Drehung ohne Analysator



(c) ω -Drehung, gemessen mit Analysator, im Maximum des Reflexprofils der α -Drehung



(d) $\omega/2\theta$ -Drehung, gemessen mit Analysator, im Maximum des Reflexprofils der α -Drehung

Abbildung 58: Am Lysozymkristall lycry28 wurden bei 130 K Profile des Reflexes (770) mit und ohne Analysator aufgenommen.

Auswertung: Nach Gleichung (64) ergibt sich bei bekannter Wellenlängendispersion $\frac{\Delta\lambda}{\lambda}$ aus der Auftragung von $\Delta\vartheta^2$ über $\tan^2 \vartheta$ aus der Steigung der Ausgleichsgeraden die Verspannung $\frac{\Delta d}{d}$ und aus dem Achsenabschnitt die Mosaikblockgröße b . Die Meßwerte bei Raumtemperatur und 130 K sind in Abbildung 59 aufgetragen.

Aus den Messungen bei Raumtemperatur ergeben sich im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Hinweise auf Verspannungen oder Teilchengrößeneffekte, der Kristall ist scheinbar perfekt. Bei einer Temperatur von 130 K ist eine Verkleinerung der Gitterparameter um $\frac{\Delta d}{d} = 5 \cdot 10^{-3}$ zu beobachten. Aus der Auftragung ergibt sich für die Verspannung $\frac{\Delta d}{d} = 5,7 \cdot 10^{-4}$ und für die Mosaikblockgröße $b = 13600 \text{ \AA}$. Beim Abkühlen zerbrach der Kristall in kleine, stark verspannte Mosaikblöcke. Da die Messung bei 130 K nur an einem Kristall durchgeführt wurde,

sind die Ergebnisse als erste Anhaltspunkte für die Verspannungen und Mosaikblockgrößen in einem Lysozymkristall zu werten.

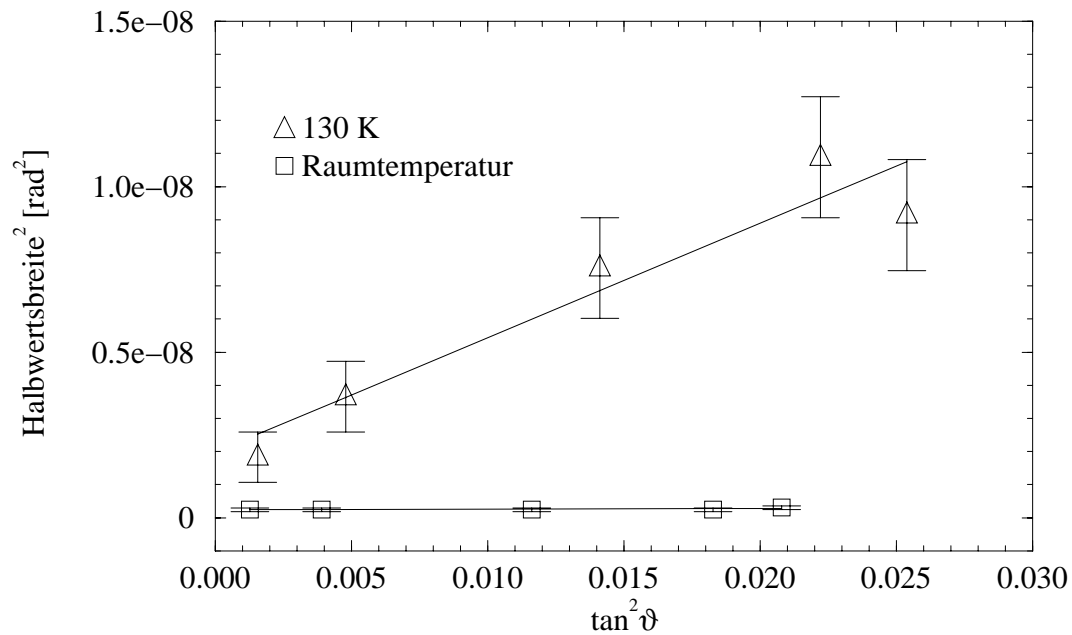


Abbildung 59: Halbwertsbreiten in Abhängigkeit des Beugungswinkels bei Raumtemperatur (Quadrate) und bei T=130 K (Dreiecke)

Die durchgezogenen Linien entsprechen den Ausgleichsgeraden.

