

Untersuchungen zur optimalen Phasierung  
bei der kristallographischen  
Strukturbestimmung  
der kleinen ribosomalen Untereinheit von  
*Thermus thermophilus*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Physik  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Marco Glühmann**  
aus Hamburg

Hamburg 2001

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. A. Yonath  
Prof. Dr. R. L. Johnson

Gutachter der Disputation:

Prof. Dr. A. Yonath  
Prof. Dr. J. Schneider

Datum der Disputation:

1. November 2001

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Dr. H. D. Rüter

## Kurzzusammenfassung

Das Ribosom, ein asymmetrischer Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 2,2 MDa, ist eins der größten biologischen Makromoleküle, deren dreidimensionale Struktur mit Hilfe von kristallographischen Methoden aufgeklärt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wird das erste nahezu vollständige Modell der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* in atomarer Auflösung präsentiert und die Methoden erläutert, welche zur Strukturbestimmung dieses für die Proteinsynthese essentiellen Partikels führten. Insbesondere wurden Untersuchungen zur optimalen Phasierung der Strukturfaktordaten mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes unter Verwendung von Schweratomclustern zur Derivatisierung der Ribosomenkristalle durchgeführt. Zur Optimierung der Phasierungsprozedur wurden sowohl simulierte als auch experimentelle Daten zum Vergleich von diversen Phasierungsprogrammen verwendet, um die Näherung des sphärischen Durchschnitts bei der Behandlung von nicht eindeutig orientierbaren Clustern zu untersuchen.

In Anbetracht der schwer zu interpretierenden Elektronendichtekarten im Vorfeld der hier erläuterten Untersuchungen bot speziell die Simulation aufgrund des vorliegenden Referenzmodells eine Möglichkeit, die Phasierung systematisch zu analysieren und zu optimieren.

Basierend auf den so gewonnenen Ergebnissen gelang es, den Aufbau der kleinen ribosomalen Untereinheit zu bestimmen und erste Einblicke in die Funktionsweise dieser faszinierenden 'Proteinfabrik' zu erlangen sowie neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Wirkungsweise von Antibiotika zu gewinnen.

## Abstract

The ribosome, an asymmetric particle with a molecular weight of approximately 2.2 MDa, is one of the largest biological macromolecules for which the three-dimensional structure could be solved by crystallographic methods.

In the present work the first nearly complete model of the small ribosomal subunit of *Thermus thermophilus* at atomic resolution as well as the methods which led to the structure determination of this particle essential for protein synthesis are described. In particular, investigations were performed to obtain the optimal phasing of the structure factor data with the method of multiple isomorphic replacement using heavy atom clusters for the derivatisation of the ribosomal crystals. In order to optimize the phasing procedure and to study the approximation of the spherical average in the treatment of not unambiguously orientable clusters, both simulated and experimental data were used to compare various phasing programs.

In view of the rather uninterpretable electron density maps prior to the studies described here, the simulation in particular offered a possibility to analyse and to optimise the phasing systematically using the available reference model.

Based on these results, it was possible to reveal the structure of the small ribosomal subunit and to obtain a first glimpse of the functionality of these fascinating 'protein factories', as well as to gain new insights regarding the method of operation of antibiotics.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Das Ribosom . . . . .	3
2.1.1	Aufbau und Funktion . . . . .	3
2.1.2	Kristallisation ribosomaler Partikel . . . . .	7
2.1.3	Kryokristallographie . . . . .	9
2.2	Kristallographische Grundlagen . . . . .	10
2.2.1	Elektronendichte und Strukturfaktor . . . . .	10
2.2.2	Intensität und Phasenproblem . . . . .	12
2.3	Theorie zur Phasenbestimmung . . . . .	13
2.3.1	Isomorpher Ersatz . . . . .	13
2.3.2	Isomorpher Ersatz mit einem Derivat (SIR) . . . . .	14
2.3.3	Multipler Isomorpher Ersatz (MIR) . . . . .	15
2.3.4	Isomorpher Ersatz und Anomale Dispersion (SIRAS) . . . . .	17
2.3.5	Dichtemodifikation . . . . .	19
2.3.6	Gütefaktoren . . . . .	20
2.4	Lokalisation der Schweratome . . . . .	22
2.4.1	Differenz-Patterson-Synthese . . . . .	22
2.4.2	Differenz-Fourier-Synthese . . . . .	24
2.5	Verfeinerung der Schweratompositionen . . . . .	25

<b>3</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>27</b>
3.1	Derivatisierung . . . . .	28
3.2	Datensammlung . . . . .	31
3.2.1	Rotationsmethode . . . . .	31
3.2.2	Synchrotronmeßstationen . . . . .	32
3.2.3	Detektoren . . . . .	35
3.3	Datenauswertung . . . . .	38
3.4	Schweratomlokalisierung . . . . .	41
3.5	Phasierung und Positionsverfeinerung . . . . .	42
3.6	Modellierung und Modellverfeinerung . . . . .	45
3.7	Simulation . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Ergebnisse vorbereitender Untersuchungen . . . . .	49
4.2	Ergebnisse der Untersuchungen von simulierten Daten . . . . .	55
4.2.1	Skalierung . . . . .	55
4.2.2	Schweratomlokalisierung . . . . .	59
4.2.3	Phasierung . . . . .	64
4.3	Phasierung experimenteller Daten . . . . .	75
4.4	Das Modell der kleinen ribosomalen Untereinheit . . . . .	85
4.4.1	Modellierung und Modellverfeinerung . . . . .	85
4.4.2	Präsentation der dreidimensionalen Struktur . . . . .	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>99</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Ribosoms . . . . .	4
2.2	Sekundärstruktur . . . . .	6
2.3	T30S Kristalle in Lösung . . . . .	8
2.4	Ewaldkugel . . . . .	11
2.5	Arganddiagramm für azentrische Reflexe . . . . .	14
2.6	Harkerdiagramme für SIR bzw. MIR und SIRAS . . . . .	15
2.7	'Lack of closure' Fehler . . . . .	16
3.1	Translation des Kristalls . . . . .	32
3.2	Transfermaschine und Probenhalter zur Montage der Kristalle . . . . .	35
3.3	Beugungsaufnahme eines Ribosomenkristalls . . . . .	39
4.1	Differenz-Patterson-Karte zwischen Backsoak und Wative . . . . .	51
4.2	Fluoreszenzspektrum von Wative-Kristallen . . . . .	52
4.3	Formfaktoren von Holmium und des sphärischen Durchschnitts von W18 . . . . .	53
4.4	$R_{merge}$ für simulierte Daten . . . . .	56
4.5	$R_{ano}$ für simulierte Daten . . . . .	58
4.6	Harker-Ebenen aus Patterson-Karten für simulierte Daten . . . . .	60
4.7	Harker-Ebenen aus Patterson-Karten für simulierte Daten . . . . .	61
4.8	Fourier-Karten für simulierte Daten . . . . .	63
4.9	Korrelation des FOM und der Phasendifferenz im Vergleich . . . . .	67
4.10	Ausschnitte aus den phasenkorrigierten Dichtekarten . . . . .	69
4.11	MIRAS-Phasierung fehlerkorrigierter simulierter Daten . . . . .	71
4.12	Phasierung simulierter, fehlerfreier W18-Daten . . . . .	72

4.13	Phasierung simulierter Daten mit SHARP . . . . .	73
4.14	MIRAS-Phasierung experimenteller Daten . . . . .	78
4.15	Phasierung experimenteller Daten mit SHARP . . . . .	79
4.16	Ausschnitte aus diversen Elektronendichten von H23 . . . . .	80
4.17	Ausschnitte aus den Elektronendichten mit SHARP . . . . .	82
4.18	MIRAS-W Elektronendichte um einen W18-Cluster . . . . .	83
4.19	Diverse Ausschnitte aus der Elektronendichte . . . . .	87
4.20	Struktureller Überblick der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S . . . . .	89
4.21	Strukturdetails des Dekodierungszentrums . . . . .	91
4.22	Strukturdetails des Kopfes und des Fußes . . . . .	94
4.23	Strukturdetails der Plattform und der Schulter . . . . .	95

# Tabellenverzeichnis

2.1	Symmetrien und Harker-Ebenen der Raumgruppe $P4_12_12$ . . . . .	23
3.1	Schweratomverbindungen zur Derivatisierung von T30S Kristallen. . . . .	29
3.2	Rahmendaten der verwendeten Synchrotronmeßplätze . . . . .	37
4.1	In dieser Arbeit verwendete Cluster-Derivatdatensätze . . . . .	50
4.2	Ergebnisse der Phasierung mit simulierten Daten . . . . .	65
4.3	Korrelation des FOM mit der Phasendifferenz . . . . .	66
4.4	Ergebnisse der Phasierung mit experimentellen Daten . . . . .	76

# Abkürzungsverzeichnis

30S	Kleine prokaryotische ribosomale Untereinheit
50S	Große prokaryotische ribosomale Untereinheit
BS	'Backsoak'-Kristall
$d_h$	Bragg-Auflösung
DM	Dichtemodifikation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$\varepsilon$	'Lack of closure'-Fehler
$f_j(d, \lambda)$	Atomformfaktor
$f_j''(d, \lambda)$	imaginärer Teil des Atomformfaktors
$F_h$	Strukturfaktor
$F_P$	Strukturfaktor des nativen Kristalls
$F_{PH}$	Strukturfaktor des Derivates
$F_H$	Strukturfaktor der Schweratomverteilung
FOM	'Figure of merit'
$Ir_4$	Tetra-Iridium-Cluster
$I_h$	Streuintensität
IF	Initiationsfaktor
h,k,l	Miller Indizes
$\lambda$	Wellenlänge
MIR	Multipler isomorpher Ersatz
MIRAS	Multipler isomorpher Ersatz mit anomalem Signal
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
MPG	Max-Planck-Gesellschaft
mRNA	Messenger-RNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SIR	Isomorpher Ersatz mit einem Derivat
T30S	Kleine ribosomale Untereinheit von <i>T. thermophilus</i>
TaBr	Tantalbromid-Cluster $Ta_6Br_{14}$
tRNA	Transfer-RNA
W18	Wolframcluster $(NH_4)_6[P_2W_{18}O_{62}] \cdot 14H_2O$
Wative	mit W18 derivatisierter Kristall

# Kapitel 1

## Einleitung

Der genetische Code, welcher in Form der Nukleotidsequenz auf der DNA gespeichert ist, bestimmt die Größe, Gestalt und Funktion jedes lebenden Organismus. Indem diese Informationen mit Hilfe der Messenger-RNA abgelesen, transportiert und in Aminosäuresequenzen der Proteine übersetzt werden, ist die Funktionalität der Zelle gewährleistet. Die Orte, an denen diese Übersetzung (Translation) stattfindet, sind die Ribosomen: sie bilden die Produktionsstätten der Proteine.

Aufgrund der fundamentalen Bedeutung des Ribosoms steht dieser makromolekulare Komplex seit nahezu einem halben Jahrhundert im Mittelpunkt diverser physikalischer, chemischer und biochemischer Forschungsprojekte.

Die von Frau Prof. Dr. Ada Yonath geleitete Arbeitsgruppe 'Ribosomenstruktur' der Max-Planck-Gesellschaft in Hamburg hat sich zum Ziel gesetzt, die dreidimensionale Struktur von Ribosomen bzw. deren Untereinheiten und speziell die des Bakteriums *Thermus thermophilus* auf atomarer Ebene zu bestimmen und die komplizierte Funktionsweise dieses Makromoleküls zu erforschen.

Nachdem über einen langen Zeitraum auflösungsbegrenzte kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen im Vordergrund der Bemühungen bei der Strukturaufklärung standen, wurde schnell klar, daß nur röntgenkristallographische Methoden zu einem detaillierten Modell auf molekularer und atomarer Ebene führen würden.

Aufgrund der bemerkenswerten Charakteristika intensiver Synchrotronstrahlung und der raschen technologischen Weiterentwicklung dieser Quellen waren röntgendiffraktometrische Untersuchungen trotz des geringen Streuvermögens von Ribosomenkristallen und der drastischen Strahlenschädigung erfolgsversprechend.

Obwohl in den achtziger Jahren ribosomale Partikel erfolgreich kristallisiert werden konnten, gelang es lange Zeit nicht, Kristalle herzustellen, welche hochauflösende Beugungsreflexe ergaben. Es war somit nicht möglich, einen detaillierten Einblick in die Struktur und dementsprechend in die äußerst wichtige Funktionsweise dieses Makromoleküls zu erhalten. Erst der Ansatz der Max-Planck Arbeitsgruppe, Kristalle der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* (T30S) mit Wolframclustern zu derivatisieren, führte zu Diffraktionsbildern mit einer maximalen Bragg-Auflösung von bis zu drei Angström.

Somit ergab sich allerdings ein neues Problem: wie sollte dieser stabilisierend wirkende Cluster, welcher nun in allen zu untersuchenden Kristallen auftauchte, speziell bei der Phasierung gehandhabt werden? Erste Versuche an experimentellen Daten scheiterten an der Nicht-Interpretierbarkeit der resultierenden Elektronendichteverteilungen und somit am Fehlen einer geeigneten Phasierungsprozedur und eines Näherungsverfahrens.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur optimalen Phasierung der Strukturfaktordaten mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes unter Verwendung von Schweratomclustern zur Derivatisierung der Ribosomenkristalle durchgeführt. Insbesondere sollten mit Hilfe einer Simulation von Meßdaten sowohl die spezifischen Probleme in der Ribosomenkristallographie herausgearbeitet werden, als auch ein Vergleich und eine Optimierung von Phasierungs- und Verfeinerungsprozeduren in der Näherung des sphärischen Durchschnitts bei der Behandlung von nicht eindeutig orientierbaren Clustern erfolgen.

Außerdem wird hier der gesamte kristallographische Arbeitsprozeß, welcher letztendlich zur Strukturaufklärung der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* führte, von der Datenmessung über die Phasierung bis hin zur Interpretation der Elektronendichte dargestellt und diskutiert.

Letztendlich ermöglichten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die Modellierung und die sukzessiven Verfeinerung des ersten nahezu vollständige Strukturmodells von T30S in atomarer Auflösung.

In Kapitel 2 sollen einführend einige grundlegende Begriffe und Theorien erläutert werden. Es wird kurz der Aufbau und die Funktion des Ribosoms sowie die Herstellung von Ribosomenkristallen beschrieben. Desweiteren soll auf die Grundlagen der Proteinkristallographie und die Theorie der Phasenbestimmung, wie auch auf die Methoden der Schweratomenlokalisierung eingegangen werden.

Kapitel 3 beinhaltet die experimentellen Methoden, welche den Prozeß der Strukturaufklärung bestimmten. Dazu gehören die Derivatisierung, die Datenmessung, die Vorgehensweise bei der Datenauswertung, Schweratomlokalisierung, Phasierung und Modellierung sowie einleitende Worte zur verwendeten Simulation.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit den Ergebnissen und der Diskussion der durchgeführten Untersuchungen sowohl bezüglich experimenteller als auch simulierter Daten. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Optimierung der Phasierungsprozedur und letztendlich auf der dadurch erst ermöglichten Modellierung und Verfeinerung der hier präsentierten Struktur der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S.

Im letzten Kapitel erfolgt schließlich die Zusammenfassung der Ergebnisse im Licht zukünftiger Projekte.

# Kapitel 2

## Grundlagen

Zur Einführung wird in diesem Kapitel der grobe Aufbau und die Funktion bakterieller Ribosomen sowie die Herstellung und Handhabung ribosomaler Kristalle dargestellt. Anschließend soll kurz auf die Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse und speziell auf die Methode des isomorphen Ersatzes zur Lösung des sogenannten Phasenproblems eingegangen werden. Im letzten Teil dieses Kapitels folgt die Beschreibung diverser Techniken zur Lokalisation von Schweratompositionen und die Darstellung theoretischer Modelle zur deren Verfeinerung.

### 2.1 Das Ribosom

Ribosomen sind universelle, supramolekulare Komplexe, welche in jeder lebenden Zelle die Biosynthese von Proteinen übernehmen und somit eine Schlüsselaufgabe bei der Funktionalität aller Organismen erfüllen.

#### 2.1.1 Aufbau und Funktion

Das Ribosom, bestehend aus Proteinen und ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA), liefert die notwendigen Bindungstellen für alle an der Proteinsynthese beteiligten Moleküle. Hier wird die genetische Information von der Messenger-RNA (mRNA) mit Hilfe von Co-Faktoren in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt (Translation).

Man differenziert zwischen Ribosomen eukaryotischer Zellen und prokaryotischer Zellen (z.B. Bakterien). Eukaryonten sind Zellen mit einer Kernhülle, wohingegen Prokaryonten keine solche Kernmembran besitzen. Im Folgenden werde ich mich auf Ribosomen der zweiten Zellgruppe beschränken.

Prokaryotische Ribosomen sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut: Die große 50S Untereinheit besteht je nach Bakterienart aus etwa 35 verschiedenen Proteinen und zwei rRNA-Strängen, wohingegen sich die kleine 30S Untereinheit aus ungefähr 20 Proteinen und einem sogenannten 16S rRNA-Strang zusammensetzt [Wittmann, 1982].

S (Svedberg-Einheit) bezeichnet die Sedimentationskonstante eines Partikels, die abhängig von der Größe, dem spezifischen Gewicht und der Form ist.

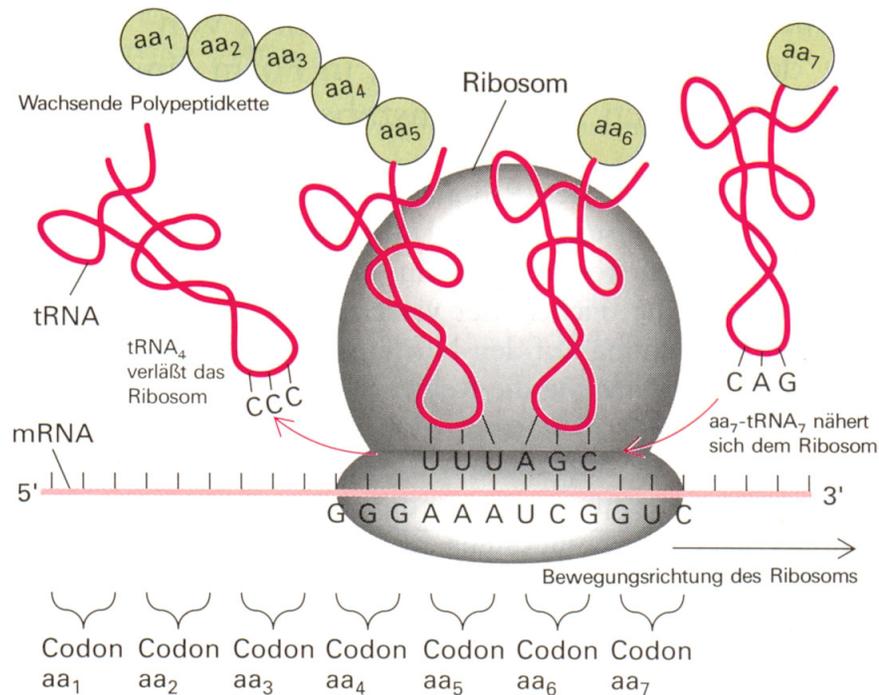


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Ribosoms (aus [Darnell, 1996])

Nukleotide sind die Bestandteile der Ribonukleinsäure. Sie bestehen aus einem Zuckermolekül (Ribose), einer Phosphatgruppe und einer organischen Base. Die Kohlenstoffatome des Zuckerrings werden von 1' bis 5' durchnummeriert, wobei C-5' mit der Phosphatgruppe und C-1' mit der Base verknüpft ist. Somit lässt sich eine chemische Orientierung definieren und jeder RNA-Strang besitzt ein 3' (3-prime) und ein 5' Ende. In der RNA kommen insgesamt vier verschiedene Basen vor: Adenin und Guanin (Purine A und G), Uracil und Cytosin (Pyrimidine U und C).

Bei der Translation spielen insgesamt drei verschiedene RNA-Arten eine Rolle:

- Die **Messenger-RNA** (mRNA) übernimmt die genetische Information der DNA als Basensequenz, die einer bestimmten Aminosäuresequenz entspricht. Jeweils drei Basen der mRNA bilden ein Triplet, das sogenannte Codon. Die Aminosäuresequenz ist durch eine lineare Abfolge benachbarter Triplet-Codons festgelegt.
- Die **Transfer-RNA** (tRNA) entziffern den Code, indem sie freie Aminosäuren koppeln und an die Enden der wachsenden Polypeptidkette anknüpfen. Die Auswahl der korrekten Transfer-RNA mit ihrer gebundenen Aminosäure wird durch Ausbildung spezifischer, komplementärer Basenpaare zwischen der tRNA und mRNA garantiert (Codon-Anticodon). Es kommt zur sogenannter Watson-Crick Basenpaarung zwischen Adenin und Uracil (A-U) sowie Guanin und Cytosin (G-C).

- Die **ribosomale RNA** (rRNA) bildet zusammen mit einer Gruppe von Proteinen das Ribosom und ermöglicht die Proteinsynthese indem es u.a. die mRNA bindet.

Die Proteinbiosynthese verläuft über die drei Stadien *Initiation*, *Elongation* und *Termination*:

- In der Phase der *Initiation* bildet sich ein sogenannter 70S-Initiationskomplex, der aus den beiden ribosomalen Untereinheiten, der mRNA, eine mit der Aminosäure Methionin beladene tRNA (Methionyl-tRNA) und drei Initiationsfaktoren (IF1, IF2, IF3) besteht. Die Initiationsfaktoren sind eine Gruppe von Proteinen, welche für die Initiation unverzichtbar sind. Die Ausbildung des Initiationskomplexes ist hierbei stark abhängig von IF3, welcher die Assoziation der beiden Untereinheiten reguliert, bzw. der kleinen ribosomalen Untereinheit ermöglicht, die Startstelle für die Translation zu finden [Gualerzi u. Pon, 1990]. IF1 und IF2 sichern hierbei vorrangig die fehlerfreie Bindung der tRNA.

Die 16S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit erkennt die Initiationsstelle auf der Messenger-RNA durch Wechselwirkungen mit einer kurzen Nukleotidsequenz auf der mRNA, der sogenannten Shine-Delgarno-Sequenz. Diese Sequenz liegt sieben bis zehn Nukleotide vom Startcodon, der Startstelle der Proteinsynthese, entfernt und hybridisiert mit der analogen Anti-Shine-Delgarno-Sequenz am 3' Ende der 16S rRNA.

Erst nach der Lokalisation des Startcodons (i.a. AUG) wird der Komplex durch die große Untereinheit vervollständigt.

- In der *Elongation* spielen insgesamt drei Bindungsstellen für die tRNA am Ribosom eine Rolle. Der A-Bereich (A steht hierbei für Aminoacyl-tRNA) bildet die Ankunftsstelle der beladenen tRNA, am P-Bereich (P steht für Peptidyl-tRNA) entstehen die Peptidbindungen der wachsenden Aminosäurekette, während der E-Bereich (E steht für 'exit') nur vorübergehend von einer tRNA besetzt wird, nachdem der Aminosäuretransfer abgeschlossen ist.

Man kann bei der Elongation einerseits die Verlängerung des Peptids und andererseits die Translokation der tRNA, bzw. mRNA unterscheiden. Die erste tRNA (Methionyl-tRNA) wird direkt am P-Bereich gebunden. Nun bindet die nächste mit einer Aminosäure beladene tRNA am A-Bereich, bevor zwischen dem Methionin und der betreffenden Aminosäure eine Peptidbindung ausgebildet wird. In der nächsten Phase wandert – katalysiert durch einen Elongationsfaktor G – die so entstandene Peptidyl-tRNA zusammen mit der mRNA vom A- zum P-Bereich und die inaktivierte tRNA vom P- zum E-Bereich, wo sie freigesetzt wird (Translokation). Indem die folgende Aminoacyl-tRNA an den A-Bereich bindet, kann sich dieser Prozeß immer weiter fortsetzen. Die wachsende Polypeptidkette ist stets mit derjenigen tRNA verknüpft, mit der die letzte Aminosäure hinzugefügt wurde.

Während die große Untereinheit die Peptidbindungen katalysiert und den Weg für die entstehende Aminosäurekette bildet, initiiert die kleine Untereinheit die Translation und sorgt für die zuverlässige Codon-Anticodon Interaktion und das Dekodieren. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise eines Ribosoms ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

- Die *Termination* der Synthese wird eingeleitet, wenn das auf der mRNA wandernde Ribosom mit Hilfe von drei Terminationsfaktoren ein Stoppcodon (UAG, UAA, UGA) erreicht und identifiziert. Die Peptidyl-tRNA wird vom Ribosom hydrolytisch abgelöst, wonach die komplette Polypeptidkette sowie die letzte tRNA freigesetzt wird und die beiden ribosomalen Untereinheiten dissoziieren.

Die Faltung der Aminosäurekette zur Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helizes und  $\beta$ -Faltblattstrukturen) oder Tertiärstruktur erfolgt entweder schon während der Translation am Ribosom oder nach Freisetzung des Polypeptids zum Teil mit Co-Faktoren (Chaperone).

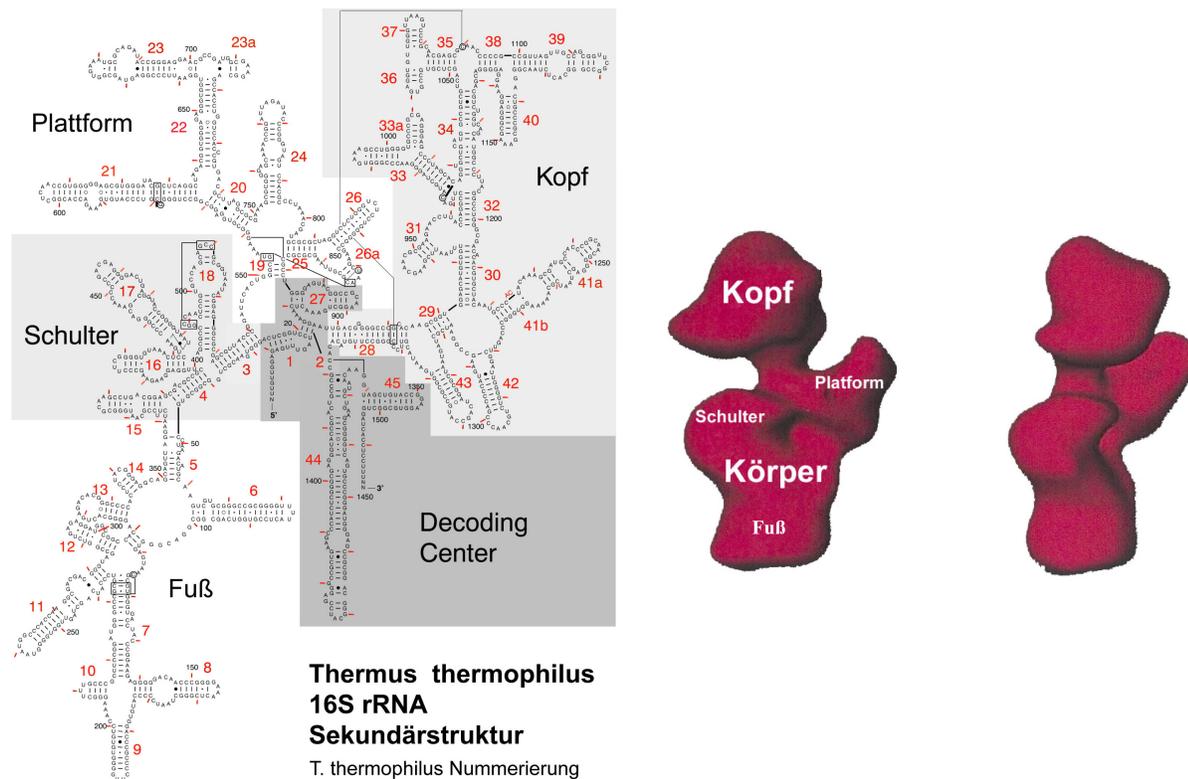


Abbildung 2.2: Sekundärstruktur und elektronenmikroskopische Darstellung der kleinen ribosomalen Untereinheit

Die in dieser Arbeit betrachtete ribosomale 30S Untereinheit der Bakterienart *Thermus thermophilus* ist aus 19 Proteinen, einer kleinen Polypeptidkette und einem aus 1518 Nukleotiden bestehendem rRNA-Strang aufgebaut, dessen Sekundärstruktur in Abbildung 2.2 gemäß [Gutell *et al.*, 1999] dargestellt ist. Bei der Bezeichnung der Nukleotide kann man zwischen *Thermus thermophilus* und *Escherichia coli* Nummerierung unterscheiden, wobei die letztere die weitaus gebräuchlichere ist, da ein Großteil der biochemischen Untersuchungen an dem Bakterium *E. coli* vorgenommen wurden.

Die Helizes, welche sowohl aus Watson-Crick Basenpaaren als auch aus Abschnitten von ungepaarten Basen (bulges) und Schleifen (loops) bestehen, werden von H1 bis H45 durchnummeriert; dieses entspricht der Nomenklatur von [Müller u. Brimacombe, 1997].

Die Proteine bezeichnet man bei T30S als S2 bis S20, bzw. THX, die oben erwähnte Polypeptidkette, bestehend aus nur 26 Aminosäuren [Tsiboli *et al.*, 1994, Choli *et al.*, 1993, Murzina *et al.*, 1988]. THX existiert nur bei *Thermus thermophilus*, während S1 und S21 bei dieser Bakterienart fehlen.

Wie mit Hilfe von diversen elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt wurde (z.B. [Frank *et al.*, 1991, Lata *et al.*, 1996]), kann man die 30S Untereinheit grob in Kopf und Körper mit der Plattform, Schulter und dem Fuß einteilen. Der rechte Teil in Abbildung 2.2 stellt die begrenzten Strukturdetails, welche aus den kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ribosomen identifizierbar sind, dar und macht die Notwendigkeit detaillierterer Modelle für das Verständnis der Funktionsweise des Ribosoms deutlich. Der zentrale Bereich der Untereinheit, in dem sich die für die Dekodierung wichtigen Bereiche befinden, wird hier als 'decoding center' bezeichnet.

### 2.1.2 Kristallisation ribosomaler Partikel

Man benötigt zur Strukturanalyse der Ribosomen eine große Anzahl von gut geordneten, dreidimensionalen Kristallen, welche in Art und Qualität reproduzierbar sein müssen. Die Voraussetzung hierfür sind hohe Stabilität der Ribosomen und Homogenität der Konformationen im Kristall. Lediglich ribosomale Partikel halophiler (*Haloarcula marismortui*) und thermophiler Bakterien (*Thermus thermophilus*) – hierbei handelt es sich um Spezies, die in extremen Bedingungen leben – konnten diesen Anforderungen gerecht werden und ergaben gut diffraktierende Kristalle. Während neben den beiden Untereinheiten von *Thermus thermophilus* T30S/T50S auch das gesamte Ribosom T70S und die große Untereinheit von *Haloarcula marismortui* H50S erfolgsversprechend kristallisiert werden konnten, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Untersuchung der kleinen Untereinheit T30S.

Aufgrund ihrer, im Vergleich zu anderen Makromolekülen, enormen Größe – mehr als 70.000 Atome und einem Molekulargewicht von ungefähr  $0,8 \cdot 10^6$  Dalton – ist es schwierig, kristallographische Untersuchungen an der ribosomalen 30S Untereinheit durchzuführen. Es bedarf spezieller Verfahren der Kristallhandhabung und der Röntgenstrukturanalyse, ergänzt durch biochemische, elektronenmikroskopische und NMR-Untersuchungen (Magnetische Kernresonanz), um interpretierbare Ergebnisse zu erlangen.

Die Bakterien für die kristallographischen Untersuchungen werden hauptsächlich am Max-Planck Institut (MPI) für molekulare Genetik in Berlin gezüchtet. Nach der Fermentation, d.h. Anzüchtung der Zellkulturen, erfolgt die Isolation der Ribosomen durch die sogenannte French-Press und anschließender Zentrifugation. Als nächstes werden die beiden Untereinheiten mittels Senkung der  $Mg^{2+}$  Konzentration und Ultrazentrifugation separiert und dann getrennt aufbereitet. Die so erhaltenen ribosomalen Partikel können bei  $-80^{\circ}C$  ohne Schaden zwischengelagert oder direkt kristallisiert werden.

Die Kristallisation erfolgt in Berlin (MPI für molekulare Genetik), Hamburg (MPG Arbeitsgruppen für Ribosomenstruktur) und Rehovot (Weizmann Institut) mit Hilfe der 'hanging drop' Methode [Davies und Segal, 1972]:

Nach dem Prinzip der Dampfdiffusion wird die Alkohol- und Salzkonzentration eines Kristallisationstropfens (Volumen etwa  $10 \mu\text{l}$ ), der sich an einem Deckglas oberhalb eines Reservoirs (1ml) befindet, langsam erhöht. In dem luftdicht abgeschlossenen System wird der Konzentrationsgradient zwischen dem hochkonzentrierten Reservoir und dem hängenden Tropfen ausgeglichen, welches nach einigen Tagen zur Präzipitatsbildung führt. Zum Teil wird mit Hilfe von Impfkristallen als Kristallisationskeime die Kristallisation der Ribosomen gefördert (nicht bei T30S). Nach Abschluß des Wachstums werden die Ribosomenkristalle geerntet und in eine Stabilisierungslösung überführt, in der sie aufgrund erhöhter Alkohol- und Salzkonzentration über Wochen erhalten werden können.

Die Stabilisierungslösung von T30S besteht zu 30 % aus MPD (2-Methyl-2,4-Pentandiol), 0,01 M  $MgCl_2$ , 0,01 M HEPES und 0,06 M  $NH_4Cl$ .

T30S kristallisiert zu feinen Nadeln (Abbildung 2.3) mit einer Größe von ca.  $400 \times 60 \times 60 \mu\text{m}^3$  in der Raumgruppe  $P4_12_12$ . Die mittleren Elementarzeldimensionen der Kristalle betragen  $407 \times 407 \times 173 \text{ \AA}^3$  und es kann derzeit eine maximale Bragg-Auflösung von  $3 \text{ \AA}$  erreicht werden.

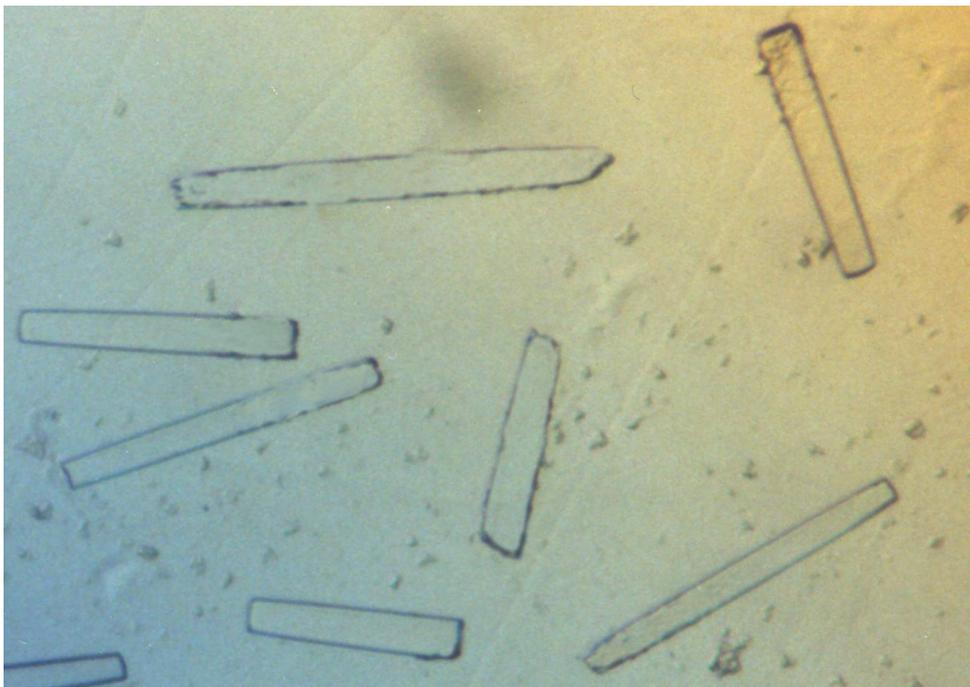


Abbildung 2.3: T30S Kristalle in Lösung

### 2.1.3 Kryokristallographie

Ribosomenkristalle sind aufgrund der schwachen intermolekularen Bindungen und dem hohen Lösungsanteil extrem strahlensensitiv und werden im Synchrotronstrahl bei Raumtemperatur innerhalb von wenigen Sekunden völlig zerstört. Andererseits bedingt ihr geringes Streuvermögen Synchrotronstrahlung, um Beugungsbilder in hoher Auflösung zu erhalten. Daher erfolgt die Messung der Daten in einem Stickstoffkühlstrom bei Kryotemperaturen von ca. 95 K [Hope *et al.*, 1989].

Hierzu werden zuerst die Kristalle in einer Lösung gefischt, d.h. in einem aus zwei sehr dünnen Glasplatten bestehenden Spatel plaziert und dann sofort in flüssiges Propan transferiert. Propan befindet sich zwischen 83 K und 231 K im flüssigen Aggregatzustand. Bei diesem sogenannten Schockgefrieren wird ein Auskristallisieren des im Kristall und in der ihn umgebenden Lösung vorhandenen Wassers durch die Zugabe des Kryoprotektors MPD in die Stabilisierungslösung verhindert. Nun kann man den Kristall sofort in einem Stickstoffkühlstrom am Meßplatz montieren oder aber das Propan in flüssigem Stickstoff (ca. 77 K) gefrieren lassen, um ihn für längere Zeit aufzubewahren.

Aufgrund der glasartig erstarrten Lösungsmatrix bei den Kryotemperaturen kann eine Zerrüttung des kristallinen Gitters mit großer Reichweite und die Beweglichkeit strahlungsbedingt gebildeter freier Radikale stark eingeschränkt werden. Die Strahlenschäden hängen praktisch nur noch von lokalen Schädigungen des Moleküls ab und die Ribosomenkristalle werden somit einer Datensammlung zugänglich.

Die speziell für die Handhabung von Ribosomenkristallen entwickelte Kühlmaschine gewährleistet einen stabilen Stickstoffkühlstrom bei konstanten Temperaturen von ca. 95 K.

## 2.2 Kristallographische Grundlagen

### 2.2.1 Elektronendichte und Strukturfaktor

In der Kristallographie geht es um die Bestimmung der Elektronendichte  $\rho(\mathbf{r})$  des zu untersuchenden Kristalls mit Hilfe der Röntgendiffraktion. Da ein idealer Kristall durch seine dreidimensionale Periodizität definiert ist, kann die Elektronendichte der Elementarzelle mit dem sogenannten Strukturfaktor  $\mathbf{F}_{\mathbf{h}}$  über eine Fourier-Transformation verknüpft werden. Hierbei bezeichnet  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  die normalisierte, orthogonalisierte Koordinate im Ortsraum und  $\mathbf{h} = (h, k, l) \in \mathbf{Z}^3$  die Koordinaten im reziproken Raum, deren Komponenten  $h, k, l$  auch als Miller-Indizes bezeichnet werden:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{h}} \mathbf{F}_{\mathbf{h}} \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}) \quad (2.1)$$

$$\mathbf{F}_{\mathbf{h}} = \int \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \quad (2.2)$$

Der Zusammenhang zwischen den Netzebenenabständen  $d_{\mathbf{h}}$  von zwei parallelen Gitterebenen, die senkrecht zur Richtung von  $\mathbf{h}$  stehen, dem Beugungswinkel  $\theta_{\mathbf{h}}$  des Reflexes  $\mathbf{h}$  und der Wellenlänge  $\lambda$  der einfallenden Strahlung wird durch das Bragg'sches Gesetz beschrieben:

$$2d_{\mathbf{h}} \sin \theta_{\mathbf{h}} = \lambda \quad (2.3)$$

$d_{\mathbf{h}}$  wird auch als Bragg-Auflösung des  $(h,k,l)$ -Reflexes bezeichnet. Das Bragg'sche Gesetz läßt sich aus der Beugungsbedingung  $2\mathbf{k} \cdot \mathbf{G} = G^2$  unter der Annahme  $d_{\mathbf{h}} = 2\pi/G$  ableiten, wobei  $k = 2\pi/\lambda$  der Wellenvektor mit der Richtung des einfallenden Strahls und  $\mathbf{G}$  ein reziproker Gittervektor ist.

Die Punkte des reziproken Gitter ergeben sich eindeutig aus den Zellparametern und der Raumgruppe des realen Kristalls und bestimmen auf recht anschauliche Weise die Richtungen des gebeugten Strahls:

Man konstruiert eine Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$  korrespondierend zur Richtung des einfallenden Strahls relativ zum reziproken Gitter, wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Hierbei ist  $P_{\mathbf{h}}$  ein reziproker Gitterpunkt und O der Ursprung des reziproken Gitters. Desweiteren bezeichnet  $\theta$  den Beugungswinkel und  $d_{\mathbf{h}}$  den Netzebenenabstand. Diese Konstruktion wird Ewald-Kugel genannt und zeigt, daß nur Beugungen zulässig sind, bei denen der gebeugte Strahl durch einen reziproken Gitterpunkt läuft, welcher auf der Ewaldkugel liegt – die Geometrie des Beugungsbildes wird vollends durch die Kristallparameter bestimmt.

Wenn man berücksichtigt, daß sich die Elektronendichte eines beliebigen Moleküls als Dichtefunktion der einzelnen Atome darstellen läßt, kann man die Strukturfaktoren mit Hilfe von Atomformfaktoren  $f_j(d, \lambda)$  ausdrücken. Die Formfaktoren beschreiben hierbei die Streustärke des Atoms  $j$  in Abhängigkeit von der Bragg-Auflösung  $d$  und der

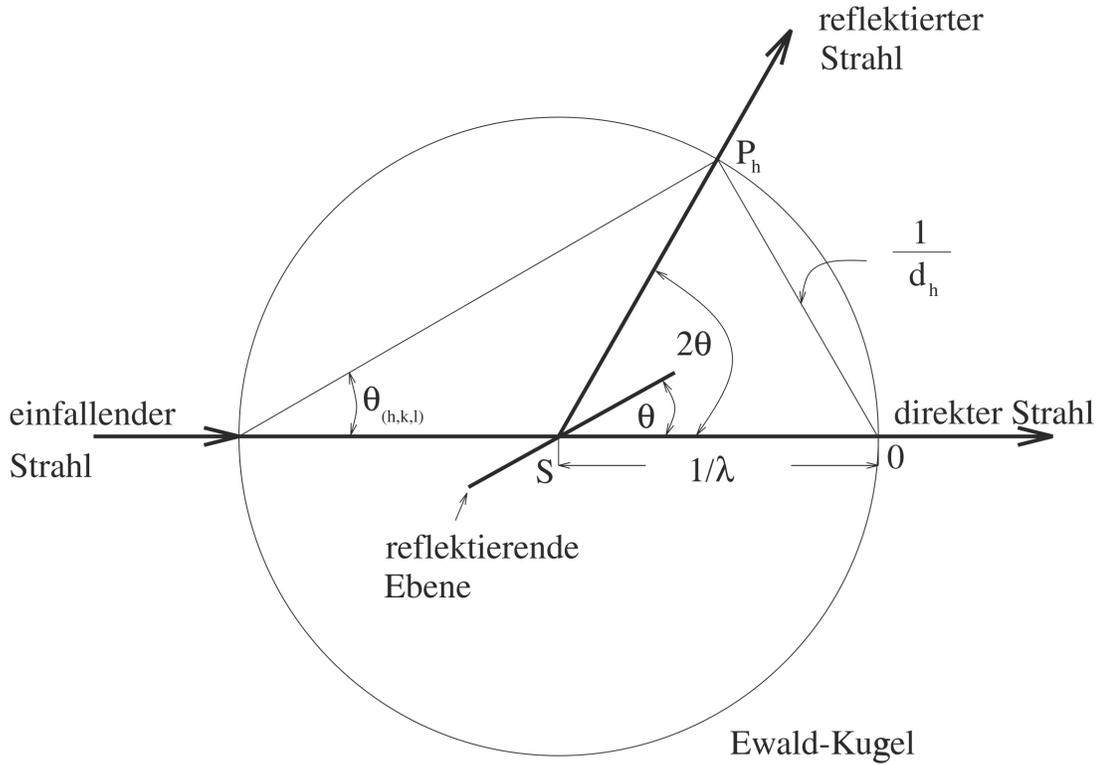


Abbildung 2.4: Ewald-Konstruktion zur Erklärung der Beugungsgeometrie

Wellenlänge  $\lambda$ ; die Summation erfolgt über alle Atome in der Elementarzelle des Kristalls, mit den Ortskoordinaten  $r_j$ :

$$\mathbf{F}_{\mathbf{h}} = \sum_j f_j(d, \lambda) \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j) \quad (2.4)$$

Aufgrund von thermischen Bewegungen der Atome besteht folgende Relation:

$$f_j(d) \propto \exp(-B/d^2) \quad (2.5)$$

B ist als Debye-Waller-Faktor oder einfacher Temperaturfaktor bekannt.

