

# Alle Angaben sind ohne Gewähr!

- Die Abbildungen sind hauptsächlich aus dem Buch:
- Van Holde/Johnson/Ho: Principles of physical biochemistry
- Buch nur zur Kristallographie:
- **Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models**  
von Gale Rhodes

# Röntgenkristallographie

Für die Röntgenkristallographie muß von dem zu untersuchenden Protein zunächst ein Kristall erzeugt werden.

Proteinkristalle entstehen aus wässrigen Lösungen durch Übersättigung.

# Erzeugen der Kristalle

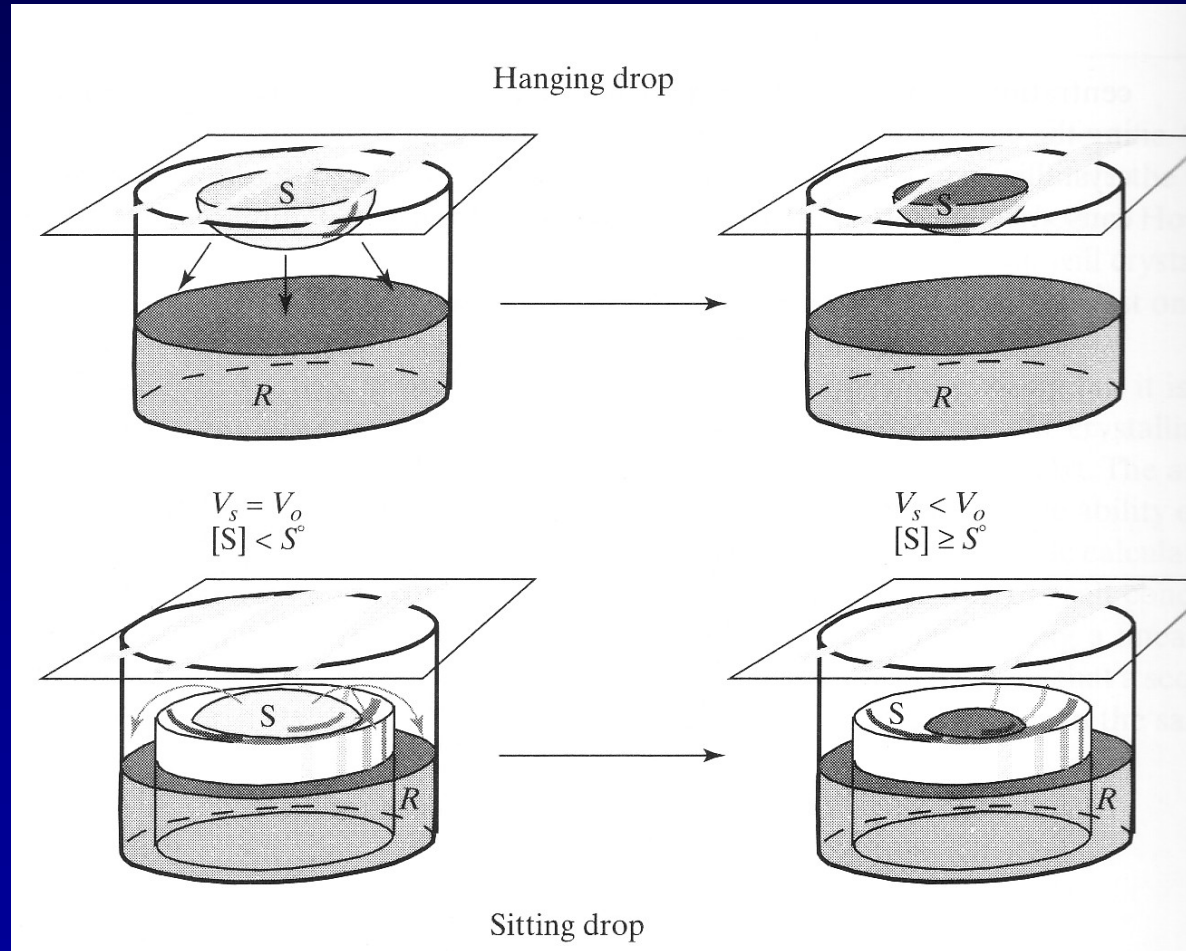
- Der Sättigungspunkt ist abhängig von der Proteinkonzentration, dem pH-Wert und der Ionenstärke (~ Salzkonzentration). Die Kristallisation erfolgt in der Praxis nach der Trial-und-error Methode bzw. dem durchscreenen verschiedener Kristallisationslösungen.

# Beispiele für Kristallisationslösungen:

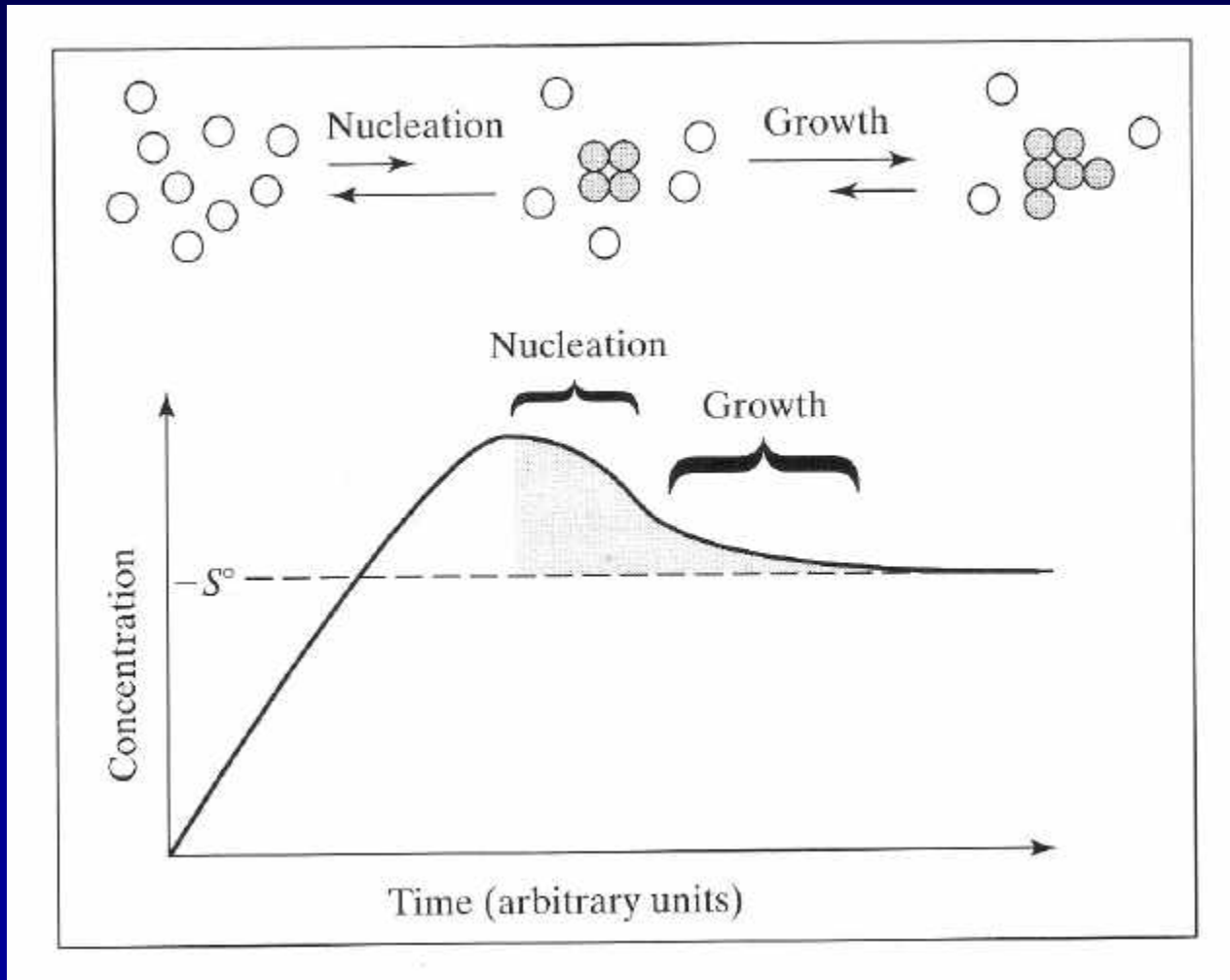
**TABLE 6.2** SCREENING SOLUTIONS IN SPARSE MATRIX METHODS FOR CRYSTALLIZING PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS

Crystallization Solutions			
Salt	Buffer	Precipitant	Molecules Crystallized
Proteins			
None	0.1 M Tris	2 M Ammonium sulfate	Tropomyosin <i>Eco</i> R1-DNA complex Monellin
0.2 M Na citrate	0.1 M Tris	30% Polyethylene glycol (PEG)	Lysozyme Myoglobin Ribonuclease A Insulin
0.2 M Na acetate	0.1 M Cacodylate	30% PEG	Lysozyme Pepsin
Nucleic acids			
12 mM Spermine, 20 mM Mg <sup>2+</sup> , 80 mM Na <sup>+</sup>	40 mM Cacodylate pH 7.0	10% 2-methyl-2,4- dimethylpentane diol (MPD)	d(CG) <sup>3</sup> Z-DNA G-quartet DNAs DNA-adriamycin
0.5 mM Spermine, 15 mM Mg <sup>2+</sup> , 2 mM BaCl <sub>2</sub>	pH 6.5	7% 2-Propanol	Phe-tRNA
2 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Mg <sup>2+</sup>	pH 7.0	15% MPD	Group I intron (from <i>Azoarcus</i> ) 12-Base pair RNA

# Kristallisationsansatz:

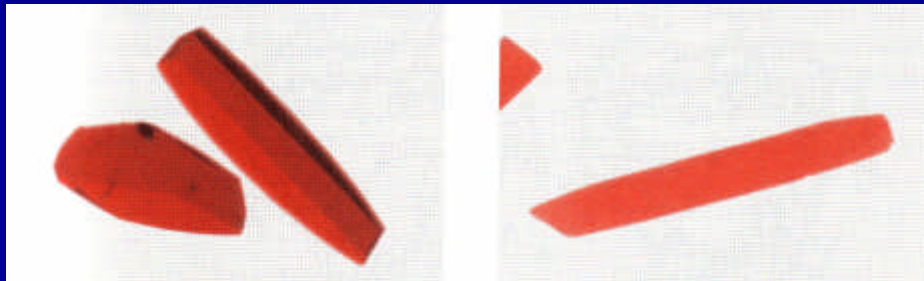


# Verlauf der Kristallisation:



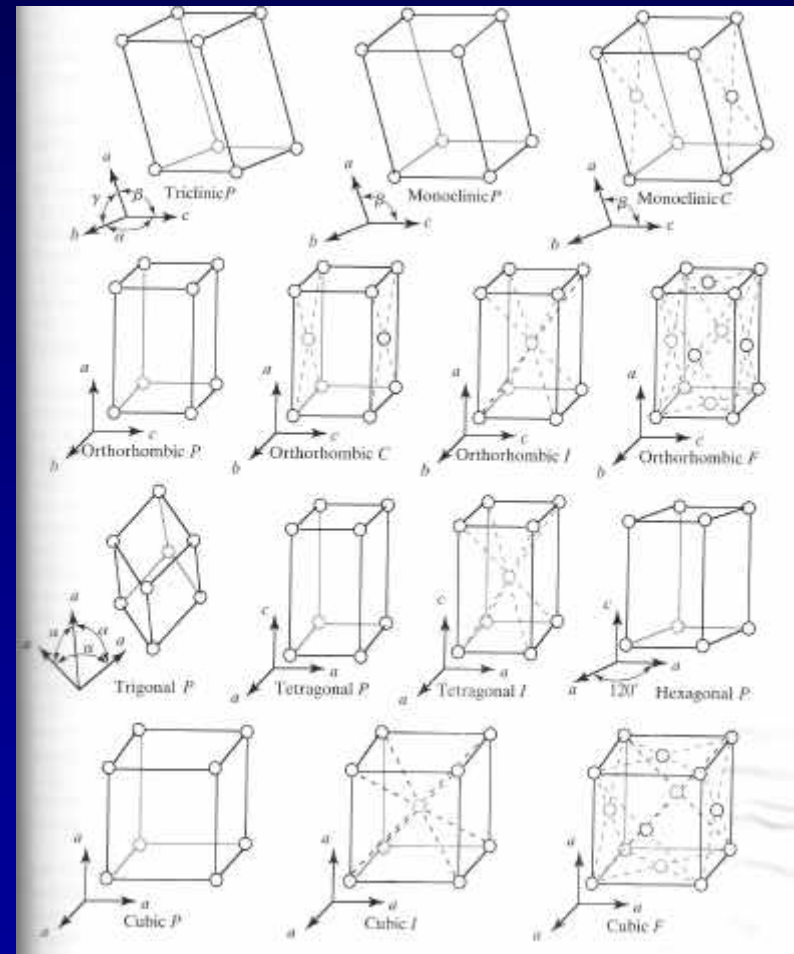
# Protein im Kristall

- Proteinkristalle sind nicht trocken, sondern erhalten zu 30-80% Mutterlauge. Der Wassergehalt entspricht etwa dem einer normalen Zelle.
- Daher liegen die Proteine im Kristall in natürlicher Faltung vor.
- Die Kristalle sind sehr labil und empfindlich.



# Die 14 Bravais-Gitter

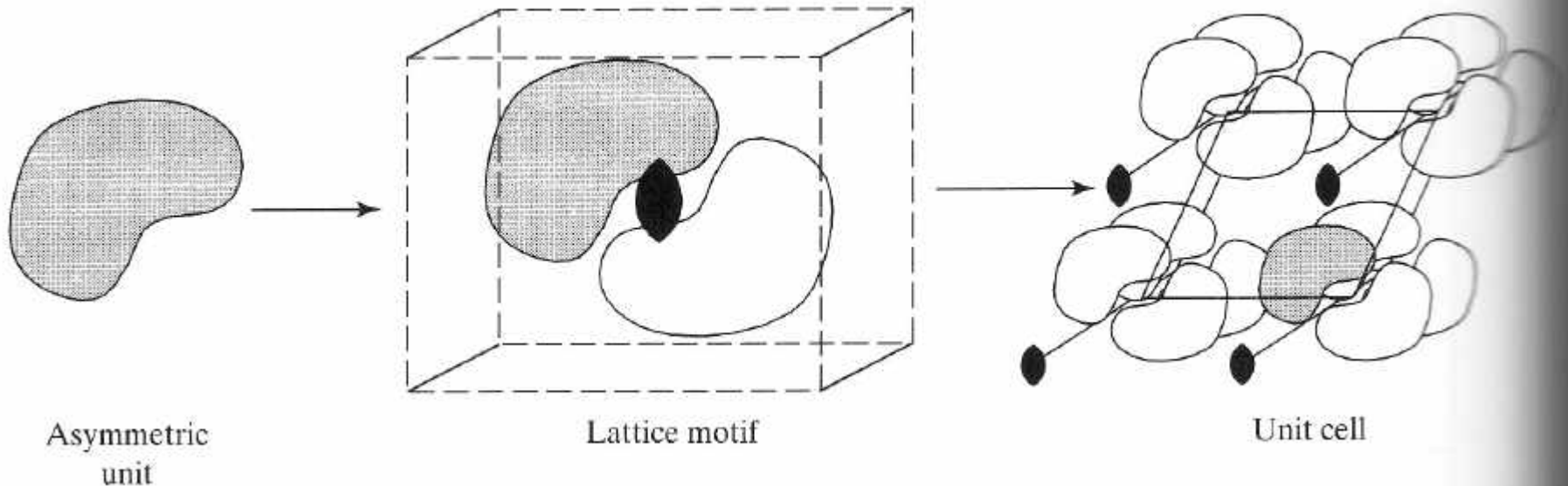
- Es gibt für 14 verschiedene Kristallgitter
- Daraus ergeben sich durch Symmetrioperationen 65 verschiedene Raumgruppen, in denen ein Protein kristallisieren kann.