8 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde am Beispiel des tetragonalen Lysozyms gezeigt, daß eine Strukturlösung ab initio von kleinen Proteinstrukturen ohne Schweratome mittels experimentell bestimmter Triplettphasen prinzipiell möglich ist. Dazu wurden Dreistrahlinterferenzprofile an tetragonalem Lysozym am Strahlrohr D1 der ESRF, Grenoble aufgenommen. Insgesamt wurden 847 Triplettphasen an 23 verschiedenen Lysozymkristallen experimentell bestimmt. Für die mittlere gewichtete Triplettphasendifferenz zum Strukturmodell R193 (Vaney, Maignan, Riès-Kautt & Ducruix, 1996) ergab sich $19,9^\circ$. Unter günstigen Bedingungen konnten an Lysozymkristallen fünf Triplettphasen pro Stunde und etwa 150 Triplettphasen pro Lysozymkristall bestimmt werden. Durch Verknüpfung der experimentell bestimmten Triplettphasen und die Zuordnung symbolischer Strukturfaktorphasen (847 Triplettphasen: zwei symbolische Einzelphasen) ließen sich 752 Strukturfaktorphasen ableiten. Diese symbolischen Strukturfaktorphasen wurden variiert und mit dem Maximum-Entropie-Verfahren (ME) wurde der geeignetste Phasendatensatz ausgewählt und eine ME-Elektronendichtekarte berechnet. An diese konnte direkt ein Startmodell angepaßt, und davon ausgehend eine Strukturverfeinerung durchgeführt werden. Das daraus resultierende Strukturmodell stimmt bis auf einige Seitenketten mit dem Strukturmodell R193 überein.

Das ME-Verfahren erwies sich als hilfreich, die durch Variation der symbolischen Strukturfaktorphasen erhaltenen Phasendatensätze zu bewerten. Ab einer gewissen Anzahl von Strukturfaktorphasen (etwa 500) ist die Korrelation zwischen Entropie und Likelihood, sowie mit der mittleren gewichteten Strukturfaktorphasen-Differenz zu erkennen. Bei weniger Einzelphasen scheint die Entropie das bessere Kriterium zu sein, um Datensätze mit niedrigem Phasenfehler auszuwählen. Sind nur wenige Strukturfaktorphasen von symbolischen Einzelphasen abhängig (bei 752 Strukturfaktorphasen nur vier Einzelphasen), so ist der Einfluß „falscher“ Phasen auf die ME-Elektronendichtekarten nicht zu beobachten. Bei der großen Anzahl von Strukturfaktorphasen und -beträgen entspricht die Qualität der Elektronendichtekarten, die direkt aus der Fouriertransformation berechnet wurden, der der ME-Elektronendichtekarten. Die bei 703 experimentell bestimmten Triplettphasen durchgeführte Extrapolation von unbekanntem Strukturfaktorphasen ergab keine Verbesserung der ME-Elektronendichtekarten. Die Bestimmung der Strukturfaktorphasen von Reflexen, deren Strukturfaktorbeiträge große Abweichungen zwischen den gemessenen und den aus der ME-berechneten Werten aufweisen, ergab eine deutliche Verbesserung der ME-Elektronendichtekarte. Somit können mit Hilfe des ME-Verfahrens die Reflexe ausgewählt werden, die an den zu messenden Dreistrahlfällen beteiligt sein sollten.