In der Nähe einer Absorptionskante des betreffenden Atoms wird der Formfaktor stark anhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Photons und lässt sich in drei Anteile zerlegen:

$$f_j(d, \lambda) = f_j(d) + f'_j(d, \lambda) + i f''_j(d, \lambda) \quad (2.6)$$

wobei

$f_j(d)$  der energieunabhängige Formfaktoranteil,  
 $f'_j(d, \lambda)$  der reale Anteil und  
 $f''_j(d, \lambda)$  der imaginäre Anteil anomaler Streuung sind.

In den Wellenlängenbereichen, die für unsere Messungen verwendet werden, liegt keine signifikante Wellenlängenabhängigkeit der Formfaktoren der Atome, aus denen die RNA und Proteine aufgebaut sind, vor. Erst durch Einbringung von Schweratomen in die Ribosomenstruktur treten die Anteile der anomalen Streuung auf.

Die komplexen Strukturfaktoren werden somit einerseits durch die Geometrie und Elektronendichte der Atome innerhalb der Elementarzelle und andererseits durch die benutzte Wellenlänge bestimmt, wohingegen die Anordnung der Beugungsreflexe  $\mathbf{h}$  im Diffraktionsmuster maßgeblich von der Raumgruppe des Kristalls abhängt.

### 2.2.2 Intensität und Phasenproblem

Zur Bestimmung des atomaren Aufbaus der Elementarzelle des Kristalls benötigt man somit einen nahezu vollständigen Satz der Strukturfaktoren  $\mathbf{F}_{\mathbf{h}}$ . Diese lassen sich allerdings aus den Reflexen nicht direkt bestimmen, sondern lediglich die Streuintensitäten  $I_{\mathbf{h}}$ , welche nach folgender Formel mit dem Betrag des Strukturfaktors verknüpft sind [Stout u. Jensen, 1989]:

$$I_{\mathbf{h}} = KpL |\mathbf{F}_{\mathbf{h}}|^2 \quad (2.7)$$

$$K \propto I_0 V N_v^2 \lambda^3$$

Hierbei sind  $p$  (Polarisationsfaktor) und  $L$  (Lorentzfaktor) rein geometrische Korrekturfaktoren, während die Intensität der einfallenden Strahlung  $I_0$  und das Kristallvolumen  $V$  durch die Strahlungsquelle und die Abmessungen des Kristalls variiert werden können.  $N_v$  bezeichnet die Anzahl der Elementarzellen pro Volumeneinheit im Kristall.

Daraus geht hervor, daß der Strukturfaktor nur vom Betrage her aus der Intensität bestimmt werden kann und die Phase  $\alpha_{\mathbf{h}}$  der komplexen bzw. vektoriellen Größe unbestimmt bleibt. Dieses allgemeine Problem der Proteinkristallographie wird als Phasenproblem bezeichnet.

## 2.3 Theorie zur Phasenbestimmung

Neben rein mathematischen Methoden (Direkte Methoden) und der Methode des molekularen Ersatzes, bei der ein bekanntes Modell in der Elementarzelle der zu untersuchenden Struktur plaziert wird, gibt es die Methode des isomorphen Ersatzes, um das Phasenproblem zu bewältigen. In dieser Arbeit steht diese Methode im Vordergrund und wird daher an dieser Stelle genauer betrachtet.

### 2.3.1 Isomorpher Ersatz

Die Grundidee dieser Methode ist das Zufügen von Schweratomen in die zu untersuchende Struktur, um deren hohe Elektronendichte bzw. Streuvermögen auszunutzen. Man nennt den Kristall ohne zugefügte Atome *nativ*, den modifizierten Kristall *Derivat*. Ist es möglich, die Schweratompositionen in der Elementarzelle des Kristalls zu bestimmen, so können durch Messung der Strukturfaktorbeträge sowohl des nativen als auch des derivatisierten Kristalls die Phasen berechnet werden.

Zuerst müssen also die Zusatzatome an distinkten Positionen des Proteins bzw. Ribosoms im Kristall binden. Dieses kann einerseits durch Kristallisation unter Anwesenheit von Schweratomen (Co-Kristallisation) oder andererseits durch Einlegen der Proteinkristalle in verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Schweratomkonzentrationen erfolgen. Die Schwierigkeit besteht darin, eine chemische Verbindung zu finden, die den Kristall nicht zerstört, die native Struktur nicht verändert (Isomorphieproblem) und gleichzeitig durch genügend Streukraft eine signifikante Änderung der Streuintensitäten herbeiführt.

Die Intensitätsänderung kann nach Crick und Magdoff [Crick und Magdoff, 1956] folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$\frac{\langle \Delta I \rangle}{\langle I \rangle} \simeq \varepsilon \sqrt{2 \frac{N_H}{N_P} \frac{f_H}{f_P}} \quad (2.8)$$

Hierbei wird eine Besetzungsdichte, d.h. der Anteil der Proteinmoleküle eines Kristalls, an denen ein Schweratom spezifisch an gleicher Stelle gebunden ist, von 100% angenommen. Die Besetzungsdichte wird auch als Okkupanz bezeichnet.  $N_H$ ,  $N_P$  bezeichnen die Anzahl der Atome in der Schweratomverbindung bzw. dem Protein und  $f_H$ ,  $f_P$  deren Formfaktoren.  $\varepsilon$  ist 1 für zentrische und  $\sqrt{2}$  für azentrische Reflexe. Ein h,k,l-Reflex wird als zentrisch bezeichnet, wenn  $A \cdot (h, k, l) = (-h, -k, -l)$ , wobei A die transponierte Rotationsmatrix einer Symmetrieoperation in der betreffenden Raumgruppe des Kristalls ist. Daraus ergibt sich, daß Strukturfaktoren zentrischer Reflexe nur Phasen haben können, die jeweils um  $180^\circ$  voneinander entfernt sind. Alle übrigen Reflexe können beliebige Phasenwinkel annehmen.

Da bei Ribosomenkristallen die Signaländerung für ein Schweratom im Bereich des mittleren Meßfehlers liegt, wird in diesem Fall auch auf die Verwendung von Schweratomclustern zurückgegriffen.

Wurden erst einmal die Daten gemessen und die Schweratompositionen bestimmt, und unterscheidet sich das Derivat nur durch die Schweratomdistribution von der nativen Struktur (perfekte Isomorphie), basiert die Bestimmung der Phasen auf folgender Vektorsumme zwischen den derivatisierten  $\mathbf{F}_{PH}$ , den nativen  $\mathbf{F}_P$  und den Schweratomstrukturfaktoren  $\mathbf{F}_H$ :

$$\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H \quad (2.9)$$

### 2.3.2 Isomorpher Ersatz mit einem Derivat (SIR)

Bei zentrischen Reflexen, für die  $\mathbf{F}_{PH}$ ,  $\mathbf{F}_P$  und  $\mathbf{F}_H$  kollinear verlaufen und unter der Annahme, daß  $|F_H| \ll |F_P|$  lassen sich die Phasen mit nur einem Derivat bestimmen. In diesem Fall vereinfacht sich die Formel 2.9 zu:

$$|F_{PH}| = |F_P| \pm |F_H| \quad (2.10)$$

Je nachdem, ob  $F_{PH} > F_P$  oder  $F_{PH} < F_P$  stimmt die Phase von  $\mathbf{F}_P$  mit der Phase von  $\mathbf{F}_H$  überein, bzw. ist um  $\pi$  versetzt.

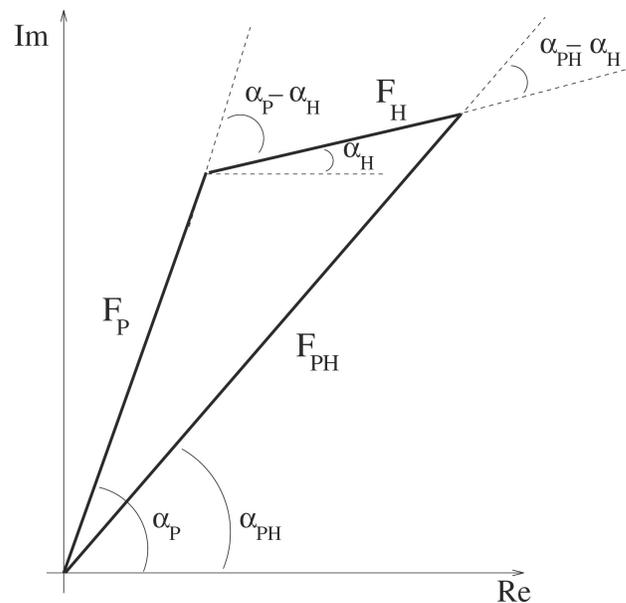


Abbildung 2.5: Im Argand-Diagramm sind die Strukturfaktoramplituden und Phasen für azentrische Reflexe (Gl. 2.11) grafisch dargestellt.

Auch wenn die Phasenbestimmung für zentrische Reflexe für eine vorläufige Phasierung durchaus hilfreich sein kann, kristallisieren biologische Makromoleküle in nicht-zentrosymmetrischen Strukturen, wodurch größtenteils azentrische Reflexe auftreten.

In diesem Fall lassen sich die Phasen mit Hilfe der Graphik 2.5 über den Cosinussatz bestimmen:

$$\alpha_P = \alpha_H + \cos^{-1} \left( \frac{F_{PH}^2 - F_P^2 - F_H^2}{2F_P F_H} \right) = \alpha_H \pm \alpha' \quad (2.11)$$

Es ergeben sich also zwei Lösungen für das Phasenproblem; es lassen sich keine eindeutigen Phasen mit Hilfe eines Derivates (Single Isomorphous Replacement/SIR) errechnen.

### 2.3.3 Multipler Isomorpher Ersatz (MIR)

Wurden Daten von zwei oder mehreren Derivaten gemessen und die jeweiligen Schweratompositionen bezüglich desselben Koordinatenursprungs bestimmt, so können die Phasen theoretisch eindeutig berechnet werden. Man kann das Prinzip dieser Methode, die als multipler isomorpher Ersatz (MIR) bezeichnet wird, anhand eines Harker-Diagramms veranschaulichen (Abbildung 2.6 aus [Harms, 1999]).

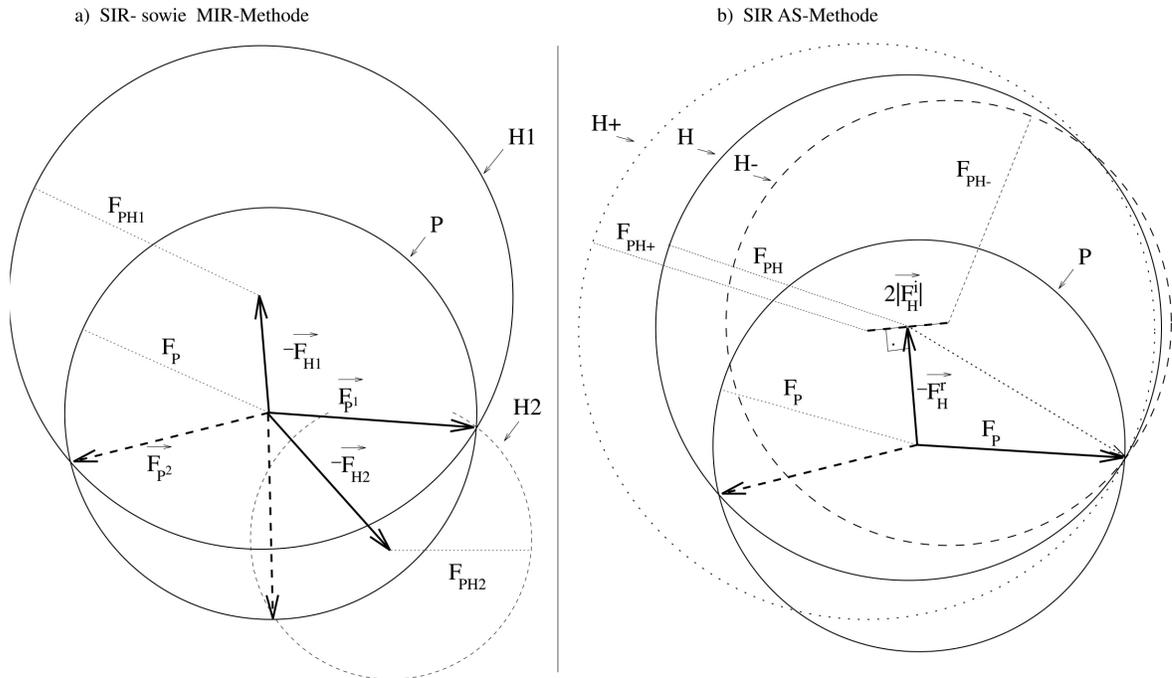


Abbildung 2.6: Darstellung des Prinzips des isomorphen Ersatzes zur Lösung der Proteinphasen im Harker Diagramm. **a:** Die Doppeldeutigkeit der SIR-Phasen lässt sich mit Hilfe eines weiteren Derivates aufklären. **b:** Lösung der Doppeldeutigkeit unter Verwendung des anomalen Signals (SIRAS).

Hierzu zeichnet man für jeden (h,k,l)-Reflex den Vektor  $-\mathbf{F}_{H1}$  und zieht einen Kreis mit dem Radius  $|\mathbf{F}_P|$  der nativen Struktur um den Ursprung des Vektors und einen Kreis mit dem Radius  $|\mathbf{F}_{PH1}|$  des ersten Derivates um das Ende des Vektorpfeils. Die beiden Schnittpunkte bestimmen dann die beiden Lösungen  $\mathbf{F}_{P1}$  und  $\mathbf{F}_{P2}$  der SIR-Methode.

Desweiteren wird am gleichen Ursprung der Schweratomstrukturfaktor  $-\mathbf{F}_{H2}$  der zweiten derivativen Struktur abgetragen und ein entsprechender Kreis mit dem Radius  $|\mathbf{F}_{PH2}|$  um dessen Ende gezeichnet. Der Schnittpunkt aller drei Kreise bestimmt nun den jeweiligen Strukturfaktor  $\mathbf{F}_P$ .

Jedoch wird im Fall realer Daten aufgrund von Fehlern ein exakter Schnitt nicht erreicht und es verbleiben somit gewisse Ungenauigkeiten. Die Fehler resultieren einerseits aus der Datenmessung (z.B. Detektorprobleme, Signal-Rausch-Verhältnis, Strahlenschädigung), Datenanalyse (z.B. Skalierungsprobleme) und Isomorphieproblemen, andererseits aus Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Schweratompositionen und somit von  $\mathbf{F}_H$ .

In diesem Fall wird die wahrscheinlichste bzw. beste Phase über eine Wahrscheinlichkeitsverteilung bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Phase  $\alpha_p$  korrekt ist, kann grob durch die Gauß-Verteilung beschrieben werden [Blow u. Crick, 1959]:

$$P(\alpha_p) = N \exp\left(-\frac{\varepsilon^2(\alpha_p)}{2E^2}\right) \quad (2.12)$$

Hierbei ist N ein Normierungsfaktor,  $\varepsilon$  der 'lack of closure' Fehler und  $E^2$  der mittlere quadratische Fehler von  $\varepsilon$ . Der 'lack of closure' Fehler  $\varepsilon(\alpha_p)$  ist die Differenz zwischen dem Betrag des gemessenen ( $\mathbf{F}_{PH}(obs)$ ) und dem berechneten Strukturfaktor des Derivats ( $\mathbf{F}_{PH}(calc) = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H$ ) (Abbildung 2.7). Dieses gilt unter der Annahme, daß sowohl  $\mathbf{F}_P$  als auch  $\mathbf{F}_H$  fehlerfrei sind, d.h die Fehler in der Bestimmung von  $|\mathbf{F}_{PH}|$  liegen.

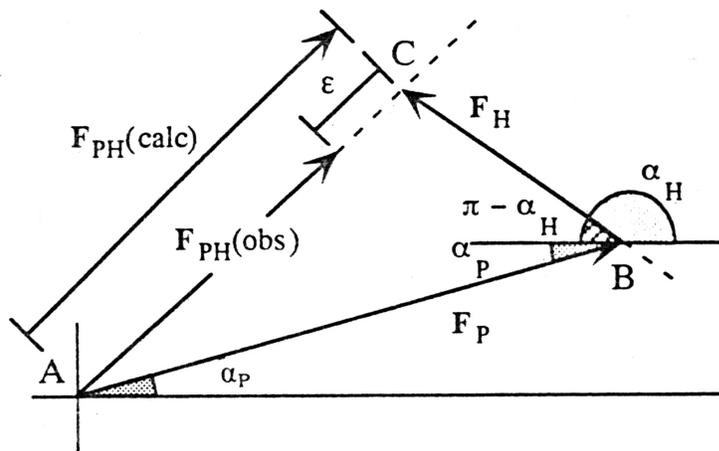


Abbildung 2.7: Grafische Darstellung des 'lack of closure' Fehlers (aus [Drenth, 1994])

Unter Verwendung der vier *Hendrickson-Lattman-Koeffizienten* A, B, C und D [Hendrickson u. Lattman, 1970] kann die Wahrscheinlichkeitsfunktion als Reihenentwicklung dargestellt werden:

$$P(\alpha) = \exp(A \cos \alpha + B \sin \alpha + C \cos 2\alpha + D \sin 2\alpha) \quad (2.13)$$

Somit läßt sich die Phaseninformation für jeden Reflex mit Hilfe der Koeffizienten A,B,C,D speichern und Verteilungsfunktionen von mehreren Derivaten im Fall von Unabhängigkeit multiplikativ kombinieren.

Aus den Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Phasen  $P(\alpha)$  kann man nun nach Blow & Crick [Blow u. Crick, 1959] die beste Phase  $\alpha_b$  für jeden Reflex  $\mathbf{h}$  über das 'least-square' Kriterium bestimmen.

Der Ausdruck

$$Q = \int_{\alpha=0}^{2\pi} (P(\alpha) |\mathbf{F}_P| \exp(i\alpha) - \mathbf{F}_b)^2 d\alpha \quad (2.14)$$

mit

$$\mathbf{F}_b = |\mathbf{F}_P| m \exp(i\alpha_b) \quad (2.15)$$

ist zu minimieren.  $|\mathbf{F}_P|$  ist der gemessene native Strukturfaktorbetrag,  $\mathbf{F}_b$  der zu bestimmende beste Strukturfaktor und  $m$  der sogenannte FOM (figure of merit).

Man erhält

$$\mathbf{F}_b = |\mathbf{F}_P| \int_{\alpha=0}^{2\pi} P(\alpha) \exp(i\alpha) d\alpha \quad (2.16)$$

Somit ergibt sich für den FOM:

$$m = \left| \int_{\alpha=0}^{2\pi} P(\alpha) \exp(i\alpha) d\alpha \right| \quad (2.17)$$

Der 'figure of merit' ist ein Maß, welches die Wahrscheinlichkeit angibt, daß die beste Phase korrekt ist. Er dient z.B. zur Gewichtung der Strukturfaktoren bei Berechnung der Elektronendichten [Blundell und Johnson, 1976].

### 2.3.4 Isomorpher Ersatz und Anomale Dispersion (SIRAS)

Eine andere Möglichkeit das Phasenproblem zu lösen besteht in der Verwendung der anomalen Dispersion in Verbindung mit dem isomorphen Ersatz (SIRAS) [Crick und Magdoff, 1956].

Befinden sich in der Protein- bzw. Ribosomenstruktur Schweratome, die als anomale Streuer fungieren, sind die beiden anomalen Terme der Formfaktoren  $f'_j(d, \lambda)$  und  $f''_j(d, \lambda)$  aus Gleichung 2.6 nicht mehr vernachlässigbar. Dieses führt dazu, daß speziell bei Wellenlängen, die sich in der Nähe der Absorptionskante befinden, das Friedel'sche Gesetz aufgehoben ist:

$$|\mathbf{F}_{-\mathbf{h}}| \neq |\mathbf{F}_{+\mathbf{h}}| \quad (2.18)$$

In diesem Fall kann man den komplexen Schweratomstrukturfaktor  $\mathbf{F}_H$  in einen realen und einen imaginären Anteil aufteilen:

$$\mathbf{F}_H = \mathbf{F}_H^r + \mathbf{F}_H^i \quad (2.19)$$

Da die imaginäre Komponente senkrecht zur Realen steht, lässt sich anschaulich die Phase mit Hilfe der Harker-Konstruktion in Abbildung 2.6 bestimmen.

Hierbei gilt:

$$|\mathbf{F}_H^i| = \left| \sum_j f_j'' \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j) \right| = \frac{f''}{f^r} |\mathbf{F}_H^r| \quad (2.20)$$

wobei  $f^r$  dem realen Anteil des Atomformfaktors entspricht.

Für die SIRAS-Methode benötigt man also sowohl die Beträge der Strukturfaktoren  $\mathbf{F}_{PH}$  für die Reflexe  $\mathbf{h}_+$  bzw.  $\mathbf{h}_-$  (Bijvoetpaar) als auch die Korrekturterme der Formfaktoren  $f'$  und  $f''$ . Die Wellenlängenabhängigkeit des imaginären Teils lässt sich aus Fluoreszenzexperimenten praktisch bestimmen, indem der Absorptionskoeffizient einer einfallenden Strahlung mit definiertem  $\lambda$  bestimmt wird; dieser ist proportional zu  $f''$ . Hierzu wird das Emissions-Spektrum der Probe mit Hilfe eines zusätzlichen Detektors aufgezeichnet und dann das Signal in einem elementspezifischen Energiebereich gegen die zu variierenden Wellenlänge der einfallenden Synchrotronstrahlung aufgetragen (siehe hierzu Figur 4.2).

Die eben vorgestellte Methode bietet eine äußerst effektive Möglichkeit, dem Phasenproblem zu begegnen, da keine zusätzlichen Derivate benötigt werden und somit u.a. Isomorphieprobleme nicht zum Tragen kommen. Allerdings ist es schwierig, die anomalen Differenzen der Bijvoetpaare überhaupt zu messen, da sie um Größenordnungen unterhalb der isomorphen Strukturfaktordifferenzen liegen ( $f'' \ll f^r$ ). Der imaginäre Anteil der Formfaktoren und somit die anomale Differenz steigt – relativ zum realen Anteil – mit höherer Auflösung.

Die Kombination des multiplen isomorphen Ersatzes mit der anomalen Streuung (MIRAS-Methode) steht im Fall der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt des Interesses.

Abschließend sei noch kurz ein Sonderfall der MIRAS-Methode erwähnt: Bei MAD-Experimenten (Multiple Anomalous Dispersion) werden mehrere Datensätze eines Kristalls bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen und ähnlich dem vorher beschriebenen Prinzip die Phasen bestimmt. Diese Vorgehensweise verlangt eine Meßvorrichtung, bei der die Wellenlänge nahezu beliebig wählbar ist und Kristalle, deren Strahlenschädigung begrenzt werden kann. Nur wenn die Messung eines nahezu vollständigen Datensatzes bei mehreren Wellenlängen durchführbar ist, kommt der Vorteil dieser Methode zum Tragen – die inherente Isomorphie. Falls dies allerdings wie im vorliegenden Fall aufgrund einer starken Strahlenschädigung nicht möglich ist, fällt ausschließlich der Nachteil, das schlechtere Signal-Rausch-Verhältnis, ins Gewicht.

### 2.3.5 Dichtemodifikation

Die Elektronendichte kann nach der Bestimmung der Phasen gemäß Gleichung 2.1 bestimmt werden. Aufgrund von oben genannten Fehlern bei der Phasenbestimmung, dem Kristalllösungsmittelbeitrag bei der Diffraktion und unvollständigen Daten, wird eine Interpretation allerdings häufig erschwert.

Generell wird daher versucht, alle vorhandenen vorläufigen Informationen, wie z.B. partielle Abschnitte des zu konstruierenden Modells oder vorläufige Phasensätze zu nutzen und bei der Berechnung der Dichteverteilung zu inkorporieren. Hier soll speziell auf die Methode der Lösungsglättung (solvent flattening) eingegangen werden, welche die Information über den Lösungsmittelanteil ausnutzt, um die Qualität bzw. den Grad der Interpretierbarkeit der Elektronendichte zu steigern.

Man versucht sich dabei die Tatsache zu Nutze zu machen, daß die Lösungsregionen eine kleinere Elektronendichte aufweisen, als die zu bestimmende Struktur selbst. Über einen Filter und Mittelungsverfahren werden die Phasen und damit auch die Elektronendichte modifiziert.

Die Elektronendichte wird in der Praxis als Netzwerk von Rasterpunkten im Abstand von ca. 1/3 der maximalen Bragg-Auflösung dargestellt. In einem Dichtefilter wird die sogenannte molekulare Maske berechnet, indem die Dichte jedes Rasterpunkts innerhalb einer Kugel des Radius  $R$  (Wang-Radius) mit einer Wichtung  $w_i$  gemittelt wird; gleichzeitig werden negative Dichten zu Null gesetzt [Wang, 1985]:

$$\rho'_j = K \sum_i^R w_i \rho_i \quad (2.21)$$

$$w_i = 1 - \frac{r_{ij}}{R}, \text{ wenn } r_{ij} < R \text{ und } \rho_i > 0 \quad (2.22)$$

$$w_i = 0, \text{ wenn } r_{ij} > R \text{ oder } \rho_i < 0 \quad (2.23)$$

$K$  ist eine Konstante und  $r_{ij}$  der Abstand der Rasterpunkte  $i$  und  $j$ .

Kennt man nun den Lösungsmittelanteil im Kristall, so kann hiermit eine Trennung zwischen Molekül und Lösung erfolgen. Die molekulare Maske wird dadurch bestimmt, daß der entsprechende prozentuale Anteil der Rasterpunkt über einem bestimmten Dichtewert berechnet wird, so daß die Maske das erwartete Volumen einnimmt. Die Dichten in der Lösungsregion werden durch eine gemittelte Lösungsdichte ersetzt. Nun erfolgt eine Berechnung neuer Strukturfaktoramplituden und -phasen  $|F_{calc}|$ ,  $\alpha_{calc}$  aus der modifizierten Dichte durch inverse Fouriertransformation (siehe Gleichung 2.2) [Cowtan, 1994]. Als nächstes findet die Berechnung der Phasenwahrscheinlichkeitsverteilung  $P_{calc}(\alpha)$  mit Hilfe der gemessenen Strukturfaktoramplituden  $|F_{obs}|$  statt.

$$P_{calc}(\alpha) = \exp\left(\frac{2|F_{obs}||F_{calc}|\cos(\alpha - \alpha_{calc})}{<|F_{obs}^2 - F_{calc}^2|>}\right) \quad (2.24)$$

Abschließend kann man die alte und neue Wahrscheinlichkeitsverteilung kombinieren und erhält:

$$P_{comb}(\phi) = P_{calc1}(\phi)P_{calc2}(\phi) \quad (2.25)$$

Die kombinierten Phasen und die observierten Amplituden  $|F_{obs}|$  bilden nun einen neuen Ausgangspunkt für weitere Dichtemodifikationszyklen bis eine Konvergenz erreicht wird.

Mit Hilfe dieser Methode und diversen Abwandlungen kann man interpretierbare Elektronendichteverteilungen erhalten.

### 2.3.6 Gütefaktoren

Es gibt diverse Kennzahlen zur Charakterisierung der Qualität von gemessenen Daten oder kalkulierten Phasen in der Kristallographie. Hier sollen nur einige kurz erwähnt werden.

In jeder Kristallstruktur gibt es Symmetrien und somit auch symmetrieäquivalente Reflexe, deren Intensitäten theoretisch übereinstimmen müssen. Dieses macht man sich zu Nutze, um die interne Qualität eines Datensatzes zu bestimmen

$$R_{sym} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{n_{sym}} |I_{\mathbf{h}}^i - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle|}{\sum_{\mathbf{h}} \langle I_{\mathbf{h}} \rangle} \quad (2.26)$$

$n_{sym}$  ist hierbei die Anzahl der symmetrieäquivalenten Intensitäten des Reflexes  $\mathbf{h}$ .  $\langle I_{\mathbf{h}} \rangle$  ist das gewichtete Mittel.

Um die Isomorphie zwischen nativen und Derivat-Kristallen zu überprüfen oder auch Hinweise auf vorhandene Schweratome zu finden, wird ein zweiter R-Faktor definiert:

$$R_{merge} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} |I_{\mathbf{h}}^1 - sI_{\mathbf{h}}^2|}{\sum_{\mathbf{h}} I_{\mathbf{h}}^1} \quad (2.27)$$

Der Faktor  $s$  dient der Skalierung der Datensätze untereinander. Anstelle von Intensitäten werden immer häufiger auch Strukturfaktorbeträge verwendet.

Für die Stärke des Signals der Schweratome bei der Bestimmung von Phasen wird häufig die Phasierungsstärke  $PS$  in Abhängigkeit von der Auflösung verwendet.

$$PS = \sqrt{\frac{\sum_n |F_H|^2}{\sum_n |\varepsilon(\alpha)|^2}} \quad \text{mit} \quad \sum_n |\varepsilon(\alpha)|^2 = \sum_n \left( |F_{PH}^{obs}| - |F_{PH}^{calc}| \right)^2,$$

Der Cullis-R-Faktor und der FOM (figure of merit) dienen der Abschätzung der Phasenqualität.

$$R_{Cullis} = \frac{\sum \left| |F_{PH} \pm F_P| - F_{H(calc)} \right|}{\sum |F_{PH} \pm F_P|} \quad (2.28)$$

für zentrische Reflexe [Cullis *et al.*, 1961]. Für Ausführungen zum FOM siehe Abschnitt 2.3.3.

## 2.4 Lokalisation der Schweratome

Aus den vorigen Abschnitten wurde klar, daß die Bestimmung der Schweratompositionen sowie der Besetzungsdichten und somit der Strukturformfaktoren  $\mathbf{F}_H$  Voraussetzung zur Lösung des Phasenproblems ist. Die grundlegenden Methoden, dies zu ermöglichen, sind die Patterson- und die Fouriermethode.

### 2.4.1 Differenz-Patterson-Synthese

Die Patterson-Funktion  $P(\mathbf{u})$  ist eine Fourier-Sumation mit dem Quadrat der Schweratomstrukturformfaktorbeträge als Koeffizienten ohne Phaseninformation:

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F_H(\mathbf{h})^2 \cos(2\pi(\mathbf{h} \cdot \mathbf{u})) \quad (2.29)$$

Sie hat folgende Eigenschaften:

- Die Pattersonfunktion hat Maxima an den Punkten  $\mathbf{u}$ , die Vektoren zwischen zwei Schweratompositionen entsprechen.
- Für jedes Atompaar in der Einheitszelle gibt es ein Maximum.
- Die Pattersonfunktion ist zentrosymmetrisch.

Unter der Annahme  $|F_H| \ll |F_P|$  gibt es einen einfachen Zusammenhang zwischen der isomorphen Differenz  $\Delta |F|_{iso} = |F_{PH}| - |F_P|$  und dem Strukturformfaktorbetrag der Schweratomordnung  $|F_H|$ , der sich rein geometrisch aus Abbildung 2.5 ergibt.

$$\Delta |F|_{iso} = |F_H| \cos(\alpha_{PH} - \alpha_H) \quad (2.30)$$

Mit Hilfe der trigonometrischen Formel 2.31 und der Tatsache, daß keine Korrelation zwischen  $\alpha_{PH}$  und  $\alpha_H$  vorliegt und somit der Cosinus-Term nur zum Rauschen beiträgt, erhält man eine alternative Darstellung der Patterson-Funktion (Formel 2.32).

$$\cos^2(\alpha_{PH} - \alpha_H) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos 2(\alpha_{PH} - \alpha_H) \quad (2.31)$$

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} (\Delta |F|_{iso})^2 \cos(2\pi(\mathbf{h} \cdot \mathbf{u})) \quad (2.32)$$

Diese Patterson-Funktion hat somit ebenso die oben aufgelisteten Eigenschaften, wobei nun allerdings die Fourierkoeffizienten direkt aus den Messungen zu bestimmen sind [Blow u. Rossmann, 1961].

Durch die Betrachtung sogenannter Harker-Ebenen in der Patterson-Karte können mit Hilfe der Raumgruppensymmetrien des Kristalls aus Tabelle 2.1 die Schweratompositionen im Idealfall leicht bestimmt werden. Harker-Ebenen sind diejenigen Ebenen, in denen die Differenzvektoren symmetrieäquivalenter Atome liegen. Die Höhe der Maxima ist von der Elektronendichte der Schweratome sowie der Besetzungsdichte abhängig und sollte sich deutlich von dem Untergrundrauschen abheben. Auch aus diesem Grund ist die Verwendung von Schweratomclustern in der Kristallographie von Ribosomen, wie später erläutert wird, vorteilhaft.

Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit bei Vorhandensein von anomalen Streuern, die Differenz der Bijvoet-Paare als Koeffizienten der Patterson-Funktion zu verwenden. Die Höhe der Peaks dieser anomalen Patterson-Funktion ist im Allgemeinen deutlich geringer, wodurch diese Methode erschwert wird. Allerdings liegt keine Beeinflussung durch Isomorphie- oder Skalierungsprobleme vor.

Neben der oben hergeleiteten Relation 2.30 gilt auch für die korrigierte anomale Differenz  $\Delta |F|_{ano} = 2(|F_{PH}(+)| - |F_{PH}(-)|)f^r/f''$

$$\Delta |F|_{ano} = |F_H^r| \sin(\alpha_{PH} - \alpha_H) \quad (2.33)$$

wobei hier  $F_H^r$  der reale Anteil des Schweratomstrukturfaktors ist. Daher können ebenso die Quadrate der korrigierten anomalen Differenzen als Koeffizienten der Pattersonfunktion verwendet werden, um die Schweratome zu lokalisieren.

Tabelle 2.1: Symmetrien und Harker-Ebenen der Raumgruppe  $P4_12_12$

SYMMETRIEN				Harker-Ebenen			
1	X	Y	Z	-	-	-	-
2	-X	-Y	Z+1/2	1-2	2X	2Y	-1/2
3	-Y+1/2	X+1/2	Z+1/4	1-3	X+Y-1/2	Y-X-1/2	-1/4
4	Y+1/2	-X+1/2	Z+3/4	1-4	X-Y-1/2	Y+X-1/2	-3/4
5	-X+1/2	Y+1/2	-Z+1/4	1-5	2X-1/2	-1/2	2Z-1/4
6	X+1/2	-Y+1/2	-Z+3/4	1-6	-1/2	2Y-1/2	2Z-3/4
7	Y	X	-Z	1-7	X-Y	Y-X	2Z
8	-Y	-X	-Z+1/2	1-8	X+Y	Y+X	2Z-1/2

## 2.4.2 Differenz-Fourier-Synthese

Ist es gelungen, Schweratompositionen ('sites') in einem oder mehreren Derivaten zu bestimmen, können die so gewonnenen vorläufigen Phaseninformationen  $\alpha(\mathbf{h})$  in einer Fourier-Reihe verwendet werden, um weitere Positionen zu finden oder andere Derivate zu untersuchen. Die ermittelten zusätzlichen Positionen beziehen sich im Idealfall alle auf denselben Ursprung, welches Voraussetzung für die Phasierung ist. Die Verwendung von Phaseninformationen eines Derivates zur Bestimmung von Schweratompositionen anderer Derivate wird als Kreuz-Differenz-Fourier-Synthese bezeichnet. Als Koeffizienten in der Fourier-Reihe werden die isomorphen Differenzen  $\Delta |F|_{iso}$ , eventuell gewichtet durch den 'figure of merit'  $m$ , verwendet.

$$\Delta\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} m \Delta |F|_{iso} \exp(i\alpha) \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}) \quad (2.34)$$

Die so ermittelte Dichte weist Maxima an den Schweratompositionen auf und bietet somit eine Möglichkeit, in Verbindung mit der Differenz-Patterson-Methode, die Phasierung iterativ voranzutreiben.

Man muß allerdings im Auge behalten, daß diverse Fehlerquellen eine Interpretation der Fourier-Karte unmöglich machen können; dazu gehören ebenso Isomorphie- und Skalierungsprobleme wie auch unzureichende Phaseninformation durch unvollständige Anzahl von Schweratompositionen.

Wenn mehrere Schweratomderivate für die Phasenbestimmung verwendet werden, müssen sich alle Positionen der Atome in allen Derivaten auf denselben Koordinatenursprung beziehen. Bei der Fourier-Synthese können, wie auch bei der Patterson-Methode, aufgrund von schwachen oder zentrisch dominierten Phasen auch Schweratompositionen gefunden werden, die zu einem anderen Ursprung gehören als die zur Phasierung verwendeten Derivate (Ambiguität des Koordinatenursprungs). Es kommen in der Raumgruppe  $P4_12_12$  folgende Transformationen in Frage:  $(X, Y, Z)$ ,  $(X+1/2, Y+1/2, Z)$ ,  $(X, Y, Z+1/2)$  und  $(X+1/2, Y+1/2, Z+1/2)$ .

Eine weitere Methode der Schweratomlokalisierung ist die sogenannte 'residual-map'. Hierbei werden zusätzlich zur Phase auch in den Koeffizienten der Fouriersumme Informationen aus schon bestimmten Schweratompositionen mit einbezogen, um so Nebenpositionen zu finden.

## 2.5 Verfeinerung der Schweratompositionen

Es ist von äußerster Wichtigkeit, daß die Positionen der Schweratome sehr genau bestimmt sind, um die Phasierung durchzuführen. Daher werden in jedes Phasierungsprogramm Verfeinerungszyklen implementiert, welche zu jedem Zeitpunkt eine Verfeinerung der Schweratompositionen und deren Besetzungsdichten vornehmen. Grundsätzlich basieren alle modernen 'refinement' Algorithmen auf der sogenannten 'maximum-likelihood' Methode, bei der das Schweratommodell so verfeinert wird, daß es die isomorphen oder anomalen Differenzen optimal beschreibt.

Die 'least-square' Methode ist ein spezieller Fall der 'maximum-likelihood' Methode unter der Annahme, daß die gemessenen Strukturfaktoramplituden  $|\mathbf{F}(obs)|$  um den realen Wert  $|\mathbf{F}(real)|$  gaußverteilt sind. Im Folgenden wird angenommen, daß die Fehler ausschließlich in der Bestimmung von  $\mathbf{F}_{PH}$  liegen; daher gilt:  $|\mathbf{F}(obs)| = |\mathbf{F}_{PH}(obs)|$ . Außerdem wird als Näherung für den realen Wert der berechnete Strukturfaktor  $\mathbf{F}_{PH}(calc)$  benutzt.  $\mathbf{F}_{PH}(calc)$  ist hierbei durch die beste native Phase fixiert.

Der Grundgedanke der 'least-square' Methode ist, daß alle  $|\mathbf{F}_{PH}(obs)|$  so nah wie möglich an den berechneten Amplituden  $|\mathbf{F}_{PH}(calc)| = |\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H|$  eines vorläufigen Modells liegen müssen.

Somit läßt sich die Wahrscheinlichkeit, daß der gemessene Strukturfaktorbetrag des Reflexes  $\mathbf{h}$  in einem infinitesimalen Intervall um  $|\mathbf{F}_{PH}(obs)|$  liegt, darstellen als

$$P(\mathbf{h}) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{(|\mathbf{F}_{PH}(obs)| - |\mathbf{F}_{PH}(calc)|)^2}{2\sigma^2} \right] d|\mathbf{F}_{PH}(obs)| \quad (2.35)$$

$\sigma^2$  ist die Varianz der Messung

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{+\infty} (|\mathbf{F}_{PH}(obs)| - \overline{|\mathbf{F}_{PH}(obs)|})^2 P(\mathbf{h}) d|\mathbf{F}_{PH}(obs)| \quad (2.36)$$

Außerdem ergibt sich bei unabhängigen Messungen als Gesamtwahrscheinlichkeit, einen Satz von  $|\mathbf{F}_{PH}(obs)|$  zu finden:

$$P = \prod_{\mathbf{h}} P(\mathbf{h}) \quad (2.37)$$

Die optimalen kalkulierten Strukturfaktoramplituden berechnen sich durch Maximierung von P und daher durch Minimierung der folgenden Summe:

$$Q = \sum_{\mathbf{h}} \frac{(|\mathbf{F}_{PH}(obs)| - |\mathbf{F}_{PH}(calc)|)^2}{2\sigma^2} \quad (2.38)$$

Mittels Differenziation von Q erhält man die gesuchten optimierten Modellparameter wie z.B. die Schweratomkoordinaten und die Besetzungsdichten.

Die 'least-square' Methode ist ein iterativer Prozeß. Nach jedem Verfeinerungsschritt ist ein anderer Parameter zu optimieren und dann die neue beste Phase zu berechnen, bis die Änderungen beliebig klein werden und die Verfeinerung konvergiert.

# Kapitel 3

## Experimentelle Methoden

Aufgrund der extremen Größe von ribosomalen Partikeln sowie der relativ kleinen Kristalle und der damit verbundenen geringen Streustärke, sind röntgendiffraktometrische Untersuchungen dieser Makromoleküle mit besonderen Schwierigkeiten verbunden.

Neben den diffizilen Kristallisationsbedingungen ergibt sich schon bei der Suche von geeigneten Derivaten das Problem, Verbindungen zu finden, die an distinkten Positionen im Ribosom binden, ohne die Kristallstruktur zu modifizieren, aber zugleich zu einem meßbaren isomorphen oder gar anomalen Signal führen. Ebenso führt die starke Strahlenschädigung verbunden mit Isomorphieproblemen gerade in der hohen Auflösung aufgrund der Notwendigkeit mehrere Kristalle zu einem Datensatz zusammenzufügen und zu skalieren (merging) zu einem signifikanten Fehler, welches den Prozeß der Schweratomlokalisierung und der Phasierung erschwert.

Desweiteren ergeben sich aus der einerseits äußerst hilfreichen Verwendung von Schweratomclustern zur Derivatisierung diverse Probleme, sowohl aufgrund der Schwierigkeit, diesen Molekülen eine Orientierung zuzuordnen als auch wegen ihrer hohen Elektronendichte. Dieses erfordert sowohl bei deren Behandlung bzw. Näherung im Prozeß der Phasierung und Positionsverfeinerung als auch im Dichtemodifikationsverfahren besondere Vorgehensweisen.

In diesem Kapitel sollen die experimentellen Methoden von der Datennahme bis hin zur Modellierung der dreidimensionalen Struktur erörtert werden. Hierzu wird auf die Derivatisierung der Kristalle, die Datensammlung, die Beschreibung der Meßstationen, die Datenreduktion und auf die Berechnung und Verwendung der Elektronendichteverteilungen näher eingegangen.

In dieser Arbeit wurden Simulationen von Strukturfaktordaten mit einem hypothetischen T30S-Modell durchgeführt. Diese Simulationen dienten einem besseren Verständnis der Probleme in der Ribosomenkristallographie und ermöglichten, optimale Methoden und Programme, speziell in den Phasen der Schweratomlokalisierung, Phasierung und Positionsverfeinerung, zu finden.

## 3.1 Derivatisierung

Zur Bestimmung der Strukturfaktorphasen nach der Methode des isomorphen Ersatzes ist es essentiell, daß Schweratome spezifisch in der Elementarzelle des Kristalls gebunden werden können.

Im vorliegenden Fall der Ribosomenkristalle war es von Vorteil, neben Einzelschweratomen (single heavy atoms) auch sogenannte Schweratomcluster zur Derivatisierung zu verwenden.

Die Cluster besitzen zumeist einen Kern aus Atomen hoher Ordnungszahl, die von verschiedenen hydrophilen Gruppen umgeben sind. Sie weisen daher im derivatisierten Kristall eine höhere Elektronendichte als Einzelatome auf und führen somit nach Formel 2.8 zu einer größeren Intensitätsänderung.

Im Prinzip müßte der Cluster bei der Phasierung als eine Gruppe von individuellen Atomen behandelt werden. Die Bestimmung der einzelnen Schweratompositionen mit Hilfe der in Kapitel 2.4 beschriebenen Verfahren gestaltet sich aufgrund der lokalen Konzentration der Atome äußerst schwierig. Ist allerdings die maximale Auflösung der gemessenen oder verwendeten Daten im Bereich des mittleren Durchmessers des Clusters, so läßt sich diese Streugruppe vereinfacht als Punktstreuer am Ort des Massenschwerpunktes betrachten. Nach [Stenkamp u. Jensen, 1984] ist dies bis zu einer Bragg-Auflösung von 0,917 mal dem mittleren Durchmesser des Clusters gültig.