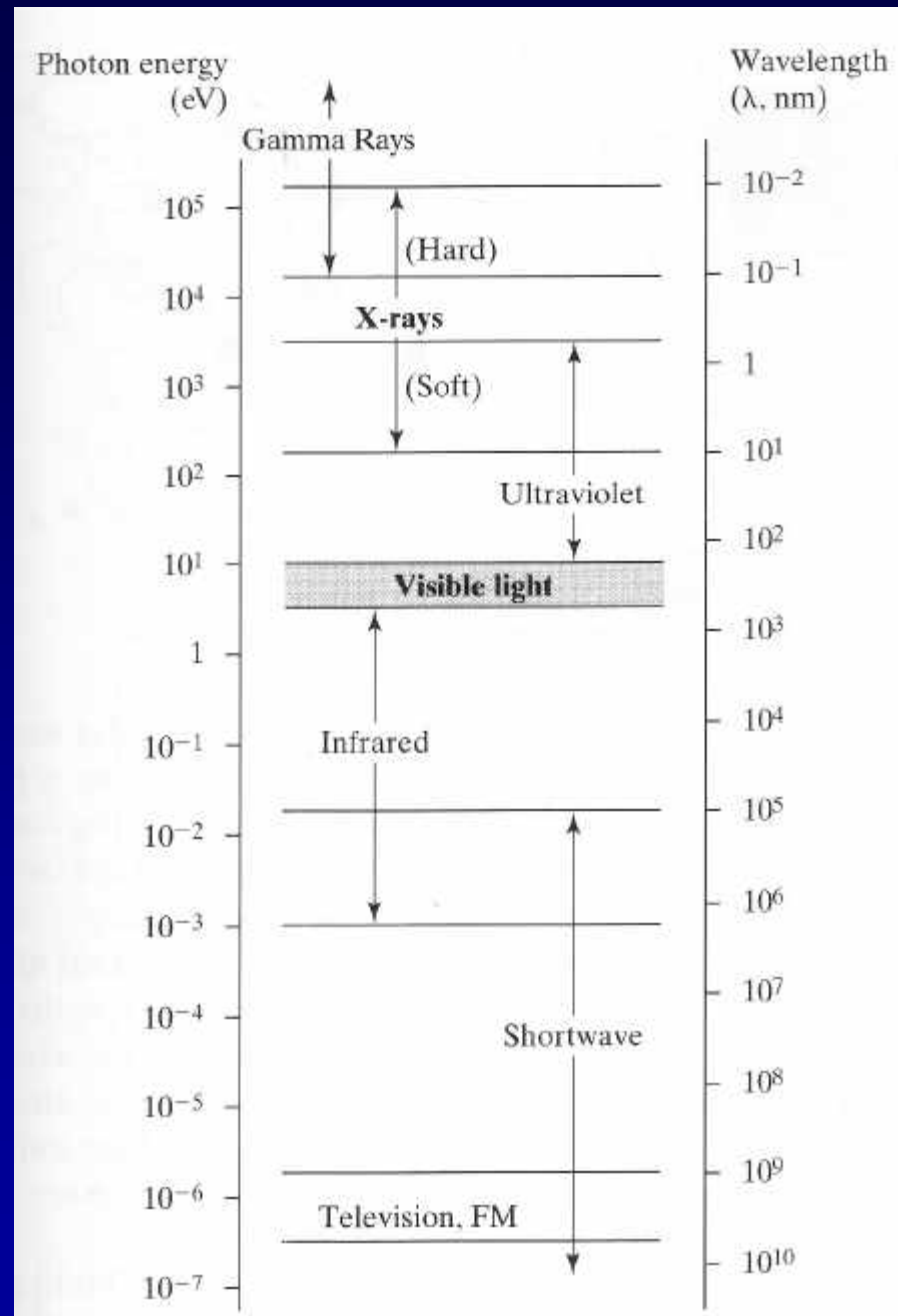
# Kristallaufbau

- Diese Raumgruppen bilden die Einheitszelle des periodisch aufgebauten Kristalls:



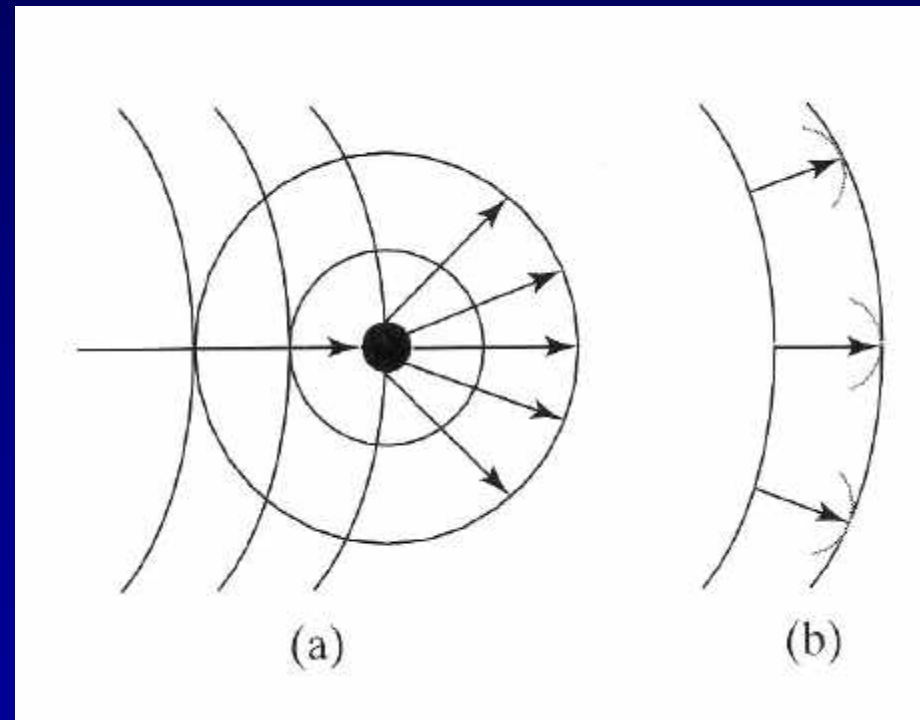
# Was ist Röntgenstrahlung?

- ein Teil der elektromagnetischen Strahlung:



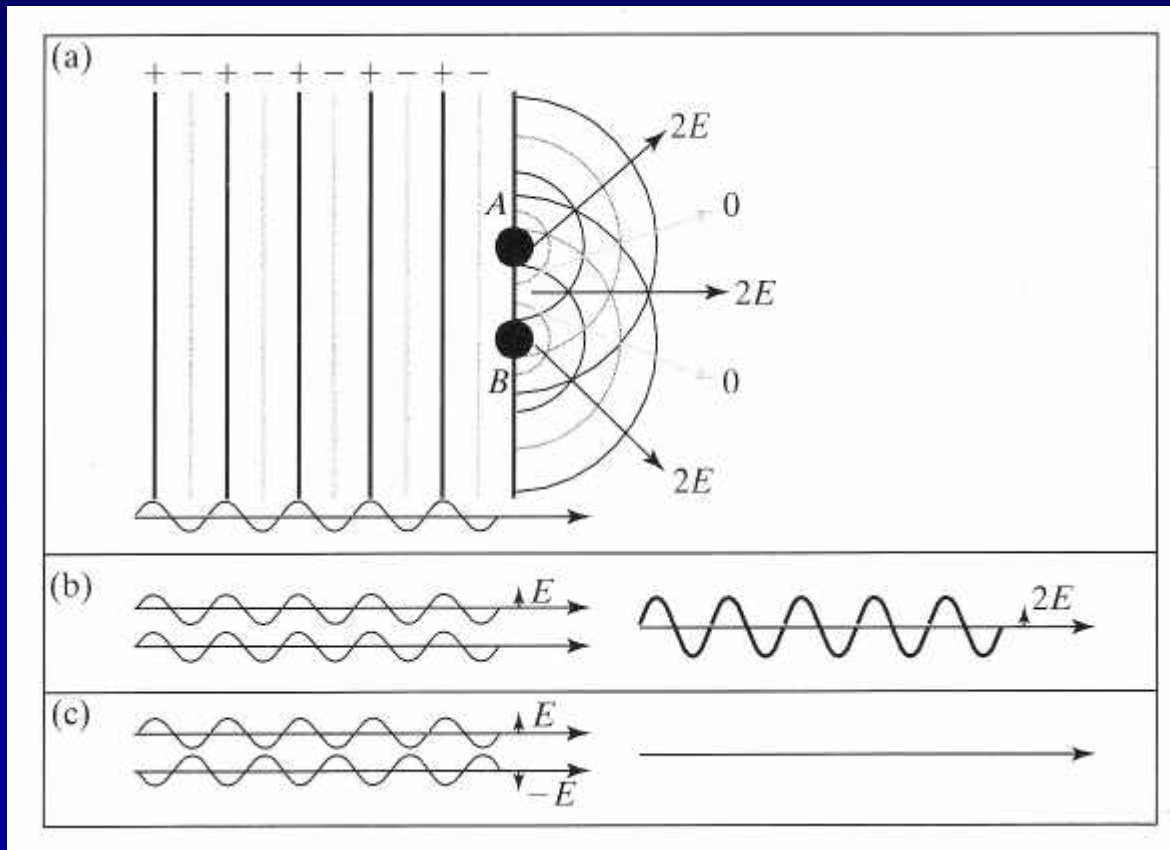
# Was ist Diffraktion? (I)