Um die Bedingungen für zukünftige Messungen von Dreistrahlinterferenzprofilen an Proteinkristallen zu optimieren, wurde der Einfluß der Reflexe mit bestimmter Strukturfaktorphase auf die ME-Elektronendichtekarte untersucht. Die Reflexe wurden aufgrund des Auflösungsgebietes und/oder des Strukturfaktorbeitrages ausgewählt. Die ME-Elektronendichtekarte, berechnet aus Reflexen mit den 548 größten Strukturfaktorbeiträgen aus dem Auflösungsgebiet zwischen $3,5$ und $55,5 \text{ \AA}$, erwies sich noch als interpretierbar. Dies entspricht der experimentellen Bestimmung von etwa 620 Triplettphasen. Diese Reflexe sind auch besonders für die Messung von Dreistrahlinterferenzen geeignet, da sie meist

große Interferenzeffekte zeigen und geringe Meßzeiten erforderlich sind. Wurden Reflexe mit großen Strukturfaktorbeträgen bei der Berechnung der ME–Elektronendichtekarten nicht berücksichtigt, so konnte die fehlende Information nicht durch das ME–Verfahren extrapoliert werden. Reflexe mit hoher Auflösung sind für die Interpretation nicht erforderlich.

An der bisher noch ungelösten Proteinstruktur von Nessellectin wurden 210 Tripletphasen experimentell bestimmt, aus denen sich 188 Strukturfaktorphasen ableiten lassen. Bei der Bewertung der Phasendatensätze durch das ME–Verfahren tritt bei der geringen Anzahl von bestimmten Strukturfaktorphasen noch keine Korrelation zwischen Entropie und Likelihood auf. Aus dem Phasendatensatz mit der maximalen Entropie wurde eine ME–Elektronendichtekarte berechnet, in der bereits die Einhüllende des Proteinmoleküls zu erkennen ist. Aus der Erfahrung bei tetragonalem Lysozym ist zu erwarten, daß etwa 200 weitere Tripletphasen bestimmt werden müssen, um eine vollständig interpretierbare ME–Elektronendichte zu erhalten. Insbesondere sollte die Strukturfaktorphase von Reflexen bis zu einer Auflösung von 3,5 Å bestimmt werden. Weitere Messungen von Dreistrahlinterferenz–Profilen sind in Vorbereitung, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Für die Strukturbestimmung an Proteinkristallen stellt die Schädigung der Proteinstruktur durch Röntgenstrahlung ein Problem dar. Bei den Dreistrahlinterferenz–Experimenten zeigen sich die Strahlenschäden in der Verbreiterung der Reflexprofile und in der Abnahme der Größe des Interferenzeffektes, wodurch die Interpretierbarkeit der Dreistrahlinterferenz–Profile erschwert wird. Eine Reduktion der Strahlenschäden kann erreicht werden, wenn die Experimente bei Temperaturen um 120 K durchgeführt werden. Erste hochaufgelöste Untersuchungen des Mosaikbaus ergaben, daß die Proteinkristalle bei Temperaturen um 130 K den Anforderungen einer Datensammlung mit Bildplattensystemen genügen, jedoch ist die Mosaikverbreiterung auf mindestens $0,2^\circ$ für Messungen von Dreistrahlinterferenz–Profilen zu groß. Bei einer Abkühlung der Proteinkristalle auf 273 bis 243 K, oberhalb des Gefrierpunktes der Mutterlösung, sind die Kristalle im thermischen Gleichgewicht nahezu perfekt, so daß die Messung von Dreistrahlinterferenz–Profilen möglich wäre. Bei diesen Temperaturen ist die Schädigungsrate bereits reduziert, wodurch eine längere Lebensdauer der Proteinkristalle im Röntgenstrahl zu erwarten ist.

Die Verwendung der experimentell bestimmten Tripletphasen sollte in allen Programmen zur Strukturlösung möglich sein. Durch eine effektive Ausnutzung dieser Tripletphasen kann voraussichtlich die Anzahl der zu messenden Dreistrahlinterferenz–Profile reduziert werden. Bei verschiedenen Methoden zur Strukturlösung ist eine Extrapolation der Strukturfaktorphasen von Reflexen mit bekanntem Strukturfaktorbetrag möglich. Dies kann zu einer Reduzierung der experimentell zu bestimmenden Tripletphasen führen.