Bei etwas höheren Auflösungen ist eine Approximation des sphärischen Durchschnitts (spherical average) möglich. Hierbei werden die Schweratomstrukturfaktoren des Clusters durch Einbeziehung der geometrischen Anordnung innerhalb des Schweratommoleküls angenähert, ohne dabei jedoch die Gesamtorientierung zu fixieren. Es wird also über mögliche Clusterorientierungen gemittelt. Bei Betrachtung von Braggauflösungen in der Nähe der interatomaren Distanzen (ca. 4 Å) ist die Aufteilung der Streugruppe in einzelne Atome nötig.

Die Ribosomenkristalle können grundsätzlich auf drei Arten derivatisiert werden:

1. Das Einlegen der fertig ausgebildeten ribosomalen Kristalle in Stabilisationslösung, welche mit einer bestimmten Konzentration einer Schweratomverbindung angereichert ist. Bedingt durch große Lösungsmittelkanäle innerhalb des Ribosomenkristalls können Schweratome oder Atomcluster eindiffundieren und an die ribosomalen Partikel binden. Dies wird für eine bestimmte Zeit direkt vor dem Schockgefrieren durchgeführt (**soaked**).
2. Die Cokristallisation, d.h. Kristallisation in Anwesenheit einer Schweratomverbindung (**grown**).
3. Die spezifische Anbindung der Schweratome, bzw. Cluster vor der Kristallisation. Dies geschieht durch Isolierung eines Proteins aus der ribosomalen Untereinheit, die kovalente Bindung eines Clusters an dieses auf biochemischem Wege und anschließender Rekonstitution der Untereinheit.

Der große Vorteil dieser Methode ist die spezifische und quantitative Bindung. Die Kristallisation rekonstituierter ribosomaler Partikel hat im Fall von T30S nicht zu nutzbar diffraktierenden Kristallen geführt.

Die inherente Flexibilität und hohe Konformationsvariabilität der kleinen ribosomalen Untereinheit, welche durch diverse elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen belegt wurde (z.B. [Frank *et al.*, 1995, Stark *et al.*, 1995, Weller u. Hill, 1992]), scheint der Grund für die geringe Bragg-Auflösung der nativen T30S Kristalle zu sein.

Eine systematische Suche nach potentiellen Schweratomen zur Derivatisierung ergaben eine drastisch verbesserte Streufähigkeit der Kristalle nach dem 'soaken' in einer Schweratomlösung mit 0,04mM  $(NH_4)_6[P_2W_{18}O_{62}] \cdot 14H_2O$  (kurz W18). Hierdurch verbesserte sich die maximale Auflösung von ursprünglich 10 Å auf 3 Å. Trotz ihrer Größe können die Wolframcluster scheinbar ohne Probleme in den Kristall penetrieren und für eine postkristalline Stabilisierung sorgen, indem sie wahrscheinlich die Mobilität des gesamten T30S Partikels innerhalb des Gitternetzwerks signifikant reduzieren. Der Kristall enthält interne Lösungsmittelkanäle, welche eine Propagation dieser großen, ovalen Anionen mit einem größten Durchmesser von ca. 13 Å ermöglichen.

Die extreme Verbesserung der Bragg-Auflösung geht nicht mit einer Änderung der Zellparameter oder Kristallsymmetrie einher, dennoch weisen native Kristalle zu diesen W18-Derivaten eine signifikante Nicht-Isomorphie auf, wodurch eine größere Konformationsänderung der ribosomalen Partikel – induziert durch die W18-Cluster – wahrscheinlich erscheint [Janell *et al.*, 2001].

Tabelle 3.1: Schweratomverbindungen zur Derivatisierung von T30S Kristallen.

Verbindung	mG [g/mol]	N	$\frac{\langle \Delta I \rangle}{\langle I \rangle}$ [%]	Abk.
$(NH_4)_6[P_2W_{18}O_{62}] \cdot 14H_2O$	4723.7	18	22.5	W <sub>18</sub>
Tetrairidium-Cluster <sup>a</sup>	2181.3	4	11.1	Ir <sub>4</sub>
$[Ta_6Br_{12}(H_2O)_6]^{2+} + Br_2^{2-}$	2152.5	6	12.8	TaBr

<sup>a</sup>  $Ir_4CO_8(P(CH_2CH_2CONH_2)_3)_3P(CH_2CH_2CONH_2)_2(CH_2CH_2CONH_2CH_2NH_2)O$  [Jahn, 1989]

Im Fall der vorliegenden Untersuchung wurden ausschließlich Daten von Kristallen verwendet, die für 12 Stunden in W18-Schweratomlösung eingelegt worden waren. Nach dieser Behandlung wurden die Kristalle, welche im weiteren als 'Wative' bezeichnet werden, entweder zusätzlich in Lösungen mit anderen Schweratomen zur Derivatisierung 'gesoakt' oder aber in Stabilisierungslösung ohne jegliche Schweratomkonzentration überführt (Backsoak), um unspezifisch gebundene Cluster in der Lösung auszuwaschen. Der 'Backsoak' mit den spezifisch gebundenen W18-Clustern bildet somit die quasi-native Referenz und es konnte die Methode des isomorphen Ersatzes mit den derivatisierten Kristallen durchgeführt werden.

In Tabelle 3.1 findet sich eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Schweratomcluster mit zusätzlichen Angaben des Molekulargewichts der Verbindung  $mG$ , der Anzahl der Schweratome pro Molekül  $N$  und der zentrischen Signalstärke bei voller Besetzungsdichte. Für die letztendliche Strukturbestimmung und die beste Elektronendichte wurden zusätzlich zu diesen Verbindungen auch Osmium- und Iridium-Einzelschweratomderivate verwendet.

Viele zur Derivatisierung getestete Schweratome oder Schweratomverbindungen ergaben entweder schlecht diffraktierende oder nicht-isomorphe Kristalle, da sie teilweise mit den W18-Bindungsstellen konkurrierten, oder es traten aufgrund der unmittelbaren Bindung an den W18-Cluster Probleme bei der Lokalisation und Beitragsbestimmung auf. Somit wird klar, weshalb sich die Suche und Selektion potentieller Derivate als äußerst schwierig und langwierig gestaltete. Ebenso wird aus den obigen Ausführungen deutlich, warum in allen hier untersuchten Kristallen W18 gebunden ist und daher eine genauere Betrachtung der Behandlung dieses Clusters speziell bei der Phasierung von Nöten war.

## 3.2 Datensammlung

### 3.2.1 Rotationsmethode

Das Ziel der kristallographischen Untersuchungen ist es, einen möglichst vollständigen Satz von Strukturfaktoramplituden bis in hohe Auflösungsbereiche zu messen, deren Qualität ausreicht, eine interpretierbare Elektronendichteverteilung zu errechnen (siehe Formel 2.1).

Um die Strahlenschäden gering zu halten, ist die Rotationsmethode [Arndt und Wonacott, 1977], welche in der vorliegenden Arbeit zur Datenmessung verwendet wurde, eine einfache Möglichkeit, dieses Ziel mit geringem Zeitaufwand zu erreichen

Dazu wurden die Kristalle um eine senkrecht zur Strahlrichtung liegenden Achse gedreht und jeweils Beugungsaufnahmen während einer Rotation um ca.  $0.1^\circ - 0.4^\circ$  aufgenommen. Hierbei durchläuft das reziproke Gitter, welches sich gemäß der Realgitterbewegung dreht, die Ewaldkugel (siehe Kapitel 2.2.1) und neue Reflexe treten auf. Die Rotationsbreite einzelner Aufnahmen wurde derart gewählt, daß eine möglichst große reziproke Region gemessen werden konnte, ohne dabei Überlappungen von Reflexen auf dem Detektor zu erhalten. Insgesamt müssen aufgrund der Symmetrie der T30S-Kristalle nur  $45^\circ$  des Rotationsbereiches gemessen werden, um einen vollständigen Intensitätensatz zu erhalten.

Bedingt durch Strahldivergenz, Wellenlängendispersion, Größe des Kristalls und kleinen Abweichungen von der perfekten Periodizität des Kristallgitters haben die Punkte des reziproken Gitters eine endliche Ausdehnung. Die Mosaizität im engeren Sinne beschreibt den Effekt, daß für praktisch alle Kristalle die beobachtete Breite eines Bragg-Reflexes viel höher ist, als theoretisch für einen idealen Einkristall zu erwarten wäre [Klug u. Alexander, 1974]. Sie ist im Prinzip ein Maß für die innere Qualität der Kristalle. Es wird dabei angenommen, daß sich Kristalle aus kleinen ideal-perfekten Blöcken zusammensetzen, welche mehr oder weniger stark gegeneinander verschoben oder gedreht sind. Aufgrund dieser 'Ausdehnung' der reziproken Gitterpunkte sind die Reflexe bei deren Durchlaufen der Ewaldkugel während eines relativ großen Rotationsbereiches meßbar.

Im Fall von Ribosomenkristallen liegt die typische Mosaikbreite bei  $0.3^\circ - 0.8^\circ$ , welches dazu führte, daß pro Rotationsaufnahme bei den hier durchgeführten Messungen im Allgemeinen nur partielle Reflexe gemessen werden konnten, welche dann bei der Datenreduktion aufaddiert werden mußten und die Datenanalyse erschwerten.

Ein weiteres Problem bei der Datenmessung war die relativ hohe Strahlenschädigung der Kristalle, welche mit der Zeit zu einer Abnahme von Reflexintensitäten hoher Auflösung führte und damit zu zusätzlichen Schwierigkeiten bei der Aufaddition von partiellen Reflexen und anschließender Skalierung. Außerdem konnte beobachtet werden, daß sich die Zellparameter der Einheitszelle bei Bestrahlung im Zeitablauf änderten [Harms, 1999]. Dieses ist der Effekt einer physikalischen Strahlenschädigung durch u.a. Auskristallisation des Wassers im Lösungsmittel.

Es wurde versucht, dieser Problematik einerseits durch eine eigens entwickelte Kühlanlage zwecks Minimierung der sekundären Strahlungsschäden zu begegnen, andererseits durch Translation des Kristalls in Richtung der Spindelachse (Drehachse). Hierdurch konnte ein und derselbe Ribosomenkristall unter der Voraussetzung einer hohen Fokussierungsmöglichkeit des Strahles an mehreren Positionen gemessen werden, da die Strahlenschädigung nur lokal auftritt. In Abbildung 3.1 ist links ein Spatel mit zwei Glasplatten zu sehen, wie er zur Positionierung des Kristalls am Meßplatz verwendet wurde. Rechts erkennt man einen Kristall, welcher mittels Translation bereits an zwei distinkten Stellen der Röntgenstrahlung ausgesetzt wurde und sich daher schwarz verfärbt hat.

Mit Hilfe dieser Translation war es möglich, mehr Daten von einem Kristall zu messen und somit Isomorphieprobleme durch Auffüllen nicht kompletter Strukturfaktoramplitudensätze mit Daten anderer Kristalle zu vermindern.

Desweiteren mussten die Kristalle aufgrund ihres schlechten Streuvermögens – verglichen mit herkömmlichen Untersuchungen in der Proteinkristallographie – relativ lange belichtet werden, welches die Folgen der Strahlenschädigung noch weiter verschlimmerte und zu einer Erhöhung des Strahlenhintergrundes und somit gerade in der hohen Auflösungen indirekt zu einem schlechteren Signal-Rausch Verhältnisses führte.

Insgesamt gibt es also neben Problemen, die bei der Aufzeichnung der Reflexe mit Hilfe von Detektoren auftreten, diverse Fehlerquellen bei der Datenmessung, welche in Form der Standardabweichungen der Intensitäten bzw. Strukturfaktoramplituden in die weitere Berechnung mit einfließen.

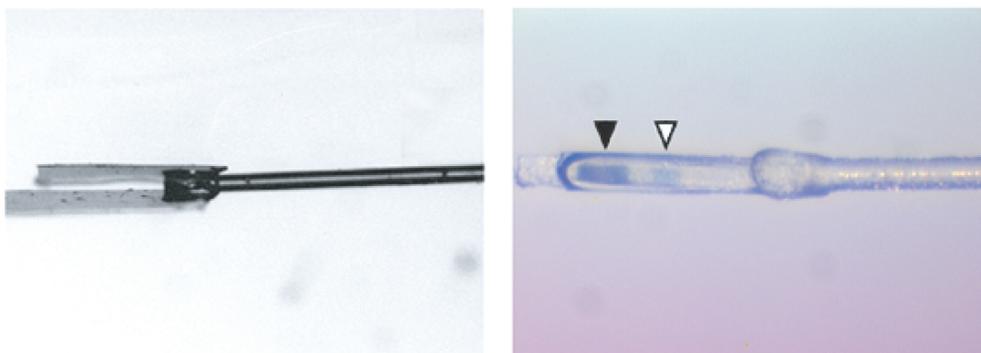


Abbildung 3.1: Glasspatel und Darstellung der Strahlenschädigung

### 3.2.2 Synchrotronmeßstationen

Durch Beschleunigung von energiereichen Elektronen oder Positronen entsteht Synchrotronstrahlung. Dieses geschieht in Ringbeschleunigern, indem diese Teilchen durch Ablenkmagnete oder spezielle magnetische Vorrichtungen – Wiggler und Undulatoren – auf gekrümmte Bahnen gezwungen werden. Gegenüber anderen Strahlungsquellen bietet die Synchrotronstrahlung besondere Vorteile, wie z.B. die extrem hohe Intensität und die äußerst geringe Divergenz, wodurch auch kleine, schwach diffraktierende Proben untersucht und scharfe Reflexe beobachtet werden können.

Außerdem kann im Allgemeinen die Wellenlängen in einem großen Bereich frei gewählt werden, welches die gezielte Verwendung des anomalen Signals oder MAD-Experimente erst möglich macht. Die übliche Wellenlänge für kristallographische Untersuchungen liegt bei ca. 1 Å, da in diesem Bereich die Strahlenabsorption in der Probe relativ gering ist. Aufgrund der geringen Streustärke und der kleinen Kristallgröße der Ribosomenkristalle ist die Verwendung von Synchrotronstrahlung Voraussetzung für hochauflösende kristallographische Untersuchungen an ribosomalen Kristallen.

Die Daten für die vorliegende Arbeit wurden an folgenden Meßplätzen gesammelt (für Details siehe auch Tabelle 3.2):

- **BW6.** Meßplatz der Max-Planck-Gesellschaft am DESY in Hamburg. Die Strahlungsquelle ist ein 56-poliger Wiggler im Positronenstrahl des DORIS-III-Speicherrings. Die resultierenden Photonen treffen zuerst auf einen 0,04x1,0 m<sup>2</sup>, platinbeschichteten Siliziumkarbidspiegel, der bei 4 mrad (Standard) Anstellwinkel Wellenlängen unterhalb 0,59 Å nicht mehr reflektiert. Ein Beitrag der im Wiggler erzeugten höherenergetischen Photonen zum Strahlungsuntergrund der Messung ist damit ausgeschlossen. Monochromatisierung des Strahles erfolgt mit einem Silizium(111)-Doppelmonochromator. Ein 3,3:1 doppelfokussierender, goldbeschichteter Toroidspiegel ist für die Fokussierung verantwortlich. Der justierte Strahl trifft dann nach Passieren eines Blendensystems auf die Probe [Kölln, 1995]. Für Messungen bei mehreren Wellenlängen (MAD) läßt sich zwischen Toroidspiegel und Blendensystem ein Wellenlängenmonitor in den Strahl fahren, um so die neugewählte Wellenlänge zu überprüfen. Zusätzlich sind dicht bei der Probenposition Szintillationsdetektoren montierbar, um die Fluoreszenzstrahlung von Schweratomen in der Probe zu messen. Als Detektor steht seit Herbst 1997 ein MAR345-ImagePlate Detektor zur Verfügung; seit März 1998 ist alternativ die Verwendung eines MAR-CCD Detektors möglich. Aufgrund der geringen Intensität dieser Synchrotronstrahlungsquelle und der sich daraus ergebenden Begrenzung der Bragg-Auflösung der Kristalldaten, wurde dieser Meßplatz vornehmlich zur Überprüfung potentieller Kristalle benutzt. Durch dieses sogenannte 'screening' konnte nach nur wenigen Diffraktionsbildern die Datenqualität und die Isomorphie grob abgeschätzt werden und somit nutzbare Kristalle zurückgefroren und an anderen Synchrotronstationen gemessen werden. Hieraus resultierte eine zeitlich optimale Nutzung der Meßperioden.
- **BW7A/B.** Die Röntgenoptik der Ende 1997 fertiggestellten MAD-Meßstation BW7A des EMBL (European Molecular Biology Laboratory) am DESY gewährleistet eine schnelle Veränderung der Wellenlänge. Ein Blendensystem mit anschließendem Kollimator ermöglicht die gewünschte Form des Röntgenstrahls und reduziert den Untergrund. Während an der Station BW7B, welche mit fixierter Wellenlänge bei zumeist 0,83 Å arbeitet, ein MAR345-Image Plate Detektor verwendet wird, steht am Meßplatz BW7A auch ein MAR-CCD zu Verfügung.

- ID2 (BL4). Ehemalige 'High-brilliance' Station des EMBL am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble/Frankreich. Die Optik war für Wellenlängen um 1,2 Å optimiert. Ein Blendensystem mit anschließendem Kollimator diente zur Begrenzung von Strahlform und Meßuntergrund. Diese Station wurde letztes Jahr geschlossen.
- ID14/2 und ID14/4 sind zwei von vier Meßstationen, die auf der Basis der *Joint Structural Biology Group* am ESRF, Grenoble, für makromolekulare Untersuchungen betrieben werden. Während ID14/4 den direkten Undulatorstrahl verwendet, werden Diamantenmonochromatoren für die übrigen Stationen eingesetzt, um den Primärstrahl aufzuspalten. ID14/2 operiert mit fixierter Wellenlänge um ca. 0,93 Å und stellt einen ADSC Quantum4 CCD Detektor zur Verfügung. ID14/4 kann auch für MAD-Experimente (Wellenlängen von 1,70 bis 0,35 Å) verwendet werden und besitzt ebenfalls einen ADSC Quantum4 CCD Detektor. An diesen 'beamlines' ist eine Fokussierung des Strahls auf bis zu 50 µm möglich.
- F1. Meßstation an der Cornell High Energy Synchrotron Source (CHESS) in Ithaca/USA. Die Synchrotronstrahlung ist hier nur das nutzbare Nebenprodukt von Hochenergieexperimenten. Seit einem Umbau des Speicherrings für höhere Elektronenenergien und der daraus resultierenden Veränderung der Röntgenstrahlung stehen Kollimatoren verschiedener Größen zur Verfügung. Im Gegensatz zu den ausschließlich zur Erzeugung von Synchrotronstrahlung gebauten Speicherringen ist die Nachfüllzeit am CHESS deutlich geringer ('run time'). Nach ca. einer Stunde werden Elektronen und Positronen, welche an Energie verloren haben, neu injiziert. Häufige Unterbrechungen mit einhergehender Änderung der Strahlage sind die Folge, da die Kühlung der Spiegel keine gleichmäßige Temperatur bei anliegender Strahlung und Injektionen bzw. Pausen ermöglicht. Von Vorteil ist allerdings der hohe Fluß des Strahles dieser Station, welcher Belichtungszeiten von einigen Sekunden pro Rotation ermöglicht. Als Detektor steht ein CCD-Detektor (ADSC-Quantum4) zur Verfügung.
- ID19/APS. Die Meßstation am APS (Advanced Photon Source) auf dem Gelände des ANL (Argonne National Laboratory/USA) benutzt als Strahlungsquelle einen 3,5-20 keV Undulator. Eine Fokussierung des Strahls bis auf 50x50 µm ist möglich.

An allen Meßplätzen wurde und wird eine in unser Gruppe entwickelte Zwei-Dewar Stickstoff-Kühlanlage verwendet [von Böhlen, 1990, Knaack, 1996]. Diese hat gegenüber anderen gängigen Kühlanlagen den großen Vorteil eines deutlich stärkeren Stickstoffgasstrahls, welcher für die Montage der Kristalle nötig ist, um deren kurzfristige Erwärmung mit größter Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Eine Verwendung von zwei Dewars sowie ein ausgeklügeltes Alarmsystem setzen zusätzlich, etwa bei Problemen mit der externen Flüssigstickstoffzufuhr, die Chance herauf, einen Kristall durch Rückfrieren in Propan zu retten, bevor die Kühlung nicht mehr gegeben ist. Desweiteren wurde eine spezielle Transfermaschine konstruiert, um den Kristall aus dem flüssigen Propan möglichst schnell in den Kühlstrom zu bewegen (Bild 3.2).

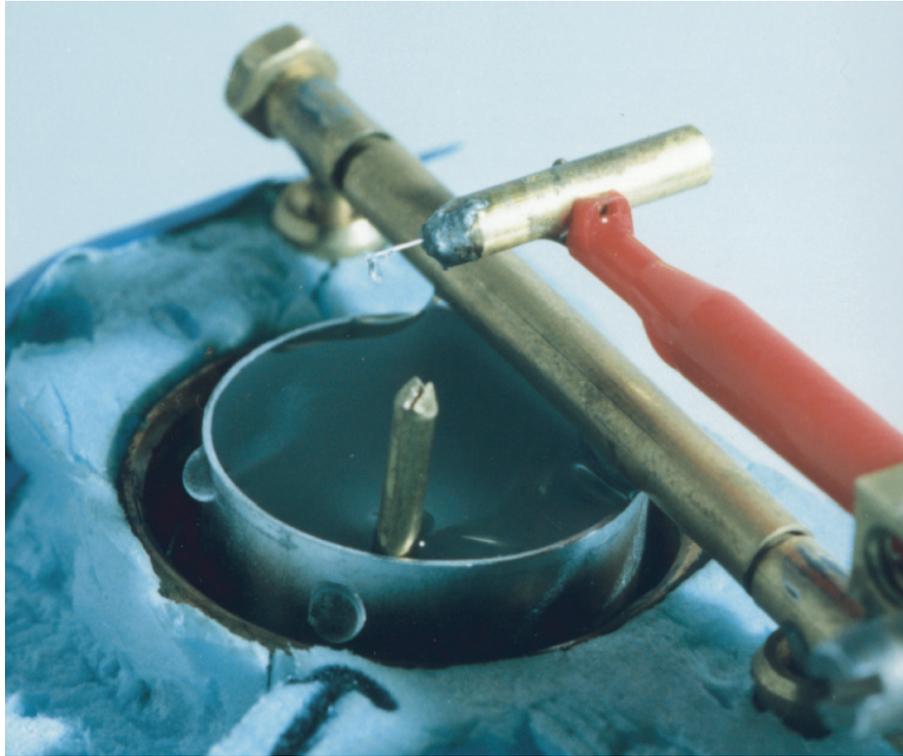


Abbildung 3.2: Transfermaschine und Probenhalter zur Montage der Kristalle

### 3.2.3 Detektoren

#### Image Plate

Die Image Plate (IP) ist ein flexibler Flächendetektor, welcher aus einer ca.  $150\ \mu\text{m}$  tiefen Schicht aus photostimulierbaren, mit  $\text{Eu}^{2+}$  dotierten, BaFBr-Kristallen besteht. Bei Bestrahlung im Röntgen- und UV-Bereich erfolgt die Deponierung der Photonenenergie über eine Anregung des  $\text{Eu}^{2+}$  zu  $\text{Eu}^{3+}$ . Die freiwerdenden Elektronen werden größtenteils in sogenannten Farbzentren eingefangen. Durch spätere Bestrahlung mit Laserlicht werden die gefangenen Elektronen angeregt und es entsteht durch den Übergang der  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen zu  $\text{Eu}^{2+}$  eine photostimulierte Lumineszenz ( $\lambda \approx 390\text{nm}$ ), welche dann mit einem herkömmlichen Photonenvervielfacher verstärkt werden kann [Miyahara *et al.*, 1986, Takahashi *et al.*, 1984]. Das gemessene Signal ist nun proportional zur Intensität der ursprünglich eingefallenen Strahlung. Die Auslesung der Image Plate erfolgt innerhalb von ca. 3-4 Minuten. Die relativ hohe Quantenausbeute von ca. 80% ist der entscheidende Vorteil gegenüber älteren Röntgenfilmdetektoren.

Es tritt parallel zur photostimulierten Lumineszenz auch eine thermostimulierte Lumineszenz der gefangenen Elektronen auf, welches zur Folge hat, daß das gespeicherte Signal schnell zerfällt. Die Signalverlustangaben liegen bei ungefähr 10% in 2 Monaten bis zu 50% in 10 Stunden [Amemiya *et al.*, 1988, Miyahara *et al.*, 1986].

Als Folge dieser Effekte sind bei intensitätsschwachen Reflexen die Linearität zwischen Intensität und Detektorsignal nicht mehr gegeben [Hall *et al.*, 1991].

## CCD-Detektoren

Bei diesen Detektoren erfolgt die Auslesung des Signals innerhalb von wenigen Sekunden und bietet daher bei höherer Quantenausbeute entscheidende Vorteile gegenüber Image Plates, wobei der dynamische Bereich der CCD-Detektoren geringer ist.

Die Funktionsweise läßt sich folgendermaßen grob beschreiben: Die Röntgenstrahlung trifft auf eine photostimulierbare Schicht, die mit einem optischen Leiter verbunden ist. Dieser transportiert das Signal direkt oder über Lichtverstärker zu einem CCD-Chip, welches dann in ein elektisches Signal umgewandelt wird. Da die Detektorfläche aufgrund begrenzten Chipgröße und endlicher Breite des Datenbus nicht beliebig groß sein kann, wird z.B. der ADSC-Quantum 4 aus 4 CCDs zusammengebaut und ermöglicht somit eine Detektorfläche von  $184 \times 184 \text{ mm}^2$  [ADSC, 1997].

Ein unangenehmer Effekt des CCD-Chips ist die Emission von thermischen Elektronen, deren Energieverteilung durch die Fermi-Dirac-Statistik bestimmt wird. Dieser sogenannte Dunkelstrom (dark current) läßt sich allerdings durch eine Kühlung des Chips auf 213 K und eine relativ einfache Korrektur des Signals minimieren [Naday *et al.*, 1994].

Für die Messung der hier verwendeten Daten wurden sowohl Image Plates als auch CCD-Detektoren verwendet (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Rahmendaten der verwendeten Synchrotronmeßplätze

Synchrotron- meßplatz	Energie [GeV]	Flux $\left[ \frac{\text{photon}}{\text{s} \times \text{mm}^2} \right]$	$\delta\lambda/\lambda$	Wellen- längen- bereich[Å]	Monochromator	Detektor	Strahl- begren- zung	Zeit eines 'runs'	Strahl- quelle
<b>DORIS</b> <b>MPG-BW6</b>	4,5	$5 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^{-4}$	0,6-2,0 variabel	2 Si(111)-Kristall Doppelmonochr.	MAR345 Image-Plate	Blenden- system	~10h	56-Pol Wiggler
<b>DORIS</b> <b>EMBL-</b> <b>BW7A/B</b>	4,5	k.A.	k.A.	0,57-1,8 variabel/ 0,83 fix	Doppelmonochr./ triangulärer Monochromator	MAR-CCD MAR345 Image-Plate	Blenden- system	~10h	56-Pol Wiggler
<b>ESRF</b> <b>EMBL-ID2</b>	6,0	$8 \cdot 10^{12}$	$2 \cdot 10^{-4}$	0,73-1,55 fest	2 Si(111)-Kristall Doppelmonochrom.	MAR345 Image-Plate	Blenden- system	~23h	Undulator
<b>ESRF</b> <b>ID14/2</b>	6,0	k.A.	k.A.	0,933 fest	Diamond (111) Ge(220)	ADSC Quantum4 CCD	Kollimator	~23h	Undulator
<b>ESRF</b> <b>ID14/4</b>	6,0	k.A.	k.A.	0,35-1,70 variabel	Doppelkristall Si(111) oder (333)	ADSC Quantum4 CCD	Kollimator	~23h	Undulator
<b>CHESS</b> <b>F1</b>	5,0-6,0	$4,7 \cdot 10^{12}$ bzw. $7,9 \cdot 10^{12}$	$10^{-3}$	0,92 fest	gebogener Si(111)-Kristall	ADSC Quantum4 CCD	Kollimator	~1h	24-Pol Wiggler
<b>APS</b> <b>ID19</b>	7,0	$3,6 \cdot 10^{15}$	k.A.	0,50-3,5 variabel	Doppelmonochrom. Si(111) und (220)	3x3-mosaic CCD detector	k.A.	~12h	Undulator

### 3.3 Datenauswertung

Nach der näheren Betrachtung der Derivatisierung und der Messung der reflektierten Intensitäten steht in diesem Abschnitt die Auswertung der Daten im Mittelpunkt.

Die Analyse und Reduktion von Diffraktionsdaten eines Einkristalls erfolgt generell in mehreren Schritten:

1. Visualisierung und vorläufige Analyse des Beugungsmusters zur groben Qualitätsbeurteilung
2. Autoindizierung eines Diffraktionsbildes zur automatischen Bestimmung der Raumgruppe, Kristallorientierung und Elementarzeldimension. Hierbei werden externe Parameter (Detektordistanz, Position des Synchrotronstrahles auf dem Detektor und Wellenlänge), sowie andere näherungsweise bekannten Informationen vorgegeben. Die Mosaizität kann typischerweise automatisch durch Betrachtung mehrerer aufeinanderfolgender Bilder abgeschätzt werden.
3. Verfeinerung der Kristallparameter
4. Integration der Intensitäten
5. Bestimmung der Skalierungsfaktoren zwischen den Messungen bzw. Diffraktionsbildern
6. Präzise Verfeinerung der Kristallparameter unter Zuhilfenahme des gesamten Datensatzes
7. Addition der partiellen Reflexe, Zusammenfügen der einzelnen Messungen und statistische Analyse

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden alle Daten mit dem HKL-Package von Z. Otwinowsky und W. Minor [Otwinowski u. Minor, 1996] ausgewertet. Die Visualisierung erfolgte hierbei mit dem Programm XDISPLAYF und die Schritte zwei bis vier übernahm das Programm DENZO. Durch die Integration, d.h. die Aufaddition der Pixelwerte, welche mit Hilfe eines gemittelten Reflexprofils erfolgt, konnten die untergrundkorrigierten Intensitäten der Reflexe eines Bildes, einschließlich einer Fehlerabschätzung, bestimmt werden.

Ein Beispiel für ein typisches Beugungsmuster von Kristallen der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S, aufgenommen mit einem Image Plate Detektor, ist auf Abbildung 3.3 zu erkennen.

Die Schritte fünf bis sieben wurden mit Hilfe des Programmes SCALEPACK durchgeführt. Da die Reflexe, bedingt durch hohe Mosaizität und begrenzte Rotation, während einer Aufnahme nur partiell gemessen werden konnten, erfolgte automatisch eine Skalierung und Aufaddition der Teilintensitäten. Somit konnte ein gesamter Intensitätsdatensatz durch Zusammenfügen der Messungen unter Berücksichtigung der Symmetrie berechnet

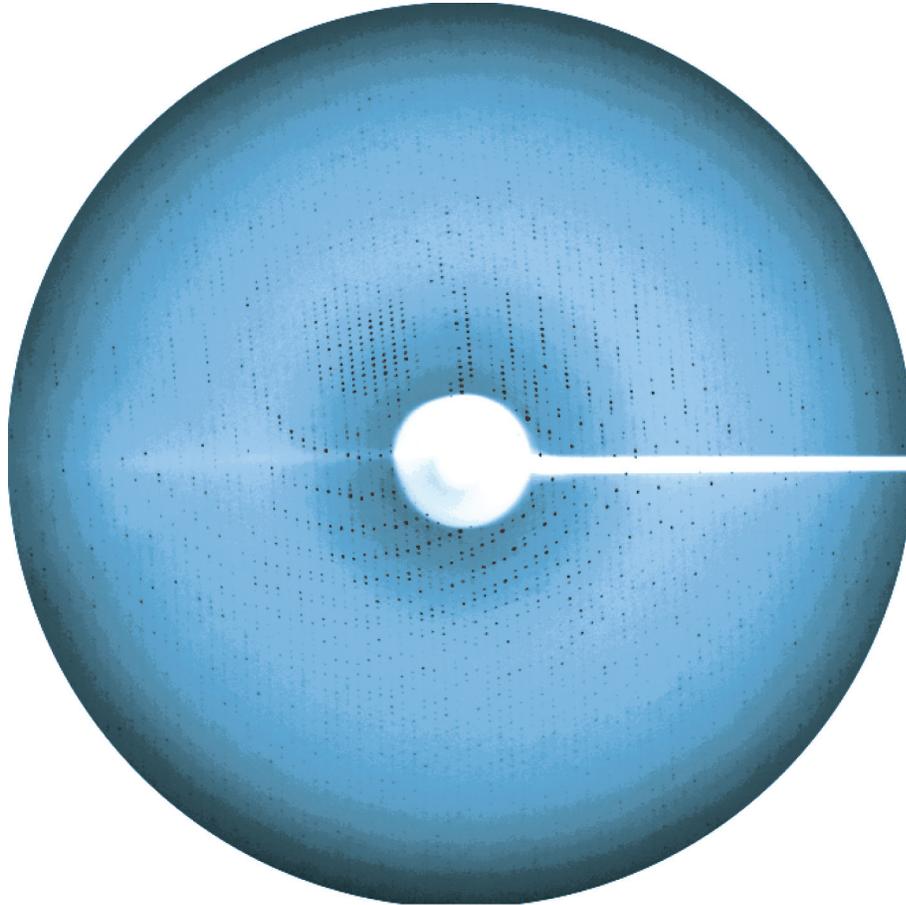


Abbildung 3.3: Beugungsaufnahme eines Ribosomenkristalls auf einem Image-Plate Detektor, visualisiert durch XDISPLAYF

werden. Eine Beurteilung der Qualität der Daten konnte nun mit Hilfe des sogenannten R-Faktors  $R_{sym}$  (siehe Formel 2.26) erfolgen: je niedriger dieser Faktor, desto besser die interne Datenqualität.

Wurde nach der Auswertung der Datensatz eines Kristalls anhand des  $R_{sym}$  als qualitativ gut beurteilt, so konnte mit Hilfe des Programmes TRUNCATE (im Rahmen des Collaborative Computational Project Number 4, CCP4 [Bailey, 1994]) die Umrechnung der Intensitäten in Strukturfaktoramplituden und die Abschätzung der negativen bzw. schwachen Reflexe anhand der Wilson-Verteilung [French u. Wilson, 1978] durchgeführt werden.

Anschließend erfolgte eine Skalierung der Strukturfaktoramplituden relativ zu denen des nativen Datensatzes oder eines anderen Referenzdatensatzes, um die isomorphen Differenzen zwischen Derivat und Referenz nutzbar zu machen. Dieses geschah in der vorliegenden Untersuchung durch das Programm FHSCAL (CCP4) [Kraut *et al.*, 1962]. Hierdurch wurden Skalierungsfaktoren und auch Temperaturfaktoren (B-Faktoren analog zur Formel 2.5), welche eine auflösungsabhängige Skalierung ermöglichen, für jedes Derivat bestimmt und dann mit Hilfe des  $R_{merge}$  (Formel 2.27) die Isomorphie bzw. das potentielle Schweratomsignal der Kristalle überprüft.

In den meisten Fällen war es aufgrund der starken Strahlenschädigung nötig, mehrere Kristalle desselben Derivates oder der nativen Struktur zu untersuchen und dann zueinander zu skalieren und die Strukturfaktorinformationen zusammenzufügen (merging). Es wurde versucht, die Vollständigkeit der Datensätze zu maximieren, ohne dabei die Datenqualität signifikant negativ zu beeinträchtigen. Das Problem lag auch hier neben Skalierungsproblemen in der nicht immer perfekten Isomorphie der Kristalle.

Bei der Datenauswertung kam es auf die stetige Überprüfung und Korrektur der semi-automatisierten Datenreduktion an, um den spezifischen Problemen jedes Kristalls gerecht zu werden und eine sinnvolle Selektion brauchbarer Datensätze zu gewährleisten. Die korrekte Wahl der angenommenen Reflexbreite zur Integration, die Abschätzung der Mosaizität, die Kontrolle der Skalierungsfaktoren und die Beeinflussung der Verfeinerung gehörten hierbei ebenso zu den Anforderungen, wie die objektive Auswahl von individuellen Kristalldaten zum 'Zusammenfügen' (merging) nicht kompletter Intensitätensätze.

## 3.4 Schweratomlokalisierung

Der nächste Schritt nach der Analyse und Auswahl der potentiell nutzbaren Datensätze war die Bestimmung der Schweratompositionen. Diese erfolgte entweder durch Betrachtung diverser Pattersonkarten, oder durch Berechnung von Differenz-Fourier- oder Residual-Maps mit Hilfe des Programms FFT (CCP4).

Zusätzlich wurde mit Hilfe der Verfeinerungsprozedur im Phasierungsprogramm SHARP getestet, inwiefern die Besetzungsdichten verfeinert wurden, um in vorläufigen Analysen gefundene Positionen auszuschließen bzw. zu verifizieren.

Ausgangspunkt für die Positionsbestimmung der Bindungsstellen der Cluster oder Einzelatome in den Derivaten bildeten zwei W18-Clusterposition, welche in diversen Patterson- und Fourierkarten auftauchten. Somit konnte ein vorläufiger Phasensatz in niedriger Auflösung bis ca. 9 Å berechnet werden, welcher eine systematische Suche nach anderen Schweratomen mit der Fourier-Methode ermöglichte. Es wurden nun mit Hilfe einer automatisierten Prozedur Fourier-Maps von 'Backsoak' Daten und diversen Derivaten auf Positionen höherere Dichte abgesucht.

Es ist zu beachten, daß der Prozeß der Atompositionsbestimmung, welcher den gesamten Ablauf der Ergebnisfindung überlagerte, von iterativer Natur war und durchaus immer wieder durch Revidierungen und Modifizierungen bestimmt wurde. So führte die Verbesserung der Phaseninformationen zur Lokalisation weiterer Schweratompositionen. Zudem wurden diverse Clusterpositionen, speziell im Backsoak-Kristall, erst in der Phase der Modellierung bei der später noch beschriebenen Betrachtung von Omit-Maps entdeckt und modifiziert, indem ausgedehnte, ovale Elektronendichtebereiche identifiziert werden konnten.

Da eine grundlegende Problematik in der Behandlung der benutzten Schweratomcluster lag, wurden diese Agglomerate von Atomen zunächst als Punktstreuer behandelt und die Position des Schwerpunktes bestimmt. Eine weitere Aufspaltung in Einzelatome war mit den hier genannten Methoden nicht durchführbar, da die Auflösung und Datenqualität begrenzt waren. Sie erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt, indem die Elektronendichteverteilung untersucht und die Cluster manuell orientiert wurden.

Die zu bewältigenden Schwierigkeiten lagen aufgrund diverser Fehlerquellen aus der Datensammlung und -auswertung, der unzureichenden, zumeist vorläufigen Phaseninformation für die Fouriersynthese und der begrenzten Vollständigkeit und Auflösung einiger Datensätze, in der Interpretierbarkeit der Patterson- oder Fourier-Karten und in der zuvor erläuterten Ambiguität des Ursprungs. Außerdem sorgte die hohe Signalstärke der W18-Cluster für Probleme bei der Detektion und Zuordnung des isomorphen bzw. anomalen Signals anderer, zusätzlicher Schweratome mit geringerer Streustärke.

### 3.5 Phasierung und Positionsverfeinerung

Abhängig von den Voraussetzungen und Bedingungen des Experimentes können diverse, schon in den Grundlagen beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Phasen angewendet werden.

Im vorliegenden Fall stellt der isomorphen Ersatz die vielversprechenste Methode dar, da direkte Methoden aufgrund der Komplexität und Größe des Ribosoms undenkbar sind, und auch der Ansatz des molekularen Ersatzes – wahrscheinlich begründet durch die inhärenten Flexibilität und Konformationsvariabilität des Partikels und in Ermangelung eines geeigneten homologen Modells – keinen Erfolg ergab [Janell *et al.*, 2001]. Desweiteren sind MAD-Experimente wegen der erläuterten hohen Strahlenschädigung der Ribosomenkristalle nicht durchführbar.

Der Vergleich diverser Programme zur Bestimmung der Phasen und zur Positionsverfeinerung der Schweratome im speziellen Fall der Ribosomenkristallographie stand u.a. im Mittelpunkt dieser Arbeit. Es soll an dieser Stelle daher kurz auf die Besonderheiten der verwendeten Programme MLPHARE (CCP4), SOLVE, CNS und SHARP eingegangen werden.

Im Kapitel Grundlagen wurde schon auf den Ansatz von Blow & Crick zur Bestimmung der besten Phase (siehe Abschnitt 2.3.3) und auf die Verfeinerung nach dem Prinzip der 'least-squares' (siehe Abschnitt 2.5) eingegangen. Hierbei wird in jedem Verfeinerungszyklus die native Phase zuerst fixiert, und dann werden in einem zweiten Schritt die Schweratommodellparameter optimiert.

Ein verbesserter Ansatz wurde u.a. von Otwinowsky mit der Implementierung des 'maximum-likelihood' Prinzips in das Programm **MLPHARE** präsentiert [Otwinowski, 1991]. Hierbei geht es im Grunde darum, die Parameter des Modells so zu variieren, daß die gemessenen Strukturfaktoramplituden durch das Modell am besten erklärt werden. Die 'likelihood' entspricht also der konditionellen Wahrscheinlichkeit, den Satz der gemessenen Strukturfaktorbeträge  $|\mathbf{F}_P|$  und  $|\mathbf{F}_{PH}|$  unter Voraussetzung der Schweratomkoordinaten, der Okkupanzen, des anomalen Anteils des Atomformfaktors und anderen Parametern (z.B. 'lack of isomorphism' Fehler) zu beobachten.

Wie schon erwähnt, ist dieses Prinzip äquivalent zum 'least-square' Prinzip unter der Annahme einer Gauß'schen Fehlerverteilung. Genau diese Verteilung kann im Allgemeinen allerdings nicht vorausgesetzt werden, vor allem, wenn nur Strukturfaktoramplituden betrachtet werden. Während 'least-square' Modelle immer als eine Vorschrift formuliert sind, gegebene Werte eines Modellparameters in kalkulierte, fehlerfreie *Werte* zu übertragen und dann mit beobachteten Größen zu vergleichen, basieren 'likelihood' Modelle auf *Wahrscheinlichkeitsverteilungen* von beobachtbaren Größen und der Betrachtung von den kalkulierten Größen als Parameter in dieser Verteilung.

Somit liegt ein fundamentaler Vorteil bei MLPAHRE gegenüber früheren Methoden in der Behandlung der nativen Phase  $\alpha$ : sie wird nicht mehr fixiert; alle möglichen Werte von  $\alpha$  werden während der Verfeinerung in Betracht gezogen und jede Phase mit der Wahrscheinlichkeit korrekt zu sein, gewichtet. Es ergeben sich bessere Konvergenzeigenschaften, gerade im Fall von gemeinsamen Schweratompositionen mehrerer Derivate.

MLPHARE benutzt neben 'normalen' zusätzlich anomale Okkupanzen. Hierdurch soll der anomale Anteil der Atomformfaktoren berücksichtigt werden, welcher selbst nicht als Parameter eingeht.

Die Software **CNS** (Crystallography & NMR Systems) beinhaltet u.a. auch ein Programm zur Phasierung und Verfeinerung der Schweratomparameter, welches ebenso wie MLPHARE auf der Basis des 'maximum-likelihood' Prinzips arbeitet [Brünger *et al.*, 1998]. Vor allem die individuellen Möglichkeiten, die Inputparameter zu variieren und somit Einfluß auf die Verfeinerungsprozedur zu nehmen, zeichnen CNS aus.

**SOLVE** ist ein Software-Paket, welches versucht, eine automatische Strukturbestimmung zu implementieren [Terwilliger u. Berendzen, 1999]. Es werden mit Patterson- und Fourier-Methoden automatisch Schweratompositionen bestimmt und dann verfeinert. Diese Methode benutzt urprungsberingte Pattersonmaps, um iterativ die Verfeinerung durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur das Programm HEAVY aus dem SOLVE Paket verwendet; es wurde also aus Vergleichsgründen von einer automatischen Schweratompositionsbestimmung abgesehen und wie bei den übrigen Programmen vorverfeinerte Positionen verwendet.