- Huygens Prinzip:  
jeder Punkt einer  
Welle kann als neuer  
Ausgangspunkt einer  
neuen  
Elementarwelle  
betrachtet werden

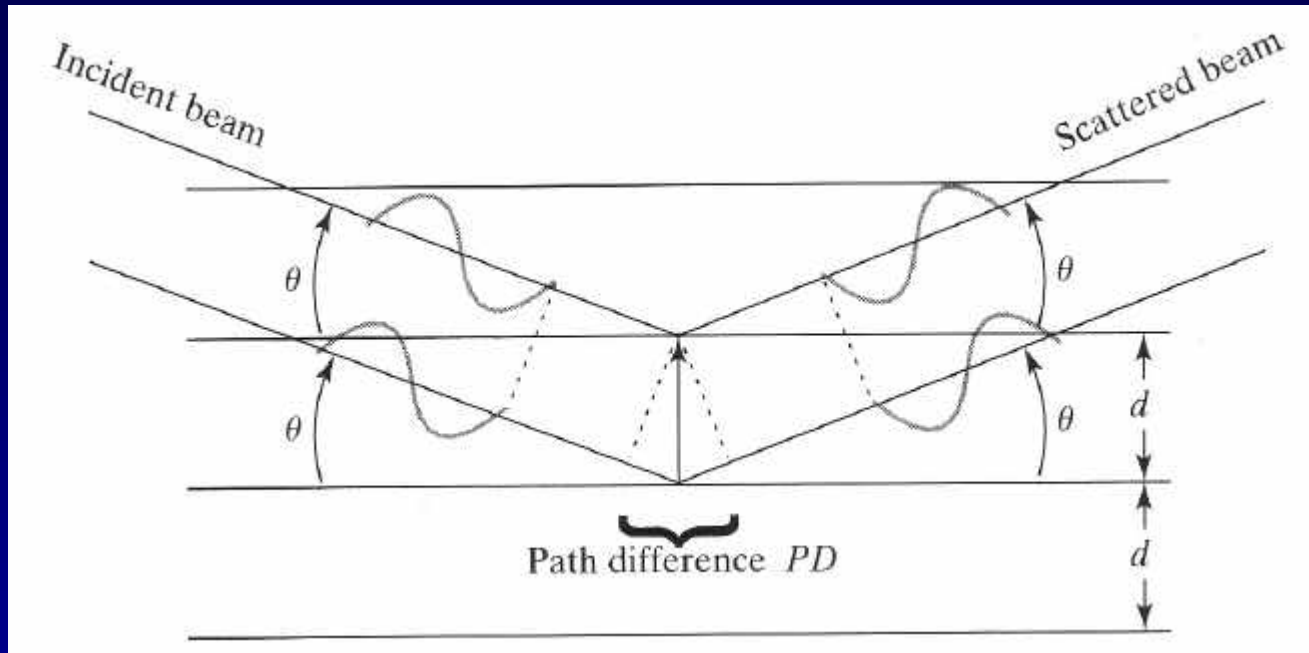


# Was ist Diffraktion? (II)

- Es gibt konstruktive und destruktive Interferenz zwischen den Elementarwellen:



# Was ist Diffraktion? (III)



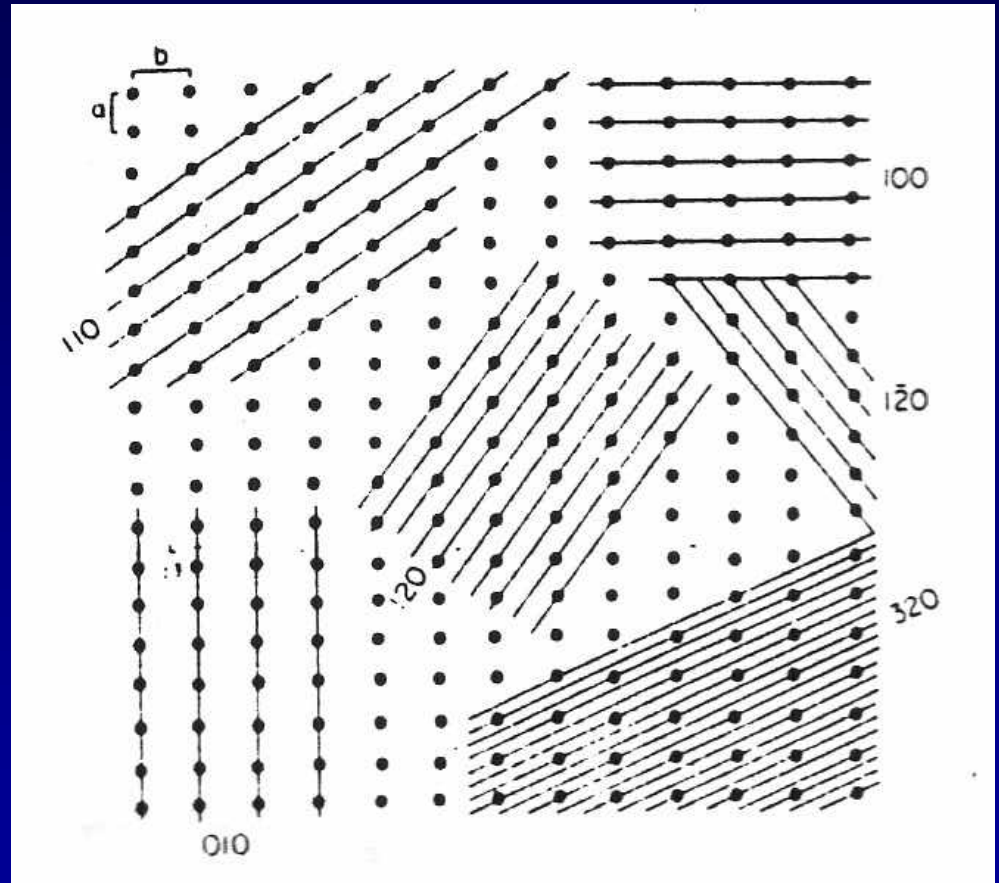
- An einer reflektierenden Ebenenschar werden Strahlen gebeugt.
- Braggsches Beugungsgesetz: positive Interferenz, falls gilt:  $2 \cdot d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$  ( $PD = n \cdot \lambda$ )