Im Maximum–Entropie–Verfahren könnte die Berücksichtigung der Strukturfaktorbeträge der Reflexe mit unbekannter Phase eine verbesserte Elektronendichtekarte ergeben.

Bisher können bei der Strukturverfeinerung die experimentell bestimmten Tripletphasen oder die daraus abgeleiteten Strukturfaktorphasen nicht berücksichtigt werden. Diese zusätzliche Information kann in Form von Zwangsbedingungen eingebunden werden und zu einer besseren Übereinstimmung des Strukturmodells mit den gemessenen Daten führen.

A Literaturverzeichnis

- Alderton, G. & Fevold, H. (1946). Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. *J.Biol.Chem.* 164, 1–5.
- Angell, C. & Trucker, J. (1980). Heat Capacity Changes in Glass-Forming Aqueous Solutions and the Glass Transition in Vitreous Water. *J.Phys. Chem.* 84, 268–272.
- Bartunik, H. (1996). Persönliche Mitteilungen.
- Bernstein, F., Koetzle, T., Williams, G., Meyer Jr., E., Brice, M., Rodgers, J., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, T. (1977). The Protein Data Bank: a Computer-based Archival file for Macromolecular Structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535–542.
- Bethe, H. (1928). Theorie der Beugung von Elektronen an Kristallen. *Ann.Phys. (Leipzig)* 87, 55–129.
- Betzl, C. (1995). Persönliche Mitteilungen.
- Betzl, C., Pal, G. & Saenger, W. (1988). Synchrotron X-ray Data Collection and Restrained Least-Squares Refinement of the Crystal Structure of Proteinase K at 1,5 Å Resolution. *Acta Cryst.* B44, 163–172.
- Blake, C., Koenig, D., Mair, G., North, A., Philipps, D. & Sarma, V. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. *Nature* 4986, 206, 757–761.
- Bode, W. & Schwager, P. (1975). The Refined Crystal Structure of Bovine β -Trypsin at 1.8 Å Resolution. II. Crystallographic Refinement, Calcium Binding Site, Benzamide Binding Site and Active Site at PH 7.0. *J.Mol.Biol.* 98, 693–717.
- Bricogne, G. (1984). Maximum Entropy and the Foundation of Direct Methods. *Acta Cryst.* A40, 410–445.
- Bricogne, G. (1997a). Bayesian Statistical Viewpoint on Structure Determination: Basic Concepts and Examples. *Meth.Enzymol.* 276, 361–423.
- Bricogne, G. (1997b). Efficient Sampling Methods for Combinations of Signs, Phases, Hyperphases, and Molecular Orientations. *Meth.Enzymol.* 276, 424–448.
- Brünger, A. (1987). *X-PLOR, Version 3.1, A System for X-ray Crystallography and NMR*. New Haven: Yale University Press.
- Brünger, A. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 6359, 355, 472–475.
- Buck, B. & Macaulay, V. (1991). *Maximum Entropy in Action. A collection of expository essays*. New York: Oxford University Press.
- Carter Jr, C. (1995). Entropy, likelihood and phase determination *Structure* 3, 147–150.
- Chang, S. & Tang, H. (1988). Quantitative Determination of Phases of X-ray Reflections from Three-Beam Diffraction. I. Theoretical Considerations. *Acta Cryst.* A44, 1065–1072.
- Cochran, W. (1955). Relations between the Phases of Structure Factors. *Acta Cryst.* 8, 1–14.
- Craven, P. & Wahba, G. (1979). Smoothing noisy data with spline functions. *Numerische Mathematik* 31, 377–403.
- Cruickshank, D., Juretschke, H. & Kato, N. (1992). *P.P.Ewald and his Dynamical Theory of X-ray Diffraction*. IUCr Monographs on Crystallography. New York: Oxford University Press.