Als viertes Programm wurde **SHARP** (Statistical Heavy-Atom Refinement and Phasing) benutzt [de la Fortelle u. Bricogne, 1997]. Ebenso wie in MLPHARE und CNS wird die 'maximum-likelihood' Methode hier implementiert. Allerdings wurden einige fundamentale Modifikationen und Weiterentwicklungen vorgenommen. Anstatt wie bei MLPHARE eine eindimensionale Integration in der 'likelihood' Funktion über die Phase zu verwenden, erfolgt bei SHARP eine zweidimensionale Integration über den gesamten nativen Strukturfaktor, also inklusive Amplitude. Hierdurch wird die Annahme in MLPHARE, die native Amplitude sei fehlerfrei, aufgehoben. Die 'likelihood' Funktion wird außerdem als Detektierungswerkzeug, speziell für Residual-Maps, verwendet. Ebenso gehört vor allem die fundiertere Fehlermodellierung, wie z.B. die parallele Verfeinerung des 'lack of isomorphism' Parameters, im Gegensatz zur lediglichen Neuabschätzung am Ende eines Verfeinerungszyklus, zu den Unterschieden gegenüber MLPHARE und CNS. Zudem wurde hier der Grundansatz aufgegeben, den Referenzdatensatz als nativ, d.h. ohne zusätzliche Schweratome zu betrachten; es kann in diesem Programm ein beliebiger Referenzdatensatz gewählt werden. Zudem betrachtet SHARP die Schweratompositionen von unterschiedlichen Derivaten nicht mehr als unabhängig, sondern verfeinert gemeinsame Positionen zusammen.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese eben vorgestellten Programme anhand simulierter und experimenteller Strukturfordaten verglichen und optimiert. Als zwingende Inputparameter mussten je nach Programm die gemessenen bzw. simulierten Strukturfaktoramplituden der nativen Referenz und der Derivate, zusammen mit den Standardabweichungen, die vorverfeinerten Schweratomkoordinaten und die jeweiligen auflösungsabhängigen Atomformfaktoren sowie im Fall von anomalen Streuern die anomale Differenz und  $f''$  angegeben werden. Als native Referenz wurde zuerst bei allen Programmen der sogenannte 'Backsoak' ohne zusätzliche Schweratome verwendet.

Die Atomformfaktoren des W18-Clusters wurden durch den 'spherical average' approximiert, wobei die Formel eines rotationsgemittelten Moleküls von Debye verwendet wurde [Guo *et al.*, 1999]:

$$f(s) = \left[ \sum_{a=1}^n \sum_{b=1}^n f_a(s) f_b(s) \frac{\sin(4\pi s r_{ab})}{4\pi s r_{ab}} \right]^{1/2} \quad (3.1)$$

Hierbei ist  $s = \sin\theta/\lambda$ ,  $r_{ab} = |\mathbf{r}_a - \mathbf{r}_b|$  der interatomare Abstand zwischen Atom a und Atom b und  $f_a$ ,  $f_b$  die Formfaktoren der vorkommenden Einzelatome.

Zur Charakterisierung der Auflösungsabhängigkeit der Atomformfaktors eines W18-Clusters wurde die folgende Darstellung mit neun Koeffizienten verwendet:

$$f^{w18} = \sum_{i=1}^4 a_i \exp(-b_i \sin^2 \theta / \lambda^2) + c \quad (3.2)$$

Genauso wurde im Fall der anderen verwendeten Cluster verfahren.

Bis auf SHARP gab es bei keinem Phasierungsprogramm eine Möglichkeit, die Auflösungsabhängigkeit von  $f''$  für Schweratomcluster in der Näherung des sphärischen Durchschnitts zu berücksichtigen. Daher ging der imaginäre Anteil der Schweratomformfaktors  $f''$  jeweils als konstanter Parameter in die Programme ein und wurde als solcher verfeinert. Lediglich im Fall von SHARP wurden sowohl Clustergeometrie als auch Atomformfaktoren und  $f''$  von Wolframeinzelatomen verwendet. Hierdurch konnte das Programm die sphärischen Approximationen sowohl des realen Anteils  $f^{w18}$  als auch des imaginären Teils  $f''$  des Faktors in Abhängigkeit von der Bragg-Auflösung automatisch berechnen.

Nachdem die Phasierung abgeschlossen war, wurde ein spezielles Dichtemodifikationsverfahren verwendet, um die Elektronendichteverteilungen zu optimieren. Die Besonderheit dieser Prozedur liegt in der Behandlung der niedrigen Auflösungsterme: während die hohe Auflösung in den meisten Modifizierungsprogrammen sukzessiv von Zyklus zu Zyklus erhöht wird, bleibt die niedrige Auflösung zumeist von Anfang an konstant. In diesem Fall wurde das Programm SOLOMON [Abrahams u. Leslie, 1996] so modifiziert, daß auch die niedrige Auflösung schrittweise dem Endniveau angenähert wurde. Dieses hat den Effekt, daß der Einfluß der Wolframcluster, welcher in der niedrigen Auflösung dominiert, minimiert wird und dadurch die Interpretation der Elektronendichtekarte verbessert werden sollte. Dieses modifizierte Programm wurde dann auf alle Phasierungsergebnisse angewendet, um eine Vergleichsbasis zu schaffen.

## 3.6 Modellierung und Modellverfeinerung

Das Anfangsmodell einer dreidimensionalen Molekülstruktur, welches in die experimentell bestimmte Elektronendichteverteilung hineinmodelliert wird, enthält im Allgemeinen viele Fehler. Um eine akkurate, atomare Abbildung der Protein- bzw. Ribosomenarchitektur zu erhalten, ist neben der manuellen Modellierung eine kristallographische Verfeinerung und interaktives Remodellieren von Nöten.

Während der Konstruktion eines Modells sollte jegliche verfügbare Information bezüglich biologischer Makromoleküle, bekannter Struktur motive, Sekundärstrukturdaten und speziell im Fall der Ribosomenkristallographie bezüglich Protein-Protein, Protein-RNA, RNA-RNA Bindungsstellen (Crosslinkdaten), genutzt werden.

Nach und während der Hauptphase der manuellen Modellierung kann eine automatisierte Verfeinerung mit Hilfe der experimentellen Strukturfaktordaten erfolgen. Automatische Verfeinerungsprogramme modifizieren das vorläufige Model, um eine optimale Übereinstimmung zwischen den beobachteten und den kalkulierten Strukturfaktoramplituden zu erhalten. Aufgrund der begrenzten Auflösung und der teilweise spärlichen Qualität von typischen biomolekularen Daten, werden hierbei zusätzliche, chemische Informationen, wie z.B. Bindungslängen, -winkel und -energien, verwendet. Die Verfeinerungsprogramme nutzen beim sogenannten 'rigid body refinement' gewöhnlicherweise jeden Freiheitsgrad, um die Diskrepanz zwischen gemessener und kalkulierter Amplitude auf der Basis des 'least-square' Prinzips zu reduzieren. Hierzu werden zuvor festgelegte mehr oder minder große Molekül- oder Atomgruppen translatiert und rotiert.

Brünger führte eine Validierungsmöglichkeit der Verfeinerungsqualität ein, welche auf dem sogenannte R-Faktor und dem  $R_{free}$  basiert. Der R-Faktor ist zu vergleichen mit dem  $R_{merge}$  (siehe 2.27), wobei hier allerdings die Strukturfaktoramplituden der Daten und des Modells verwendet werden.  $R_{free}$  ist der R-Faktor eines kleinen Testsatzes von Daten (ca. 10%), der nicht bei der Verfeinerungsprozedur verwendet wird. Durch Vergleich der beiden R-Werte kann eine Aussage über die Überinterpretation und Qualität der Prozedur gewonnen werden.

Mit diesem automatisierten Prozess geht allerdings immer eine manuelle Remodellierung einher, um Fehler zu korrigieren und die Elektronendichte visuell zu interpretieren. Dabei sind Differenzdichteverteilungen unter Verwendung von  $2F_o - F_c$  oder  $F_o - F_c$  als gewichtete Koeffizienten in der Fouriersummutation und insbesondere 'omit-maps' hilfreich.  $F_o$  bezeichnet die experimentelle und  $F_c$  die aus dem Modell zurückgerechnete Strukturfaktoramplitude. Bei 'omit-maps' werden lediglich spezielle Bereiche im Modell zur Berechnung von  $F_c$  ausgelassen, um zusätzliche Informationen über gerade diese Regionen aus den experimentellen Daten zu erhalten, ohne daß eine ungewollte Beeinflussung durch die Modellstruktur stattfindet.

Die Interpretation der optimierten, dichtemodifizierten Elektronendichte erfolgte zunächst visuell mit Hilfe physikalischen und biochemischen Ergebnissen unabhängiger Experimente. Hierzu wurde die Dichtekarte mit dem Programm O [Jones u. Kjeldgaard, 1997] untersucht und per Hand die Proteine und die rRNA modelliert. Dabei waren sowohl diverse Crosslinkdaten als auch die Sekundärstrukturdaten von herausragender Wichtigkeit [Gutell *et al.*, 1999].

Außerdem konnte man sich bereits untersuchte Motive von Nukleotidsäure- und Aminosäureketten zu Nutze machen. Äußerst hilfreich waren auch die oben beschriebenen Differenzdichteverteilungen, insbesondere die 'omit-maps', um die Dichteverteilung zu interpretieren.

Nachdem das Modell nahezu vollständig konstruiert werden konnte, wurde eine Verfeinerung der Atomkoordinaten durchgeführt. Es erfolgte nach einer Minimierung der Bindungsenergien der Struktur ein 'rigid body refinement'. Dazu wurde die Verfeinerung im reziproken Raum mit dem Programm CNS gewählt, bei der neben einer 'bulk-solvent' Korrektur die zuvor beschriebene Minimierung des R-Faktors vorgenommen wurde.

Die 'bulk-solvent' Korrektur berücksichtigt den Anteil der Strukturfaktoramplituden des vorhandenen Lösungsmittels in der niedrigen Auflösung der gemessenen Daten.

Die Minimierung erfolgte durch Translation und Rotation von kleinen Molekülgruppen, welche im vorliegenden Fall die Proteine, bzw. einzelne Nukleotide waren. Somit sollte das Modell optimal an die gemessenen Daten angepaßt werden. Als Kriterium für die Qualität des Modells wurde neben dem R-Faktor der  $R_{free}$  verwendet.

Die letzte Phase der Strukturbestimmung bestand aus paralleler automatischer Verfeinerung und manueller Remodellierung, um ein akkurates, nahezu vollständiges atomares Modell der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* zu erhalten.

## 3.7 Simulation

Die Verwendung von Schweratomclustern bei der Derivatisierung der Kristalle und die Unmöglichkeit, diese Agglomerate zu orientieren, bzw. die Einzelatome zu lokalisieren, verlangte die Auswahl eines geeigneten, für diesen Spezialfall optimierten Phasierungsverfahrens. Somit erfolgten im Rahmen dieser Arbeit parallel zur Datenmessung Untersuchungen mit simulierten Strukturfaktordaten.

Da Phasierungsversuche im Vorfeld dieser Arbeit zu keiner interpretierbaren Elektronendichte führten, sollte die Simulation dazu dienen, optimale Prozeduren und eine optimale Parametrisierung für die Phasierung und die Schweratompositionsverfeinerung zu finden. Zudem sollte dadurch eine Möglichkeit geschaffen werden, die Erwartungen und Probleme in der Ribosomenkristallographie, sowohl auf der Ebene der Datenauswertung und Schweratomlokalisierung, als auch der Phasierung besser einschätzen und beurteilen zu können. Der Vorteil lag hierbei in der Existenz einer Vergleichsreferenz in Form des hypothetischen Modells, welches zur Berechnung der simulierten Strukturfaktoramplituden verwendet wurde.

Es wurde ein vorläufiges Modell der kleinen ribosomalen Untereinheit benutzt, um daraus mit Hilfe des Programms GENERATE aus dem SOLVE-Package fiktive Intensitäten eines nativen Datensatzes im Auflösungsbereich 30 bis 4.5 Å zu errechnen. Die Elementarzelldimensionen und Symmetrien des realen Kristallgitters wurden vorgegeben, und das verwendete T30S Modell, bestehend aus einem RNA-Strang und 20 Proteinen, entsprach bezüglich Größe und Architektur dem aktuellen Wissensstand zu Beginn dieser Arbeit – basierend auf unabhängigen biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Ebenso wurden Derivatdaten ermittelt, wobei hier entweder zwei bzw. drei spezifisch orientierte W18-Cluster, ein Tantal-bromid Cluster, sechs Holmium-Einzelatome als Repräsentanten für beliebige Einzelschweratome oder Kombinationen dieser Schweratommodelle zum T30S Modell hinzugefügt wurden. Die Intensitäten wurden dann mit TRUNCATE in Strukturfaktoramplituden umgerechnet.

Es war mit Hilfe des Programmes GENERATE auch möglich, anomale Signale zu erzeugen, indem den Schweratomen Werte für  $f'$  und  $f''$  zugeordnet wurden, welche in diesem Fall den experimentell bestimmten, bzw. tabellierten Werten bei der Wellenlänge 1 Å entsprachen.

Um außerdem realitätsnahe Bedingungen zu erhalten, wurde ein Fehlermodell entwickelt, welches auf experimentell gemessenen Datensätzen und deren Standardabweichungen basiert:

Indem die experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden  $F_{ex}$  und deren Standardabweichungen  $\sigma_{ex}$  in ein Array eingelesen wurde, welches dann mit Hilfe einer Sortierprozedur in eine nach den Faktorbeträgen aufsteigend geordnete Reihenfolge gebracht wurde, konnte ein möglichst genauer Abgleich zwischen simulierter und experimenteller Amplitude erfolgen. Dazu wurde ein Bereich sukzessiv steigender Breite  $\Delta$  um den Strukturfaktorbetrag  $F_{sim}$ , welcher ein Fehler zugeordnet werden sollte, gebildet und ein experimenteller Wert von  $F_{ex}$  gesucht, der in diesen Bereich fiel. Gab es kein solches  $F_{ex}$ , so wurde  $\Delta$  erhöht und die Suche ging von vorne los.

Gelang es, ein Strukturfaktorbetrag in diesem Intervall zu finden, so wurden die Standardabweichungen  $\sigma_{ex}$  in einem zu definierenden Bereich um  $F_{ex}$  gemittelt und der Amplitude  $F_{sim}$  zugeordnet, gegebenenfalls gewichtet mit einem Wichtungsfaktor.

Die Standardabweichungen  $\sigma_{sim}$  wurde dann unter der Annahme einer Gaußverteilung der Strukturfaktoramplituden um den realen Wert dazu genutzt,  $F_{sim}$  zu modifizieren, um den Meßfehler zu simulieren. Hierzu wurde eine mit unitärer Standardabweichung gaußverteilte Zufallsvariable  $v$  eingeführt, welche die simulierte Amplitude gemäß

$$F_{sim}^{mod} = F_{sim} + \sigma_{sim} \cdot v \quad (3.3)$$

dem Fehlermodell anpaßte.

Ebenso wurde im Fall von anomalen Daten mit den Bijvoet-Paaren F(+) und F(-) verfahren. Zur Simulation der nativen Daten erfolgte die Zuordnung der Standardabweichungen mit Hilfe des experimentellen Backsoak-Datensatzes, wohingegen für die Derivate Wative-Datensätze oder diverse andere experimentelle Derivatdaten verwendet wurden. Es wurden ebenso Variationen dieser Zuordnungsprozedur, welche mit Hilfe eines selbst entwickelten Programmes in FORTRAN realisiert wurde, getestet, welche vergleichbare Ergebnisse lieferten.

Diesem eben beschriebenen Fehlermodell liegt die Annahme zugrunde, daß die Standardabweichung ausschließlich Funktion der Strukturfaktorbeträge ist. Diese Voraussetzung ist gewährleistet, wenn man annimmt, daß lediglich statistische Fehler beim Auslesen der Intensität vorliegen und keine dominanten systematischen Fehler im Versuchsaufbau auftreten.

Zusätzlich wurde eine in den Experimenten stets zu beobachtende, geringe Nicht-Isomorphie zwischen Nativ und Derivat simuliert, indem die große Zelldimension des fiktiven Schweratomkristalls um 1 Promille modifiziert wurde.

Somit wurden also, wie später noch gezeigt werden soll, realitätsnahe Datensätze produziert, mit deren Hilfe nun das Verhalten diverser Phasierungsprogramme im Fall der Strukturuntersuchungen an Ribosomenkristallen, vor allem unter Verwendung von Schweratomclustern, analysiert werden konnte. Es ist allerdings zu beachten, daß die durch das im Kristall vorhandene Lösungsmittel bedingten Effekte vernachlässigt wurden.

Die simulierten Strukturfaktoramplituden wurden neben diversen Tests hinsichtlich der Schweratomlokalisierung speziell dazu benutzt, einen Vergleich der oben genannten Phasierungsprogramme durchzuführen.

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen und deren Diskussion dargestellt werden. Im Mittelpunkt steht hierbei die optimale Phasierung mit der Methode des isomorphen Ersatzes bei der Verwendung von Schweratomclustern. Um den Verlauf der Experimente und den Prozeß der Strukturbestimmung zu verdeutlichen, soll einleitend kurz auf einige vorbereitende Arbeitsschritte eingegangen werden. Anschließend werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit simulierten, sowie experimentellen Daten erläutert und eine in diesem Fall optimale Phasierungs- und Verfeinerungsprozedur herausgearbeitet und angewendet. Nach der Modellierung und der Verfeinerung führte dies zu einem detaillierten Strukturmodell der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S, welches abschließend präsentiert und im Relation zu funktionalen Aspekten und weiterführenden Arbeiten gesetzt wird.

### 4.1 Ergebnisse vorbereitender Untersuchungen

Aufgrund der erwähnten, umfangreichen Suche nach geeigneten Derivaten und Kristallisationsbedingungen, dem Isomorphieproblem und der extremen Strahlenschädigung, war es nötig, zahlreiche Kristalle röntgendiffraktometrisch zu untersuchen. Es wurden daher im Verlauf dieser Arbeit Beugungsexperimente an tausenden von Ribosomenkristallen durchgeführt, um so einerseits potentielle Schweratomverbindungen zu testen und andererseits möglichst hochauflösende, komplette Datensätze von guter Qualität zu erhalten. Indem versucht wurde, die bekannten Probleme bei der Datensammlung zu minimieren und die speziellen Schwierigkeiten bei der Datenreduktion zu berücksichtigen, konnten einige partielle Kristalldatensätze selektiert werden, die hilfreich bei der Strukturbestimmung sein sollten.

Für die hier diskutierte Arbeit wurden zunächst fünf Datensätze zusammengestellt und ausgewählt, die aufgrund ihrer internen Datenqualität, der ausreichenden Vollständigkeit und des nutzbaren Schweratomsignals am geeignetsten für die Untersuchungen waren.

Einige Informationen, wie z.B. Meßort/-datum, R-Faktoren, Vollständigkeit bis zur maximalen Auflösung  $d_{min}$ , durchschnittliches Signal-Untergrund Verhältnis I/sigma(I), Anzahl der Schweratompositionen in der asymmetrischen Einheit während und nach der Optimierung der Phasierungsprozedur ( $Sites_{opt}/Sites_{fin}$ ) und finale Phasierungsstatistiken, sind in der Tabelle 4.1 aufgelistet. Auf die Phasierungsergebnisse wird später noch eingegangen.

Dieser Prozeß der Selektion war keineswegs trivial oder geradlinig, da es aufgrund der Isomorphieprobleme schwierig war, Gruppen von partiellen Meßdaten zu ermitteln, die beim Zusammenfügen (merging) kompatibel waren. Es wurde darauf geachtet, nur Kristalldatensätze zu einem Gesamtdatensatz zusammenzufügen, welche an ein und derselben Meßstationen gemessen wurden, um so spezifische Eigenschaften speziell der Detektoren zu berücksichtigen. Ebenso wurden fortwährend neue Datensätze mittels Fouriermethoden und vorläufiger Phaseninformationen nach Schweratompositionen durchsucht und aussortiert, bzw. hinzugefügt.

Dieser gesamte Prozeß der Datenmessung, Datenanalyse und -selektion, sowie die vorläufige Schweratomlokalisierung bestimmte über einen langen Zeitraum die Arbeit an diesem Experiment und bildete somit parallel zur Simulation die erste Phase dieser Untersuchungen.

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete Cluster-Derivatdatensätze

	<b>Backsoak</b>	<b>Wative 1</b>	<b>Wative 2</b>	<b>Tetra-Ir</b>	<b>TaBr</b>
Bezeichnung	BS	Wid14	Wat	Irg	TaBr
Meßort	APS 6/98	ID14/2 5/00	ID2 7/97	APS 11/98	ID2 12/98
Wellenlänge [Å]	1,03	0,93	0,99	1,00	0,99
Deriv.-methode	soaked	soaked	soaked	grown	soaked
Vollständigkeit (%)	86,4	94,7	80,5	69,3	56,1
Anzahl Reflexe	725465	2186910	327448	218049	99137
$R_{sym}$	12,7	13,6	10,6	12,4	14,3
I/sigma(I)	14,5	21,9	12,3	10,7	10,5
$d_{min}$ [Å]	3,8	3,3	3,5	4,5	5,0
$Sites_{opt}$	7	8	8	4	4
$Sites_{fin}$	8	13	10	4	5
$R_{Cullis}$ zentrisch	0,60	–	0,67	–	0,82
$R_{Cullis}$ azentrisch	0,72	–	0,76	0,75	0,88
PS zentrisch	1,14	–	0,64	0,79	0,98
PS azentrisch	1,22	–	0,70	0,96	1,13

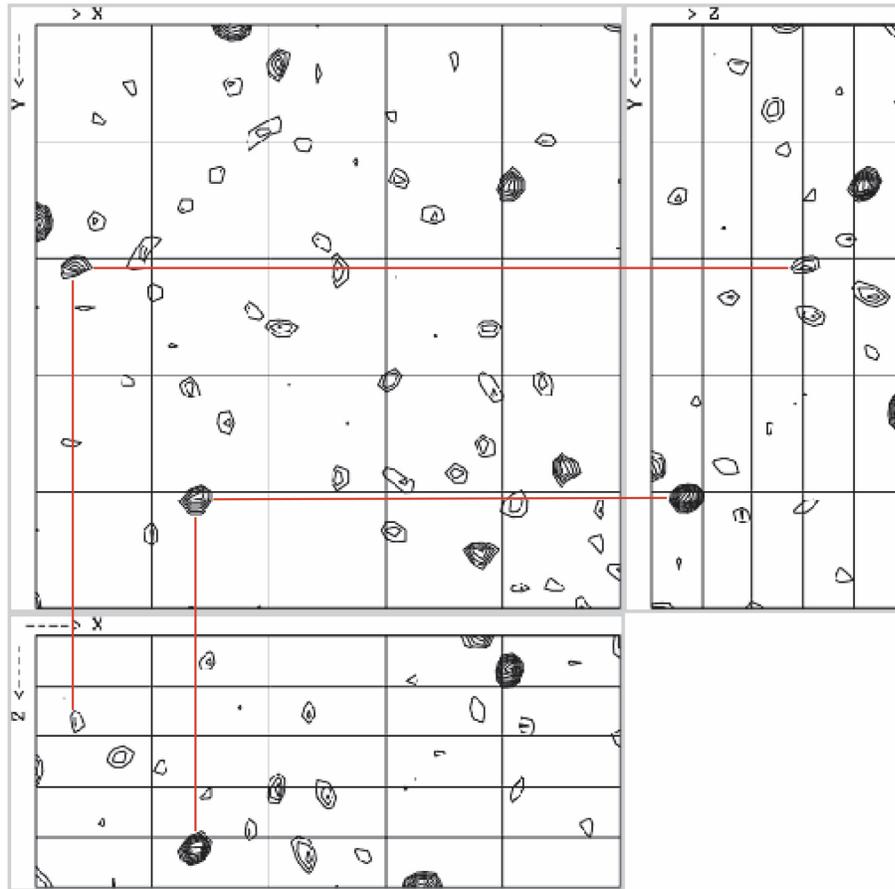


Abbildung 4.1: Differenz-Patterson-Karte zwischen Backsoak und Wative (20-10 Å)

Wie schon in Kapitel 3.1 erwähnt, wurde eine signifikante Auflösungsverbesserung von ca. 10 Å auf 3 Å beobachtet, indem eine Schweratomlösung mit W18-Clustern zur Derivatisierung verwendet wurde (Wative). Ausgehend hiervon konnten dann entweder sogenannte 'zurückgewaschene' Kristalle (Backsoaks) präpariert oder zusätzliche Schweratome hinzugefügt werden. Die Backsoaks zeichneten sich dadurch aus, daß die Besetzungsdichten einiger gebundener Cluster niedriger waren als im Wative selbst. Aus diesem Grund, verbunden mit der Tatsache, das anomale Signal von W18 nutzen zu können, war es möglich, den Wative ebenfalls als Derivat zu verwenden.

Daß dabei auch signifikante Schweratombeiträge auftraten, zeigt die Patterson-Karte in Abbildung 4.1. Diese Differenz-Patterson-Map wurde mit Hilfe des Backsoaks *BS* als nativem Kristall und einem Wative als Derivat im Auflösungsbereich 10 bis 20 Å berechnet. Man erkennt deutliche Peaks in den drei dargestellten Harkerebenen, welches auf distinkt gebundene W18-Cluster hindeutet (verbunden durch rote Linien). Somit war es möglich, zwei Hauptpositionen des Clusters zu identifizieren und den Anfangspunkt für eine vorläufige Phasierung und folgende Fouriermethoden zu setzen. Diese Peaks konnten außerdem in einigen weiteren Patterson-Untersuchungen im Bereich von 6 bis 30 Å gefunden werden und gaben Anlaß zur Annahme, daß diese relativ gut diffraktierenden Kristalle zur Strukturaufklärung hilfreich sein würden [Janell, 2000].

Um auch das anomale Signal von W18 für MIRAS-Untersuchungen zu nutzen, mußte im Vorfeld die Wellenlänge bestimmt werden, bei der  $f''$  und somit das anomale Signal, bzw. die anomale Differenz (siehe Formel 2.20 und 2.33) lokal maximal ist. Eine dieser Wellenlängen, welche im Energiebereich der Absorptionskanten liegen, wurde für einen Wative-Kristall mit Hilfe von Fluoreszenzexperimenten bestimmt. Abbildung 4.2 zeigt ein solches Spektrum [Harms, 1999]. Das Maximum von  $f''$  an der  $L_3$  Absorptionskante liegt bei ca. 1,214 Å. Diese Information sollte verwendet werden, um das anomale Signal der Derivate  $Wid14$  und  $Wat$  und des Backsoaks  $BS$  zu nutzen. Aufgrund des starken Untergrundes und somit einer Verminderung des Signal-Rausch Verhältnisses, hat es sich als sinnvoll herausgestellt, nicht bei dieser Wellenlänge die Beugungsdaten zu messen, sondern im Allgemeinen Wellenlängen um 1 Å zu wählen. Allerdings sind auch in diesem Bereich von  $\lambda$  noch signifikante anomale Signale von Wolfram zu detektieren. Es wurden ebenfalls Fluoreszenzversuche für die übrigen Schweratome durchgeführt und versucht, deren anomales Signal bei der Phasierung zu integrieren.

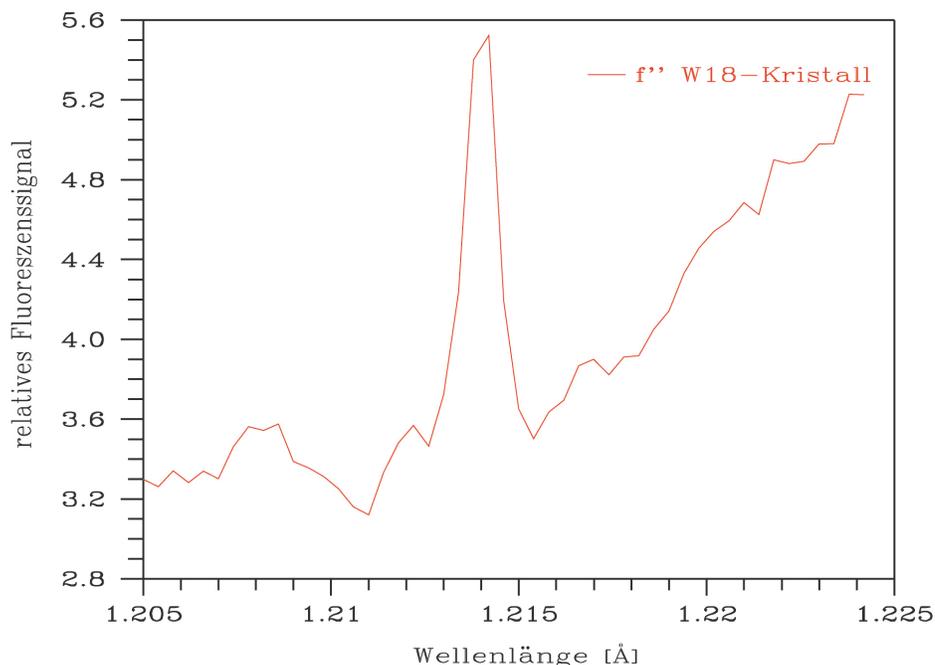


Abbildung 4.2: Fluoreszenzspektrum von Wative-Kristallen

Bevor auf die Ergebnisse der Untersuchungen von simulierten Daten eingegangen wird, soll hier kurz der Clusterformfaktor von W18 in der Näherung des sphärischen Durchschnitts eingeführt und die Auflösungsabhängigkeit verdeutlicht werden.

Aufgrund der Probleme bei der Orientierung der zur Derivatisierung verwendeten Schweratomcluster und somit bei der Lokalisierung von deren einzelnen Atomen wurde in dieser Arbeit der Ansatz des sphärischen Durchschnitts als Näherung für den Atomformfaktor  $f^{w18}$  des W18-Clusters gewählt, wie in Formel 3.1 dargestellt.

Hiermit war es möglich,  $f^{w18}$  durch neun Koeffizienten gemäß Formel 3.2 zu beschreiben. Die Auflösungsabhängigkeit sowohl für den approximierten Clusterformfaktor von W18 als auch vergleichsweise für Holmium, welches im weiteren Verlauf als Beispiel für ein Einzelatom steht, ist in der Graphik 4.3 abgebildet. Der Holmiumatomformfaktor ist hierbei zur Verdeutlichung mit dem Faktor zehn multipliziert worden.

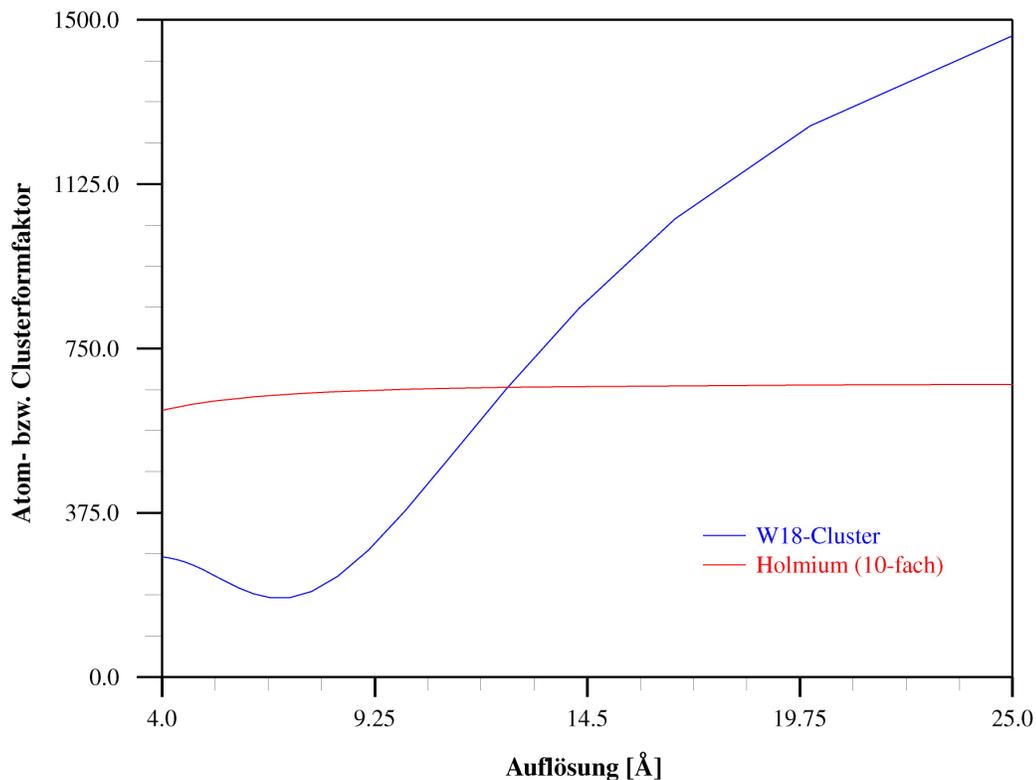


Abbildung 4.3: Formfaktoren von Holmium und des sphärischen Durchschnitts von W18

Während der Betrag des Faktors für Holmium im betrachteten Bereich nur langsam mit 'höherer' Auflösung, d.h. gegen 4 Å verlaufend, abnimmt, zeigt der Faktor vom Cluster einen u-förmigen Verlauf mit relativ größeren Werten. Das Minimum von  $f^{w18}$  liegt zwischen 7 und 8 Å.

Diese Näherung beschreibt im Bereich bis ca. 4 Å die Auflösungsabhängigkeit des realen Clusterformfaktors bzw. W18-Strukturformfaktorbetrages  $f_{real}^{w18}$  in brauchbarer Weise. Der dargestellte Verlauf läßt sich mit Hilfe der Formel 2.4 wie folgt grob erklären: Bei der Berechnung des Formfaktors handelt es sich um eine Addition von Vektoren mit demselben Betrag  $f^w$  und einer Orientierung, die durch den exponentiellen Term bestimmt wird. Im Bereich niedriger Auflösung, d.h. kleinen hkl, ergibt sich ein hoher Wert für  $f_{real}^{w18}$ , da das Vektorprodukt in der Exponentialfunktion aufgrund der kleinen relativen Ortskoordinaten der vergleichsweise nahe beieinanderliegenden Clusteratome minimal ist. Dieses führt zu einer Phasenkoherenz der Summenterme und daher zu einer Aufaddition und Verstärkung der Beträge.

Bewegt man sich zu höherer Auflösung, d.h. zu größeren hkl, so fallen die Phasen immer mehr ins Gewicht und führen nahezu zu einer gegenseitigen Auslöschung der Terme: der Formfaktorbetrag fällt stetig.

Der Anstieg bei noch höheren Auflösungen ist auf die Mittelung der nun zufällig im Raum verteilten Vektoren zurückzuführen.

Der Verlauf von  $f^{w18}$ , welcher auch als Clustereffekt bezeichnet wird, entspricht hierbei in erster Näherung dem des gemittelten Schweratomstrukturfaktorbetrages  $|F_H^{w18}|$  für einen oder mehrere W18-Cluster in der betrachteten Auflösung.

Im Fall von Holmium ist der Abfall zu höheren Auflösungen mit der Auflösungsabhängigkeit des Atomformfaktors eines Einzelatoms zu erklären (siehe Formel 2.5).

## 4.2 Ergebnisse der Untersuchungen von simulierten Daten

Aufgrund der Wahl der Datensätze und der Derivatisierung mit W18 sowie dem Problem, diesen Agglomeraten eine Orientierung zuzuordnen, stellte sich nun die Frage nach Phasierungsprozeduren, welche auch in höheren Auflösungen alleine aus der Geometrie und der Zusammensetzung der Cluster bestmögliche Phasen liefern konnten. Dieses Optimalitätskriterium konnte nur mit Hilfe von Simulationsexperimenten bestimmt werden.

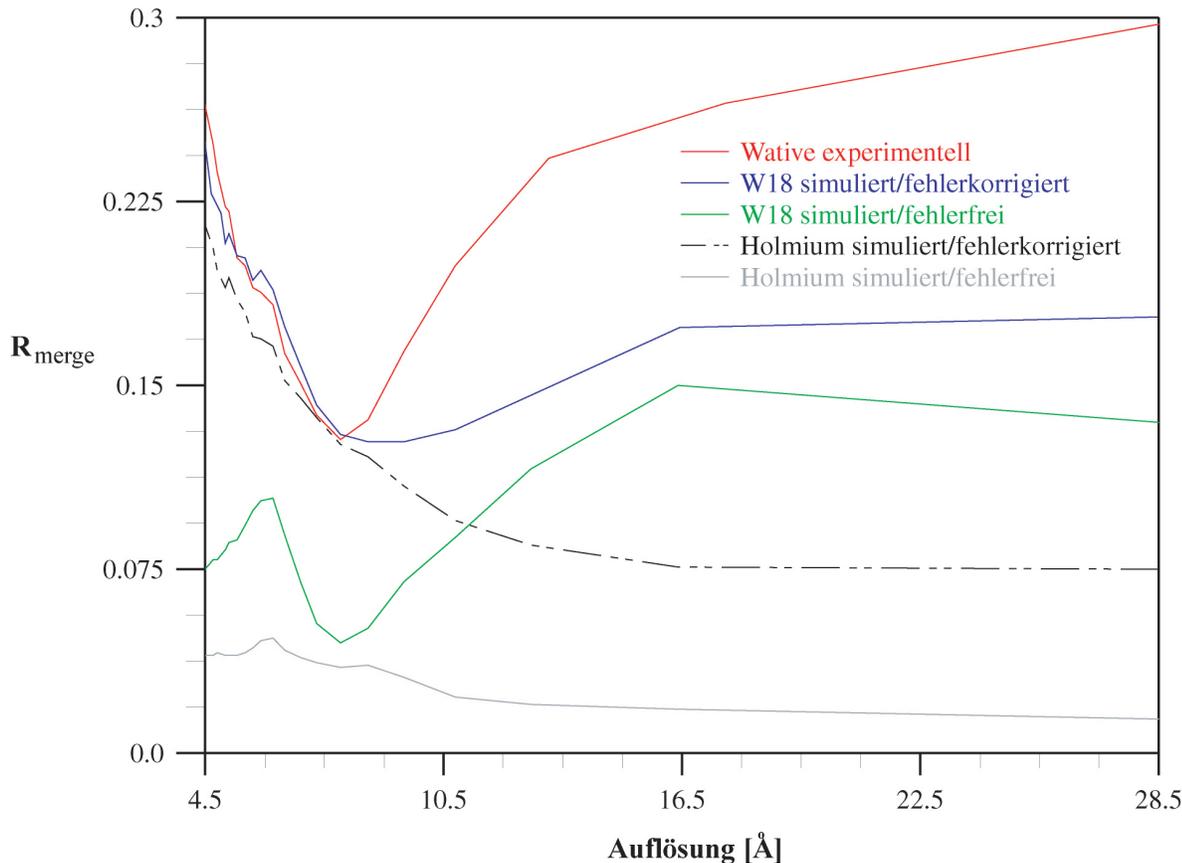
### 4.2.1 Skalierung

In der ersten Untersuchung mit den simulierten Strukturfaktordaten sollte einerseits das angewendete Fehlermodell überprüft und andererseits ein Gefühl für die bei experimentellen Daten zu erwartenden Ergebnisse gewonnen werden, um die Qualität von Meßdatensätzen besser einschätzen zu können. Ebenso sollten die Vorteile, aber auch die Nachteile der Verwendung von Schweratomclustern bei der Derivatisierung herausgearbeitet werden.

Hierzu wurden die simulierten Daten, welche wie schon vorhergehend beschrieben einerseits aus einem nativen Modell und andererseits aus mit drei W18-Clustern, bzw. sechs Holmium-Atomen derivatisierten Modellen berechnet wurden, zueinander skaliert und der  $R_{merge}$  mit dem Programm FHSCAL bestimmt (siehe Formel 2.27).

In Abbildung 4.4 sind die Werte für den  $R_{merge}$  bei Skalierung von Nativ mit W18-Derivat und Holmium-Derivat für fehlerfreie Daten und mit dem oben beschriebenen Fehlermodell korrigierte Daten dargestellt. Zum Vergleich ist ebenfalls ein Graph im Fall von experimentellen Backsoak- und Wativedaten (*BS/Wid14*) eingezeichnet.

Man kann deutlich den u-förmigen Verlauf bei den Clusterdaten erkennen. Das Minimum liegt hier bei ungefähr 8 Å. Bei den fehlerfreien Einzelatomdaten ist ein leicht steigender Verlauf zu hohen Auflösungen hin zu beobachten; das relativ stärkste isomorphe Signal liegt hier also im Bereich von 4,5 bis 10 Å. Im entsprechenden Fall von W18 erkennt man die im Vergleich zu Holmium höheren  $R_{merge}$ -Werte, speziell bei niedriger Auflösung. Ab ca. 6 Å ist ein Abfall des  $R_{merge}$  zu erkennen. Es wird deutlich, daß der Verlauf qualitativ mit dem aus Abbildung 4.3 übereinstimmt. Betrachtet man die Formel 2.30, so wird der Zusammenhang mit  $f^{w18}$  deutlich, macht man sich klar, daß der  $R_{merge}$  in der Abbildung nur einen relativen, gemittelten Betrag der isomorphen Differenz darstellt. Es ist allerdings zu beachten, daß es sich bei der hier betrachteten Kennzahl um eine relative Größe handelt, die mit den nativen Strukturfaktoren gewichtet wird. Daher ist der Bereich hoher Auflösungen, in denen der mittlere Strukturfaktorbetrag der ribosomalen Referenzstruktur sinkt, überproportional verstärkt. Das Abfallen der nativen Faktorbeträge in hoher Auflösung läßt sich dadurch erklären, daß – ähnlich wie beim Schweratomcluster – die Ribosomenbereiche als Atomagglomerate betrachtet werden können.

Abbildung 4.4:  $R_{merge}$  für simulierte Daten

Dieses führt analog zum oben beschriebenen Clustereffekt zur steigenden gegenseitigen Auslöschung der Atomformfaktorbeträge in diesem Auflösungsbereich. Da dieser 'negative Ribosomenclustereffekt' größer ist als das Abfallen der Atomfaktorbeträge von Einzelschweratomen, wird die zur hohen Auflösung hin steigende Kennzahl für Holmium erklärt.

Der fallende  $R_{merge}$  zwischen 6 und 4,5 Å im Fall der simulierten, fehlerfreien W18-Daten ist auf den fallenden Atomformfaktor der einzelnen Wolframatome zurückzuführen. Dieser 'Einzelatomeffekt' tritt in der Graphik 4.3 nicht auf, da bei der Näherung des sphärischen Durchschnitts eben dieser Auflösungsbereich am schlechtesten beschrieben wird; es sind keine Einzelatompositionen bestimmt, der Cluster ist zufällig orientiert.

Betrachtet man die fehlerkorrigierten Daten, so erkennt man eine weitaus stärkere Abweichung der Werte vom fehlerfreien Fall im Bereich hoher Auflösung. Dieses ist auf die Tendenz fallender Strukturfaktorbeträge und steigender Standardabweichungen sowohl des nativen als auch des Derivat-Datensatzes in diesem Bereich zurückzuführen, wodurch der relative Fehler an Bedeutung gewinnt. Ebenso spielt der eingeführte Isomorphiefehler gerade in höheren Auflösungen eine größere Rolle. Im Fall von Holmium ist hierbei ein rapider Anstieg der Werte in diesem Bereich zu verzeichnen, da der Fehler in den Daten im Vergleich zum isomorphen Signal dominiert.

Es wird deutlich, daß das simulierte Fehlermodell den realen Daten im Bereich zwischen 4,5 und 10 Å relativ gut entspricht und somit die Fehlerkorrektur legitimiert wird. Lediglich bei niedriger Auflösung ist das isomorphe Signal der experimentellen höher als das der simulierten Daten. Dies liegt hauptsächlich am vernachlässigten Lösungsmittelbeitrag bei der Diffraktion. Dieser Beitrag ist gerade in niedrigeren Auflösungsbereichen relevant. Allerdings sollte diese Diskrepanz zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisinterpretation führen, da im Wesentlichen die hohe und mittlere Auflösung bei der Phasierung von Interesse war.

Die Untersuchungen weisen sowohl auf die Brauchbarkeit des hier entwickelten Fehlermodells für die simulierten Daten als auch auf die Vorteilhaftigkeit von Schweratomclustern hin. Dieses begründet sich durch das höhere isomorphe Signal und der daraus resultierenden weitaus geringen Fehleranfälligkeit in höheren Auflösungen im Vergleich zu Einzelschweratomen.

Desweiteren wurde das anomale Signal der simulierten Daten analysiert und die Auflösungsabhängigkeit des  $R_{ano}$  untersucht (Graphik 4.5). Hierbei ist  $R_{ano}$  äquivalent zum  $R_{merge}$  (siehe Gleichung 2.27), wobei jedoch als Zähler die Summe der Beträge der anomalen Differenzen gewählt wurde. Es handelt sich also um eine Kennzahl zur Darstellung des relativen anomalen Signals.