# Beugung im Kristall:

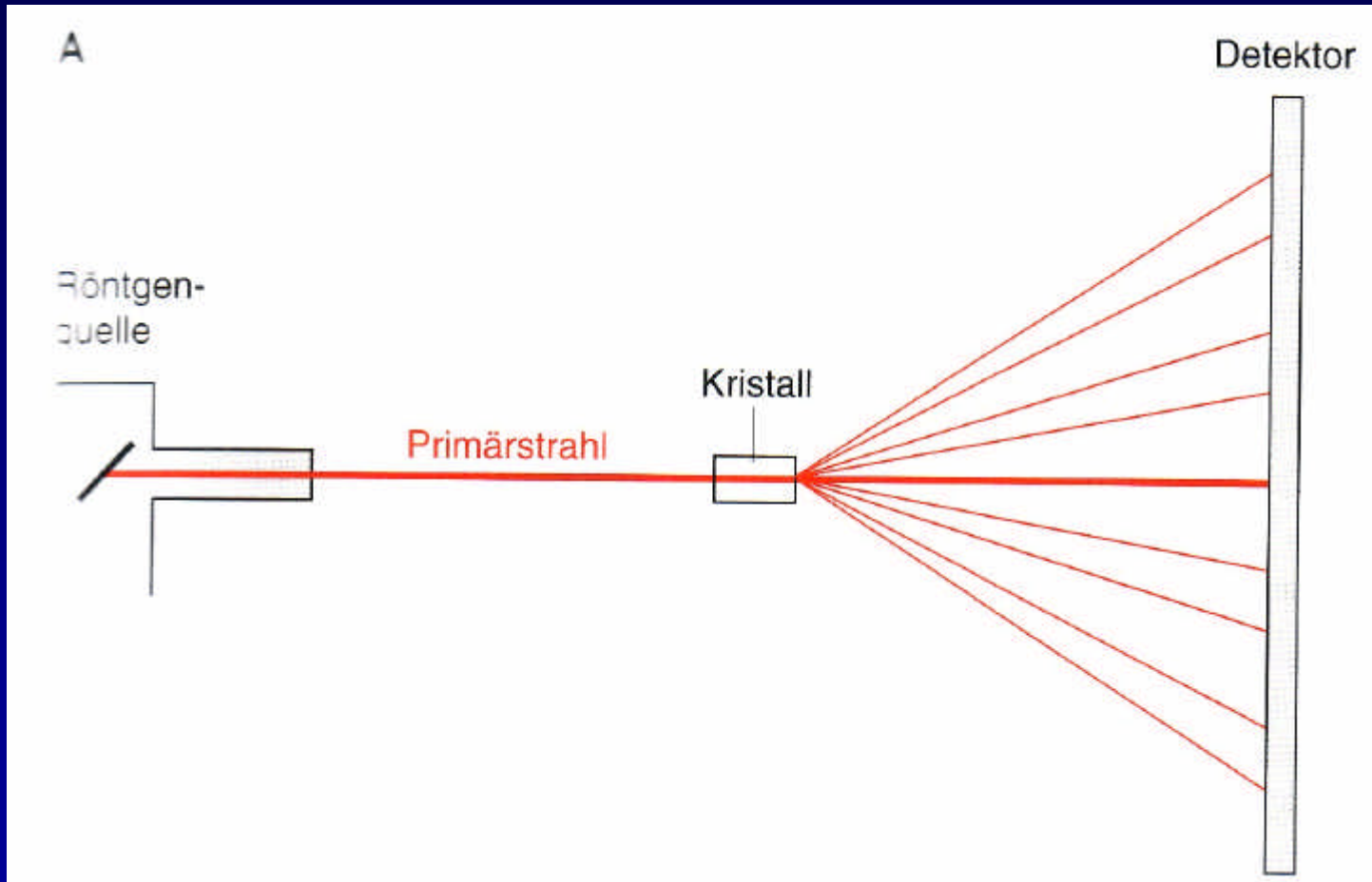
- Röntgenstrahlen werden durch Elektronen von Molekülen im Kristall reflektiert.
- Durch die periodische Anordnung im Kristall kommt es zur Interferenz nach dem Braggschen Gesetz.
- Die Ebenen im Kristall sind die Gitterebenen (beliebige Ebenen, die mit Gitterpunkten besetzt sind).

# Gitterebenen

- Die jeweiligen Gitterebenen werden mit den Miller-Indices  $h, k, l$  bezeichnet (entlang den drei Raumvektoren  $a, b, c$ ).  $hkl$  bezeichnet dabei eine Ebenenschar. Je größer  $hkl$  sind, desto kleiner wird der Ebenenabstand in der Schar.



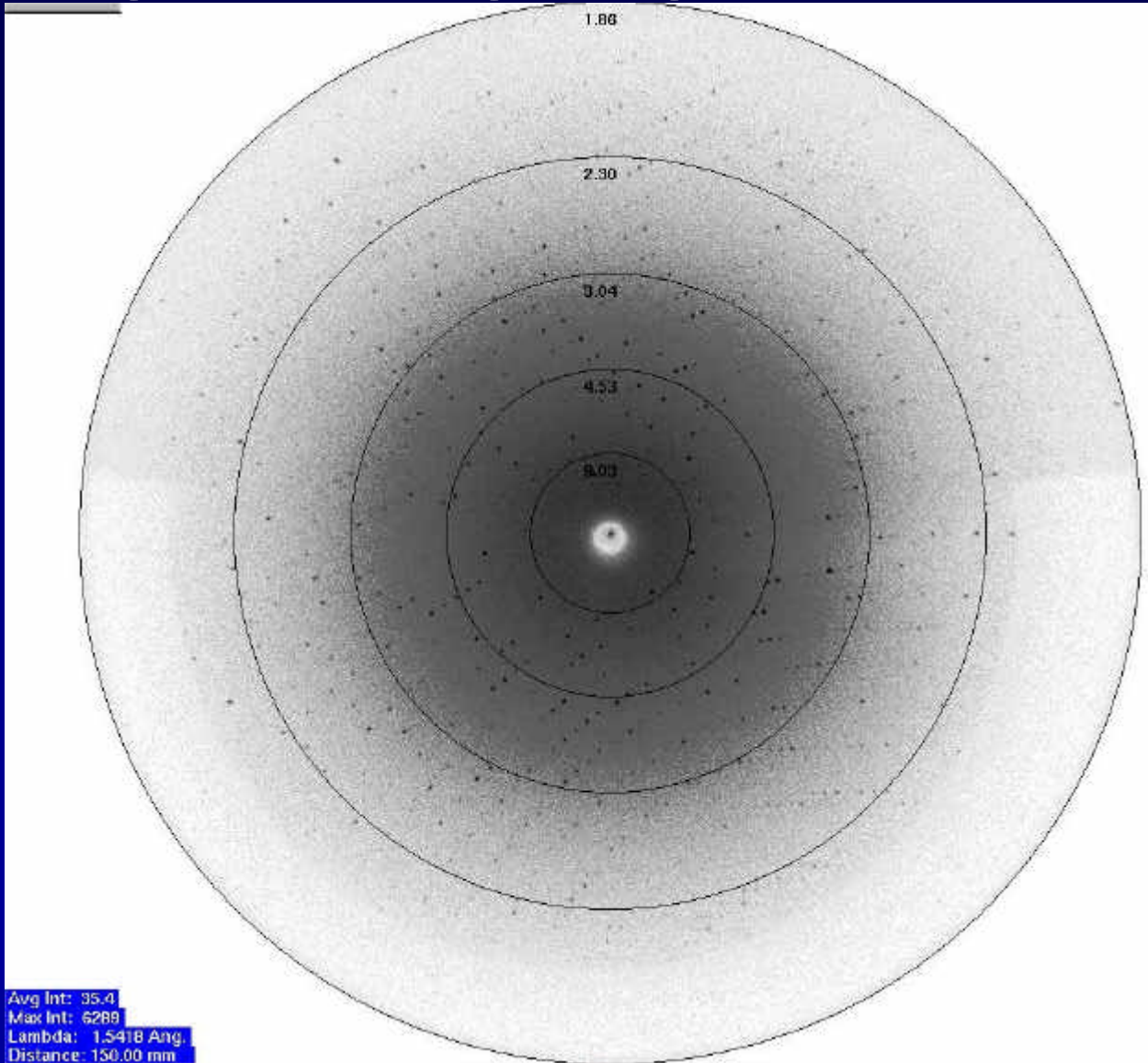
# Datensammlung



- Der Kristall wird während der Aufnahme gedreht. Der Drehwinkel für einen kompletten Datensatz ist abhängig von der Kristallgeometrie.