- Dattagupta, J., Fujiwara, T., Grishin, E., Lindner, K., Pal, G., Suck, D., Weber, G. & Saenger, W. (1975). Crystallization of the fungal enzyme proteinase k and amino acid composition. *J.Mol.Biol.* **97**, 267–271.
- Dodson, E., Kleywegt, G. & Wilson, K. (1996). Report of a Workshop on the Use of Statistical Validators in Protein X-ray Crystallography. *Acta Cryst.* **D52**, 228–234.
- Earnest, T., Faumann, E., Craik, C. & Stroud, R. (1991). 1.59 Å Structure of Trypsin at 120 K: Comparison of Low Temperature and Room Temperature Structures. *Proteins* **10**, 171–187.
- Engh, R. & Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein Structure Refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392–400.
- Ewald, P. (1917). Zur Begründung der Kristallographie. Teil III: Die Kristallographie der Röntgenstrahlen. *Ann.Phys. (Leipzig)* **54**, 519–597.
- Ewald, P. (1958). Group Velocity and Phase Velocity in X-ray Crystal Optics. *Acta Cryst.* **11**, 888–891.
- Ewald, P. (1965). Crystal Optics for Visible Light and X-Rays. *Rev.Mod.Phys.* **37**, 46–56.
- Garman, E. & Schneider, T. (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J.Appl.Cryst.* **30**, 211–237.
- Giacovazzo, C. (1980). *Direct Methods in Crystallography*. London: Academic Press.
- Giacovazzo, C., Monaco, H., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G. & Catti, M. (1995). *Fundamentals of Crystallography*. Oxford University Press.
- Gilliland, G., Tung, M., Blakeslee, D. & Ladner, J. (1994). The Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: New Features, Data and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data. *Acta Cryst.* **D50**, 408–413.
- Green, D., Ingram, V. & Perutz, M. (1954). The structure determination of hemoglobin: IV. Sign determination by the isomorphous replacement method. *Proc.R.Soc.London* **A225**, 287–307.
- Haas, D. & Rossmann, M. (1970). Crystallographic Studies on Lactate Dehydrogenase at -75°C . *Acta Cryst.* **B26**, 998–1004.
- Hauptman, H. & Karle, I. J. (1953). *Solution of the Phase problem. I. The centrosymmetric crystal*. A.C.A. Monograph No.3. Pittsburgh: Polycrystal Book Service.
- Henderson, R. (1990). Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction. *Proc.R.Soc. London* **B241**, 6–8.
- Hendrickson, W. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51–58.
- Hendrickson, W. & Konnert, J. (1980). Incorporation of stereochemical information into crystallographic refinement. *Computing in Crystallography*, Herausgegeben von R. Diamond, S. Ramaseshan & K. Venkatesan, 13.01–13.25, Bangalore. Indian Acad.Sci. and IUCr.
- Hodsdon, J., Brown, G., Sieker, L. & Jensen, L. (1990). Refinement of Triclinic Lysozyme: I. Fourier and Least-Squares Methods. *Acta Cryst.* **B46**, 54–62.
- Hölzer, K. (1996). leh-lar – Eine Programmroutine für die Auswertung gemessener Reflexprofile. *Universität Karlsruhe*.
- Hölzer, K. (1997). diff6triplet – Ein Programm für die Interpretation gemessener Dreistrahlinterferenz-Profile. *Universität Karlsruhe*.