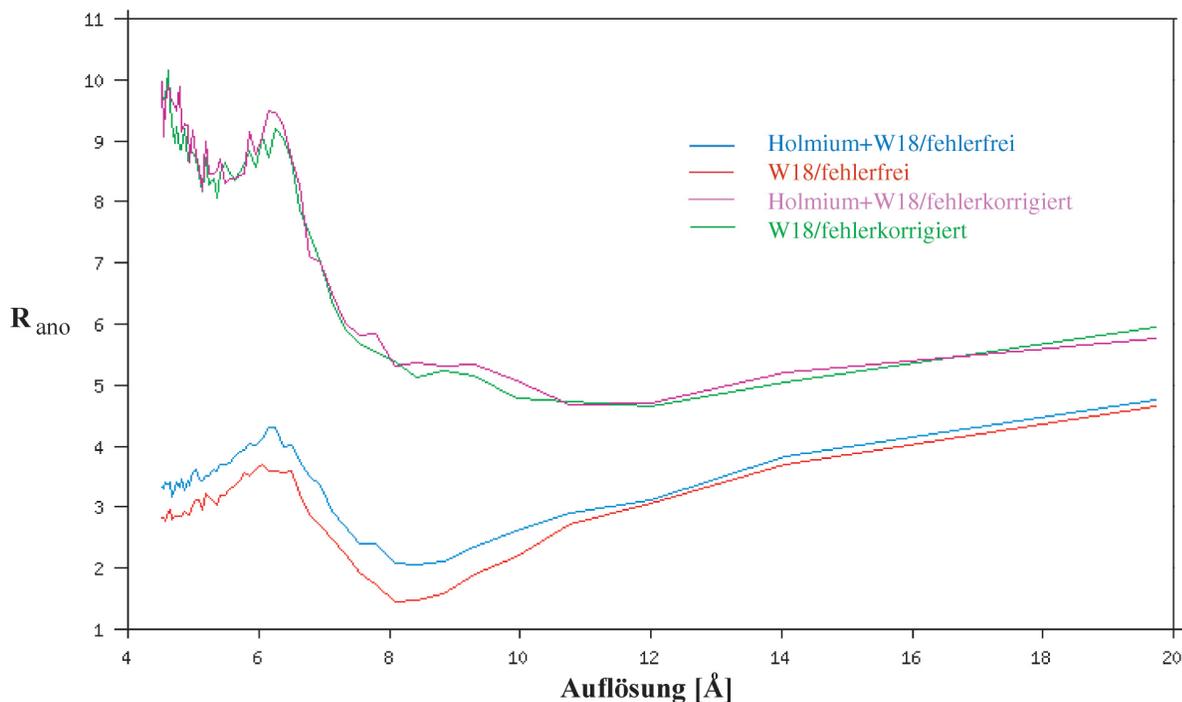
Betrachtet wurden simulierte fehlerfreie oder fehlerkorrigierte W18-Strukturfaktorsätze und zusätzlich Daten, bei denen sowohl drei W18 Cluster als auch sechs Holmium Atome zur nativen Struktur hinzuaddiert wurden (Holmium+W18).

Der Verlauf des Graphen beim Datensatz mit drei zusätzlichen W18-Clustern entspricht sowohl im fehlerfreien als auch im fehlerkorrigierten Fall dem des  $R_{merge}$ : der u-förmige Verlauf mit dem Minimum bei ca. 8 Å und Abnahme bei höheren Auflösungen, wobei der Einfluß des Fehlers in hoher Auflösung dominiert. Das Maximum des  $R_{ano}$  liegt bei ungefähr 6 Å.

Aufgrund der Abhängigkeit in Formel 2.33 und 2.20 wird dieser direkte Zusammenhang klar, da die mittlere anomale Differenz  $\overline{\Delta}_{ano}$  proportional zum Betrag des imaginären Anteils des Schweratomstrukturfaktors ist:

$$\overline{\Delta}_{ano} = \overline{|F_{PH}(+)| - |F_{PH}(-)|} \sim |\mathbf{F}_H^i| = \frac{f''}{f_r} |\mathbf{F}_H^r| \quad (4.1)$$

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit den 'Holmium+W18'-Datensätzen betrachtet. Da bei allen experimentellen Meßdaten auch in Einzelatomderivaten Wolframcluster vorlagen, konnte diese Simulation Rückschlüsse auf die Verwendung des anomalen Signals bei experimentellen Daten liefern. Es wurde hierbei eine Messung bei einer Wellenlänge mit maximalem  $f''$  und somit maximalem anomalen Signal für Holmium simuliert, wobei  $f''$  von Wolfram auf ein Viertel seines ursprünglichen Wertes gesenkt wurde, um so optimale Bedingungen zur Detektion des anomalen Signals des Einzelschweratoms anzudeuten.

Abbildung 4.5:  $R_{ano}$  für simulierte Daten

Für die 'Holmium+W18'-Daten ist beim Vergleich mit den W18-Daten im fehlerfreien Fall deutlich ein höherer  $R_{ano}$  ab ungefähr 10 Å zu beobachten; dieser Unterschied ist allerdings bei realistischeren, fehlerkorrigierten Daten nicht mehr zu beobachten.

Diese Untersuchungen zeigten, daß sich selbst bei Wellenlängen, bei denen die anomale Differenz der Einzelschweratome maximal ist, eine Verwendung des anomalen Signals im Realfall äußerst schwierig gestaltet. Der Effekt der Wolframcluster dominiert in nahezu allen Wellenlängenbereichen und überlagert gerade im fehlerbehafteten Normalfall die übrigen Signale. Es war daher fraglich, ob eine Verwendung des anomalen Signals von Einzelschweratomen bei der MIRAS-Methode möglich ist. Ebenso wurde verdeutlicht, daß das relativ hohe isomorphe und anomale Signal der in allen Kristallen vorhandenen Wolframcluster einerseits von großer Bedeutung für die Strukturanalyse des Ribosoms sein konnte, aber andererseits zur Überdeckung der Signale anderer potentieller Einzelatomderivate führte und somit die Suche nach zusätzlichen Derivaten erschwerte.

Die relativen Änderungen der R-Werte beim Vergleich der fehlerfreien und fehlerkorrigierten W18-Daten sind im anomalen und isomorphen Fall ungefähr gleich groß. Obwohl der Einfluß des Fehler aufgrund der Signalgröße beim anomalen Signal deutlich höher sein müßte, bewirkt der integrierte Isomorphiefehler nur bei Betrachtung der isomorphen Differenz ein Ansteigen des R-Wertes bei Fehlerkorrektur.

### 4.2.2 Schweratomlokalisierung

In diesem Abschnitt werden die Untersuchungsergebnisse der Standardmethoden zur Schweratomlokalisierung anhand von simulierten Daten dargestellt.

Durch diese Untersuchungen sollten Aussagen über zu erwartende Möglichkeiten und Limitationen bei der Detektion von Schweratompositionen gewonnen werden, um somit die Erwartungen und speziell den Einfluß von experimentellen Unzulänglichkeiten im Fall von realen Daten zu erarbeiten.

Als erstes wird auf die Patterson-Methode eingegangen. Hierzu wurden Differenz-Patterson-Karten für mit zwei W18 bzw. sechs Holmium berechnete Formfaktorbeiträge sowohl im fehlerfreien Fall (a und c) als auch im fehlerkorrigierten Fall (b und d) kalkuliert (Abbildung 4.6). Der Auflösungsbereich liegt bei den W18-Daten zwischen 10 und 20 Å und bei den Holmium-Daten zwischen 5 und 15 Å, um den Bereich des größten isomorphen Signals abzudecken. Der Darstellungs-Schwellenwert beträgt in allen Patterson-Karten  $1,5 \sigma$ , d.h. nur Dichten, die größer als der 'root mean square' (rms) plus 1,5 facher Standardabweichung sind, werden dargestellt. Ohne Korrektur durch das Fehlermodell konnten bei beiden Derivaten die Positionen der Schweratome ohne Schwierigkeiten aus den Peaks in den Harker-Ebenen bestimmt werden. Während auch im Fall realistischer Fehler bei W18 eine Identifikation der Bindungsstellen ohne große Probleme möglich war, ist die Lokalisierung der Einzelatome nicht zu bewerkstelligen. Hierbei ist der Untergrund viel stärker als das eigentliche isomorphe Signal und es ergeben sich daher fiktive Peaks, die eine Interpretation der Patterson-Karte unmöglich machen.

Abbildung 4.7 zeigt Harker-Ebenen aus Differenz-Pattersonkarten für die simulierten W18-Derivat-Daten im Bereich 8 bis 20 Å. Die Teile a) und b) zeigen die Ergebnisse von nicht kompletten Datensätzen. Hierbei wurden zufällig 40 % bzw. 70 % der Formfaktoren selektiert und zur Berechnung der Patterson-Maps verwendet. Während im Fall von 70 % kompletten Daten eine Interpretation ohne weiteres möglich war, ergaben sich bei der Analyse der Patterson-Karte unter Benutzung von nur 40 % der isomorphen Differenzen deutlich Schwierigkeiten bei der Zuordnung der Peaks in den Harker Ebenen. Zur Verdeutlichung sind die mit den zwei W18-Positionen korrelierten Pattersonmaxima durch rote Linien gekennzeichnet. Die Karte c) stellt den Fall von fehlerfreien W18-Daten dar; lediglich eine Elementarzeldimension des Derivates wurde um 3 Promille relativ zum nativen Kristall modifiziert, um so eine mittelgroße Nicht-Isomorphie zu simulieren. Schon in diesem fehlerfreien Fall ergeben sich signifikante Probleme bei der Schweratomlokalisierung.

Mit Hilfe der anomalen Patterson-Methode, deren Ergebnis in Teilabbildung d) für W18 mit Fehlerkorrektur dargestellt ist, ist aufgrund der diversen auftretenden Zusatzpeaks eine Interpretation äußerst schwierig.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, daß die Patterson-Methode nur bedingt, unter besonderen Voraussetzungen für die Lokalisierung der Schweratompositionen geeignet ist. Während im Fall von Wolframclustern auch im realistischen fehlerkorrigierten Fall eine Interpretation der Patterson-Karten möglich war, wurde eine Analyse bei Einzelschweratomdaten, aufgrund des im Vergleich zum Fehler zu geringen isomorphen Signals, verhindert.

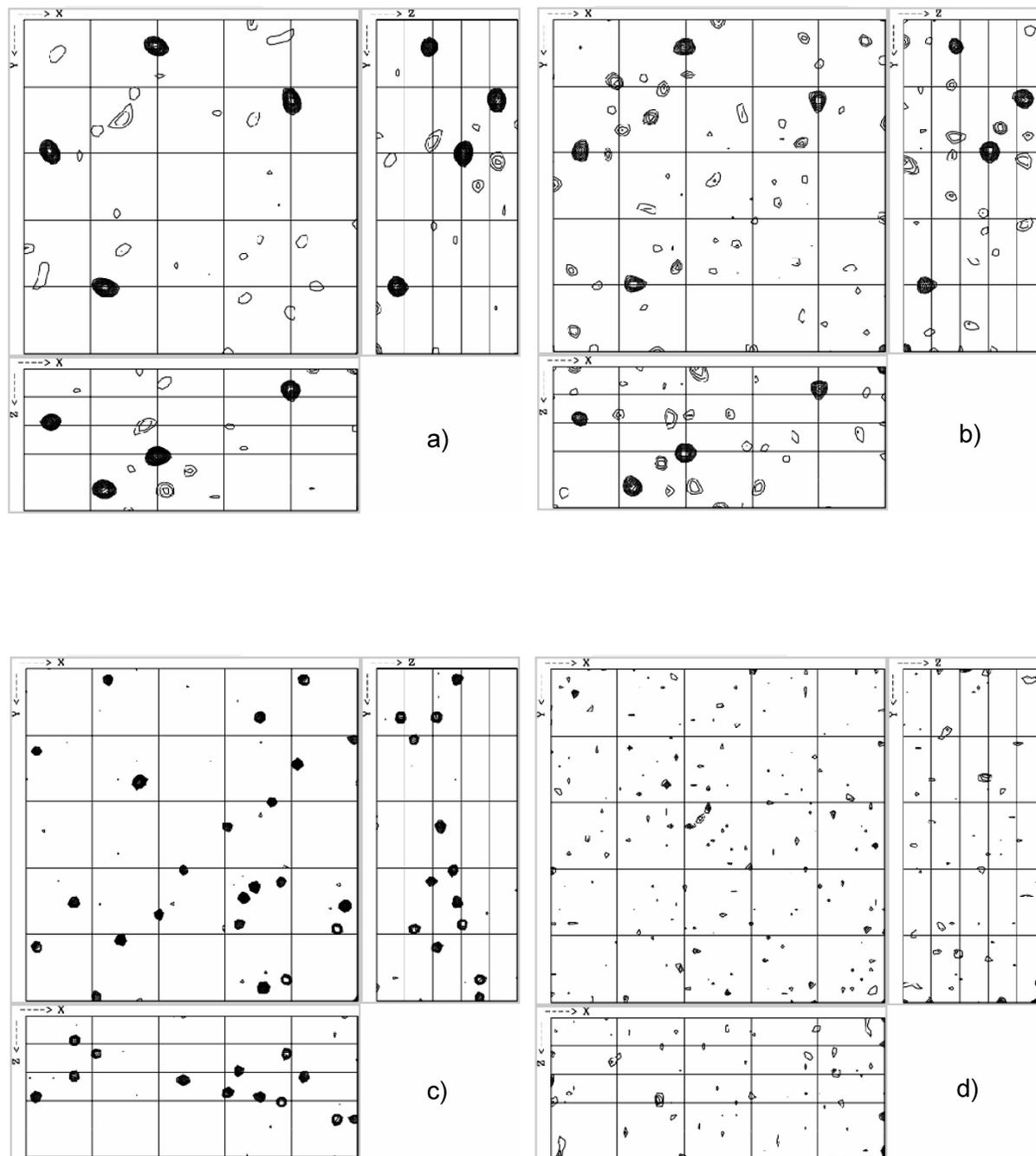


Abbildung 4.6: Harker-Ebenen aus Patterson-Karten für simulierte Daten: a) W18 fehlerfrei b) W18 fehlerkorrigiert c) Holmium fehlerfrei d) Holmium fehlerkorrigiert

Die Patterson-Methode bietet auch bei nur teilweise vollständigen Cluster-Daten eine Möglichkeit, die Lokalisation von Hauptbindungsstellen mit hoher Besetzungsdichte – welche in diesem Fall als maximal, d.h. eins, angenommen wurde – durchzuführen und die Positionsbestimmung zu initiieren. Allerdings muß diese Vorgehensweise durch weitere Methoden unterstützt und erweitert werden.

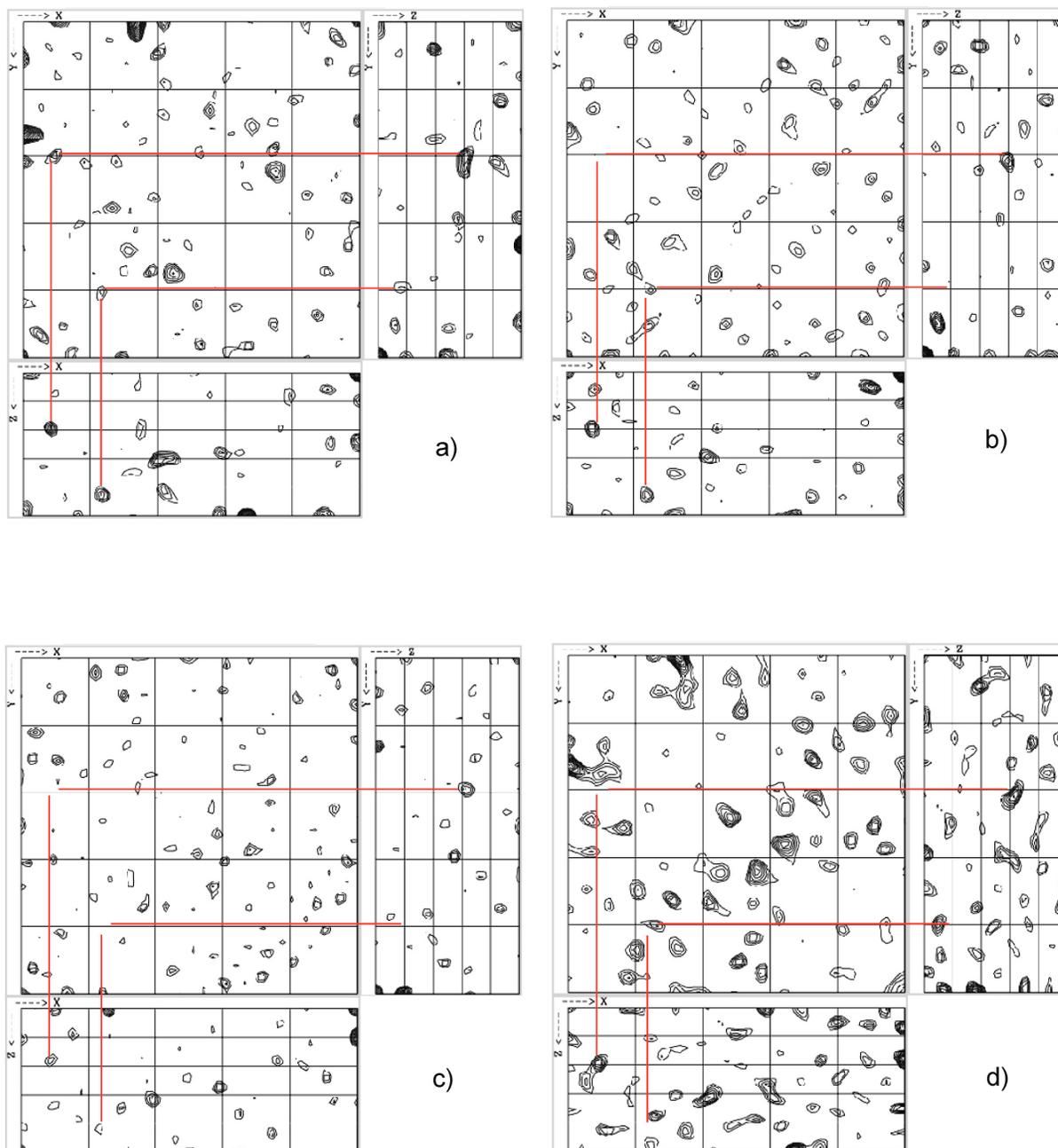


Abbildung 4.7: Harker-Ebenen aus Patterson-Karten für simulierte Daten: a) W18 fehlerkorrigiert (70% komplett) b) W18 fehlerkorrigiert (40% komplett) c) W18 fehlerfrei (3 Promille Nicht-Isomorphie) d) Anomales W18-Patterson fehlerkorrigiert

Bei lediglich halb-kompletten Daten und auch, wie hier gezeigt, bei schon relativ geringer Nicht-Isomorphie, wird die Patterson-Methode difizil und unzureichend. Es kann außerdem gezeigt werden, daß dieses Problem bei systematischem Fehlen von Strukturfactor-daten in spezifischen Regionen des reziproken Raumes noch verschlimmert wird. Ebenso ist die anomale Pattersonmethode im realitätsnahen Fall auch bei Clusterdaten nicht ohne weiteres bei der Schweratomlokalisierung hilfreich.

Als nächstes werden die Ergebnisse der Fourier-Methode dargestellt. In Abbildung 4.8 erkennt man vier Differenz-Fourier-Karten, die mit Hilfe von realistischen vorläufigen Phasen und den jeweiligen simulierten isomorphen Differenzen als Koeffizienten im Auflösungsbereich 30 bis 6 Å berechnet wurden. Links oben sind Derivativ-Daten mit drei W18 verwendet worden und auf der rechten oberen Seite Daten mit einem Tantal-Bromid-Cluster. Die Phasen stammen aus einer vorläufigen SIR-Phasierung mit MLPHARE, wobei ein fehlerkorrigierter W18-Datensatz mit insgesamt drei W18-Clustern benutzt wurde und nur zwei der drei Clusterpositionen zur Phasierung gegeben waren. Der  $\sigma$ -Wert wurde in beiden Fällen auf vier festgesetzt. Hier zeigt sich, daß im Fall von W18 die Lokalisation der dritten, fehlenden Position ohne weiteres möglich ist. Auch die relativ hohe Elektronendichte des Tantal-Bromid-Clusters mit seinen sechs Tantalatomen reicht zur Detektion unter Verwendung von vorläufigen SIR-Phasen bereits aus. Die roten Kreise markieren jeweils eine der symmetrieäquivalenten Positionen.

Im linken unteren Teil der Abbildung 4.8 ist eine Fourierkarte mit den oben beschriebenen SIR-Phasen und simulierten Holmium-Derivaten dargestellt ( $3\sigma$ ). Rechts unten wurden hingegen SIRAS-Phasen fehlerkorrigierter W18-Daten verwendet, welche mit Hilfe von MLPHARE und unter Vorgabe aller drei Wolframclusterpositionen berechnet wurden ( $3,5\sigma$ ). Bei den Einzelatomen ist die Identifikation im Fall der SIR-Phasen unmöglich. Die in der Phasierung verwendeten W18-sites treten in den Karten als sogenannte 'ghost-peaks' auf (blauer Kreis). Trotz der zusätzlichen vorläufigen Phaseninformation reichen hier die isomorphen Differenzen nicht aus, um Informationen zur Lokalisation der Holmium Positionen zu liefern. Im Gegensatz dazu ist eine bedingte Detektion einiger Bindungsstellen (roter Kreis) unter Verwendung besserer SIRAS-Phasen durchaus möglich, wenn auch schwierig.

Es wird deutlich, daß bei der Lokalisation von Einzelschweratomen mit Hilfe der Fourier-Methode besondere Anforderungen an die Qualität der verwendeten Ausgangsphasen gestellt werden müssen.

Somit konnte hier gezeigt werden, daß im Gegensatz zur Lokalisation von Clustern die Bestimmung von Einzelatompositionen auch mit der Fourier-Methode nicht ohne weiteres möglich ist. Auch wenn die Verwendung von vorläufigen Phaseninformation eine Identifizierung der Bindungsstellen unter bestimmten Voraussetzungen bedingt ermöglicht, ist eine vollständige Bestimmung der Positionssätze auch durch diese Methode alleine nicht durchführbar.

Es wird verständlich, daß der Schritt der Lokalisation von Schweratomen mit diesen Standard-Methoden nicht isoliert möglich ist. Ergänzend müssen dazu in rekursiven Prozessen Methoden gefunden werden, die in der Ribosomenkristallographie bei der Detektion speziell von Einzelschweratomen oder Nebenpositionen niedriger Okkupanz der Cluster auch im Fall von nicht kompletten Daten, Isomorphieproblemen oder anderen auftretenden Fehlerquellen zu verwendbaren Lösungen führen.

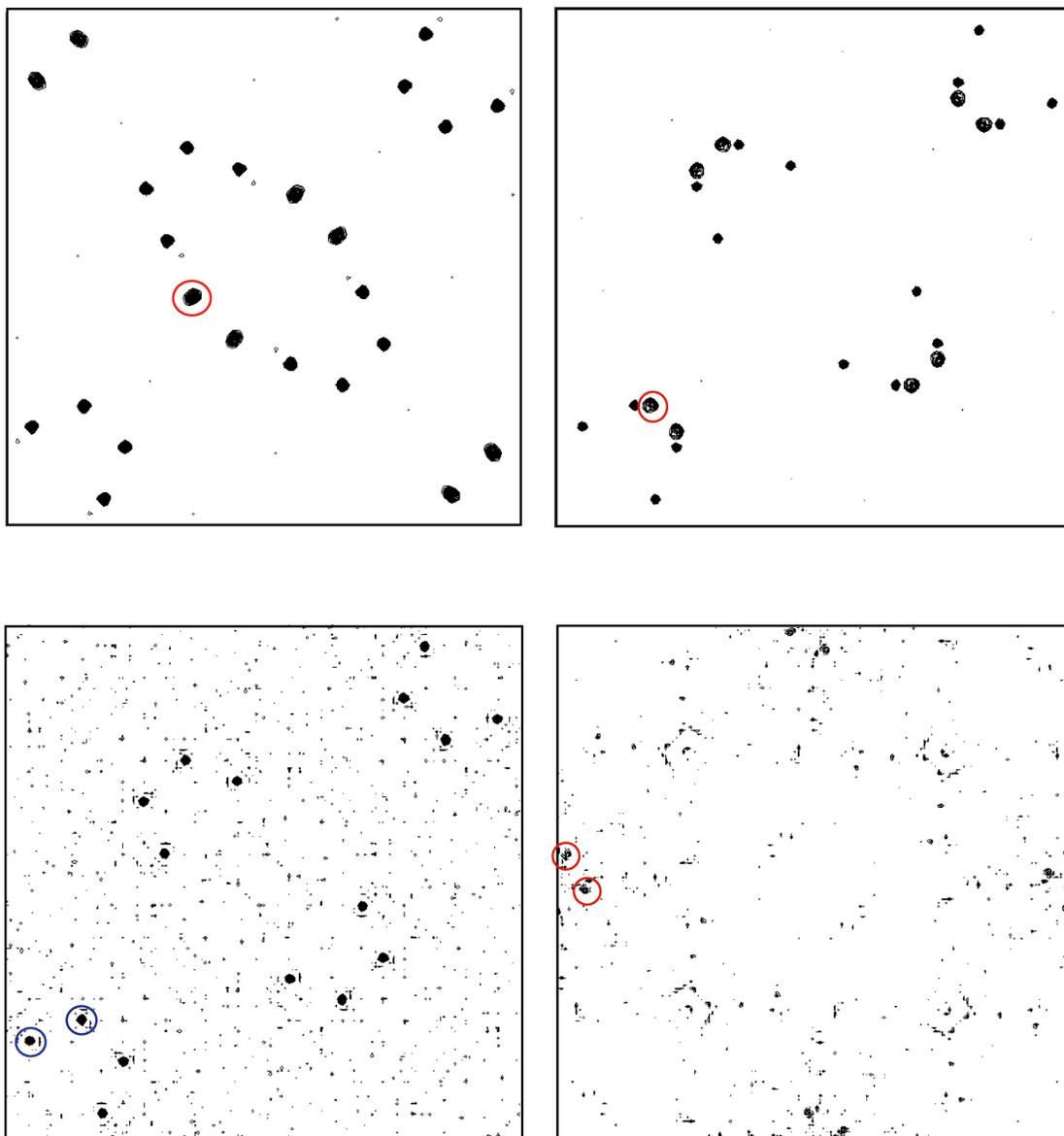


Abbildung 4.8: Fourier-Karten für simulierte Daten

Einerseits wird deutlich, daß Schweratomcluster einen entscheidenden Vorteil gegenüber Einzelatomen bieten, indem ihr stärkeres Signal ein höheres Lokalisierungspotential besitzt, andererseits konnte auch gezeigt werden, daß eine systematische Suche nach Positionen nicht ohne weiteres möglich ist, sondern diverse Standardprozeduren durch z.B. 'residual-maps' oder Beobachtungen in der Phasierungsphase (Positionsverfeinerungen) bzw. Modellierungsphase (omit-maps) ergänzt werden müssen.

### 4.2.3 Phasierung

Die Phasierung, als der entscheidendste Schritt in der Proteinkristallographie, stand im Mittelpunkt der hier vorliegenden Untersuchungen. Phasierungsversuche mit experimentellen Daten im Vorfeld ergaben nur unbefriedigende Ergebnisse hinsichtlich der Dichte-Karten. Um dem letztendlichen Ziel einer interpretierbaren Elektronendichteverteilung näherzukommen, bedurfte es daher einer Möglichkeit, eine optimale Parametrisierung und Wahl der Phasierungsprozedur zu erarbeiten. Hierzu wurde die weiter oben erläuterte Simulation als Vorbereitung und Unterstützung der Arbeit mit experimentellen Daten verwendet.

Es ging primär um die Selektion der Programme zur Phasenbestimmung und deren Optimierung. Demzufolge wurden simulierte Strukturfaktoren mit den Programmen SHARP, SOLVE/HEAVY, MLPHARE und CNS zur Phasierung verwendet. Fehlerfreie Daten lieferten dabei Hinweise zur Wahl der Eingabeparameter, wobei die fehlerkorrigierten Amplituden zum direkten Vergleich der Programme benutzt wurden. Auch im sogenannten fehlerfreien Fall wurde ein marginaler Fehler – durch eine Modifikation des Programmes zur Fehlerkorrektur – verwendet, da z.B. SHARP Probleme bei Standardabweichungen von Null aufweist.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Korrelation der Phasierungsergebnisse mit dem verwendeten Modell. Es wurde die Phasenkorrelation  $PC$  und der mittlere Phasenunterschied  $DPhi$  bzw.  $DeltaPhi$  zwischen den jeweilig berechneten Phasen und den Modellphasen, die über inverse Fouriertransformation mit Hilfe des Programms SFALL (CCP4) aus dem zur Simulation verwendeten Strukturmodell bestimmt wurden, kalkuliert. Außerdem ist die Mapkorrelation  $MC$  zwischen der berechneten und der aus den Modellstrukturfaktoren und Modellphasen berechneten Elektronendichteverteilung aufgeführt. Zudem wurde der 'figure of merit'  $FOM$  bestimmt.

Die Angaben in der Tabelle entsprechen den Werten der jeweiligen optimierten Prozeduren. Es erfolgte zuerst für jeden Phasierungsversuch mit den diversen Programmen eine Optimierung der zu variierenden Parameter und Vorgehensweisen anhand der simulierten, fehlerfreien Daten – wie z.B. Art und Anzahl der zu verfeinernden Parameter, Anzahl der Verfeinerungszyklen, stufenweise Verfeinerung und Phasierung durch Trennung von isomorpher und anomaler Verfeinerung, Skalierungsrestriktionen oder sonstige Beschränkungen und sukzessive Verfeinerungsmethoden. Hierbei wurde jedoch darauf geachtet, daß die vorläufigen Inputvariablen, wie z.B. Schweratompositionen, anomale Atomformfaktoren, Auflösungsbereiche oder Okkupanzen, überall gleich waren.

Diese optimierten Phasierungsmethoden wurden dann auf den Fall der fehlerkorrigierten Daten angewendet, gegebenenfalls modifiziert und bildeten sowohl die Basis als auch den Rahmen der weiteren Strukturuntersuchung.

Die Selektion der optimalen Phasierungsprozeduren erfolgte anhand der signifikantesten Kennzahl, der Mapkorrelation  $MC$ , da dieser Wert direkten Bezug zur Elektronendichte hat und Aussagen über die Interpretierbarkeit der Dichteverteilung liefern kann. Die Phasenkorrelation und der Phasenunterschied lieferten Aussagen über die Auflösungsabhängigkeit der Phasierungsqualität.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Phasierung mit simulierten Daten

Phasensatz	PC	DPhi	MC	FOM
<b>SHARP</b>				
W18-SIRAS fehlerfrei	0,77	42,9	0,75	0,70
Ho-SIRAS fehlerfrei	0,95	9,5	0,95	0,96
MIRAS fehlerfrei	0,93	12,9	0,94	0,97
W18-SIRAS fehlerkorrigiert	0,64	69,9	0,44	0,23
Ho-SIRAS fehlerkorrigiert	0,59	75,3	0,23	0,21
MIRAS fehlerkorrigiert	0,71	62,2	0,51	0,35
<b>SOLVE/HEAVY</b>				
W18-SIRAS fehlerfrei	0,37	118,6	0,13	0,50
Ho-SIRAS fehlerfrei	0,95	9,5	0,95	0,97
MIRAS fehlerfrei	0,89	22,2	0,90	0,76
W18-SIRAS fehlerkorrigiert	0,46	100,6	0,17	0,41
Ho-SIRAS fehlerkorrigiert	0,58	77,0	0,22	0,22
MIRAS fehlerkorrigiert	0,53	95,8	0,22	0,50
<b>MLPHARE</b>				
W18-SIRAS fehlerfrei	0,46	111,4	0,36	0,63
Ho-SIRAS fehlerfrei	0,94	12,1	0,94	0,93
MIRAS fehlerfrei	0,93	13,4	0,95	0,93
W18-SIRAS fehlerkorrigiert	0,46	101,6	0,20	0,17
Ho-SIRAS fehlerkorrigiert	0,59	80,9	0,16	0,13
MIRAS fehlerkorrigiert	0,53	91,8	0,26	0,21
<b>CNS</b>				
W18-SIRAS fehlerfrei	0,38	120,6	0,18	0,58
Ho-SIRAS fehlerfrei	0,96	9,9	0,94	0,94
MIRAS fehlerfrei	0,94	12,6	0,95	0,94
W18-SIRAS fehlerkorrigiert	0,41	105,2	0,15	0,32
Ho-SIRAS fehlerkorrigiert	0,72	66,0	0,29	0,04
MIRAS fehlerkorrigiert	0,51	100,1	0,19	0,31

Die Bestimmung von  $PC$ ,  $DPhi$  und  $MC$  erfolgte mit den CCP4-Programmen PHISTATS und OVERLAPMAP. Alle Phasen und die entsprechenden Elektronendichteverteilungen wurden ohne Dichtemodifikation und im Auflösungsbereich 4,5 bis 30 Å verglichen. Bei allen Programmen wurden dieselben, geringfügig variierten, bekannten Schweratompositionen als Startpunkt der Verfeinerungsprozedur benutzt und der bei der Simulation verwendete anomale Anteil des Atomformfaktors  $f''$ , falls möglich, vorgegeben. Die Cluster wurden als 'spherical average' angenähert, welches eine gute Approximation im verwendeten Auflösungsbereich darstellt;  $f''_{w18}$  wurde näherungsweise als Summe der 18 anomalen Wolframatomformfaktoren angesetzt und dann gegebenenfalls verfeinert. Lediglich im Fall von SHARP wurde der Wolframatomformfaktor und die Clustergeometrie angegeben. Es wurden ausschließlich Derivatdaten mit drei W18-Clustern und Daten mit sechs Holmiumatomen inklusive des anomalen Signals bei der Phasierung verwendet. Die Ergebnisse der SIRAS- und MIRAS-Untersuchungen der diversen Programme sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Um Aussagen über die Signifikanz bestimmter Kennzahlen beim Vergleich der Phasierungsprogramme zu gewinnen, wurden zwei zusätzliche, systematische Untersuchungen durchgeführt. Zum einen ging es um die Betrachtung der Korrelation des 'figure of merit'  $FOM$  mit der Phasendifferenz zwischen den berechneten MIRAS-Phasen und den Modellphasen für jedes der vier Phasierungsprogramme. Hierdurch sollte ein Gefühl für die Aussagekraft dieser Kennzahl für die 'Qualität' der Phasen entwickelt werden.

Es wurde ein Programm geschrieben, welches den Korrelationskoeffizienten  $K$  zwischen dem  $FOM$  und der Phasendifferenz  $Dphi$  gemäß der folgenden Formel 4.2 berechnet:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n (FOM_i DPhi_i) - 1/n [\sum_{i=1}^n FOM_i \sum_{i=1}^n DPhi_i]}{\sqrt{\sum_{i=1}^n FOM_i^2 - 1/n [\sum_{i=1}^n FOM_i]^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n DPhi_i^2 - 1/n [\sum_{i=1}^n DPhi_i]^2}} \quad (4.2)$$

Hierbei wurde jeweils über alle  $n$  Reflexe des jeweiligen fehlerkorrigierten MIRAS-Phasensatzes summiert oder im Fall von SHARP zusätzlich nur die azentrischen Reflexe mit einbezogen.

Tabelle 4.3: Korrelation des FOM mit der Phasendifferenz

Programm	Gesamt	30-10 Å	10-7 Å	7-5,5 Å	5,5-4,5 Å
MLPHARE	- 0,13	- 0,27	- 0,11	- 0,03	- 0,01
CNS	- 0,03	- 0,34	0,00	+ 0,21	+ 0,12
SOLVE	0,00	- 0,28	+ 0,02	+ 0,18	+ 0,11
SHARP	- 0,18	- 0,25	- 0,14	- 0,19	- 0,13
SHARP (azentrisch)	- 0,19	- 0,28	- 0,16	- 0,19	- 0,13
SHARP/SOLOMON	- 0,30	- 0,15	- 0,27	- 0,30	- 0,29

Anschließend erfolgte eine auflösungsabhängige Betrachtung. Zudem wurde die Korrelation nach einer Dichtemodifikation des SHARP-MIRAS-Phasensatzes untersucht (SHARP/SOLOMON).

Aus der Tabelle 4.3 wird deutlich, daß die Aussagekraft des 'figure of merit' äußerst beschränkt ist. Während im Programm SHARP der *FOM* mit einer durchschnittlichen negativen Korrelation von  $-0,18$  noch einen verhältnismäßig akzeptablen Informationsgehalt hinsichtlich der 'Qualität' der Phasen, d.h. der Differenz zu den Modellphasen, besitzt, liefern die *FOM* der übrigen Programme lediglich in der niedrigen Auflösung akzeptable Ergebnisse. Die ausschließliche Betrachtung der azentrischen Reflexe verbessert die Korrelation nur geringfügig.

Die Auflösungsabhängigkeit der Korrelation des *FOM* von MLPHARE und von SHARP vor und nach der Dichtemodifikation wurden in einem Graphen veranschaulicht. Zum Vergleich ist ebenfalls die mit einem Faktor 0,01 multiplizierte Phasendifferenz der SHARP-MIRAS-Phasen mit den Modellphasen eingezeichnet (Abbildung 4.9).

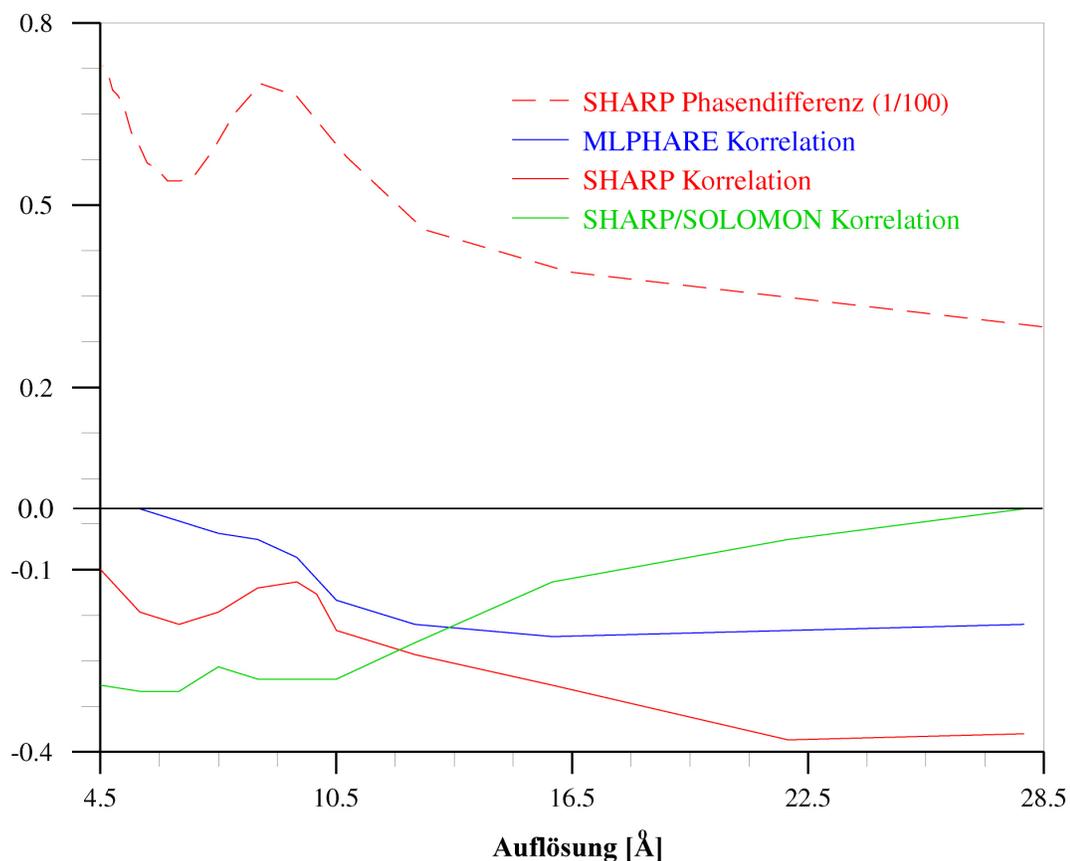


Abbildung 4.9: Korrelation des FOM und der Phasendifferenz im Vergleich

Aus der Abbildung 4.9 wird ersichtlich, daß der Verlauf der Korrelation bei SHARP analog zu dem der Phasendifferenz nach der SHARP-MIRAS-Phasierung ist.

Dies bedeutet, daß die Aussagekraft den *FOM* in denjenigen Auflösungsbereichen besonders gering ist, in denen die Phasenqualität besonders niedrig, d.h. der Phasenfehler besonders hoch ist. Gerade eine solche Korrelation zwischen 'Aussagekraft' des *FOM* und 'Phasenqualität' ist allerdings unerwünscht, da auf dieser Basis kein verlässlicher Informationsgehalt in der Kennzahl 'figure of merit' liegt.

Der Betrag der Korrelation des Programmes SOLOMON ist speziell in der hohen und mittleren Auflösung über einen großen Auflösungsbereich relativ konstant. Der Abfall zur niedrigeren Auflösung läßt sich wahrscheinlich mit der fehlenden 'bulk-solvent' Korrektur zur Berücksichtigung des Lösungsmittelleffekts erklären. Somit ist der *FOM* von SOLOMON im Vergleich der Programme am aussagekräftigsten.

Die zweite Untersuchung zur Signifikanz der Kennzahlen bestand in der Einführung der 'effektiven Auflösung'. Hierzu wurden die zurückgerechneten Phasen des hypothetischen Modells bis 4,5 Å mit Hilfe eines Programms analog zur Modifikation der Strukturfaktoramplituden zur Entwicklung des Fehlermodells verändert. Es wurde versucht, die Mapkorrelation *MC* zwischen der Elektronendichtekarte des Modells und des modifizierten Phasensatzes systematisch zu ändern und dann eine Grenze zu definieren, bei der eine visuelle Interpretation der Dichteverteilung nahezu unmöglich wird.

Bei der Modifikationsprozedur wurde der Cosinus der jeweiligen Phase  $\phi$ , welcher auch in die Berechnung Elektronendichte direkt eingeht, folgendermaßen verändert:

$$\cos(\phi_{mod}) = \cos(\phi) + \cos(\phi) \cdot a \cdot v \quad (4.3)$$

wobei  $v$  eine gaußverteilte Zufallsvariable mit der Standardabweichung 1 und  $a$  eine beliebig wählbare Variable ist. Es ist zu beachten, daß vorerst nur azentrische Phasen modifiziert wurden.

Nach der jeweiligen 'azentrischen' Modifikationsprozedur erfolgte die Berechnung der über den gesamten Datensatz gemittelten Phasendifferenz *Dphi* mit den unmodifizierten Phasen. Mit Hilfe dieser Differenz konnten nun auch die Strukturfaktoren zentrischer Reflexe, welche ja nur Phasen besitzen können, die 180° voneinander entfernt sind, modifiziert werden, indem ein bestimmter Prozentsatz dieser Phasen 'gekippt' wurden. Letztendlich erfolgte die Bestimmung der Mapkorrelation und die visuelle Betrachtung mit dem Programm O.

In Figur 4.10 sind nun ausgewählte Ausschnitte aus den Elektronendichteverteilungen um das Modell herum abgebildet. Die jeweilige Mapkorrelation *MC* ist der Abbildungsbetitelung zu entnehmen. Die zugeordneten Phasendifferenzen ergeben sich zu a)  $Dphi=0^\circ$  b)  $Dphi=59^\circ$  c)  $Dphi=64^\circ$  d)  $Dphi=68^\circ$  e)  $Dphi=71^\circ$ .

Nach einer näheren Analyse der jeweiligen Elektronendichte ergab sich, daß die Grenze der Interpretierbarkeit bei einer Mapkorrelation von ungefähr 0,30 liegt. Trotz der Subjektivität dieser Grenze kann man als Interpretierbarkeit die Möglichkeit definieren, den Verlauf der RNA verfolgen zu können. Betrachtet man den Verlauf der Modellhelix in der Abbildung 4.10 und speziell die Dichte, welche der Base eines Nukleotiden entspricht (roter Pfeil), so wird deutlich, daß diese Grenze zwischen Bild c) und d) liegt. Die Dichte aus Abschnitt e) ist definitiv nicht mehr interpretierbar.