# Röntgenbeugungsaufnahme:



# Das Phasenproblem der Kristallographie (I)

- Die Intensität der einzelnen Punkte gibt die Amplitude der aufgetroffenen Welle wieder. Man kann anhand der Aufnahmen aber keine Aussage über die Phase der Welle machen. Die ist jedoch notwendig für die Berechnung der Elektronendichte:

$$\rho(x, y, z) = \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\alpha_i} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

F: Strukturfaktoramplitude

# Das Phasenproblem der Kristallographie (II)

Für die Lösung des Phasenproblems  
benutzt man hauptsächlich 3 Methoden:

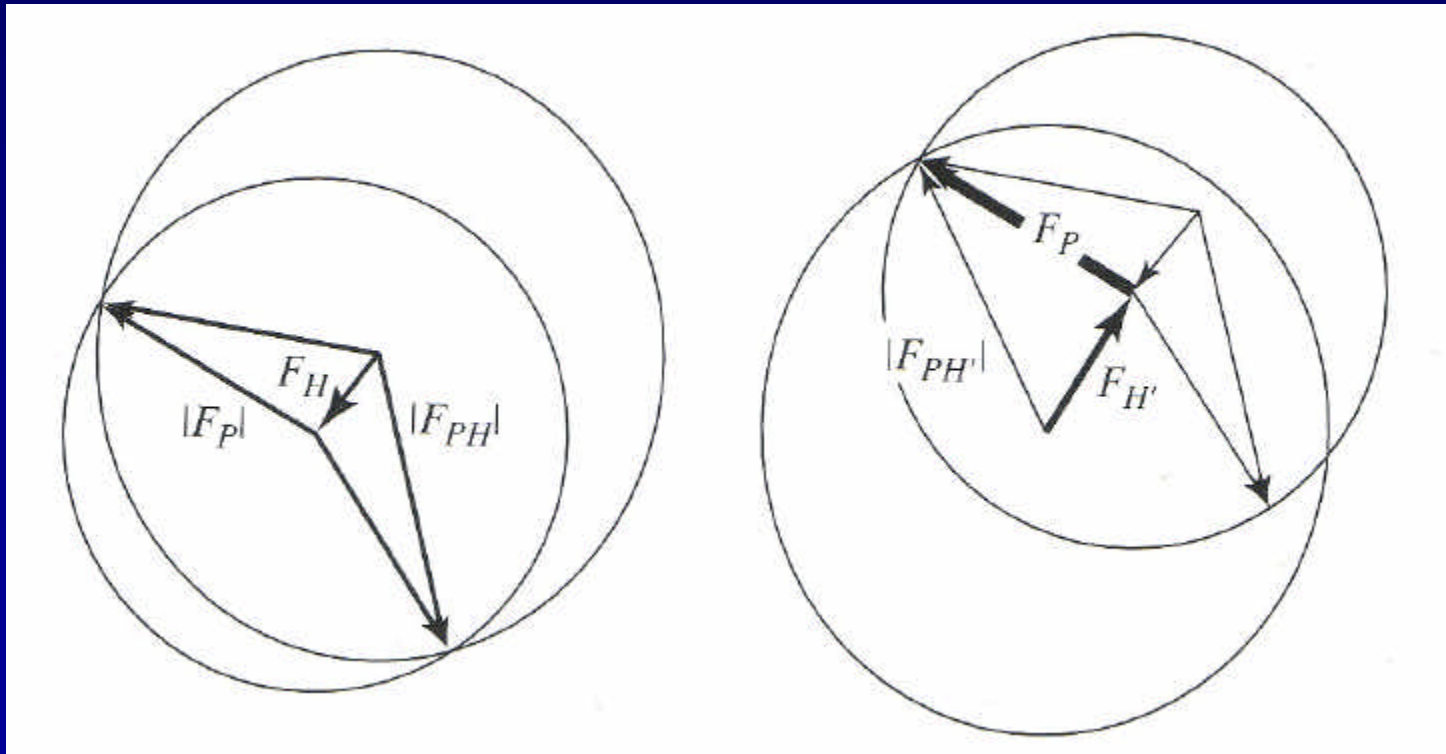
- Multipler Isomorpher Ersatz
- Multiple Anomale Dispersion
- Molekularer Ersatz (Computer!)

# Multipler Isomorpher Ersatz (I)

- Man stellt mindestens zwei Schweratomderivate (Atome mit sehr vielen Elektronen) der Proteinkristalle her und nimmt deren Daten auf.
- Dabei darf die Position der Proteine im Kristall durch Einlagerung der Schweratome nicht verändert werden.
- Durch die hohe Elektronendichte kann die *relative* Lage der Schweratome im Kristall berechnet werden (Patterson-Methode), mit diesen Lagen kann dann die Strukturfaktor-amplitude der Schweratome bestimmt werden.

# Multipler Isomorpher Ersatz (II)

- Mit den Strukturfaktoramplituden des Proteins mit und ohne Schweratome sowie denen der Schweratome allein kann die Phase konstuiert werden:



mit erstem Schweratom

mit zweitem Schweratom

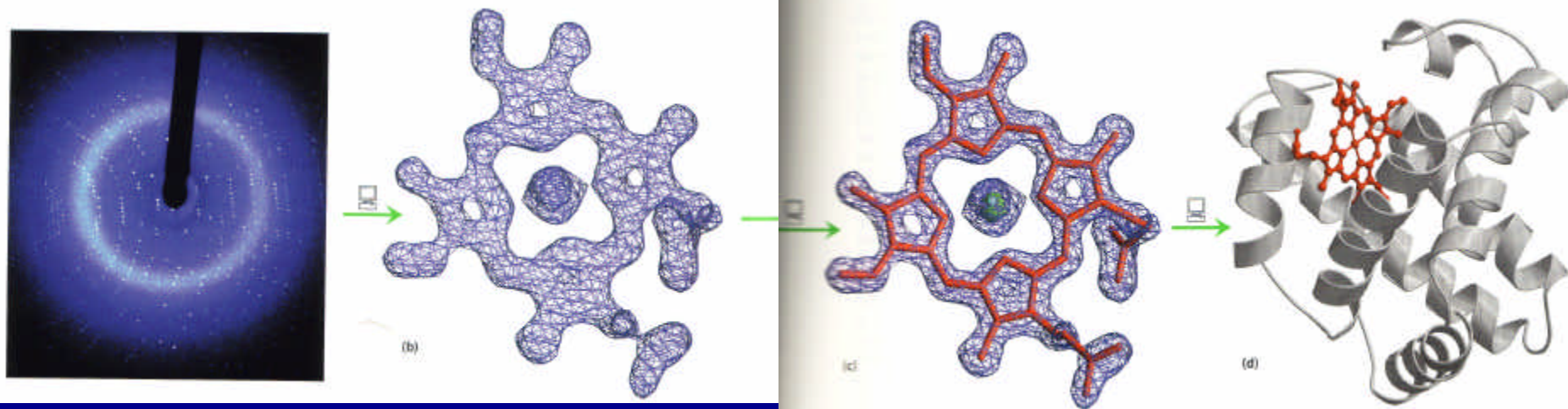
# Multiple Anomale Dispersion

- Die Messung unter Verwendung der anomalen Dispersion von Schweratomen kann nur an Synchrotronen stattfinden, da die Wellenlänge der Röntgenstrahlung hierzu variiert werden muß.
- Es wird für die Messung nur ein Schweratomderivat benötigt (z.B. mit Selenomethionin modifiziertes Protein)

# Molekularer Ersatz

- Hierzu verwendet man die Daten von bereits bekannten Strukturen, die eine hohe Ähnlichkeit mit der erwarteten Struktur aufweisen (z.B. homologe Proteine, Mutanten, Protein-Inhibitor-Komplexe).
- Durch Lösung der Rotations- und Translationsfunktion können die ähnlichen Bereiche als Basis für die Modellierung der neuen Elektronendichteverteilung dienen.
- Die Methode ist fehleranfälliger, da das Startmodell ohne experimentelle Phaseninformationen aufgebaut wird.