- Hope, H. (1988). Cryocrystallography of Biological Macromolecules: a Generally Applicable Method. *Acta Cryst.* **B44**, 22–26.
- Hope, H. (1996). Cryocrystallography : Smoothing the Path to Success. *Acta Cryst. Supplement A52*, C–8.
- Hümmer, K. & Billy, H. (1982). Theoretical considerations on phase determination by three-beam interference. *Acta Cryst.* **A38**, 841–848.
- Juretschke, H. J. (1984). Modified two-beam description of X-ray fields and intensities near a three-beam diffraction point. General formulation and first-order solution. *Acta Cryst.* **A40**, 379–389.
- Kabsch, W. (1988). Evaluation of Single-Crystal X-ray Diffraction Data from a Position-Sensitive Detector. *J. Appl. Cryst.* **21**, 916–924.
- Karle, I. & Hauptman, H. (1956). A Theory of Phase Determination of the Four Types of Non-Centrosymmetric Space Groups $1P222$, $2P22$, $3P_12$, $3P_22$. *Acta Cryst.* **9**, 635–651.
- Kato, N. (1958). The Flow of X-rays and Material Waves in Ideally Perfect Single Crystals. *Acta Cryst.* **11**, 885–887.
- Kendrew, J., Dickerson, R., Strandberg, B., Hart, R. & Davis, D. (1960). Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **185**, 422–427.
- Koepke, J. (1996). Persönliche Mitteilungen.
- Koepke, J. (1997). Persönliche Mitteilungen.
- Kurinov, I. & Harrison, R. (1995). The Influence of Temperature on Lysozyme Crystals. Structure and Dynamics of Protein and Water. *Acta Cryst.* **D51**, 98–109.
- Laue von, M. (1931). Die dynamische Theorie der Röntgenstrahlinterferenzen in neuer Form. *Ergebn.exakt.Naturwiss.* **10**, 133–158.
- Laue von, M. (1960). *Röntgenstrahl-Interferenzen*. Frankfurt/Main: Akademische Verlagsgesellschaft mbH.
- Lehmann, M. & Larsen, F. (1974). A Method for Location of the Peaks in Step-Scan-Measured Bragg-Reflexions. *Acta Cryst* **A30**, 580–584.
- Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. (1994). *Prinzipien der Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lipscomb, W. (1949). Relative phases of diffraction maxima by multiple-reflections. *Acta Cryst.* **2**, 193–194.
- Loris, R., Dao-Thi, M., Lisgarent, J. & Wyns, L. (1993). Purification, crystallization and preliminary X-ray studies on the rhizome lectin from stinging nettle and its complex with NN'N"-Triacetylchitotriose. *Proteins* **15**, 205–208.
- Main, P. (1977). On the Application of the Phase Relationships to Complex Structures. XI. A Theory of Magic Integers. *Acta Cryst.* **A33**, 750–757.
- Marquart, M., Walter, J., Deisenhofer, J., Bode, W. & Huber, R. (1983). The Geometry of the Reactive Site and of the Peptide Groups in Trypsin, Trypsinogen and Its Complexes with Inhibitors. *Acta Cryst.* **B39**, 480–490.
- Masson-Fauchier, M. (1995). Züchtung und Charakterisierung von triklinen und tetragonalen Lysozymkristallen zur Messung von Phasenbeziehungen zwischen Bragg-Reflexen von Makromolekülstrukturen. *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe*.
- Matthews, B. (1968). Solvent Content in Protein Crystals. *J.Mol.Biol.* **33**, 491–497.
- McRee, D. (1993). *Practical Protein Crystallography*. San Diego: Academic Press, INC.