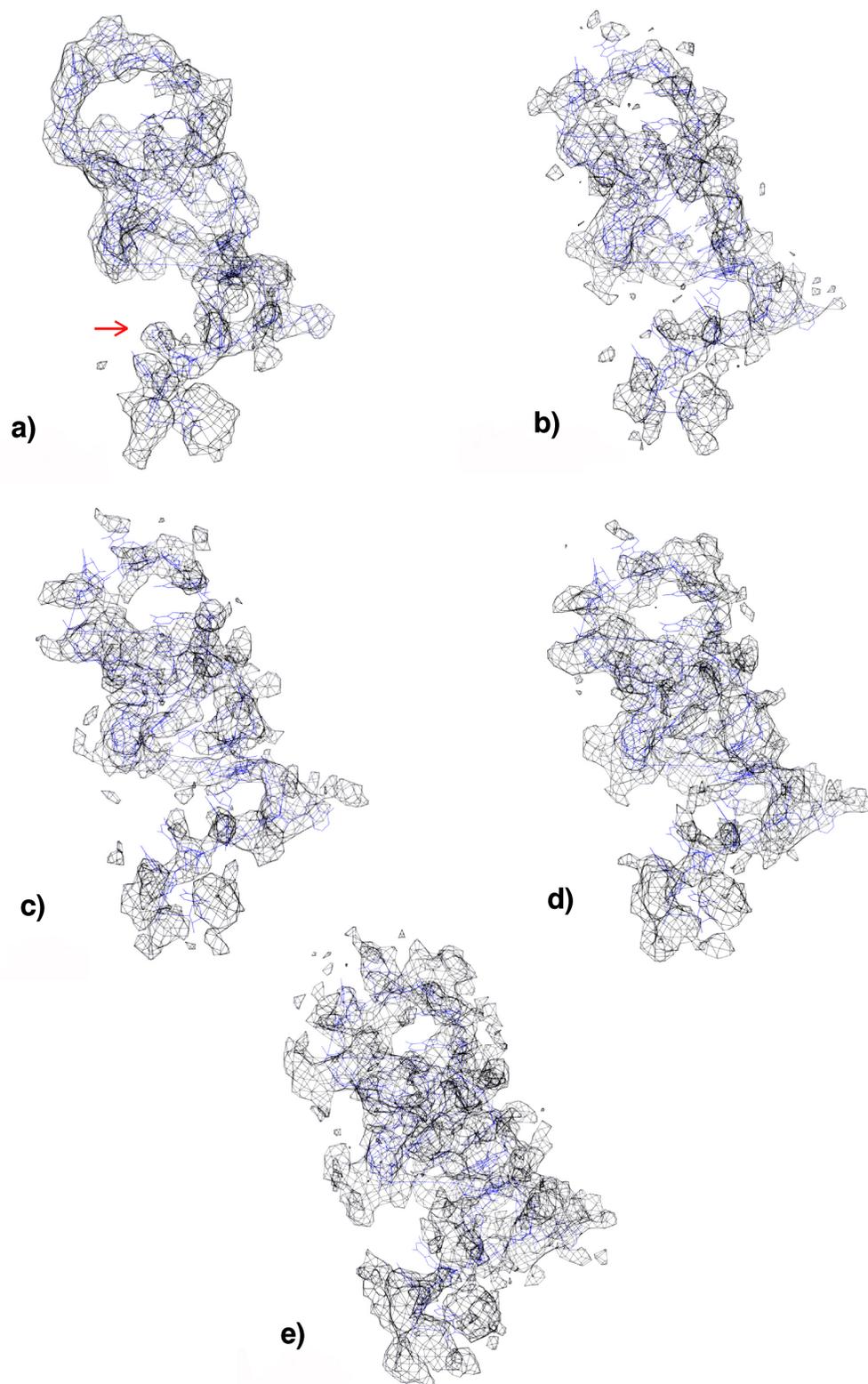


Abbildung 4.10: Ausschnitte aus den phasenkorrigierten Dichtekarten a)  $MC=1,0$  b)  $MC=0,40$  c)  $MC=0,35$  d)  $MC=0,30$  e)  $MC=0,25$

Hierbei ist nicht zu vergessen, daß eine Reduktion auf zwei Dimensionen immer ein Verlust von Information bedeutet und daß die dargestellten Elektronendichten mit einem Radius von 6 Å um das Modell herum ausgeschnitten wurden und somit der Blick für die Gesamtheit verloren geht.

Mit diesem Ergebnis ist es nun möglich, eine Interpretierbarkeitsgrenze hinsichtlich der Phasendifferenz von ungefähr  $68^\circ$  festzulegen und somit eine 'effektive Auflösung' zu definieren. Die 'effektive Auflösung' wird hier definiert als:

$$d_{eff} = \text{Min}(d_{(hkl)} | \overline{DPHi}(d_{(hkl)}) \leq 68^\circ) \quad (4.4)$$

wobei  $d_{(hkl)}$  die Bragg-Auflösung in Angström und  $\overline{DPHi}(d_{(hkl)})$  die mittlere Phasendifferenz in einem Intervall um  $d_{(hkl)}$  ist. Diese neue Kennzahl entspricht grob der Distanz, die in der resultierenden Elektronendichte noch aufzulösen, d.h. zu erkennen ist.

Die Tabelle 4.2 zeigt, daß die besten Ergebnisse aller Phasierungsversuche im Allgemeinen mit dem Programm SHARP erzielt wurden. Lediglich im Fall von Holmium-SIRAS war CNS am vielversprechendsten. Es fällt auf, daß der *FOM* kein guter Indikator für die Phasenqualität beim Vergleich der Programme ist, da hierbei SOLVE/HEAVY den höchsten Wert aufweist. Der *FOM* ist stark abhängig vom verwendeten Programm und wird beeinflußt von der Schweratomverteilung, da z.B. auftretende, gemeinsame Schweratompositionen in verschiedenen Derivaten zu einer Erhöhung dieser Kennzahl führen. Zudem konnte gezeigt werden, daß der 'figure of merit' der jeweiligen Programme ziemlich fragwürdig und von eher geringer Aussagekraft ist. Auch beim Vergleich der Phasierungsprogramme bot sich die Mapkorrelation als signifikanteste Maßzahl an, da der Blick in die produzierte Elektronendichten eine direkte Korrelation zur Dichteverteilung deutlich machte. Abbildungen der jeweiligen Elektronendichteverteilungen sollen im Fall der simulierten Daten nicht näher betrachtet werden; es wird hierbei auf spätere Ausführungen im Rahmen der experimentellen Daten verwiesen. Außerdem ließ sich mit der Definition 4.4 die 'effektive Auflösung' der fehlerkorrigierten MIRAS-Phasierung von SHARP zu  $d_{eff} = 5,6$  bestimmen, wohingegen  $d_{eff}$  der MIRAS-Phasierung der übrigen Programme eher bei 10 liegt.

Es kann noch kurz auf die auffällige Relevanz der W18 Phasierung im fehlerkorrigierten Fall hingewiesen werden: die sich anhand der Mapkorrelation *MC* ergebende Rangfolge der Programme hinsichtlich Phasen- bzw. Elektronendichtequalität SHARP – MLPHARE – SOLVE – CNS ist analog zur Reihenfolge der W18-SIRAS Phasierung jedoch nicht konform mit dem Holmium-SIRAS Ergebnis. Dies weist auf die Bedeutung der Behandlung des Clusters bei der Phasierung hin.

Um einen Eindruck von der Auflösungsabhängigkeit der Korrelationen zu erhalten, wurden in der Grafik 4.11 die Phasendifferenzen der fehlerkorrigierten MIRAS-Phasierungen dargestellt.

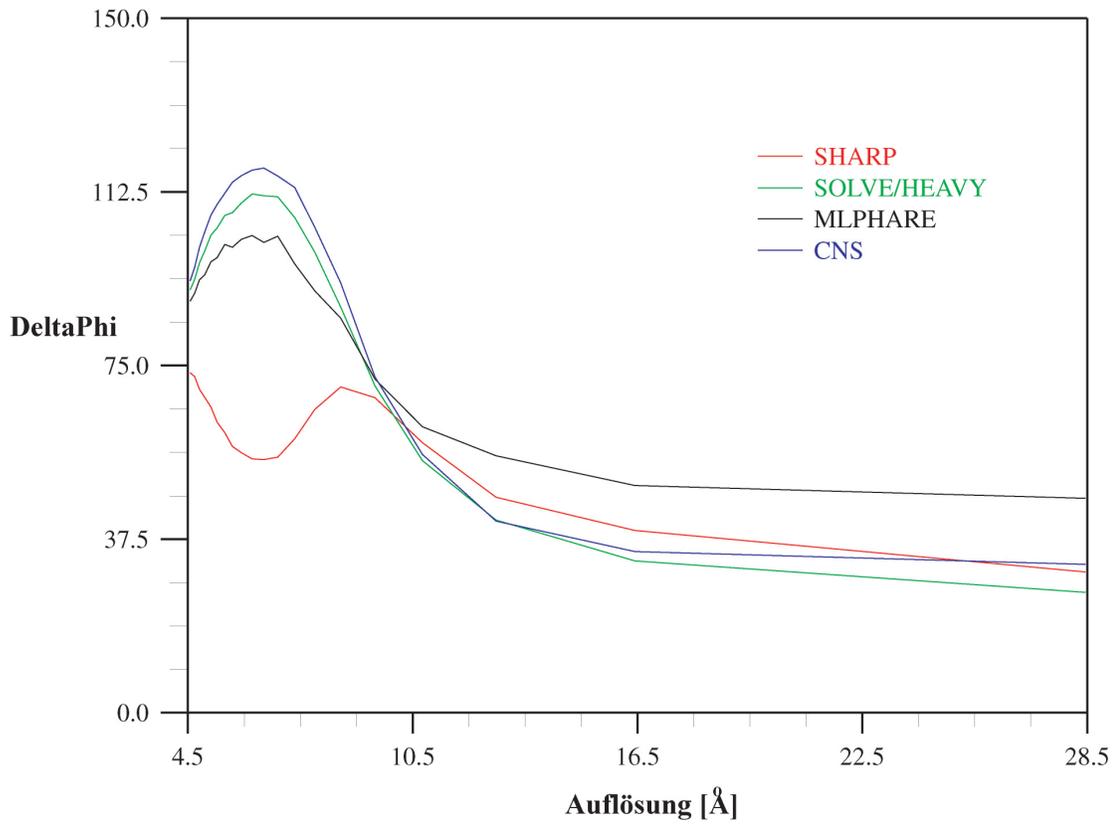


Abbildung 4.11: MIRAS-Phasierung fehlerkorrigierter simulierter Daten

Am deutlichsten ist die relativ niedrige Phasendifferenz bei der Phasierung mit SHARP im Bereich zwischen 4,5 und 10 Å. Es ist zu erwarten, daß in diesem Auflösungsbereich im Vergleich zu den übrigen Programmen die mit SHARP berechneten Phasen das Modell am besten beschreiben. Hier hebt sich die Qualität der Phasen somit extrem von denen der anderen Programme ab, wobei in niedriger Auflösung die Unterschiede marginal sind. Die maximalen Phasenunterschiede im Vergleich mit den Modellphasen liegen in der hohen Auflösung und bei ca. 8 Å, wobei die höchste Phasenqualität in der niedrigen Auflösung und bei ca. 6,5 Å zu finden ist. Damit entspricht der s-förmige Verlauf dem invertierten u-förmigen Form der Skalierungsergebnisse. Dieser Verlauf kann im Fall der anderen Phasierungsprogramme, von denen MLPHARE bis 10 Å die besten Ergebnisse liefert, nicht beobachtet werden.

Der Vorteil von SHARP liegt hierbei insbesondere in der Handhabung des W18-Clusters: während die übrigen Programme einerseits neun Koeffizienten zur Formfaktorbestimmung des Clusters benötigen und andererseits nur einen konstanten Wert für  $f''_{w18}$  zulassen, berechnet SHARP aus der Geometrie und Zusammensetzung des Clusters die Näherung des Formfaktors und auch  $f''_{w18}$  selbst. Gerade die begrenzte Handhabung und die Auflösungsunabhängigkeit von  $f''$  im Fall der anderen Programme führt zu Problemen bei der Benutzung des anomalen Signals eines Schweratomclusters.

Da die Näherung von  $f''_{w18}$  als Summe der einzelnen Wolframatomformfaktoren nur in niedriger Auflösung legitim ist, führen die Phasierungsprogramme, mit Ausnahme von SHARP, nur in diesem Bereich zu befriedigenden Ergebnissen.

Ausschließlich die Phasierung mit SHARP führt zu dem erwarteten Verlauf der Phasenunterschiede, invers zum Graphen aus Abbildung 4.4 und 4.5. Dort, wo die relativen isomorphen bzw. anomalen Differenzen am größten sind, ist eine bessere Phasenqualität zu erwarten. Hierbei scheint, wie schon vorher vermutet, das Verhalten des W18-Clusters das Ergebnis äußerst stark zu dominieren.

Betrachtet man die Phasendifferenzen der fehlerfreien W18-SIRAS Untersuchungen genauer (siehe Figur 4.12), so erkennt man tendenziell denselben Verlauf der Graphen wie in der vorhergehenden Abbildung. Somit resultiert der Unterschied in der Phasenqualität eindeutig aus der Handhabung des Clusters.

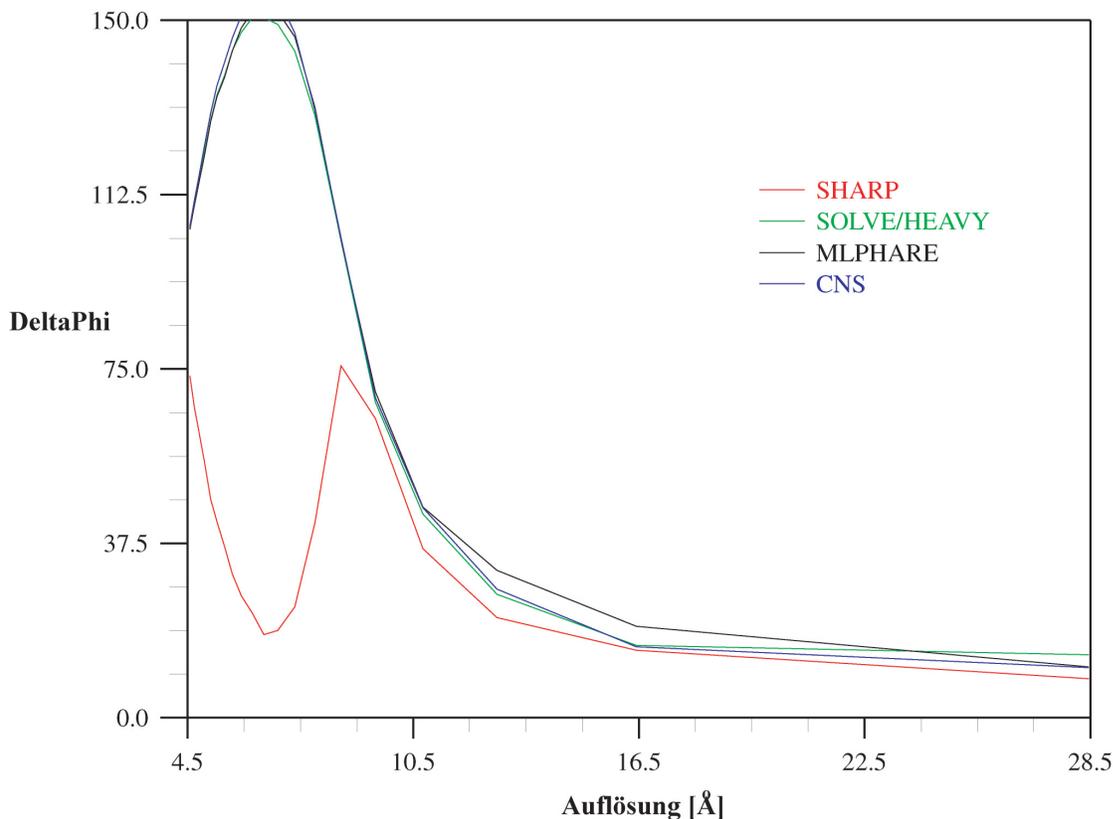


Abbildung 4.12: Phasierung simulierter, fehlerfreier W18-Daten

Im Folgenden sollen die Phasierungsergebnisse für das vielversprechenste Programm SHARP noch näher beleuchtet werden.

Anhand der Graphik 4.13, welche  $DPhi$  in Abhängigkeit von der Auflösung im Fall der Phasierung mit SHARP darstellt, kann man neben dem s-förmigen Verlauf der beiden W18-SIRAS Ergebnisse auch die relativ konstante Phasendifferenz der Holmium-SIRAS Untersuchungen erkennen. Das sehr gute Ergebnis im fehlerfreien Fall steht im Gegensatz zur schlechten Phasenqualität bei der Betrachtung der Fehlerkorrektur.

Hierbei wird deutlich, welchen großen Einfluß der Fehler auf das Phasierungsergebnis im Fall von Einzelschweratomen haben kann. Eine Phasierung nur mit Einzelatom-Derivaten ist in der Ribosomenkristallographie im Allgemeinen nur bedingt zur Strukturbestimmung geeignet und nur dann sinnvoll, wenn sehr viele Atome spezifisch gebunden sind und auch lokalisiert werden können und somit ein signifikantes Signal liefern.

Bei der fehlerfreien MIRAS-Phasierung kann man einen Anstieg der Phasendifferenz im Bereich hoher Auflösung ab ca. 8 Å erkennen. Dieses deutet darauf hin, daß aufgrund der Näherung des sphärischen Durchschnitts bei der Behandlung von W18 die Phasen in diesem Bereich auch im nahezu fehlerfreien MIRAS-Fall negativ beeinflusst werden.

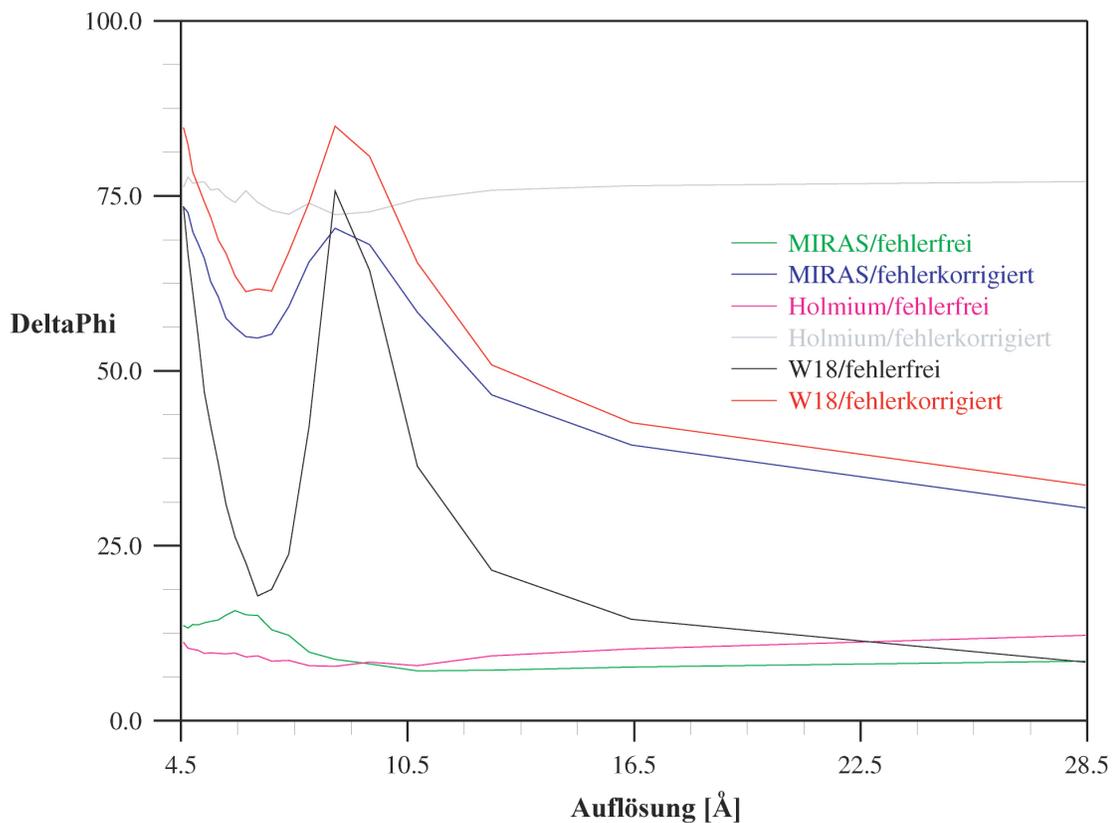


Abbildung 4.13: Phasierung simulierter Daten mit SHARP

Vergleicht man die fehlerkorrigierte W18-SIRAS Untersuchung mit der fehlerfreien, so fällt ein drastischer Abfall der Phasenqualität um ca. 6,5 Å herum auf. Außerdem ist beim Vergleich mit der fehlerkorrigierten MIRAS-Phasierung nur ein relativ kleiner Qualitätsgewinn zu verzeichnen.

Der Abfall der Phasenqualität erklärt sich durch die, relativ zum Strukturfaktorbetrag gesehen, größeren Fehler in der höheren Auflösung. Gerade im Bereich um 6,5 Å, wo die Phasen am besten bestimmt waren, fällt die Fehlerkorrektur besonders ins Gewicht.

Der Qualitätsgewinn zwischen der SIRAS- und MIRAS-Phasierung im fehlerkorrigierten Fall zeigt einen durchaus existierenden, wenn auch nicht dominierenden Einfluß des Einzelatomderivates auf die Phasenqualität. Dies macht deutlich, daß Einzelschweratome trotz ihrer signifikanten Problemen bei der Lokalisation und ihrem nur bedingten Potential bei der SIRAS-Phasierung in der Ribosomenkristallographie durchaus zur Verbesserung des Phasierungsergebnisses bei MIRAS-Untersuchungen in Verbindung mit Clustern führen können. Jedoch dominiert der Einfluß des Clusters aufgrund des deutlich größeren anomalen und isomorphen Signals.

Die Untersuchungen mit simulierten Strukturfaktordaten führte letztendlich zu einer bestmöglichen Phasierungsprozedur mit dem Programm SHARP, welche es nun anhand von experimentellen Daten zu verifizieren galt. Während eine Phasierung der realen Meßdaten im Vorfeld zu keiner befriedigend interpretierbaren Elektronendichte führte, stand nun ein optimiertes Verfahren zur Verfügung, welche die Basis für weitere Vorgehensweisen bildete und den Rahmen für die Strukturuntersuchung an der ribosomalen Untereinheit T30S speziell unter Verwendung von Clustern zur Derivatisierung absteckte.

## 4.3 Phasierung experimenteller Daten

In diesem Kapitel soll die Phasierung mit experimentellen Daten dargestellt werden. Hierbei wurden die Simulationsergebnisse als essentielle Grundlage verwendet und versucht, sie anhand realer Meßdaten zu bestätigen und zu erweitern. Die Resultate der Skalierung und der Schweratomlokalisierung mit Hilfe von simulierten Daten gaben wichtige Hinweise auf die Vorgehensweisen und Begrenzungen bei den der experimentellen Phasierung vorgelegten Schritten, wie z.B. Datenselektion und Schweratomlokalisierung.

Zuerst erfolgt die Betrachtung der vergleichenden Untersuchungen anhand der diversen Phasierungsprogramme analog zur Behandlung der simulierten Daten; darauffolgend soll auf die anschließende beste Phasierung, welche letztendlich zur Identifikation der Clusterorientierung und somit zur Strukturaufklärung führte, eingegangen werden.

Zum Vergleich wurden wiederum Phasierung und Schweratompositionsverfeinerung mit den Programmen SHARP, SOLVE/HEAVY, MLPHARE und CNS durchgeführt. Es wurden die in Tabelle 4.1 aufgelisteten fünf Datensätze verwendet und sowohl bei den 'Watives' als auch beim Tantal-Bromid-Derivat (*TaBr*) und Tetra-Iridiumcluster (*Irg*) die Näherung des sphärischen Durchschnitts gewählt. Als nativer Satz von Strukturparametern wurde anfangs aus Vergleichszwecken für alle Programme der Backsoak *BS* verwendet und das vorliegende anomale Signal aller Derivate bei der Phasierung berücksichtigt. Lediglich beim *TaBr*-Datensatz gingen nur isomorphe Differenzen in die Berechnung ein. Phasiert wurde hierfür zwischen 4,5 und 30 Å, und  $f''$  wurde näherungsweise als Summe der anomalen Wolframatomformfaktoren der betreffenden Wellenlänge angesetzt und dann verfeinert. Im Programm SHARP wurde entsprechend der Atomformfaktor von Wolfram, bzw. den anderen Schweratomen, vorgegeben.

Die verwendeten Schweratompositionen stammten aus diversen Patterson- und Fourier-Untersuchungen. Insgesamt wurden bei der Phasierung für alle vier Derivate acht W18-Positionen und für *Irg* und *TaBr* jeweils vier Positionen verwendet, wobei hier natürlich zusätzlich auch die acht Wolframclusterpositionen angenommen werden mussten.

Die optimale Parametrisierung wurde von den vorher durchgeführten Simulationsuntersuchungen übernommen und angepaßt. Hierbei konnten die gesammelten und getesteten Erfahrungen mit den diversen Programmen speziell bezüglich der Verfeinerungsprozeduren (z.B. vorgelagerte isomorphe Verfeinerung vor Verwendung des anomalen Signals, Anzahl und Art der verfeinerten Parameter, Reihenfolge der Parameterverfeinerung) bei der Phasierung experimenteller Daten helfen und einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur Strukturbestimmung schaffen.

Auf der Basis der Ergebnissen der Simulation wurde nun also versucht, die jeweilige Phasierungsprozedur weiter zu verbessern, mit dem primären Ziel, die resultierende Elektronendichteverteilung visuell bestmöglichst interpretieren zu können. Da diese Vorgehensweise äußerst subjektiv und teilweise schwer durchzuführen war, wurde im Verlauf der Analyse zudem die Korrelation mit einer Referenz betrachtet.

Als Referenz diente hier das verfeinerte Modell der kleinen Untereinheit T30S. Mit dem Programm SFALL wurden wiederum die Phasen zurückgerechnet und dann auch zur Bestimmung der Referenzelektronendichte verwendet. Dieses stellte unabhängig vom verwendeten Programm eine gute Vergleichsbasis dar. Hierbei soll darauf verwiesen, daß der visuelle Vergleich der Elektronendichten im Vordergrund stand und die Referenz zur Bestimmung von Korrelationen nur ein Hilfsmittel zum Vergleich darstellte, welches letztendlich nur im Nachhinein eine Bestätigung der Ergebnisse lieferte.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Phasierung mit experimentellen Daten

Phasensatz	PC	DPhi	PC <sub>d</sub>	DPhi <sub>d</sub>	MC <sub>d</sub>	FOM	FOM <sub>d</sub>	d <sub>eff</sub>
<b>SHARP</b>								
MIRAS-BS	0,55	82,6	0,61	72,9	0,46	0,34	0,81	6,8
MIRAS-W	0,56	81,3	0,62	71,1	0,50	0,41	0,82	6,4
<b>SOLVE/HEAVY</b>								
MIRAS-BS	0,52	89,3	0,52	89,3	0,21	0,52	0,78	10,5
<b>MLPHARE</b>								
MIRAS-BS	0,51	91,8	0,51	91,8	0,22	0,40	0,77	10,3
<b>CNS</b>								
MIRAS-BS	0,51	90,6	0,51	90,4	0,12	0,42	0,76	-

In der Tabelle 4.4 sind sowohl die Phasendifferenzen als auch die Phasenkorrelation mit ( $PC_d$ ) und ohne ( $PC$ ) anschließender Dichtemodifikation, die Map-Korrelation mit Modifikation, die 'figure of merits'  $FOM$  und die 'effektive Auflösung'  $d_{eff}$  aufgelistet. Es wurde hierbei die spezielle Dichtemodifikationsprozedur verwendet, auf die weiter oben schon näher eingegangen worden ist.

Ergänzend zu den eben beschriebenen MIRAS-Untersuchungen für alle Phasierungsprogramme mit dem Backsoak als nativem Satz (MIRAS-BS) wurde für SHARP zusätzlich der Strukturfaktoramplitudensatz  $Wid14$  (siehe Tabelle 4.1) als Datenreferenz verwendet (MIRAS-W), da dieser die beste Datenqualität bis in hohe Auflösungen besaß und daher eine potentiell bessere Referenz darstellte.

Zudem wurden bei dieser MIRAS-W-Phasierung W18-Cluster Positionen für alle Datensätze mit angegeben, ebenso für  $Wid14$  als Bezugsdatensatz wie auch für den nun als Derivat fungierenden Backsoak-Datensatz  $BS$ . Im Strukturfaktoramplitudensatz  $BS$  wurden sieben W18-Sites und nun auch das anomale Signal verwendet.

SHARP war das einzige Programm, welches diese Optionen zuließ, da hier einerseits der Referenzdatensatz nicht zwingend als nativ, d.h. ohne Schweratome, betrachtet werden muß und andererseits auch Derivate mit geringerer Besetzungsdichte als Referenz verwendet werden können.

Wie aus der Tabelle 4.4 deutlich wird und auch mit Hilfe der Graphik 4.16 zu erkennen ist, produziert die Phasierung mit SHARP die besten Ergebnisse. Die Phasenkorrelation, die signifikante Mapkorrelation und die weiter oben eingeführte 'effektive Auflösung' machen deutlich, daß für die Ribosomenkristallographie unter Verwendung von Schweratomclustern SHARP den anderen Programmen überlegen ist. Hierdurch konnte das Ergebnis der Simulation bestätigt werden. Es fällt auf, daß die Verwendung der Dichtemodifikation nur beim Programm SHARP eine signifikante Änderung der Kennzahlen mit sich bringt. Auch hier ist wiederum der FOM mit Vorsicht zu genießen und keinesfalls bei Programmvergleichen zu Rate zu ziehen, da u.a. die Wolframclusterposition in allen Derivaten übereinstimmen und neben den programmspezifischen Unterschieden zu einer Verbesserung und somit Verzerrung dieser Kennzahl führen. Lediglich die Kennzahl  $FOM_d$  aus SOLOMON zeigt eine Tendenz beim Programmvergleich auf.

Die Untersuchung mit *Wid14* als nativ und unter Berücksichtigung aller W18-Cluster (MIRAS-W) ergab eine zusätzliche Verbesserung der Phasenqualität und wurde desweiteren, wie spätere näher erläutert wird, als Brücke vom sphärischen Durchschnitt zur Betrachtung der Clusters als einzelne Punktstreuer verwendet.

Die Graphik 4.14 zeigt grob denselben auflösungsabhängigen Verlauf der Phasenunterschiede wie im Fall der Simulation, wobei allerdings das Minimum und die Maxima des SHARP-Graphen weitaus weniger stark ausgeprägt sind. Bei dieser Darstellung der dichtemodifizierten Ergebnisse zeigt sich selbst in der niedrigen Auflösung die Rangfolge der Elektronendichtequalitäten im Vergleich der Programme, wie sie auch schon aus den Kennzahlen  $MC_d$  und  $d_{eff}$  zu ersehen war. Es werden speziell im Bereich ab 9 Å die niedrigeren Phasenunterschiede bei Benutzung des Programmes SHARP deutlich. Hier treten die Maxima bei 4,5 und 8,5 Å und das lokale Minimum bei ca. 7 Å auf. Es ist zu erkennen, daß sich die bei der Simulation erlangten Ergebnisse im Fall von experimentellen Daten bestätigten; lediglich der Einfluß des Fehlers bzw. der Unzulänglichkeiten der Approximation in hoher Auflösung fällt stärker als erwartet aus.

Bei der speziellen Betrachtung der Phasenunterschiede bei der Phasierung mit SHARP in Abbildung 4.15 wird der Einfluß der Dichtemodifikation auf das Ergebnis deutlich. Obwohl der Verlauf der Graphen analog ist, liefert die modifizierte Prozedur weitaus niedrigere Phasenunterschiede als die normale SOLOMON Dichtemodifikation. Zudem kann man die 'effektiven Auflösungen' von MIRAS mit SOLOMON zu  $d_{eff} = 10,4$  und von MIRAS mit der modifizierten SOLOMON Prozedur zu  $d_{eff} = 6,8$  bestimmen. Dieses zeigt, daß die sukzessive Betrachtungsweise der niedrigen Auflösungssterne in den ersten Modifikationszyklen im Fall der Verwendung von Schweratomclustern zu einer verbesserten Phasenqualität führte. Wie zu erwarten, kann man beim Ergebnis ohne Dichtemodifikation eine weitere Verschlechterung der Phasen erkennen (MIRAS ohne SOLOMON  $d_{eff} = 11,2$ ).

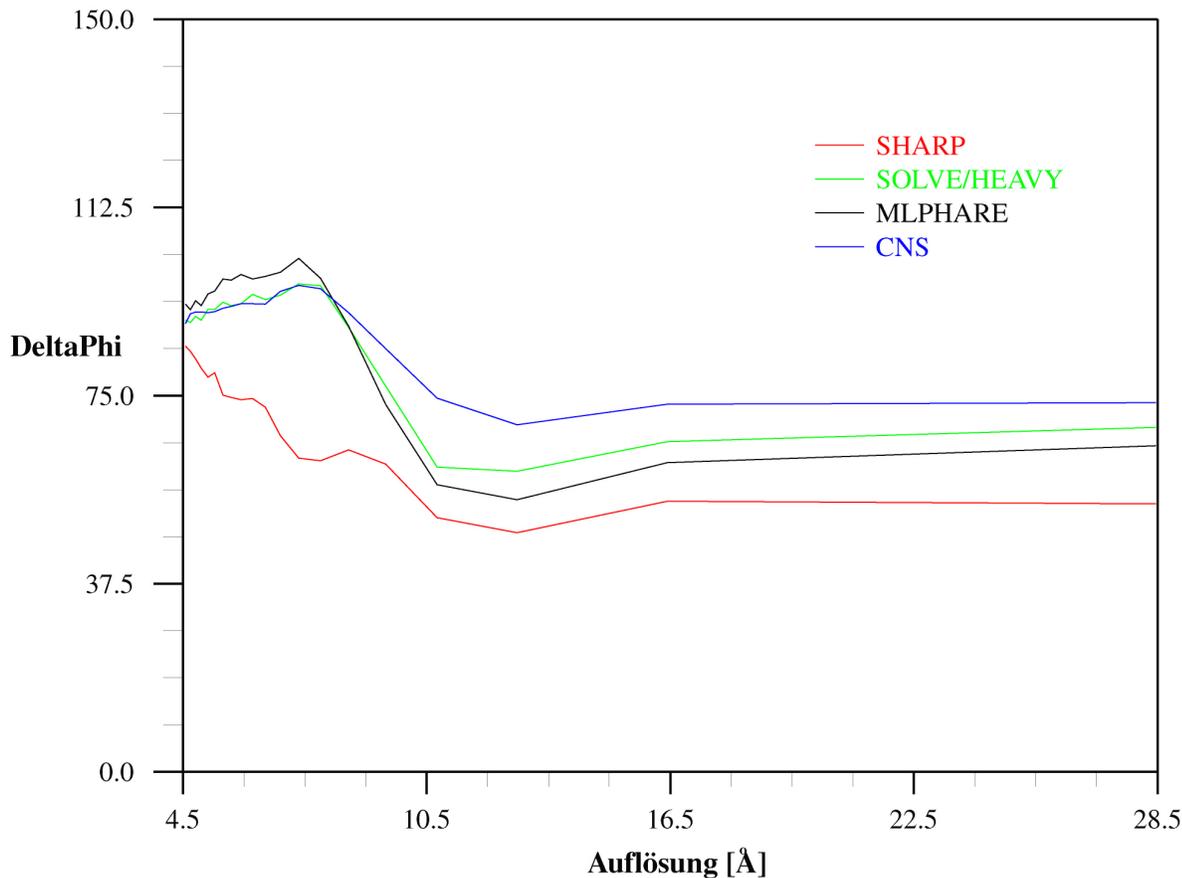


Abbildung 4.14: MIRAS-Phasierung experimenteller Daten

Die Simulationsergebnisse sind zum Vergleich in die Abbildung mit eingezeichnet und es fällt lediglich in der niedrigen Auflösung und um 6 Å ein leichtes Abweichen vom typischen Verlauf auf. Desweiteren wird deutlich, daß das anomale Signal im vorliegenden Fall bei der Phasierung eine große Rolle spielte und zu einer deutlichen Verbesserung der Phasen führte. Im Übrigen war hierbei eine Interpretation der resultierenden MIR-Elektronendichtekarte unmöglich, welches zusätzlich durch die minimale Phasendifferenz von  $71^\circ$  belegt wird. Dieses macht die Notwendigkeit der Existenz von anomalen Streuern und der Nutzung des anomalen Signals bei diesen kristallographischen Untersuchungen deutlich und hebt noch einmal den primären Vorteil von SHARP gegenüber den anderen verwendeten Phasierungsprogrammen hervor: die Handhabung des anomalen Clusterformfaktors.

Da der Vergleich der Phasierungsergebnisse in erster Linie auf der Basis der Qualität der Elektronendichteverteilungen vorgenommen wurde, sollen sie an dieser Stelle dargestellt werden. In Abbildung 4.16 sind Auschnitte der aus den Programmen MLPHARE, SOLVE/HEAVY und SHARP resultierenden Dichtemaps der Region um Helix 23 abgebildet. Alle Dichten resultieren aus der MIRAS-BS-Phasierung zwischen 4,5 und 30 Å.

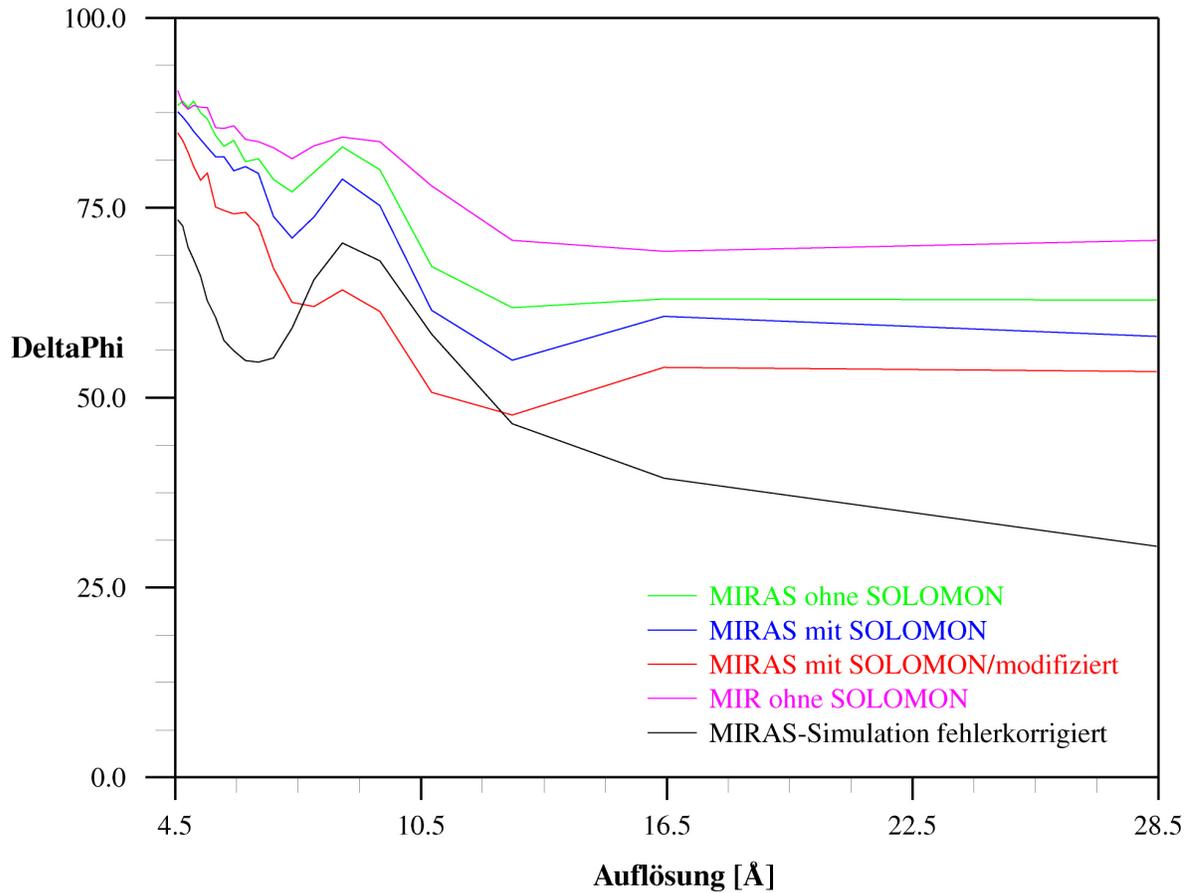


Abbildung 4.15: Phasierung experimenteller Daten mit SHARP

Es wurde zusätzlich die spezielle Dichtemodifikation angewendet. Das Modell der RNA wurde ebenfalls eingezeichnet (blau), um die Darstellung, welche mit RIBBONS ([Carson, 1997]) produziert wurde, zu verdeutlichen.

Während alle Ergebnisse eine grobe Modellierung der RNA zuließen, ist die Elektronendichte im Fall von SHARP regelmäßiger und durchgängiger. Trotz der begrenzten Auflösung und der Näherung ließ sich die Elektronendichte hinsichtlich dem Verlauf der RNA ohne Probleme interpretieren. Trotz der zweidimensionalen Darstellung kann man die Defizite und Lücken der beiden oberen Dichten erkennen, welches auf die geringere Phasenqualität hindeutet. Bei Betrachtung anderer Bereiche der Elektronendichte, speziell auch Proteinregionen und der ganzheitlichen Qualitätsbeurteilung, wurde die bessere Interpretierbarkeit der Dichte bei einer Phasierung mit der optimierten SHARP-Prozedur noch deutlicher. Aufgrund dieses Ergebnisses, das sich durch den Phasenvergleich mit einer später gewählten Referenz bestätigte, wurde in dieser Arbeit die weitere Phasierung mit SHARP als Phasierungsprogramm durchgeführt.

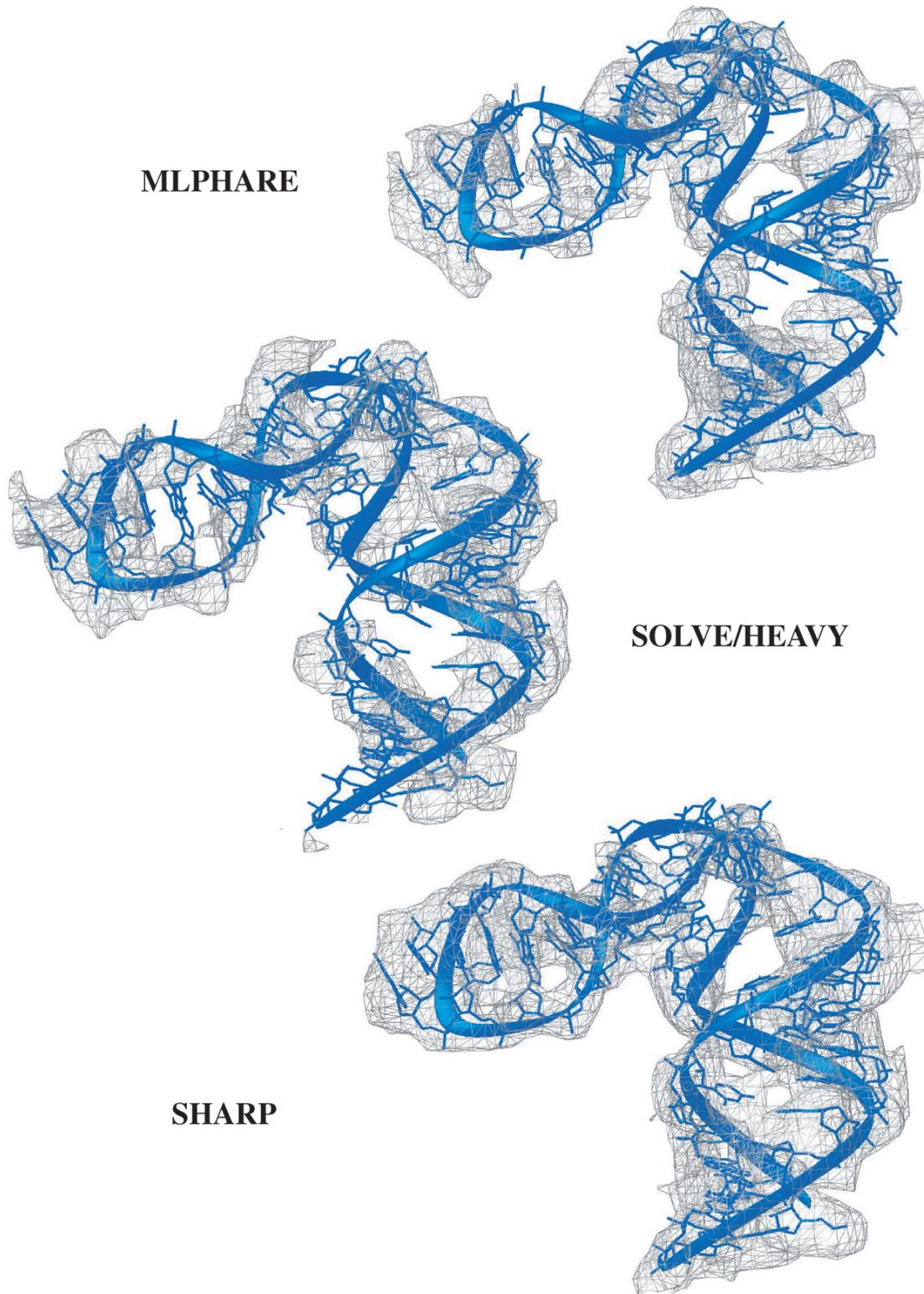


Abbildung 4.16: Ausschnitte aus diversen Elektronendichten von H23

Letztendlich konnte also auf der Basis der durchgeführten Simulation, welche die optimalen Parameter bei der Phasierung zugänglich machte und somit erstmals die Berechnung interpretierbarer Elektronendichteverteilungen ermöglichte, der Ausgangspunkt für die Modellierung der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S gelegt werden. Es konnte gezeigt werden, daß eine optimale Wahl der Parameter und der Phasierungsprozeduren gerade bei der Verwendung von Schweratomclustern zur Derivatisierung unerlässlich ist, um den Schritt von der Datenmessung und Schweratomlokalisierung zur Modellierung und Strukturbestimmung zu tätigen.