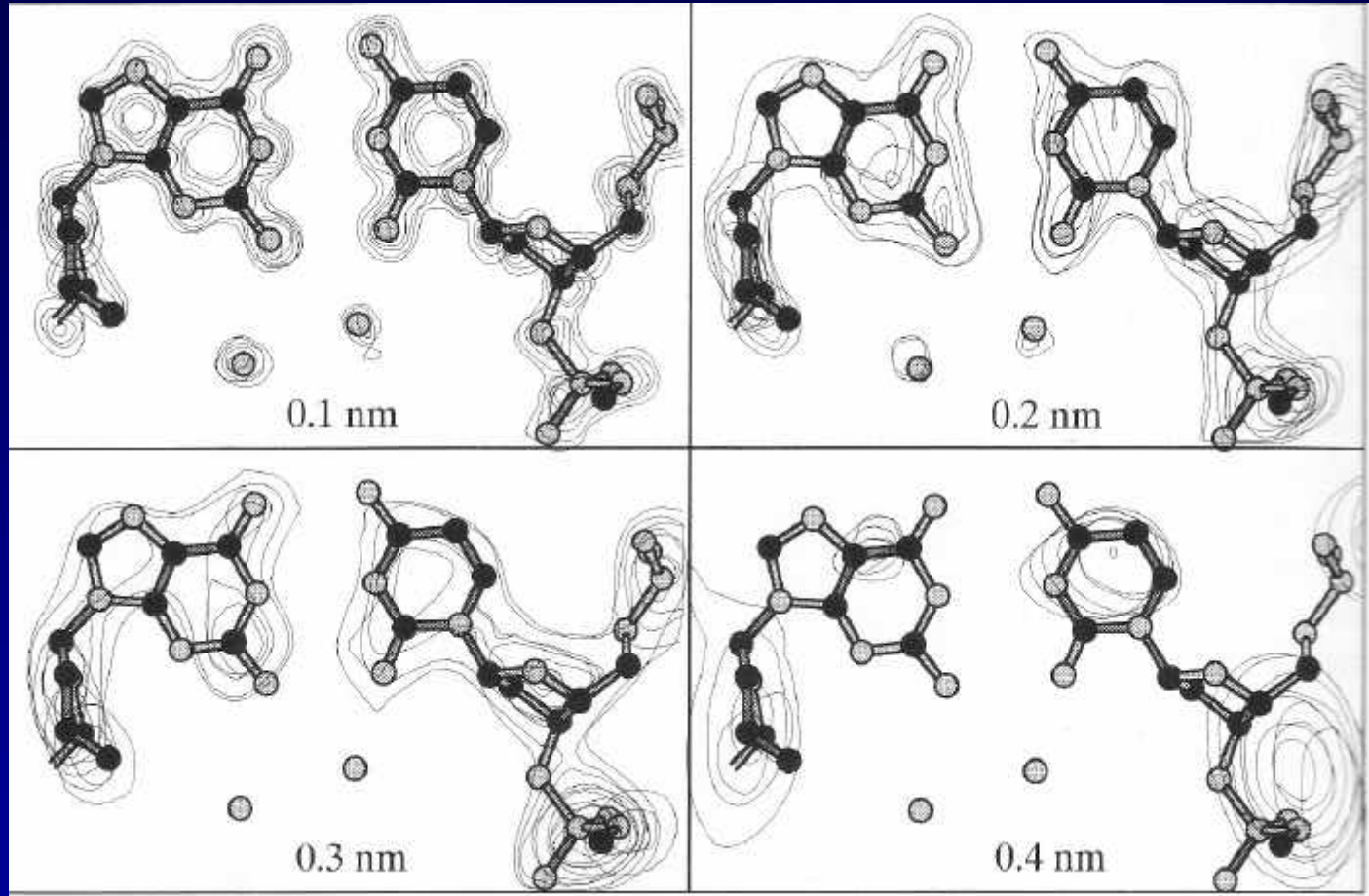
# Modellierung der Proteinsequenz in die Elektronendichteverteilung



- Die Bereiche der höchsten Elektronendichte werden zuerst modelliert



# Elektronendichteverteilung

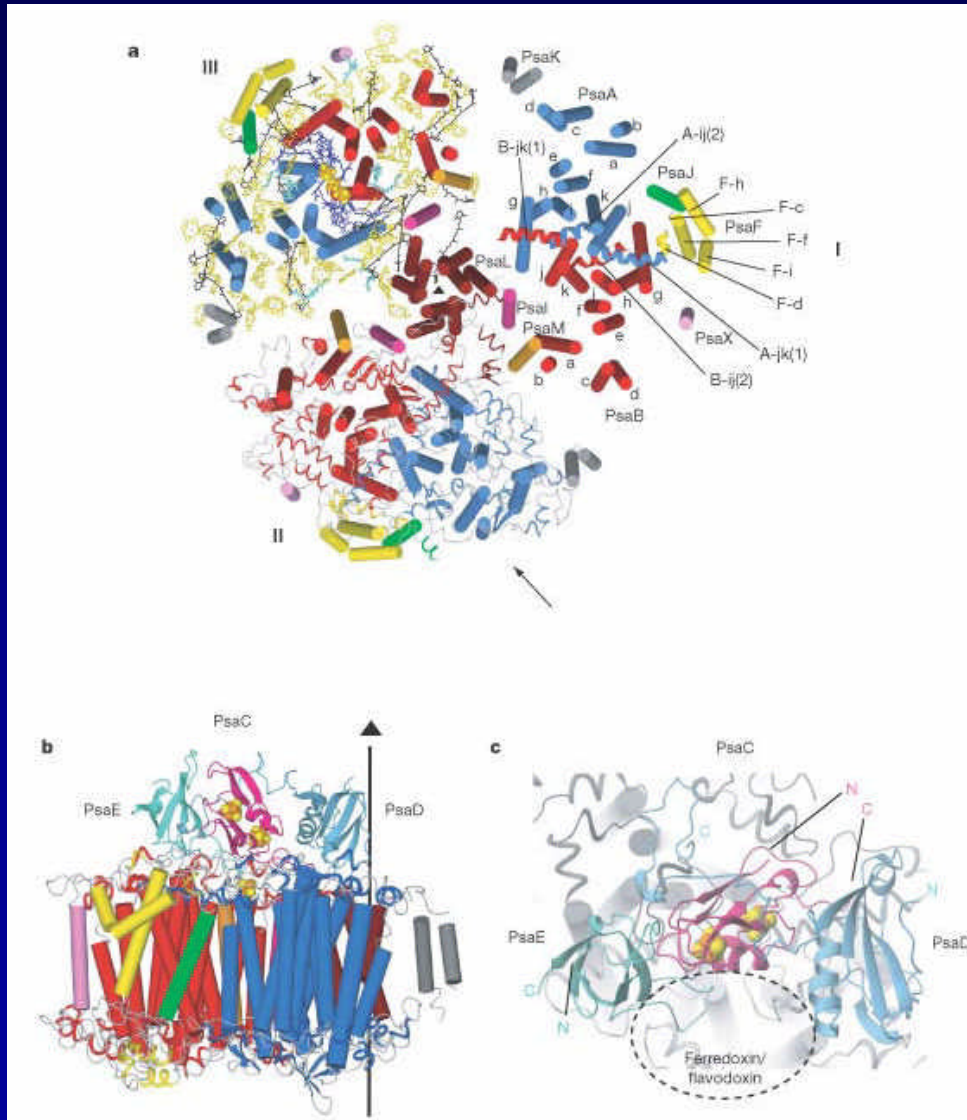


- Beispiel (anhand von DNA) für die Information in Elektronendichtekarten verschiedener Auflöung

# Verfeinerung

- Von dem erstellten Modell werden Strukturfaktoramplituden berechnet und mit den gemessenen verglichen.
- Die Differenz wird durch verschiedene Optimierungen minimiert: Variation der Torsionswinkel, Potentialenergie-berechnungen, Moleküldynamiksimulationen
- Die Güte der Verfeinerung wird durch den Reliability-Faktor R angegeben. Je kleiner der R-Faktor, desto besser das Modell.  $R=0,15-0,25$  für Proteine guter Auflösung ( $<2,5 \text{ \AA}$ )