- Miller, R., DeTitta, G., Jones, R., Langs, D., Weeks, C. & Hauptmann, H. (1993). On the application of the minimal principle to solve unknown structures. *Science* **259**, 1430–1433.
- Moon, R. & Shull, C. (1964). The Effects of Simultaneous Reflections on Single-Crystal Neutron Diffraction Intensities. *Acta Cryst.* **A17**, 805–812.
- Müller, R. (1998). Dreikristalldiffraktometrie zur Charakterisierung von Mosaikkristallen. Anwendung auf die Tripletphasenmessung. *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe*.
- Pähler, A., Banerjee, A., Dattagupta, J., Fujiwara, T., Lindner, K., Pal, G., Suck, D., Weber, G. & Saenger, W. (1984). Three-dimensional structure of fungal proteinase K reveals similarity to bacterial subtilisin. *EMBO J.* **3**, 1311–1314.
- Petsko, G. (1975). Protein Crystallography at Sub-zero Temperatures: Cryo-Protective Mother Liquors for Protein Crystals. *J.Mol.Bio.* **96**, 381–392.
- Peumans, W., De Ley, M. & Broekaert, W. (1984). An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome. *FEBS Lett.* **177**, 99–103.
- Pinsker, Z. (1978). *Dynamical Scattering of X-rays in Crystals*. Berlin: Springer-Verlag.
- Plattner, H. & Bachmann, L. (1982). Cryofixation: A Tool in Biological Ultrastructural Research. *Int.Rev.Cyt.* **79**, 237–304.
- Ramachandran, G., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J.Mol.Biol.* **7**, 95–97.
- Ramakrishnan, V. & Biou, V. (1997). Treatment of MAD Data as a Special case of MIR. *Meth.Enzymol.* **276**, 538–557.
- Renninger, M. (1937). Röntgenometrische Beiträge zur Kenntnis der Ladungsverteilung im Diamantgitter. *Z. Kristallogr.* **97**, 107–121.
- Rodgers, D. (1994). Cryocrystallography. *Structure* **212**, 1135–1140.
- Sayre, D. (1952). The Squaring Method: a New Method for Phase Determination. *Acta Cryst.* **5**, 60–65.
- Schroer, K. (1995). diff6xmgr – ein Programm zur Darstellung der Meßdaten. *Universität Karlsruhe*.
- Schwegle, W. (1993). Theoretische und Experimentelle Untersuchungen an Mehrstrahlinterferenzen. *Dissertation, Universität Karlsruhe*.
- Sheldrick, G. (1997). *SHELX-97, Kristallographisches Verfeinerungsprogramm*. Universität Göttingen.
- Sheldrick, G. (1998). *Ab initio* Strukturlösungsmethoden für kleine Proteine und große Peptide. *Z.Kristallogr. Suppl.* **15**.
- Sheldrick, G. & Gould, R. (1995). Structure solution by iterative peaklist optimization and tangent expansion in space group P 1. *Acta Cryst.* **B51**, 423–431.
- SIGMA (1997). *Katalog: Biochemikalien und Reagenzien für die naturwissenschaftliche Forschung*. SIGMA-Chemie GmbH & Co.
- Snell, E., Weisgerber, S., Helliwell, J., Weckert, E., Hölzer, K. & Schroer, K. (1995). Improvements in Lysozyme Protein Crystal Perfection through Microgravity Growth. *Acta Cryst.* **D51**, 1099–1102.
- Sousa, R. (1995). Use of glycerol, Polyols and Other Protein Structure Stabilizing Agents in Protein Crystallization. *Acta Cryst.* **D51**, 271–277.
- Steinrauf, L. (1959). Preliminary X-ray data for some new crystalline forms of β -lactoglobulin and hen egg-white lysozyme. *Acta Cryst.* **12**, 77.