Es wurde anschließend versucht, die Phasen weiter zu optimieren. Hierbei sollte die Auflösung der verwendeten Daten zuerst beibehalten werden; der Datensatz *Wid14* wurde als Referenz genutzt (MIRAS-W). Zusätzlich konnten nun alle W18 Positionen zur Phasierung verwendet werden und ebenso gingen anomale Differenzen aller Datensätze mit in die Phasierung ein. Es handelt sich also um eine Betrachtung aller Strukturfaktorsätze als Derivate, wobei lediglich einer zusätzlich als Referenz fungiert.

Das Ergebnis ist in Tabelle 4.4 und in Abbildung 4.17 dargestellt. In der Abbildung sind wiederum Ausschnitte um Helix 23 der Elektronendichte bei der Phasierung mit SHARP zu sehen. Das obere Bild (a) stellt das Ergebnis mit der Näherung der sphärischen Durchschnitts nach der speziellen Dichtemodifikation dar. In der Mitte (b) ist zum Vergleich das Ergebnis mit der normalen SOLOMON Modifikation zu erkennen und unten (c) wurden im Gegensatz dazu nun die W18-Cluster bei der Phasierung als 18 Punktstreuer betrachtet. Die Orientierung der Cluster gelang durch visuelle Inspektion der Elektronendichte. Hierbei wurde ebenfalls die spezielle Modifikationsprozedur benutzt.

Es wird in Abbildung 4.17 deutlich, daß die spezielle Dichtemodifikation eine Interpretation der Dichte erst umfassend möglich machte; die Verteilung in b) ist zu lückenhaft, um eine eindeutige Modellierung in allen Bereichen der Dichtekarte durchzuführen. Es fällt auf, daß die Elektronendichten in Teil a) und c) schon detailreicher sind als in Figur 4.16, wobei c) die beste Qualität aufweist.

Um die W18-Cluster zu orientieren und somit eine Betrachtung auf der Basis der Einzelatome zu ermöglichen, wurde die MIRAS-W Elektronendichte untersucht. Es war möglich, die bekannte, ovale Geometrie der Schweratomcluster in der Dichtekarte zu plazieren, wie in Abbildung 4.18 zu erkennen ist.

Diese Orientierung gelang zunächst für insgesamt vier Wolframcluster, da aus der Verwendung des *Wid14*-Datensatzes als Referenz größtenteils eindeutig ovale W18-Dichteregionen resultierten. Die Tantal-Bromid- und Iridium-Cluster sowie die übrigen Wolframcluster wurden weiter in der Näherung des sphärischen Durchschnitts betrachtet.

Mit dieser Information konnte nun die Qualität der Elektronendichte weiter verbessert werden, indem die individuellen Wolframatome bei der Phasierung verwendet wurden. Somit konnte ein genaueres Schweratommodell definiert werden, welches auch eine Phasierung in der Nähe der interatomaren Distanzen zuließ. Im nächsten Kapitel wird auf die weitere Ausdehnung des Auflösungsbereiches bis zu 3,3 Å und die darauf folgende Modellierung und Verfeinerung sowie auf die Detektion weiterer W18-Cluster innerhalb der Dichte eingegangen.

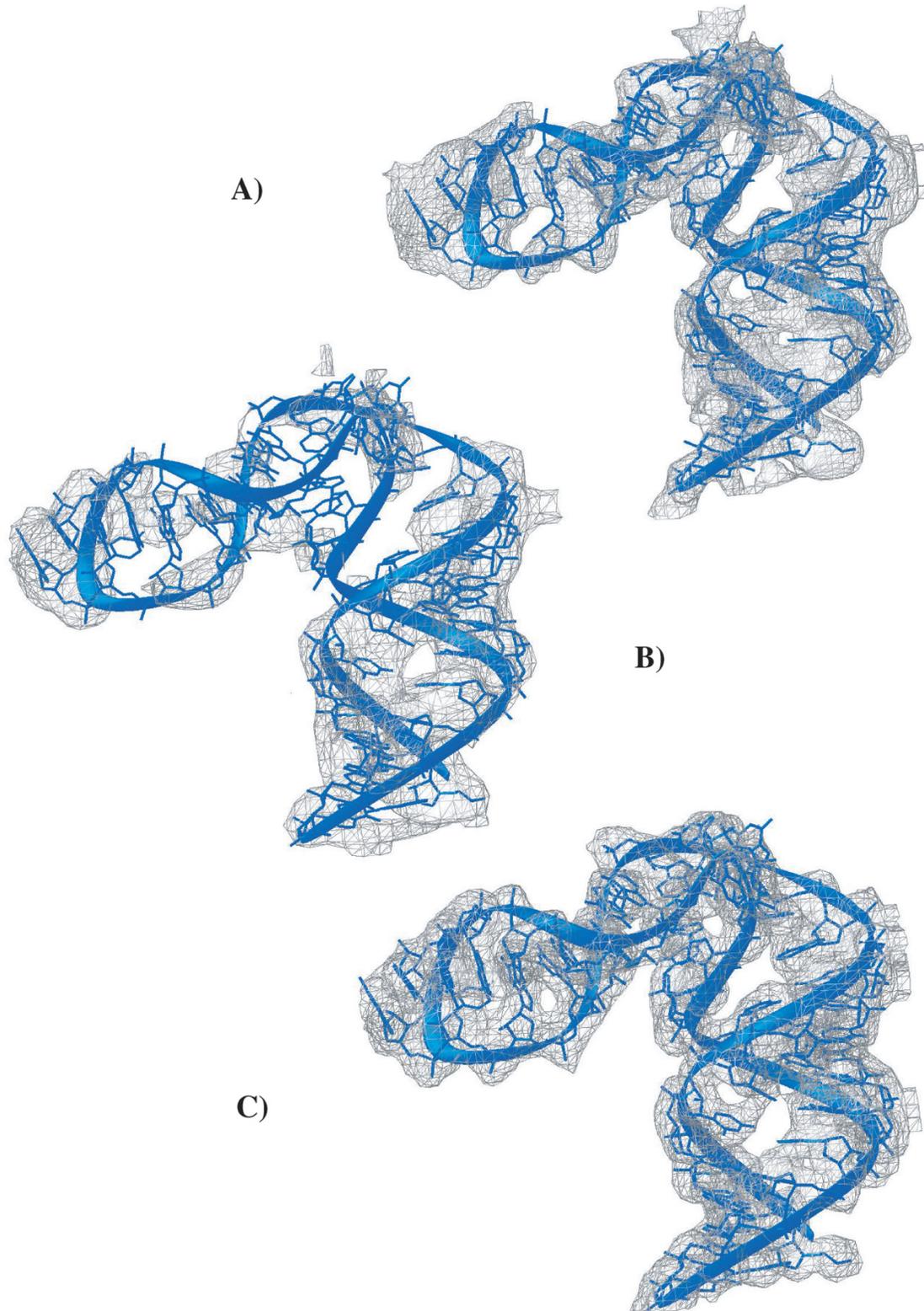


Abbildung 4.17: Ausschnitte aus den Elektronendichten mit SHARP a) MIRAS-W (modifizierte DM) b) MIRAS-W (normale DM) c) MIRAS (W-Einzelatome)

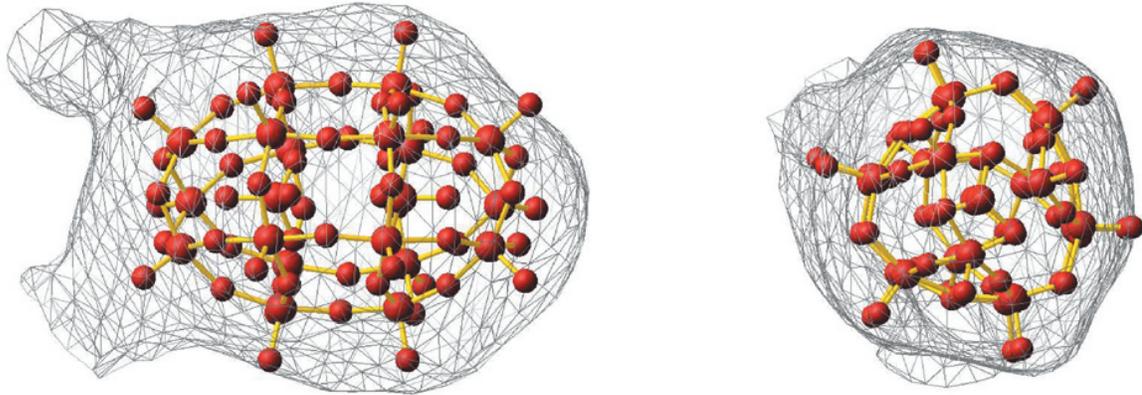


Abbildung 4.18: MIRAS-W Elektronendichte um einen W18-Cluster

Die beschriebenen und diskutierten Ergebnisse machen die Vorteile aber auch die Probleme durch Benutzung von W18-Cluster bei der ribosomalen Strukturbestimmung deutlich. Neben der Stabilisierung der Ribosomen im Kristall [Tocij *et al.*, 1999], bieten sie zudem bessere Lokalisationsmöglichkeiten bei hohem Signal, welches gerade im Fall von zahlreichen Fehlerquellen von großer Bedeutung ist. Allerdings treten neben der Überschattung von schwächeren Einzelatomsignalen spezielle Probleme bei der Phasierung und der Dichtemodifikation auf. Während im ersten Fall die Behandlung des Clusters im Näherungsfall speziell bezogen auf das anomale Signal Probleme macht, da eine Identifizierung individueller Atome nicht ohne weiteres möglich ist, leidet im zweiten Fall die Interpretierbarkeit der Dichteverteilung aufgrund der hohen Elektronendichte des Clusters.

Unter diesen Voraussetzungen und den eben genannten Problemen ist SHARP zur Phasierung der Strukturfaktordaten von allen untersuchten Programmen am besten geeignet und wurde daher zur Strukturbestimmung verwendet. SHARP bietet neben der zu integrierenden Auflösungsabhängigkeit des imaginären Anteils des Clusterformfaktors, welches den Ansatz des sphärischen Durchschnitts in diesem Fall zu einem effektiven Ausgangspunkt der Strukturbestimmung macht auch eine fundiertere Fehlermodellierung und Weiterentwicklung des 'maximum likelihood' Prinzips bezogen auf andere Phasierungsprogramme. Ebenso besteht die Möglichkeit, den Referenzdatensatz frei zu wählen und gleiche Positionen analog zu verfeinern. Außerdem führte eine spezielle Dichtemodifikationsprozedur zu besseren Ergebnissen und somit zu einer potentiell besseren Interpretierbarkeit der Elektronendichteverteilungen.

Erst durch die Ergebnisse der Simulation und die daraus resultierende optimale Phasierungsprozedur konnte eine interpretierbare Elektronendichte produziert werden. Die Ausführungen im nächsten Kapitel sollen die weiteren Schritte zur Strukturaufklärung von T30S verdeutlichen.

## 4.4 Das Modell der kleinen ribosomalen Untereinheit

In diesem Abschnitt wird die Strukturaufklärung der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S dargestellt. Hierzu gehört neben der Modellierung auch die fortwährende Verfeinerung des Modells. Anschließend wird die erste nahezu vollständige Struktur der kleinen ribosomalen Untereinheit detailliert beschrieben und diskutiert.

### 4.4.1 Modellierung und Modellverfeinerung

Nachdem nun, wie im vorigen Kapitel dargestellt eine optimale Phasierungsprozedur entwickelt werden konnte und mit der Orientierung der Wolframcluster die Basis für die Ausdehnung der zu verwendenden Datenauflösung gelegt wurde, sollen in diesem Abschnitt die weiteren Schritte zur Elektronendichteverteilung mit einer Bragg-Auflösung von 3,3 Å erläutert werden.

Die zu interpretierende Elektronendichte wurde ebenfalls mit den in Tabelle 4.1 beschriebenen fünf Datensätzen unter Benutzung des Programmes SHARP berechnet. Zusätzlich dienten zwei weitere Derivate zur Verbesserung der mittleren und niedrigen Auflösung (bis ca. 5,5 Å). Hierbei handelt es sich um mit Osmium, bzw. Iridium gesoakte Kristalle, die vorher ebenfalls mit W18 behandelt wurden. Mit Hilfe der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes und des anomalen Signals der Datensätze *BS*, *Wid14*, *Wat* und *Irg*, wurden analog zur entwickelten Phasierungsprozedur letztendlich Phasen zwischen 3,3 und 30 Å berechnet und dann die oben beschriebene, spezielle Dichtemodifikation angewendet. Da die Atome der W18-Cluster nun teilweise als Punktstreuer betrachtet werden konnten, war eine Phasierung der gemessenen Reflexe hoher Auflösung möglich, wobei die Ausweitung der Bragg-Auflösung stufenweise vorgenommen wurde. Die Orientierung der W18-Cluster erfolgte wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Für den *TaBr*- und *Irg*-Datensatz wurde weiterhin der Ansatz des sphärischen Durchschnitts verwendet. Als Referenz diente ebenso der Datensatz *Wid14*, allerdings wurden nun weitere W18-Nebenpositionen bei der Phasierung verwendet, die im Verlaufe der Phasierungsversuche zusätzlich detektiert werden konnten. Schrittweise immer bessere experimentelle und Modellphasen ermöglichten genauere Lokalisationsmöglichkeiten mit Fouriermethoden bzw. 'omit-maps' und auch die graduell verbesserten Dichtekarten wiesen zusätzliche Regionen höherer Dichte auf, welche auf Nebenpositionen der Wolframcluster hindeuteten. Dadurch erhöhte sich die Zahl der W18-Cluster in den Watives auf 13, bzw. 10 (*Wat*) und im Backsoak auf 8. Die Anzahl der Tantal-Bromid-Cluster im *TaBr*-Derivat erhöhte sich auf insgesamt 5 Sites. Alle zusätzlichen Cluster wurden bei der Phasierung aufgrund der nicht eindeutigen Orientierung in der Näherung des sphärischen Durchschnitts betrachtet, wohingegen alle ursprünglichen W18-Agglomerate nun eindeutig orientiert werden konnten.

Bei der Phasierung und Berechnung jeder neuen Elektronendichteverteilung im Verlauf der Untersuchungen wurden vorläufige Modellinformationen verwendet, um speziell bei der Dichtemodifikation jegliche verfügbare Information zu nutzen. Die Phasierungsstatistiken, darunter der  $R_{cullis}$  für zentrische, bzw. azentrische Reflexe und

die Phasierungsstärke  $PP$ , sind in Tabelle 4.1 eingetragen. Der  $FOM$  betrug 0,48 vor und 0,78 nach der Dichtemodifikation.

Das Modell wurde mit Hilfe der Sekundärstruktur der 16S RNA und den Sekundärstrukturvorhersagen sowie Sequenzen der Proteine von *Thermus thermophilus* konstruiert. Lediglich für das Protein S16 wurde die Sequenz von *Bacillus subtilis* verwendet, da diejenige von *T. thermophilus* noch nicht unabhängig bestimmt war. Das Programm O wurde benutzt, um die Elektronendichteverteilung, zunächst bei 3,8 Å, zu interpretieren und auch diverse Omit-Maps zu Rate zu ziehen. Die Dichteverteilungen waren gut genug, um die Phosphate in der RNA eindeutig zu identifizieren und somit den Verlauf der Ribonukleinsäure in T30S unter Berücksichtigung von Bindungslängen und -winkeln zu modellieren; jedoch war ein Erkennen einzelner Basen im Allgemeinen noch nicht möglich. In den Fällen, in denen Koordinaten, bzw. Modelle von einzelnen Proteinen schon von anderen Forschungsgruppen bestimmt worden waren, wurden diese benutzt und nötigenfalls strukturell angepaßt. Mit Hilfe der 3,3 Å Elektronendichteverteilung konnten letztendlich nahezu alle Bereiche der RNA interpretiert werden und auch die Proteine wurden zum größten Teil modelliert.

Eine Modellverfeinerung mit dem Programm CNS wurde parallel durchgeführt. Hierbei wurde zuerst eine Rigid-Body-Verfeinerung vorgenommen, in der festgelegte Bereiche des Modells nach dem in Abschnitt 3.6 beschriebenen Prinzips optimiert wurden. Als Molekülgruppen wurden einzelne Nukleotide und die Proteine als Gesamteinheiten gewählt. Das Problem lag in der Wahl geeigneter zu rotierender und translatierender Atomgruppen. Während die Betrachtung zu großer Strukturbereiche als 'rigid bodies' die Freiheitsgrade und daher die Verfeinerungsmöglichkeiten rapide herabsetzte, führte die Wahl zu kleiner Gruppen zu einer Verzerrung der vorliegenden biologischen Struktur. Desweiteren bereitete die gerade in hoher Auflösung geringe Datenqualität und auch die für die Proteinkristallographie begrenzte Bragg-Auflösung bei 3,3 Å besondere Schwierigkeiten. Da bei der 'rigid body' Verfeinerung ein Abgleich mit den Strukturfaktoramplituden anhand des R-Faktors erfolgt, werden hierbei besondere Anforderungen an die Datenqualität gestellt, und es wird zudem eine sinnvolle Wahl der Kriterien zur Auswertung von Reflexen erforderlich. Auch bei der zwingend notwendigen 'bulk-solvent' Korrektur machte sich die Begrenzung der Auflösung und die limitierte Datenqualität negativ bemerkbar, da das Modell der Lösungsmittelbereiche und somit die Korrekturfaktoren nur unzulänglich bestimmt werden konnten. Die Integration einer externen Lösungsmittelmaske, welche aus der Elektronendichte herausgeschnitten werden konnte, war anfangs hilfreich. Außerdem muß generell die manuelle Modellierung im Vorfeld eine angemessene Präzision bieten, damit die automatische Verfeinerung erfolgreich ist, welches im vorliegenden Fall aufgrund der begrenzten Auflösung im atomaren Bereich teilweise schwierig und daher nur stufenweise durchführbar war. Somit lag die Aufgabe bei der Verfeinerung in der Wahl optimaler Parameter und Annahmen, welche an die speziellen Anforderungen und Probleme in der Ribosomenkristallographie angepaßt werden mußten. Auch hier sollten analog zur Phasierung diverse Prozeduren und Methoden ausgetestet werden, um zu einer sinnvollen Verfeinerung des T30S-Modells zu gelangen. Dabei darf nicht vergessen werden, daß eine manuelle Nachkorrektur bezogen auf die tatsächliche Elektronendichte und auf diverse Verfeinerungsfehler in jedem Schritt erfolgen mußte.

Nach der 'rigid body' Verfeinerung erfolgte eine Minimierung der Bindungsenergien in der Struktur und abschließend eine Optimierung der Temperaturfaktoren, bzw. B-Faktoren der einzelnen Atome, immer verbunden mit einer manuellen Nachkorrektur. Diese Faktoren beschreiben die lokale Unordnung der Atome, bzw. die Flexibilität bestimmter Bereiche. Speziell die Handhabung der Wolframcluster, welche ja Bestandteil des 'nativen' Modells sind, bereitete große Schwierigkeiten. Da Annahmen über die Bindungsenergien innerhalb des Clusters für eine Verfeinerung von Nöten waren, aber keine genauen Angaben darüber vorlagen, mußten Näherungswerte verwendet werden. Besonders auf eine unerwünschte Verzerrung der Clustergeometrie nach den Verfeinerungsprozeduren mußte hierbei geachtet werden.

All diese Verfeinerungsschritte, welche im Verlauf der Modellierung immer wieder durchgeführt wurden, erfolgten auf der Basis der experimentellen Strukturfaktoren und resultierten in der Minimierung des sogenannten R-Faktors. Die Verfeinerungsstatistiken ergaben einen finalen R-Faktor von 20,3 % und eine R-free von 24,5 % im Bereich zwischen 3,3 und 30 Å. Der R-free berechnete sich aus einem 10% der Daten umfassenden Testsatz und dient der Bewertung der Überinterpretation und Qualität der Prozedur durch Vergleiche mit dem R-Faktor. Auch hierbei hat sich herausgestellt, daß es keinesfalls nur auf die Minimierung dieser Kennzahlen, sondern vielmehr auf eine sinnvolle Überprüfung des verfeinerten Modells ankommt.

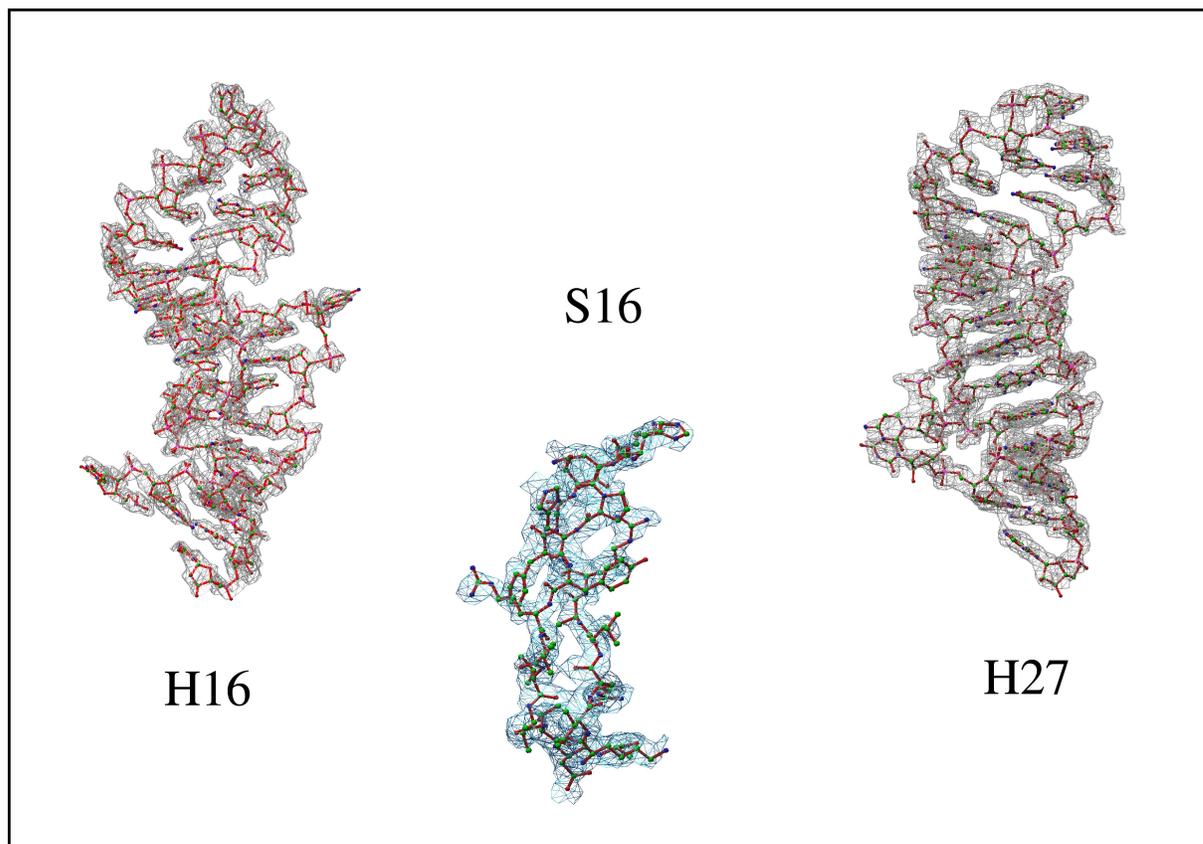


Abbildung 4.19: Diverse Ausschnitte aus der Elektronendichte

Es resultierte letztendlich ein Modell auf molekularer Ebene, welches 99% der RNA entspricht, wobei die Basen eindeutig modelliert werden konnten. Lediglich Teile der 3' und 5' Enden wurden nicht entschlüsselt. Die Strukturidentifikation aller Proteine war möglich und in vielen Fällen waren auch die Seitenketten der Aminosäuren sichtbar. In Abbildung 4.19 sind Ausschnitte aus der Elektronendichte im Bereich der Helizes 16 und 27 und im Bereich des Proteins S16 zu sehen. Das atomare Modell ist mit eingezeichnet.

#### 4.4.2 Präsentation der dreidimensionalen Struktur

In diesem Abschnitt soll das Strukturmodell der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S dargestellt und auf einige funktionale und biochemische Schlußfolgerungen eingegangen werden.

Das nahezu vollständige Modell von T30S besteht aus insgesamt 1507 Nukleotiden und allen 20 Proteinen, die entweder vollständig oder nahezu vollständig modelliert werden konnten. Die aus früheren kristallographischen oder NMR-Untersuchungen bestimmten Strukturen der Proteine S4, S5, S6, S7, S8, S15, S17, S18 und S19 wurden in der Dichte plaziert und modifiziert. Die übrigen Proteine wurden allein mit Hilfe der experimentellen Elektronendichte modelliert.

Das Strukturmodell, welches hier vorgestellt werden soll, zeigt die morphologischen Charakteristika (Domänen), wie sie schon aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen bekannt sind: die Unterteilung in Kopf und Körper. Auffällig ist die sogenannte Nase im Kopf-Bereich. Der Körper weist eine Schulter, eine Plattform und einen unteren Teil auf, welcher hier im weiteren Sinne als Fuß bezeichnet werden soll, obwohl die Bezeichnung 'bottom' im Englischen üblich ist. Aus Abbildung 4.20 ist das Gesamtmodell ersichtlich. Im oberen Teil erkennt man die ribosomale Untereinheit in zwei um 90° gegeneinander rotierten Darstellungen, wobei die RNA in weiß und die Proteine in blau gefärbt sind. Unten links sind die RNA-Domänen dargestellt: Der Kopf (K) in blau, die Schulter (S) in gelb, die Plattform (P) in rot, der Fuß (F) in grün und die sogenannten '3-prime minor' Domäne in weiß. Unten rechts ist die Elektronendichte in orange abgebildet, wie sie aus der oben geschilderten Phasierung und Dichtemodifikation hervorging.

Die **globale Organisation** der kleinen ribosomalen Untereinheit wird durch drei lange Helizes H44, H7 und H16/H17 bestimmt, welche longitudinal, d.h. in Abbildung 4.20 vertikal, verlaufen. H44 und H16/H17 liegen dabei auf der flachen Seite von T30S, welche bei der Assoziation den Kontakt mit T50S bildet. Diese drei Helizes werden durch transversale Helizes leiterartig verbunden. Hierzu gehören H21 und H23, die sichelförmig von der Schulter zur Plattform verlaufen (siehe Abbildung 4.23 oben in rot). Der Kopf besteht dahingegen hauptsächlich aus kurzen Helizes. Er kann generell in zwei Bereiche eingeteilt werden, die durch H34 verbunden werden (siehe Abbildung 4.22 oben). Der Kopf wird nur durch eine RNA-Helix H28 mit dem Körper verbunden, welche als eine Art Gelenk fungiert und auch als Hals bezeichnet wird.

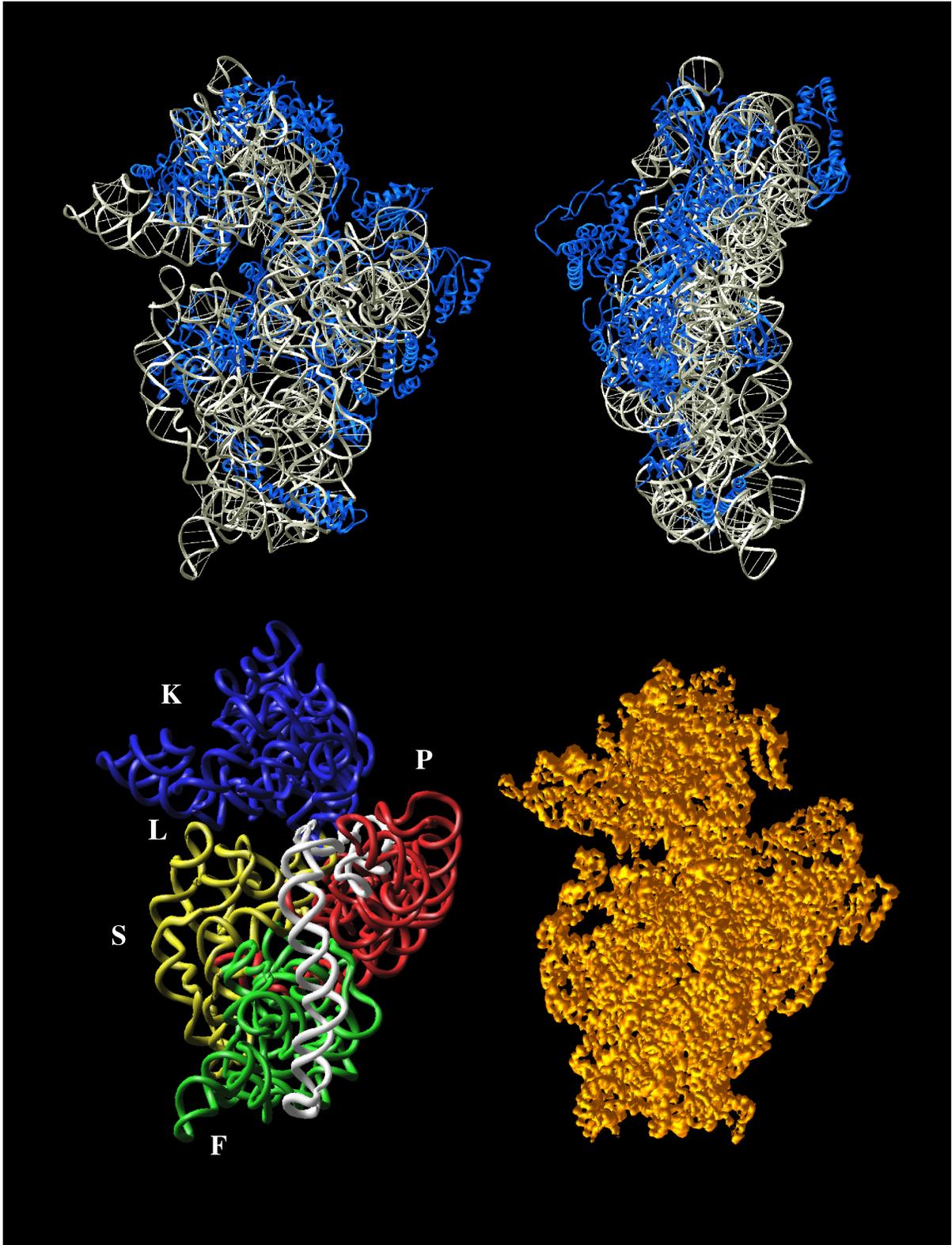


Abbildung 4.20: Struktureller Überblick der kleinen ribosomalen Untereinheit T30S

Zusätzlich bilden die Schulter mit H16/H17 und der Kopf mit H33/H34 eine nicht-kovalente Verbindung, die hier Riegel genannt wird und in Abbildung 4.20 unten mit L (für 'latch') gekennzeichnet ist. Er formt den Eingang zu einem länglichen Kanal. Es ist zu erkennen, daß alle wichtigen funktionellen Bereiche der Untereinheit hauptsächlich aus RNA bestehen und die Proteine scheinbar größtenteils nur als Stützen oder Verbindungen dienen. So existieren zum Beispiel ausgedehnte Verlängerungen von Proteinen, die in RNA-Bereiche hineinragen und auch andere Proteine erreichen; diese Verlängerungen, welche in isolierten Strukturen aufgrund des ungeordneten Zustandes im Kristall nicht sichtbar waren, sind aufgrund ihrer schmalen Abmessungen besonders gut geeignet, räumlich weit entfernte Proteine oder RNA zu erreichen. Außerdem neutralisieren sie die Abstoßung der negativen geladenen RNA-Ketten durch die teilweise positive Ladung der Aminosäurereste. Hier wäre z.B. S12 zu nennen, dessen Ende sich in Richtung S17 als eine Art Anker ausdehnt (Abbildung 4.23 unten). Nur ein ribosomales Protein, S12, befindet sich auf der RNA-reichen Oberfläche, die mit der großen Untereinheit wechselwirkt und zwei weitere, S7 und S15, liegen am Rand dieser Region (siehe auch Abbildung 4.20 oben rechts). Diese Aminosäureketten sind vielleicht teilweise an der tRNA Bindung oder der Untereinheitenbindung beteiligt. Ungefähr ein halbes Dutzend Proteine liegen auf der Lösungsmittelseite von T30S und haben sich vielleicht in einem späteren Stadium der Evolution entwickelt, um die Feinarbeit der Erkennung im Dekodierungsprozeß zu übernehmen oder unproduktive Interaktionen mit der großen Untereinheit zu verhindern. Diese Annahme steht im Zusammenhang mit der 'RNA-world' Hypothese, die von einem Ribosom ausgeht, welches im Frühstadium der Entwicklung nur aus RNA bestand.

Das **Dekodierungszentrum**, welches die mRNA und tRNA Translokation organisiert und die Genauigkeit der Codon-Anticodon Interaktion kontrolliert [Green u. Noller, 1997], befindet sich im oberen, bzw. zentralen Teil des Körpers und im unteren Teil des Kopfes. Dieser Bereich umfaßt H44, H45, das 3' und 5' Ende der RNA, die Helix 27, welche als 'switch-helix' bekannt ist [Lodmell u. Dahlberg, 1997] und den sogenannten Pseudoknoten H1/H2. Außerdem kann man noch Teile des Kopfes und die Schleife (loop) von H18 zum Dekodierungszentrum zählen. Eine Abbildung der Hauptbereiche dieser Region sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Es konnte eine bemerkenswerte Erhaltung der Nukleotidsequenz in diesem Bereich im Vergleich zwischen diversen Spezies festgestellt werden, welches in Übereinstimmung mit der Universalität des Dekodierungsprozesses steht.

Das auffälligste Merkmal ist der obere Teil von Helix 44, welche auch als 'penultimate stem' bezeichnet wird und sich in Richtung Hals biegt. Die Nukleotide 1492–1498 und die zugehörigen Basenpaare 1402–1408 (*E. coli* Nummerierung) formen den A- und P-Bereich der tRNA Bindung. H44 bildet einen großen Teil der Intersektion mit der T50S Untereinheit. Die End-Helix 45 ist zwischen H44 und H24 gelagert und führt zum 3' Ende. Dieses Ende der RNA ist sehr flexibel und interagiert mit der Shine-Delgarno Sequenz auf der mRNA, welches von herausragender Wichtigkeit für die Initiation ist (siehe Kapitel 2.1.1).

Die Schalter-Helix 27 kann durch Änderung von drei Basenpaarungen eine Konformationsänderung im Ribosom herbeiführen, indem durch eine kooperative Umstellung

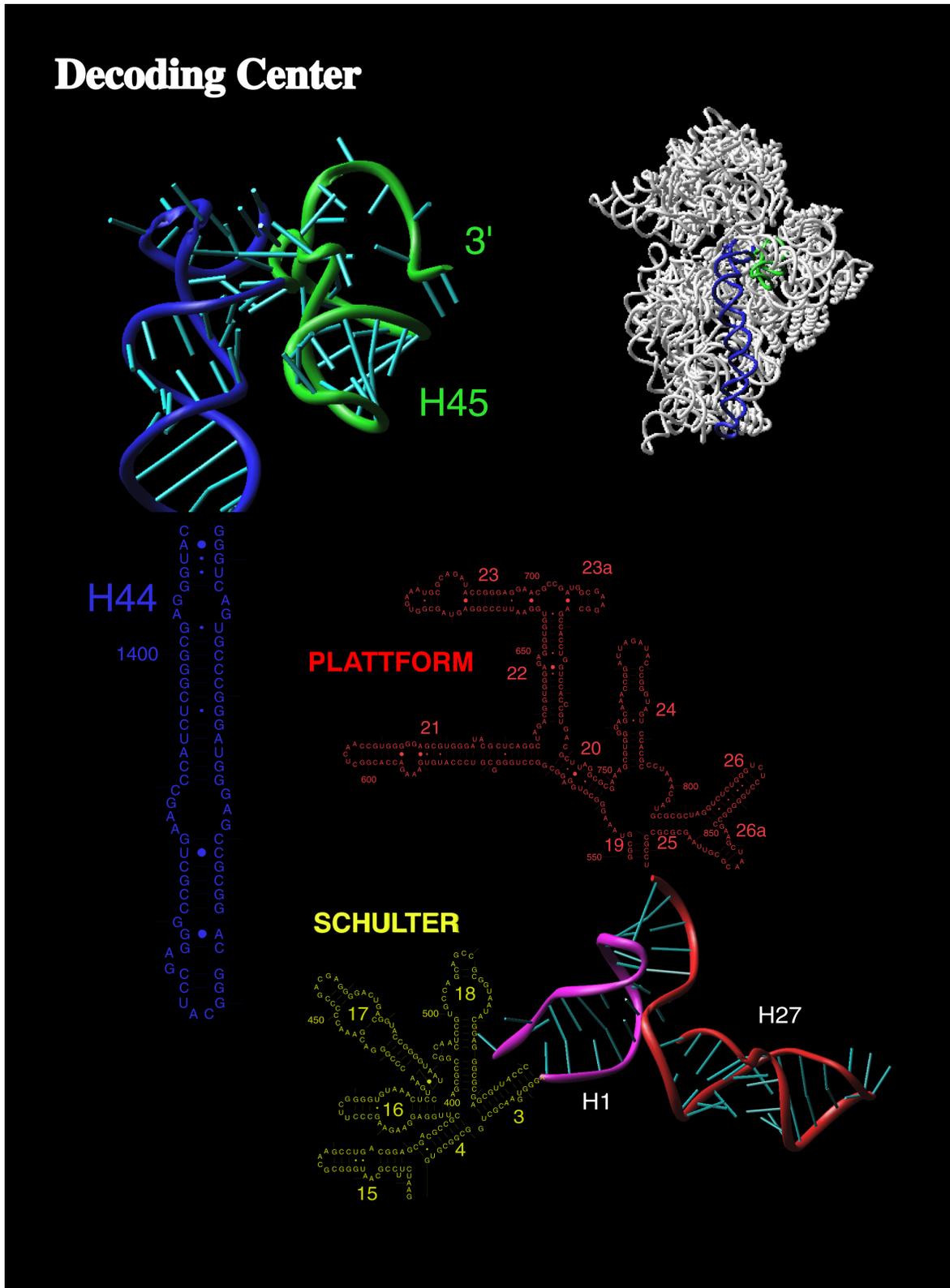


Abbildung 4.21: Strukturdetails des Dekodierungszentrums

die Plattform, die Schulter und der Kopf bewegt werden [Gabashvili *et al.*, 1999]; die Konformation des ribosomalen Teilchens ist mit dem Schema der Basenpaarung in H27 korreliert.

In der vorliegenden Elektronendichte konnte die 912–885 Paarung (*E. coli* Nummerierung) identifiziert werden, welches konsistent mit dem Erhalt des Pseudoknotens ist und auf den funktional aktivierten Zustand der kristallisierten 30S in diesem Fall hindeutet [Poot *et al.*, 1998].

Durch Überlagerung des Modells mit der Struktur eines tRNA-T70S Komplexes, welche mit Hilfe kristallographischer Methoden in mittlerer Auflösung (7,8 Å) in einer Arbeit von [Cate *et al.*, 1999] bestimmt wurde, konnte festgestellt werden, daß die A- und P-Bereich tRNA kein ribosomales Protein berührt und somit nur die 16S RNA die Anordnung der an der Dekodierung beteiligten Elemente übernimmt und für die Präzision bei der Codon-Anticodon Interaktion sorgt, welches die 'RNA-world' Hypothese stützt.

Die Elemente des Dekodierungszentrums formen zwischen Kopf und Körper in der 'Nakkenregion' einen länglichen, gebogenen Kanal, der hier dem Weg der mRNA zugeordnet wird. Die Schleife der Helix 18 befindet sich an einem Eingang dieses Kanals und ist in Übereinstimmung mit 'crosslinking' Informationen in Richtung des Dekodierungszentrums gebogen (Abbildung 4.23 unten). Die oben angesprochene Überlagerung zeigt, daß die mRNA durch den Riegel in den Kanal eintreten muß, welcher durch H33/H34 und H16/H18 geformt wird. Der Riegel ist in der beschriebenen Struktur geschlossen, da die kleine ribosomale Untereinheit in den Kristallen in der funktional aktiven Konformation stabilisiert wurde. Das Öffnen und Schließen ist mit dem Basenpaarungsschema von H27 korreliert [Gabashvili *et al.*, 1999, Lodmell u. Dahlberg, 1997]. Man kann annehmen, daß das Schließen eine Geometrie bietet, die den Translationsprozeß garantiert und eine maximale Genauigkeit sichert. Ebenso könnte eine Dissoziation der beiden Untereinheiten verhindert werden.

Der Körper der 30S Untereinheit besitzt einen relativ kompakten unteren Teil (Fuß) und einen breiteren und flexibleren oberen Bereich, welcher die Plattform, die Schulter und das Dekodierungszentrum beinhaltet.

Die Abbildungen 4.23 und 4.22 der nun zu beschreibenden Domänen zeigen sowohl den Verlauf der RNA, die Struktur der Proteine, als auch die Sekundärstrukturausschnitte, welche entsprechend coloriert wurden. Außerdem wurde die Domänenposition in der Untereinheit veranschaulicht.

Der **Fuß** scheint als eine Art Anker zu fungieren, um die Neigung und Orientierung wichtiger Bereiche der Untereinheiten-Kontaktfläche und des Dekodierungszentrums zu kontrollieren. Helix 6 bis Helix 11 und Protein S20 sind die Hauptbestandteile des Fußes (siehe Abbildung 4.22 unten). H7 verläuft longitudinal, parallel zu H44, und verzweigt dann in H8, welche die untere Grenze des Teilchens darstellt. Helix 9 besitzt einen 'groove-groove' Kontakt mit H7, wobei die Schleife nach außen gerichtet ist. H7 ist mit Helix 11 verbunden, welche zwischen H7 und H44 eingeklemmt ist. Die Helizes H6 bis H11 und der untere Teil von Helix 44 werden durch das helikalische Protein S20 zusammengehalten. Seine Aminosäuresequenz zeigt periodisch verteilte Lysine und Arginine, welche eine positiv geladene Oberfläche bilden und die negativen Phosphate der RNA kontaktieren.

Diese Charakteristika lassen vermuten, daß S20 eher RNA-Struktur als RNA-Sequenz erkennt. Dieses wird durch den niedrigen Erhaltungsgrad der Nukleotidsequenz dieser Region bestätigt. Trotz der abgelegenen Position von S20 ist dieses Protein maßgeblich an der Dekodierung beteiligt, da Mutanten des Ribosoms ohne S20 Fehler bei der Transkription, Temperaturanfälligkeit oder reduzierte Fähigkeit der Assoziation beider Untereinheiten aufwiesen [Gotz *et al.*, 1990, Ryden-Aulin *et al.*, 1993]. S20 muß daher, zumindest in einer Teilfunktion, für die korrekte Orientierung von H44 verantwortlich sein. Die Architektur der kleinen ribosomalen Untereinheit mit seinen drei longitudinalen Helizes H44, H16/17 und H7 bildet hierbei eine Art Pfeiler, welcher sich über eine Länge von 110 Å erstreckt. Diese Helizes stabilisieren nicht nur den Körper, sondern übertragen auch Konformationsänderungen über eine lange Distanz.