# Kristallographie an der FU



## Prof. W. Saenger

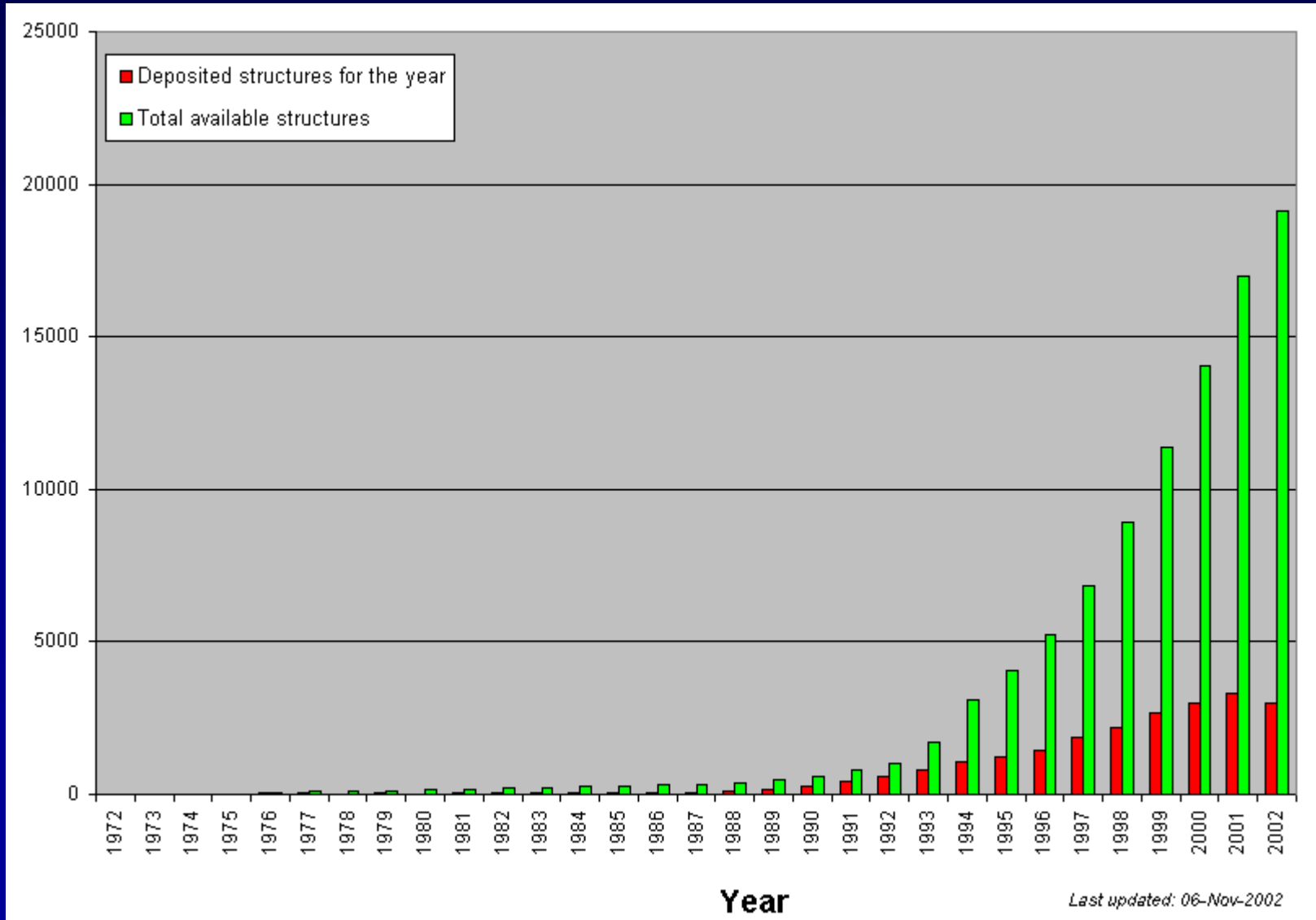
- Struktur von Photosystem I bei 2.5 Å Auflösung
- *Nature* **411**, 909 - 917 (2001)



# PDB

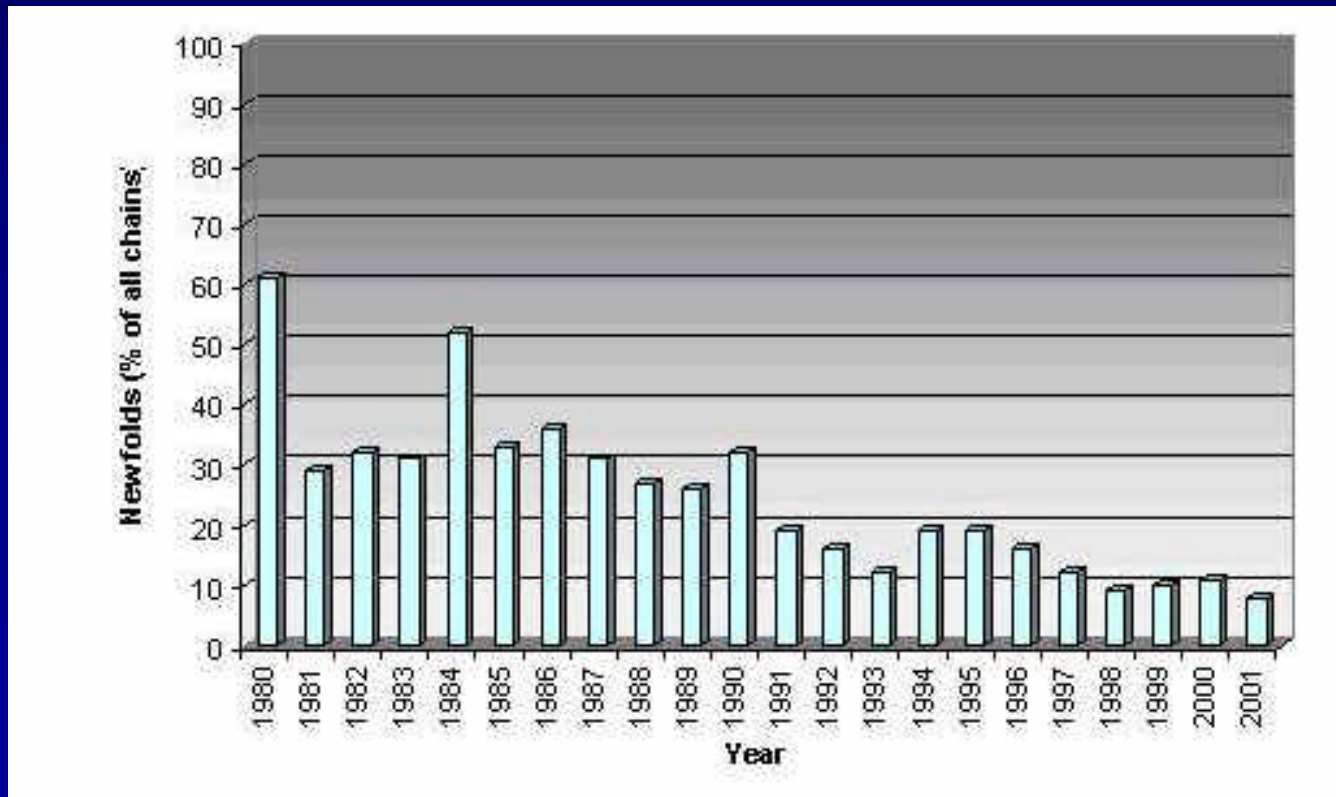
- Alle bisher aufgeklärten Proteinstrukturen sind in der Protein Data Bank gespeichert.
- Zur Zeit sind dort 19 311 Strukturen gespeichert.
- Mit den Strukturen können viele bioinformatische Fragestellungen bearbeitet werden (z.B. Proteinevolution, Vorhersage von Protein-Interaktionen, Faltungsvorhersage...)
- [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)

# Entwicklung der PDB



# New Folds

- Die Zahl der neuentdeckten Faltungsmuster von Proteinen stagniert:



# Zusammenfassung

- Grundlage der Röntgenkristallographie ist die Beugung am (Kristall-)Gitter.
- Das größte Problem ist es, die Proteinkristalle zu erhalten.
- Des weiteren muß das Phasenproblem gelöst werden (MIR, MAD, MR).
- Anhand der erhaltenen Elektronendichteverteilung wird am Computer ein Modell entworfen und durch verschiedene Optimierungen verfeinert.