- Stroud, R., Kay, L. & Dickerson, R. (1974). The structure of Bovine Trypsin: Electron Density Maps of the Inhibited Enzyme at 5 Å and at 2.7 Å Resolution. *J.Mol.Biol.* **83**, 185–208.
- Stuhrmann, S. (1997). Crystallographic studies of the small ribosomal 30S subunit from the thermus thermophilus and bovine pancreatic trypsin. *Dissertation, Universität Hamburg*.
- Sumner, J. (1926). The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. *J.Biol.Chem.* **69**, 435–441.
- Tang, M. & Chang, S. (1990). Kramers–Kronig Relations in Three–Beam X–Ray Diffraction: Application to Phase Determination. *Phys. Lett. A* **143**, **8**, 405–408.
- Thomanek, U., Parak, F. & Wintergerst, B. (1977). The active Center of Methemoglobin Hb(H₂O) Investigated by Mössbauer and Susceptibility Experiments. *Z.Naturforsch.* **C32**, 11–19.
- Vaney, M., Maignan, S., Riès-Kautt, M. & Ducruix, A. (1996). High-Resolution Structure (1.33Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab–01 Mission. *Acta Cryst.* **D52**, 502–517.
- Weckert, E. (1988). Zum Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse. Experimentelle Bestimmung von Phasenbeziehungen durch Mehrstrahlinterferenzen. *Dissertation, Universität Erlangen*.
- Weckert, E. (1994). psiab – Ein Programm zur Optimierung von Mehrstrahlinterferenz–Messungen. *Universität Karlsruhe*.
- Weckert, E. (1997). Grundlagen und Anwendungen von Mehrstrahlinterferenzen: ein neuer Ansatz zur röntgenographischen Bestimmung von Kristallstrukturen. *Habilitation, Universität Karlsruhe*.
- Weckert, E. & Hümmel, K. (1990). On the Quantitative Determination of Triplet Phases by X–Ray Three Beam Diffraction. *Acta Cryst.* **A46**, 387–393.
- Weckert, E. & Hümmel, K. (1997). Multiple–Beam X–ray Diffraction for Physical Determination of Reflection Phases and its Applications. *Acta Cryst.* **A53**, 108–143.
- Weckert, E., Schroer, K., Hölzer, K., Zellner, J. & Brennfleck, M. (1995). Das Diffraktometer–Steuerungsprogramm diff6. *Universität Karlsruhe*.
- Weckert, E., Schwegle, W. & Hümmel, K. (1993). Direct phasing of macromolecular structures by three–beam diffraction. *Proc.R.Soc.Lond.* **A**, 33–46.
- Wölfel (1972). *Theorie und Praxis der Röntgenstrukturanalyse*. Vieweg.
- Woolfson, M. & Fan, H. (1995). *Physical and non–physical methods of solving crystal structures*. Cambridge University Press.
- Young, A., Dewan, J., Nave, C. & Tilton, R. (1993). Comparison of Radiation–Induced Decay and Structure Refinement from X–ray Data Collected from Lysozyme at Low and Ambient Temperatures. *J.Appl.Cryst.* **26**, 309–319.
- Zachariasen, W. (1967). A General Theory of X–Ray Diffraction in Crystals. *Acta Cryst.* **23**, 558–564.
- Zegers, I. (1997). Persönliche Mitteilungen.
- Zellner, J. (1996). Optimierung der Datenerfassung für Kristallstrukturuntersuchungen mit Synchrotronstrahlung durch den Einsatz schneller Plastiksintillatoren. *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe*.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Hümmer für die interessante Aufgabenstellung und für die gebotenen Möglichkeiten, bei verschiedenen Laboratorien Gast zu sein und bei Tagungen und Workshops teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. W. Prandl (Universität Tübingen) danke ich für die spontane Übernahme des Korreferats.

Bei PD Dr. Edgar Weckert möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die vielen anregenden Gespräche und seine große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen, die in Zusammenhang mit der Arbeit aufgetreten sind, trugen zum Gelingen bei.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Klaus Schroer für die Diskussionen, die oft Anregungen für neue Ideen waren und für seine tatkräftige Unterstützung in Computerfragen.

Prof. Dr. C. Betzel danke ich für die Einladung an das EMBL in Hamburg, die mir bei meinem ersten Aufenthalt in einem molekularbiologischen Labor einen Einblick in die Auswertung von Proteindaten ermöglichte.

Dr. J. Koepke danke ich für Einladung an das MPI für Biophysik in Frankfurt und für die tatkräftige Unterstützung bei der Auswertung der Elektronendichtekarten.

Für die Unterstützung während der Meßzeiten an der ESRF möchte ich mich bei Martin Brennfleck, Myriam Masson-Fauchier, Ralf Müller und vor allem bei Johannes Zellner bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Kristallographie und der Werkstatt für die gute Zusammenarbeit.

Bei den SNBL-Mitarbeitern an der ESRF möchte ich mich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des BMBF-Projekts „Strukturbestimmung von Makromolekülen durch Kombination von gemessenen Strukturfaktorphasen mit statistischen Methoden“. Für die damit verbundene finanzielle Unterstützung möchte ich mich bedanken.

Bei Prof. Dr. H. Wondratschek möchte ich mich herzlich für das aufmerksame Interesse an dieser Arbeit bedanken. Mit seinen Vorlesungen hat er meine Freude an der Kristallographie geweckt.