Die **Plattform** ist an der P-Bereich Bindung der tRNA beteiligt und deplaziert sich, wenn die beiden Untereinheiten assoziieren [Gabashvili *et al.*, 1999]. Sie besteht aus Helix 20 bis Helix 26 und den Proteinen S6, S8, S11, S15 und S18 (siehe Abbildung 4.23). H23 und H22 definieren einen Arm der ausgedehnten, l-förmigen Domäne, und H21, die zur Schulter hin verläuft, definiert den anderen Arm. 'Groove-groove' Kontakt zwischen H23 und H24 bilden die Basis der Plattform. H25 und H26, senkrecht zueinander stehend, formen eine Bindungsfläche für S8. Außerdem festigen Kontakte zwischen H22 und H25 den Kern der Struktur. Die Plattform und die Schulter sind durch einen proteinreichen Gürtel verbunden, welcher aus S4, S5 und S8 besteht.

Die **Schulter** setzt sich aus zwei longitudinalen Streben zusammen, bestehend aus H15/H4/H18, bzw. H16/H17 (siehe Abbildung 4.23). Die Anordnung der senkrecht zueinander liegenden Helizes H3 und H4 schafft eine äußerst kompakte Faltung in der 5-Wege Verbindung H3/H4/H16/H17/H18, welche über Helix 3 mit dem zentralen Pseudoknoten verbunden ist. Die Schleifen der Helizes 16 und 18 bilden eine Seite des Riegels, wie oben beschrieben. Der vermeintliche Weg der mRNA befindet sich in dieser Region. Die Komponenten, die mit der Messenger-RNA interagieren, sind die Schleife von H18 und die Proteine S3, S4, S5 und S12. S4, S5 und S12 assistieren wahrscheinlich bei der Direktionalität des Dekodierungsprozesses und bei der Genauigkeit der Translation, wie Untersuchungen mit Mutationen der Proteine bestätigen [van Acken, 1975, Wittmann-Liebold, 1978].

Der **Kopf** enthält einen Großteil der sogenannten '3-prime major' Domäne der 16S RNA. Er wechselwirkt mit der mRNA, der tRNA und mehreren Antibiotika. Die Proteine des Kopfes helfen, seine Faltung, bestehend aus diversen kurzen Helizes mit komplizierter Architektur, zu stabilisieren. Sie lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen, welche sich auf der jeweils gegenüberliegenden Seite befinden. Die Spitze des Kopfes wird von H41 und H42 gebildet; die sogenannte Nase besteht aus H33 und H33a und der gegenüberliegende Bereich setzt sich aus H35/H36/H38 und H39 zusammen. Helix 29, 30 und 32 wickeln sich um den Kopf und bilden eine Verbindung. Diese unübliche RNA Struktur bildet eine ovale Proteintasche (siehe Abbildung 4.22). Die 3-Wege Verbindung H28/H29/H43 ist Teil des P-Bereichs für die tRNA. Helix 28 ist die einzige kovalente Verbindung des Kopfes mit dem Körper. Die Unregelmäßigkeiten in der Basenpaarung führen zu struktureller Abweichung von der Helix-Normalform (A-Form).

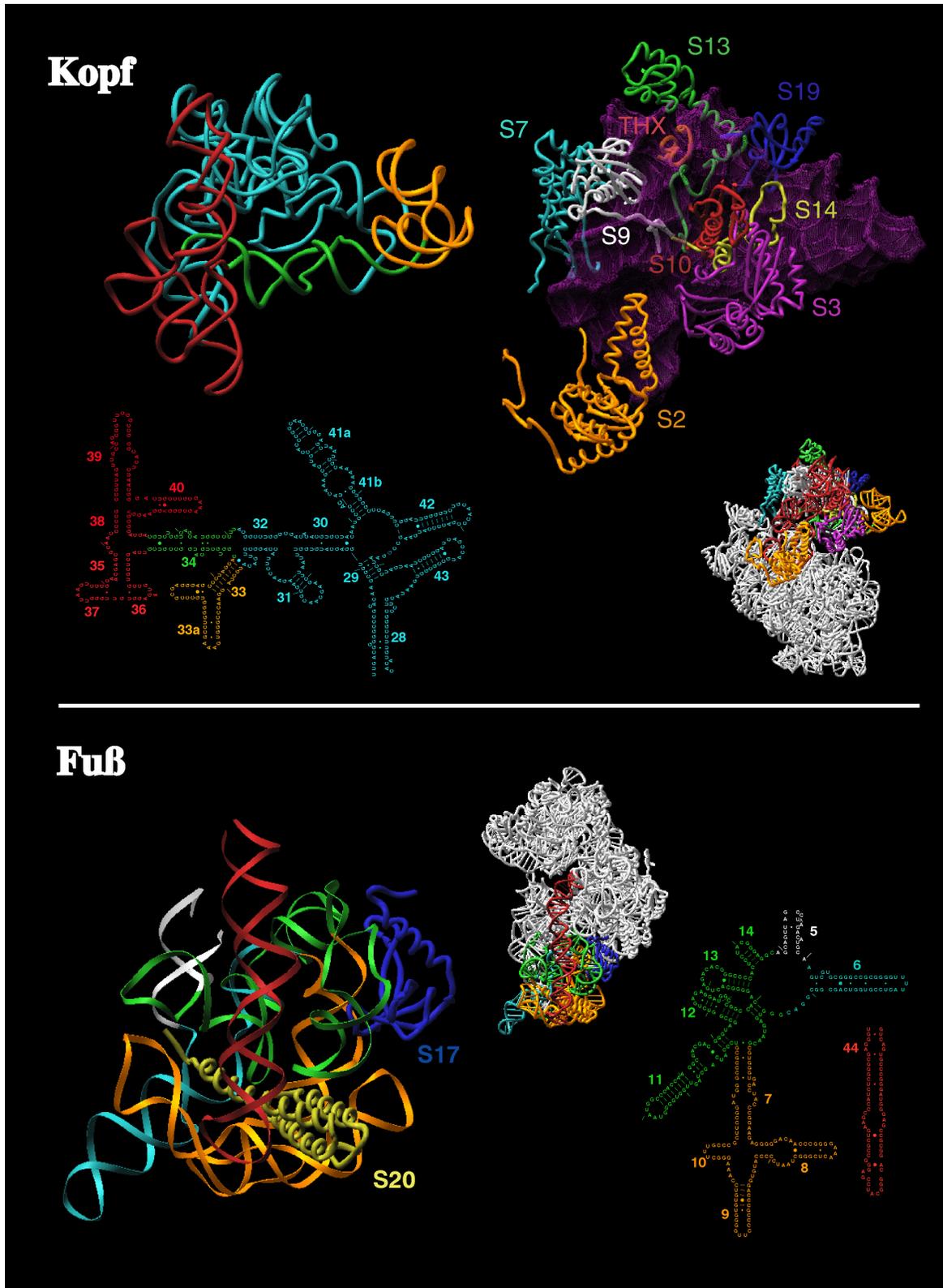


Abbildung 4.22: Strukturdetails des Kopfes und des Fußes

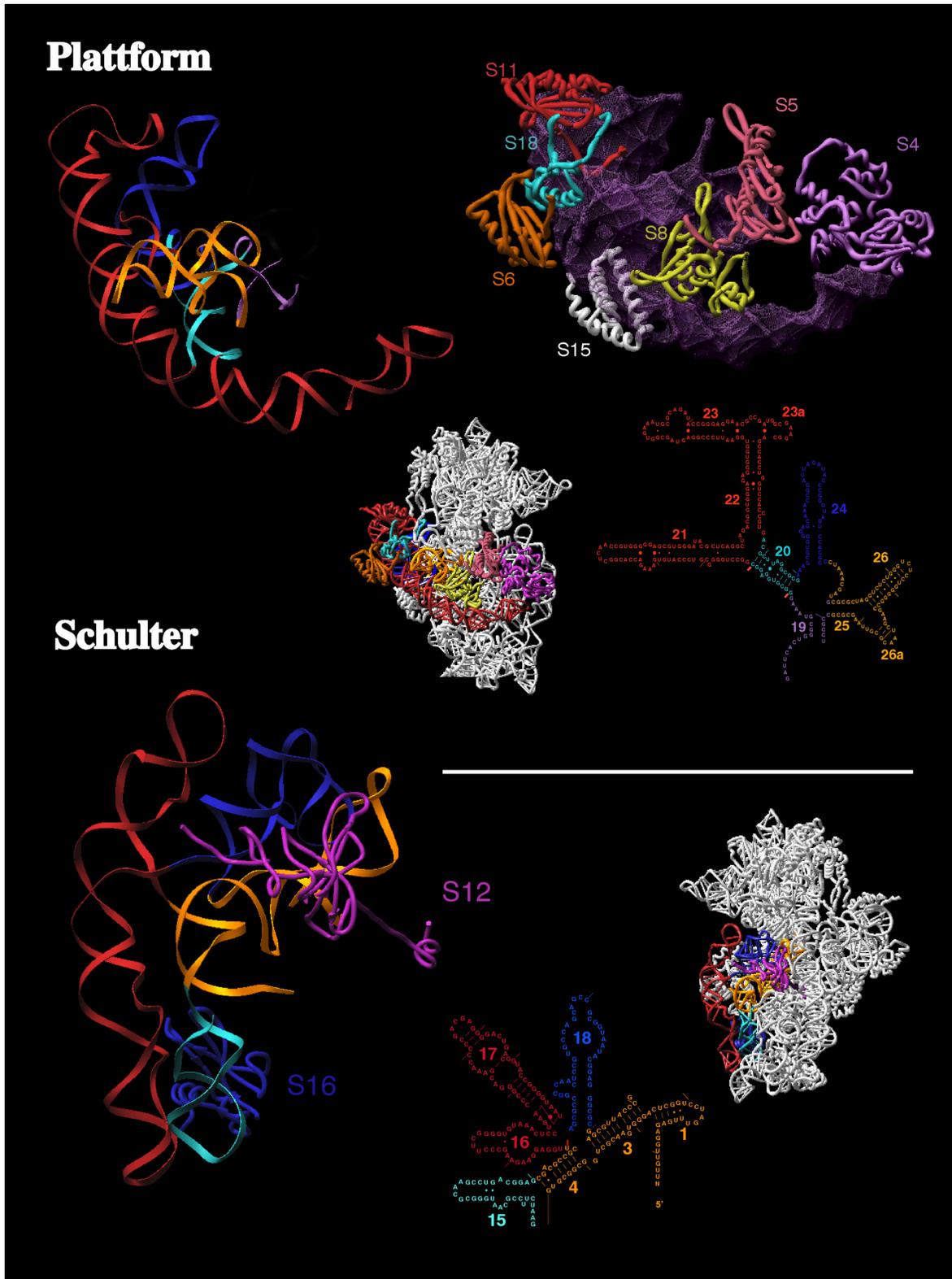


Abbildung 4.23: Strukturdetails der Plattform und der Schulter

Möglicherweise hängt diese Tatsache mit der vermuteten Rolle dieser Helix als Scharnier für die globale Bewegung des Kopfes zusammen. Die Variabilität der Form des Kopfes, welche in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde [Frank *et al.*, 1995], zeigt, daß Konformationsänderungen in dieser Domäne, neben der Bewegung des gesamten Kopfes, auftreten können. Die Veränderung der Orientierung des Kopfes scheint mit der Bewegung der Plattform verbunden zu sein.

Das Bild von der kleinen ribosomalen Untereinheit, welches sich aus dieser Analyse ergibt, beschreibt eine präzise Maschine, welche über lange oder kurze Distanz genau definierte Bewegungen weitergibt, um eine exakte Dekodierung zu gewährleisten. Das Dekodierungszentrum selbst besteht ausschließlich aus RNA, wobei die Proteine als Strukturierungshilfe dienen oder unterstützende Funktionen wahrnehmen.

Die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen wurden in [Glühmann *et al.*, 2001] und [Schlünzen *et al.*, 2000] publiziert, und die atomaren Koordinaten dieser Struktur sind in der PDB-Datenbank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) unter dem Code *1FKA* deponiert worden.

In einer unabhängigen Veröffentlichung wurde zu einem etwas späteren Zeitpunkt das hier präsentierte Ergebnis bestätigt [Wimberly *et al.*, 2000], wobei allerdings keine Schweratomcluster, sondern lediglich Einzelschweratome zu Derivatisierung verwendet wurden. Außerdem konnte eine hochauflösende Struktur der großen ribosomalen Untereinheit von *Haloarcula marismortui* (H50S) bestimmt werden [Ban *et al.*, 2000].

Mit Hilfe des optimierten und verfeinerten Modells der 'nativen' Struktur von T30S und den zurückgerechneten Modellphasen konnten zusätzlich drei verschiedene funktionell relevante Komplexe analysiert und deren Struktur gelöst werden. Es gelang, die ribosomale Untereinheit mit den beiden Antibiotika Tetracyclin, Edein und mit dem Initiationsfaktor IF3 zu kristallisieren und die Zusatzmoleküle durch Fourier-Methoden und 'omit-maps' zu lokalisieren und zu modellieren. Außerdem konnte die ribosomale Struktur in Verbindung mit den Zusatzmolekülen bis zu einer Auflösung von 4,2 Å verfeinert werden.

Antibiotika sind extrem vielseitig in ihrer Handlungsweise; sie können die bakterielle Zellwand-Biosynthese, die Proteinsynthese oder die DNA-Reparatur beeinflussen [Walsh, 2000].

Tetracyclin wirkt gegen eine Vielfalt von Bakterien, indem es in die Bindung der tRNA an den A-Bereich des Ribosoms eingreift und so die Proteinbiosynthese hemmt [Spahn u. Prescott, 1996].

Es wurden sechs Tetracyclin Bindungsstellen an der kleinen ribosomalen Untereinheit identifiziert. Die Position mit der höchsten Besetzungsdichte (Tet-1) konnte in der Nähe des A-Bereichs, wo auch die Struktur der tRNA überlagert wurde (siehe oben), lokalisiert werden. Somit könnte vermutet werden, daß Tet-1 die Bindung der tRNA am A-Bereich räumlich verhindert und so die Proteinsynthese hemmt. Außerdem konnte ein Tetracyclin im Bereich der Helix 27 positioniert werden, welches vielleicht die Beweglichkeit dieser Helix einschränkt und somit die für die Translation wichtige Konformationsänderung verhindert.

Das Antibiotikum Edein wirkt sich hemmend auf die Initiation der Translation an Ribosomen aller Spezies aus, wodurch deutlich wird, daß die Strukturelemente, welche eine Rolle bei der Initiation spielen, in Prokaryonten und Eukaryonten konserviert sind.

Es wurde eine Edein Bindungsstelle in der Nähe von H24, H28, H44 und H45 gefunden. Alle RNA-Basen mit denen Edein einen Wechselwirkung eingeht sind in allen Spezies gleich, welches die Universalität dieses Antibiotikums erklärt. Durch die Bindung dieses Moleküls ist die Helix 24 ein wenig verzerrt, welches allerdings ausreicht, um eine Basenpaarung zwischen den Loops dieser Helix und H23 zu initiieren. Es scheint nun plausibel, daß hierdurch eine unerwünschte Stabilisierung der Konformation der Plattform stattfindet und die Initiation somit gehemmt wird.

Die Bildung des Initiationskomplexes ist stark abhängig von IF3. IF3 ist ein kleines Protein, welches aus einer C-Domäne (IF3C), einer N-Domäne (IF3N) und einer kurzen Verbindung dieser beiden Teile besteht. Dieser Initiationsfaktor bindet mit hoher Affinität an die 30S Untereinheit und verhindert so die Re-Assoziation von 30S und 50S [Grunberg-Manago *et al.*, 1975, Gualerzi u. Pon, 1990].

Es wurden ribosomale Kristalle in einer Lösung 'gesoakt', die lediglich IF3C enthielt und so konnte eine Bindung dieser Domäne an die Plattform auf der Lösungsmittelseite von T30S festgestellt werden. Somit basiert die Wirkung dieses Proteins nicht auf einer räumlichen Blockierung der Wechselwirkung zwischen der kleinen und der großen ribosomalen Untereinheit. Vielmehr läßt sie sich durch eine Beeinflussung der Beweglichkeit von H45 und somit einer Beeinträchtigung der konformationalen Dynamik erklären, da IF3C an H23, H26 und H45 bindet. Erst die Wechselwirkung zwischen mRNA, der Anti-Shine-Delgarno-Sequenz am 3'-Ende der 16S rRNA und dem nahen IF3 könnte die konformationale Beeinträchtigung, welche durch den Initiationsfaktor induziert wurde, unterdrücken und so die für die Translation nötige Assoziation der beiden Untereinheit ermöglichen.

Diese äußerst wichtigen Erkenntnisse wurden in [Pioletti *et al.*, 2001] veröffentlicht.

Es konnten mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die Basis zum Verständnis der Wirkungsweise einiger Antibiotika gelegt werden. Ebenso wurde es möglich, die Anti-Assoziationsaktivität vom Initiationsfaktor 3 auf der Beeinflussung der konformationalen Dynamik der ribosomalen Untereinheit zurückzuführen.

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, auf welche Weise die Kenntnis der Struktur der ribosomalen Untereinheit bei der Aufklärung der komplexen Mechanismen in der Proteinsynthese helfen kann. Nur durch eine detaillierte Betrachtung der molekularen Veränderungen in Komplexen mit Antibiotika oder diversen anderen Strukturen können wichtige Aussagen über die Funktionsweisen dieser 'Proteinmaschine' gegeben und somit zahlreichen wissenschaftlichen Anstrengungen eines halben Jahrhunderts erfolgreich zu Ende geführt werden.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Methoden, die speziellen Anforderungen und Begrenzungen, die diversen auftretenden Probleme und deren Lösungsansätze in der Ribosomenkristallographie erläutert. Hieraus ist klar geworden, daß aufgrund der extremen Größe sowie Flexibilität von ribosomalen Partikeln, die Kristallisation und Derivatisierung äußerst schwierige Prozesse sind, und die starke Strahlenschädigung zusammen mit den Isomorphieproblemen zu Schwierigkeiten bei der Datensammlung und Datenreduktion führt. Es wurden insbesondere die Vorteile, aber auch die Nachteile bei der Verwendung von Schweratomclustern zur Erzeugung eines isomorphen und anomalen Signals diskutiert. Einerseits führte die Derivatisierung der Kristalle mit W18 zu einer postkristallinen Stabilisierung und somit zu einer drastischen Auflösungsverbesserung. Zudem ergab die große Elektronendichte dieser Cluster ein hohes Signal bzw. bessere Lokalisierungsmöglichkeiten, welches gerade im Fall von zahlreichen Fehlerquellen von herausragender Bedeutung ist. Andererseits bereiteten die Überschattung von schwächeren Einzelatomsignalen, Probleme bei der Orientierung dieser Agglomerate und die sich daraus ergebende Notwendigkeit eines Näherungsansatzes bei der Phasierung sowie dominierende Effekte bei der Dichtemodifikation besondere Schwierigkeiten.

Aufgrund der Tatsache, daß in allen hier verwendeten Kristallen Wolframcluster vorlagen und das vorrangige Ziel der Berechnung einer interpretierbaren Elektronendichteverteilung allein mit den vorläufigen Informationen und experimentellen Daten nicht gelang, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Analyse von simulierten Strukturfaktordaten durchgeführt. Hierdurch sollte die optimale Prozedur und die optimale Parametrisierung für die Phasierung und die Schweratompositionsverfeinerung in der Approximation des sphärischen Durchschnitts gefunden werden. Unter diesen Voraussetzungen und den eben genannten Problemen ist die Software SHARP speziell aufgrund der Handhabung des anomalen Signals zur Phasierung der Strukturfaktordaten unter allen untersuchten Programmen am besten geeignet und wurde daher zur Strukturbestimmung von T30S verwendet. Außerdem führte eine spezielle Dichtemodifikationsprozedur zu besseren Ergebnissen und somit zu einer potentiell besseren Interpretierbarkeit der Elektronendichteverteilungen.

Erst durch die Ergebnisse der Simulation und die daraus resultierende optimale Phasierung konnte eine interpretierbare Elektronendichte berechnet werden und das erste nahezu vollständige Modell der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* in atomarer Auflösung erstellt und verfeinert werden.

Die Präsentation der sich daraus ergebenden dreidimensionalen Struktur von T30S, welche die Translation initiiert und für die zuverlässige Codon-Anticodon Interaktion und das Dekodieren sorgt, zeigt eine präzise Maschine, welche über lange oder kurze Entfernungen klar definierte Bewegungen weitergibt, um eine genaue Dekodierung zu gewährleisten. Das Dekodierungszentrum besteht ausschließlich aus RNA, wobei die Proteine als Strukturierungshilfe fungieren oder unterstützende Funktionen wahrnehmen. Das in dieser Arbeit dargestellte Modell von T30S bietet einen strukturellen Rahmen zum besseren Verständnis der Mechanismen zur Dekodierung von genetischer Information. Die Kenntnis dieses Prozesses ist von fundamentaler Bedeutung für die Biologie, Biochemie sowie auch für die Medizin.

Die kristallographische Betrachtung von drei weiteren T30S Komplexen mit den Antibiotika Tetracyclin und Edein sowie dem Initiationsfaktor 3 machen deutlich, daß die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit die Grundlage für viele weitere, notwendige Untersuchungen und Voraussetzung für zukünftige Bemühungen sind.

Die Kenntnis der Struktur der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* wird zum weiteren Verständnis von Protein-RNA Wechselwirkungen führen und den Weg zur Kristallisation von Ribosomen in verschiedenen funktionalen Zuständen ebnen. Sie wird ebenfalls die gezielte Konstruktion von Modellen zur Untersuchung der Funktion des Ribosoms sowie den Entwurf neuer, effektiverer Medikamente zur Beeinflussung der bakteriellen Proteinsynthese erleichtern.

Auch wenn letztendlich die Verlagerung der strukturellen Forschungen auf eukaryotische Zellen noch aussteht, für die eine erfolgreiche Kristallisation der ribosomalen Partikel noch nicht gelungen ist und die weitere Einblicke in die Natur des menschlichen Organismus bieten würden, hat die Strukturaufklärung dieses ribosomalen Partikels die vierzigjährige Suche nach dem Mechanismus der Proteinsynthese einen großen Schritt vorangebracht.

# Literaturverzeichnis

- [Abrahams u. Leslie, 1996] Abrahams, J.P. und Leslie, A.G.W. (1996). *Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase*. Acta Crystallogr. Sect. D **52**, 30-42.
- [van Acken, 1975] van Acken, U. (1975). *Proteinchemical studies on ribosomal proteins S4 and S12 from ram (ribosomal ambiguity) mutants of Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **140**, 61-8.
- [ADSC, 1997] ADSC (Area Detector Systems Corporation) (1997), *ADSC Quantum 4 Detector*. Offizielle Information, Internet.
- [Amemiya *et al.*, 1988] Amemiya, Y., Matsushita, T., Nakagawa, A., Satow, Y., Miyahara, J. and Chikawa, J. (1988). *Design and performance of an imaging plate system for x-ray diffraction study*. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. **A266**, 645
- [Arndt und Wonacott, 1977] Arndt, U.W. und Wonacott, A.J. (Hrsg.) (1977). *The rotation method in crystallography*. Northholland Publishing Co., Amsterdam.
- [Bailey, 1994] Bailey, S. (1994). *The CCP4 suite - programs for protein crystallography*. Acta Crystallogr. Sect. D **50**, 760-763.
- [Ban *et al.*, 2000] Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000). *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution*. Science **289**, 905-920.
- [Blow u. Rossmann, 1961] Blow, D.M. und Rossmann, M.G. (1961). *The single isomorphous replacement method*. Acta Crystallogr. **14**, 1195.

- [Blow u. Crick, 1959] Blow, D.M. und Crick, F.H.C. (1959). *The treatment of errors in the isomorphous replacement method*, Acta Cryst. **12**, 794.
- [Blundell und Johnson, 1976] Blundell, T.L. und Johnson, L.N. (1976) *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- [von Böhlen, 1990] von Böhlen, K. (1990) *Tieftemperaturkristallographie an bakteriellen Ribosomen*, Dissertation, Universität Hamburg.
- [Brünger *et al.*, 1987] Brünger, A.T., Kuriyan, J. and Karplus, M. (1987). *Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics*. Science **235**, 458-460.
- [Brünger *et al.*, 1998] Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998). *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. Acta Crystallogr. Sect. D **54**, 905-921.
- [Carson, 1997] Carson, M. (1997). *Ribbons*. Acta Crystallogr. Section B **277**, 493-505.
- [Cate *et al.*, 1999] Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N., and Noller, H.F. (1999). *X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes*. Science **285**, 2095-2104.
- [Choli *et al.*, 1993] Choli, T., Franceschi, F., Yonath, A., and Wittmann-Liebold, B. (1993). *Isolation and characterization of a new ribosomal protein from the thermophilic eubacteria, Thermus thermophilus, Thermus aquaticus and Thermus flavus*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler **346**, 377-383.
- [Cowtan, 1994] Cowtan, K.D. (1994). *'DM': An Automated Procedure for Phase Improvement by Density Modification*. Jt. CCP4-ESF-EACBM Newslett. Protein Crystallography **31**, 34-38.
- [Crick und Magdoff, 1956] Crick, F.H.C. und Magdoff, B.S. (1956). *The theory of the method of isomorphous replacement for crystals. I*. Acta Crystallogr. **9**, 901.

- [Cullis *et al.*, 1961] Cullis, A.F., Muirhead, H., Perutz, M.F., Rossmann, M.G., North, A.C.T. (1961). *The structure of haemoglobin VIII. A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution: determination of the phase angles*. Proc. Roy. Soc. **A265**, 15-38.
- [Darnell, 1996] Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. (1996) *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter, New York, 2. Auflage.
- [Davies und Segal, 1972] Davies, D.R. und Segal, D.M. (1972). *Protein crystallization: Micro techniques involving vapor diffusion*. Meth. Enz. **22**, 266.
- [Drenth, 1994] Brenth, J. (1994). *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer, New York.
- [de la Fortelle u. Bricogne, 1997] de la Fortelle, E. und Bricogne, G. (1997). *Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods*. Macromolecular Crystallography, **A 276**, 472-494.
- [Frank *et al.*, 1991] Frank, J., Penczek, P., Grassucci, R., Srivastava, S. (1991). *Three dimensional reconstruction of the 70S Escherichia coli ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA*. J. Cell Biology **115 (3)**, 597-605.
- [Frank *et al.*, 1995] Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y.H., Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, R.K., and Agrawal, R.K. (1995). *A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome*. Nature **376**, 441-444.
- [French u. Wilson, 1978] French G.S. und Wilson K.S. (1978). *On the treatment of negative intensity observations*. Acta. Crystallogr. **A34** , 517.
- [Gabashvili *et al.*, 1999] Gabashvili, I.S., Agrawal, R.K., Grassucci, R., Squires, C.L., Dahlberg, A.E., Frank, J. (1999). *Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16S ribosomal RNA*. EMBO J. **18**, 6501-6507.

- [Glühmann *et al.*, 2001] M. Glühmann, R. Zarivach, A. Bashan, J. Harms, F. Schlünzen, H. Bartels, I. Agmon, G. Rosenblum, M. Pioletti, T. Auerbach, H. Avila, H.A.S. Hansen, F. Franceschi and A. Yonath *Ribosomal crystallography: from poorly diffracting micro-crystals to high resolution structure* to be published in *Methods: a companion to methods in enzymology*, accepted (2001).
- [Gotz *et al.*, 1990] Gotz, F., Dabbs, E.R., and Gualerzi, C.O. (1990). *Escherichia coli 30S mutants lacking protein S20 are defective in translation initiation*. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**, 93-97.
- [Green u. Noller, 1997] Green, R. und Noller, H.F. (1997). *Ribosomes and translation*. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 679-716.
- [Grunberg-Manago *et al.*, 1975] Grunberg-Manago, M., Dessen, P., Pantaloni, D., Godefroy-Colburn, T., Wolfe, A.D. and Dondon, J. (1975). *Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of Escherichia coli ribosomes*. *J. Mol. Biol.* **94**, 461-478.
- [Gualerzi u. Pon, 1990] Gualerzi, C.O. und Pon, C.L. (1990). *Initiation of mRNA translation in prokaryotes*. *Biochemistry* **29**, 5881-5889.
- [Guo *et al.*, 1999] Guo, D.Y., Blessing, H., Langs, D.A., Smith, G.D. (1998). *On 'globbicity' of low-resolution protein structures*. *Acta Crystallogr. Section D* **D55**, 230-237.
- [Gutell *et al.*, 1999] Gutell, R.R., Subashchandran, S., Schnare, M., Du, Y., Lin, N., Madabusi, L., Muller, K., Pande, N., Yu, N., Shang, Z., Date, S., Konings, D., Schweiker, V., Weiser, B., Cannone, J.J. (1999). *Comparative sequence analysis and the prediction of RNA structure*, and the Web. <http://www.rna.icmb.utexas.edu/>.
- [Hall *et al.*, 1991] Hall, C.J., Lewis, A., Parker, B., Worgan, J.S. (1991). *The secret life of image plate phosphors*. *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 697-699.

- [Harms *et al.*, 1993] Harms, J., Schlünzen, F., von Böhlen, K., Thygesen, J., Meyer, S., Dunkel, I. Donzelmann, B., Hansen, H.A.S., Zaytzev-Bashan, A., Dribin, A., Kryger, G., Thoms, G., Volkmann, N., Bartels, H., Bennett, W.S., Yonath, A. (1993). *The effect of cryogenic treatment on the cell dimensions of ribosomal crystals*. Jt. CCP4-ESF-EACBM Newslett. Protein Crystallography **28**, 26-28.
- [Harms, 1999] Harms, J. (1999). *Kristallographische Untersuchungen der großen ribosomalen Untereinheit Haloarcula marismortui*. Dissertation, Universität Hamburg.
- [Hendrickson u. Lattman, 1970] Hendrickson, W.A. und Lattman, E.E. (1970). *Representation of phase probability distributions for simplified combination of independent phase information*. Acta Crystallogr. **B26**, 136.
- [Hendrickson, 1978] Hendrickson, W.A. (1978). *Phase-information from anomalous-scattering measurements*. Acta Crystallogr. **A35**, 245-247.
- [Hope *et al.*, 1989] Hope, H., Frolow, F., von Böhlen, K., Makowski, I., Kratky, C., Halfon, Y., Danz, H., Webster, P., Bartels, K.S., Wittmann, H.G., Yonath, A. (1989). *Cryocrystallography of Ribosomal Particles*. Acta Crystallogr. **B 45**, 190.
- [Jahn, 1989] Jahn, W. (1989). *Synthesis of a water-soluble undecagold cluster for specific labeling of proteins*. Z. Naturforsch. **44b**, 1313.
- [Janell, 2000] Janell, D. (2000). *Lokalisation von Schweratomen und Phasenberechnung an Kristallen der ribosomalen 30S Untereinheit von Thermus thermophilus*. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- [Janell *et al.*, 2001] D. Janell, A. Tocilj, I. Kölln, F. Schlünzen, M. Glühmann, H.A.S. Hansen, J. Harms, A. Bashan, I. Agmon, H. Bartels, M. Kessler, S. Weinstein, F. Franceschi and A. Yonath *Ribosomal crystallography and heteropolytungstates* In: Polyoxometalate Chemistry, M.T. Pope and Müller (eds.), Kluwer Academic Publishers/Netherlands 391-415 (2001).

- [Jones u. Kjeldgaard, 1997] Jones, T.A. und Kjeldgaard, M. (1997). *Electron-density map interpretation*. Methods Enzymol. **277**, 173-208.
- [Klug u. Alexander, 1974] H.P. Klug und L.E. Alexander (1974). *X-Ray diffraction procedures*. Wiley and Sons, NY.
- [Knaack, 1996] Knaack, K. (1996), *Funktionsbeschreibung der Kühlanlage*, interne Veröffentlichung der Max-Planck-Arbeitsgruppe für Ribosomenstruktur, Hamburg.
- [Kölln, 1995] Kölln, I. (1995), *Optimierung von Bedingungen für Phasenbestimmungen an Proteinkristallen unter Einsatz anomaler Beugung*. Dissertation, Universität Hamburg.
- [Kraut *et al.*, 1962] Kraut, J., Sieker, L.C., High, D.F. and Freer S.T. (1962) Proc. Nat. Acad. Sci. USA **48**, 1417-1424.
- [Lata *et al.*, 1996] Lata, K.R., Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R., Zhu J., Frank, J. (1991). *Three dimensional reconstruction of the Escherichia coli 30S ribosomal subunit in ice*. J. Mol. Biology **262**, 43-52.
- [Lodmell u. Dahlberg, 1997] Lodmell, J.S., and Dahlberg, A.E. (1997). *A conformational switch in Escherichia coli 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA*. Science **277**, 1262-1267.
- [Miyahara *et al.*, 1986] Miyahara, J., Takahashi, K., Anemiya, Y., Kamiya, N. and Satow, Y. (1986). *A new type of x-ray area detector utilising laser stimulated luminescence*. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. **A246**, 572.
- [Müller u. Brimacombe, 1997] Müller, F., and Brimacombe, R. (1997). *A new model for the three-dimensional folding of Escherichia coli 16S ribosomal RNA. I. Fitting the RNA to a 3D electron microscopic map at 20 Å*. J. Mol. Biol. **271**, 524-544.
- [Murzina *et al.*, 1988] Murzina, N.V., Vorozheykina, D.P. and Matvienko, N.I. (1988). *Nucleotide sequence of Thermus thermophilus HB8 gene coding 16S ribosomal-RNA*. Nucleic Acids Res. **16**, 8172-8172.

- [Naday *et al.*, 1994] Naday, I., Westbrook, E.W., Westbrook, M.L., Travis, D.J., Stanton, M., Phillips, W.C., O'Mara, D. and Xie, J. (1994). *Characterization and data collection on a direct-coupled CCD X-ray detector*. Nucl. Instr. and Meth. in Physics Research A **348**, 635-640.
- [Otwinowski, 1991] Otwinowski, Z. (1991). *Maximum likelihood refinement of heavy atom parameters*. Vortrag, Daresbury Study Weekend proceedings, 1991, 69-79
- [Otwinowski u. Minor, 1996] Otwinowski, Z. und Minor, W. (1996). *Processing of X-Ray diffraction data collected in oscillation mode*. Meth. Enzymol. **276**, 307-326.
- [Pioletti *et al.*, 2001] Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsch, T., Yonath A. and Franceschi, F. (2001). *Crystal structure of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3* EMBO J. **20** 1829-1839.
- [Poot *et al.*, 1998] Poot, R.A., van den Worm, S.H., Pleij, C.W.A., and van Duin, J. (1998). *Base complementarity in helix 2 of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for ribosome functioning*. Nucleic Acids Res. **26**, 549-553.
- [Ryden-Aulin *et al.*, 1993] Ryden-Aulin, M., Shaoping, Z., Kylsten, P. and Isaksson, L.A. (1993). *Ribosome activity and modification of 16S RNA are influenced by deletion of ribosomal protein S20*. Molecular Microbiology **7**, 983-992.
- [Schlünzen *et al.*, 2000] Schlünzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Glühmann, M., Janell, D., Bashan A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (2000). *Structure of a functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution*. Cell **102**, 615-623.
- [Spahn u. Prescott, 1996] Spahn, C.M.T. und Prescott, C.D. (1996). *Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translational apparatus*, J. Mol. Med. **74**, 423-439.

- [Stenkamp u. Jensen, 1984] Stenkamp, R. und Jensen, L.H. (1984). *Resolution revisited: Limit of detail in electron density maps*. Acta Crystallogr. **A40**, 251-254.
- [Stark *et al.*, 1995] Stark, H., Müller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R. and van Heel, M. (1995). *The 70S E. coli ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA*. Structure **3**, 815-821.
- [Stout u. Jensen, 1989] Stout, G.H. und Jensen, L.H. (1989). *X-Ray structure determination*. John Wiley & Sons, NY.
- [Takahashi *et al.*, 1984] Takahashi, K., Kohda, K. and Miyahara, J. (1984). *Mechanism of photostimulated luminescence in BaFX:Eu<sup>2+</sup> (X=Cl, BR)*. Journ. of Luminescence, **31 & 32**, 266-268.
- [Ten Eyck, 1973] Ten Eyck, L.F. (1973). *Efficient structure-factor calculation for large molecules by the fast fourier transform*. Acta Crystallogr. **A29**, 486.
- [Terwilliger u. Berendzen, 1999] Terwilliger, T.C. und Berendzen, J. (1999). *Automated MAD and MIR structure solution*. Acta Crystallogr. Sect. D **55**, 849-861.
- [Tocij *et al.*, 1999] Tocij, A., Schlünzen, F., Janell, D., Glühmann, M., Hansen, H. A., Harms, J., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (1999). *The small ribosomal subunit from Thermus thermophilus at 4.5 Å resolution: pattern fittings and the identification of a functional site*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14252-14257.
- [Tsiboli *et al.*, 1994] Tsiboli, P., Herfurth, E. and Choli, T. (1994). *Purification and characterization of the 30S ribosomal proteins from the bacterium Thermus thermophilus*. Eur. J. Biochem. **226**, 169-177.
- [Walsh, 2000] Walsh, C. (2000). *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*, Nature **406**, 775-781.
- [Wang, 1985] Wang, B.C. (1985). *Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography*, Meth. Enz. **115**, 90.

- [Weller u. Hill, 1992] Weller, J.W. and Hill, W.E. (1992). *Probing dynamic changes in rRNA conformation in the 30S subunit of the E. coli ribosome*, *Biochemistry* **31**, 2748-2757.
- [Wimberly *et al.*, 2000] Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C. und Ramakrishnan, V. (2000) *Structure of the 30S ribosomal subunit*. *Nature* **407**, 327-339.
- [Wittmann, 1982] Wittmann, H.G. (1982). *Components of bacterial ribosomes*, *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 155.
- [Wittmann-Liebold, 1978] Wittmann-Liebold, B. und Greuer, B. (1978). *The primary structure of protein S5 from the small subunit of the Escherichia coli ribosome*. *FEBS Lett.* **95**, 91-8.
- [Yonath u. Wittmann, 1988] Yonath, A. und Wittmann, H.G. (1988). *New aspects in three-dimensional structure determination of ribosomal particles*, *Structure & Expression* **1**, 191, R.H. Sarma & M.H. Sarma (Hrsg.), Adenine Press.



## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Ada Yonath für die Möglichkeit danken, diese äußerst interessanten Untersuchungen in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und somit meinen Teil zu einem so wichtigen Thema beisteuern zu können. Ich konnte von ihrer Seite zu jeder Zeit mit einem offenen Ohr und einer hilfreichen Hand rechnen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Schlünzen, der mir durch seine Hilfe und Frohnatur den nicht immer leichten Weg dieser Untersuchungen zeigte und immer ein Ausweg wußte. Ich konnte viel von ihm lernen.

Für die Begutachtung seitens des Fachbereichs und für die kritischen Anmerkungen möchte ich Herrn Prof. Dr. Robert Johnson danken.

Zudem wären die Meßzeiten im Ausland und die sonstige Arbeitszeit ohne meine Arbeitskollegen, die immer Verständnis zeigten, nur halb so interessant gewesen.

Vielen Dank insbesondere an Dr. Jörg Harms, der neben der Arbeit noch die Zeit fand, nahezu alle meine Konzerte zu besuchen und mich auch sonst musikalisch und 'bildlich' unterstützte.

Ebenfalls gilt mein Dank Ante Tocilj, der mir in der Zeit eher ein guter Freund als ein guter Schichtpartner war.

Und vielen Dank auch an unsere 'Engel', die immer für Kristalle und Freude sorgten.

Für die Bereitstellung der Synchrotron-Meßplätze bedanke ich mich herzlich.

Mein Dank gebührt natürlich auch meinen Eltern, die mich wo immer es ging liebevoll unterstützten.

Karen, ohne Dich wäre ich nie dort angelangt, wo ich jetzt bin!

## Liste der Publikationen von Marco Glühmann

- M. Glühmann, R. Zarivach, A. Bashan, J. Harms, F. Schlünzen, H. Bartels, I. Agmon, G. Rosenblum, M. Pioletti, T. Auerbach, H. Avila, H.A.S. Hansen, F. Franceschi and A. Yonath *Ribosomal crystallography: from poorly diffracting micro-crystals to high resolution structure*. To be published in *Methods: a companion to methods in enzymology*, accepted (2001).
- M. Pioletti, F. Schlünzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Glühmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath and F. Franceschi *Crystal structure of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3*. *EMBO J.* **20** 1829-1839 (2001).
- D. Janell, A. Tocilj, I. Kölln, F. Schlünzen, M. Glühmann, H.A.S. Hansen, J. Harms, A. Bashan, I. Agmon, H. Bartels, M. Kessler, S. Weinstein, F. Franceschi and A. Yonath *Ribosomal crystallography and heteropolytungstates*. In: *Polyoxometalate Chemistry*, M.T. Pope and Müller (eds.), Kluwer Academic Publishers/Netherlands 391-415 (2001).
- F. Schlünzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Glühmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi and A. Yonath *Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution*. *Cell* **102** 615-623 (2000).
- A. Bashan, M. Pioletti, H. Bartels, D. Janell, F. Schlünzen, M. Glühmann, I. Levin, J. Harms, H.A.S. Hansen, A. Tocilj, T. Auerbach, H. Avila, M. Simitsopoulou, M. Peretz, W.S. Bennett, I. Agmon, M. Kessler, S. Weinstein, F. Franceschi and A. Yonath *Identification of selected ribosomal components in crystallographic maps of prokaryotic ribosomal subunits at medium resolution*. In: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions*, ASM Press 21-33 (2000).
- H. Bartels, M. Glühmann, D. Janell, F. Schlünzen, A. Tocilj, A. Bashan, I. Levin, H.A.S. Hansen, M. Kessler, M. Pioletti, T. Auerbach, I. Agmon, W.S. Bennett, F. Franceschi and A. Yonath *Targeting exposed RNA regions in crystals of small ribosomal subunits at medium resolution*. *Cell. Mol. Biol. (Noissy-le-Grand)* **46(5)** 871-82 (2000).
- A. Tocilj, F. Schlünzen, H.A.S. Hansen, A. Bashan, D. Janell, M. Glühmann, H. Bartels, J. Harms, I. Agmon, F. Franceschi, and A. Yonath *The small ribosomal subunit from *Thermus thermophilus* at 4.5 Å resolution: pattern fittings and the identification of a functional site*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96** 14252-7 (1999).
- S. Weinstein, W. Jahn, C. Glotz, F. Schlünzen, I. Levin, D. Janell, J. Harms, I. Kölln, H.A.S. Hansen, M. Glühmann, W.S. Bennett, H. Bartels, A. Bashan, I. Agmon, M. Kessler, M. Pioletti, H. Avila, K. Anagnostopoulos, M. Peretz, T. Auerbach, F. Franceschi and A. Yonath *Metal compounds as tools for the construction and the interpretation of medium-resolution maps of ribosomal particles*. *J. Structural Biology* **127** 141-151 (1999).
- F. Schlünzen, M. Glühmann, D. Janell, I. Levin, A. Bashan, J. Harms, H. Bartels, T. Auerbach, M. Pioletti, H. Avila, K. Anagnostopoulos, H.A.S. Hansen, W.S. Bennett, I. Agmon, M. Kessler, A. Tocilj, M. Peretz, S. Weinstein, F. Franceschi and A. Yonath *Identification of selected components in electron density maps of prokaryotic ribosome at 7 Å resolution*. *J. Synchrotron Radiation* **6** 928-941 (1999).

# Lebenslauf

<b>Name</b>		Marco Glühmann
<b>Geburtsdatum</b>	09.02.1972	in Hamburg
<b>Schulbildung</b>	1978 – 1982	Besuch der Grundschule in Hamburg
	1982 – 1991	Besuch des Gymnasiums in Hamburg mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife
<b>Wehrdienst</b>	1991 – 1992	Neumünster und Schleswig
<b>Studium</b>	1992 – 1998	Studium der Physik an der Universität Hamburg
	1995 – 1996	Abschluss der Maitrise an der Universität Paul Sabatier in Toulouse, Frankreich
	1997 – 1998	Anfertigung der Diplomarbeit an der Technischen Universität Hamburg Harburg 'Mikroskopische Untersuchung der Phasentwicklung von $Al_2O_3/Ti_xAl_y$ -Verbundwerkstoffen'
	1997 – 2001	BWL-Zusatzstudium an der Fernuniversität in Hagen
<b>Promotion</b>	1998 – 2001	In den Max-Planck-Arbeitsgruppen für Strukturelle Molekularbiologie, Hamburg, unter Leitung von Frau Prof. Dr. A. Yonath

# Selbständigkeitserklärung

Hamburg, den 6. August 2001

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt zu haben und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Marco Glühmann

# Erklärung

Hamburg, den 6. August 2001

Hiermit erkläre ich, daß ich mich bis dato nicht anderwärts um den Doktorgrad beworben habe.

Marco Glühmann