

45: RÖNTGENSTRUKTURUNTERSUCHUNGEN AN PROTEINEN

INHALTSVERZEICHNIS

1. Hintergrund	1
1.1. Prinzip der Röntgenstrukturuntersuchung	1
1.2. Versuchsaufbau	2
2. Versuchsdurchführung	2
3. Auswertung	3
4. Fragen zum Versuch	4
4.1. Breite der Reflexe:	4
4.2. Symmetrioperationen innerhalb der Einheitszelle:	4
4.3. Zahl der Moleküle pro Einheitszelle	5

1. HINTERGRUND

1.1. Prinzip der Röntgenstrukturuntersuchung. Die Grundlage jeder Strukturuntersuchung durch Streuung ist die Tatsache, daß das Streubild auf dem Schirm (bzw. im Detektor) die Fouriertransformierte des Streuers / Targets darstellt, und die Fouriertransformation mathematisch umkehrbar ist, und somit aus dem Streubild eindeutig die Form des Streuers errechnet werden kann.

Bei der Strukturuntersuchung eines Proteinkristalls ergibt sich das Streubild als Produkt aus dem Formfaktor des Inhalts einer Einheitszelle (kann durchaus mehrere Moleküle des Proteins enthalten) und dem Streufaktor des Kristallgitters. Die Lage der Reflexionen ist somit durch das Gitter festgelegt, ihre Intensität gibt Aufschluß auf den Inhalt der Einheitszellen.

Allerdings stellt der Streuer im allgemeinen ein dreidimensionales Skalarfeld dar (z.B. Elektronendichte), das Bild auf dem Schirm ein zweidimensionales Skalarfeld. Somit ist sofort einsichtig, daß bei dem Vorgang Information verloren geht und eine Rücktransformation im allgemeinen nicht so einfach ist.

Die fehlende Information steckt in unserem Fall in der Phase des Röntgenlichts, das auf den Detektor trifft, der allerdings nur dessen Intensität (= Betrag des Feldvektors) registriert. Man kann die Phasen allerdings mit brauchbarer Genauigkeit durch den Einsatz des sogenannten multiplen isomorphen Ersatzes rekonstruieren, bei dem in das Präparat ohne Strukturveränderungen verschiedene Schwerionen eingelagert werden (U, Pb, Au, ...) um aus den überlagerten Intensitäten auf die Phase des originalen Proteinkristalls rückzuschliessen. Für eine eindeutige Bestimmung sind mindestens zwei Schwerionenpräparate notwendig, aber weitere verbessern die Genauigkeit ganz erheblich.

1.2. Versuchsaufbau.

1.2.1. Röntgenquelle.

Für scharfe Reflexe benötigt man möglichst monochromatisches und paralleles Röntgenlicht. Die Monochromatisierung erfolgt durch einen Graphitmonochromator (Braggbedingung), der die K_{α} -Linie (0,154nm) selektiert. Dabei dürften von der ursprünglichen Strahlungsleistung der Röhre mindestens 90% herausgefiltert werden.

Es folgt ein Kollimator mit einer Blendenöffnung von 0,3mm, was bei einem Abstand der zweiten Blende von schätzungsweise 40cm von der Anode einem Raumwinkelanteil von ca. 10^{-7} entspricht. Damit werden bestenfalls $1/10^8$ der Strahlungsleistung genutzt. Um trotzdem brauchbare Intensitäten zu bekommen (Sonst werden die Meßzeiten zu lang bzw. der Strahlungshintergrund wird zu einem Problem) wird eine Röntgenröhre mit wassergekühlter Drehanode eingesetzt. (Hohe Elektronenstrahlintensitäten möglich)

Um den Detektor nicht zu überlasten befindet sich hinter der Probe in Strahlrichtung ein "Nullstrahlfänger", ein kleiner Bleizylinder (ca. 1mm Durchmesser), der das in der Probe nicht gestreute Röntgenlicht absorbiert bzw. isotrop streut.

1.2.2. Probe.

Unser Streuer ist ein kleiner Myoglobin-Kristall, der sich in einem dünnen Glasrohr in wässriger Lösung befindet. Die Probe läßt sich um zwei Achsen drehen, um möglichst viele Reflexe sichtbar zu machen. Da der Winkel, unter dem dabei durch die Ewald-Kugel gedreht wird, die Reflexintensität beeinflußt, muß noch der sogenannte Lorenz-Faktor berücksichtigt werden. Das erledigt glücklicherweise bereits die Meßelektronik.

Da die Existenz von Phononen (Gitterschwingungen) die Intensität der Streureflexe schwächt (Debye-Waller-Faktor), was bei Raumtemperatur zu einem miserablen Rauschabstand und zu unverhältnismäßig langen Meßzeiten führen würde, muß die Probe gekühlt werden. Dazu dient ein freier Strahl von flüssigem (oder frisch verdampften (?) – wurde im Versuch nicht benutzt) Stickstoff, der eine Temperatur von ca. 70–80 K ermöglichen sollte. Prinzipiell wäre eine Helium-Kühlung natürlich besser (4,2K), aber weder die Verschwendung von Helium durch offene Kühlung noch der Aufwand, wollte man es zurückführen, wären dem Intensitätsgewinn im Normalfall angemessen.

Allerdings muß bedacht werden, daß trotz Schockfrostung der Probe und dem Einsatz von Gefrierschutz in der Lösung (beides zur Verhinderung der Kristallbildung im Wasser) jeder Einfrier- und Auftauvorgang die Struktur des Proteinkristalls schädigt.

1.2.3. Detektor.

Als Detektor dient eine ortsauflösende Ionisationskammer (Violdrahtkammer) mit je 512 Drähten in drei Ebenen. Die Transformation von den ebenen Koordinaten des Detektors zu den Kugelkoordinaten, in denen die Reflexe angegeben werden müssen, übernimmt nach einer Eichung mit einer Gittermaske der angeschlossene Meßrechner. Da der Detektor bei weitem nicht den ganzen Raumwinkel abdeckt, läßt er sich um die Probe herumfahren.

2. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Da der Glühdraht der Röntgenröhre kaputt war, konnte leider nicht selbst gemessen werden, was bei 2-3 Wochen Meßzeit für eine vollständige Serie wohl nicht weiter tragisch ist, da sowieso mit bereits bestehenden Ergebnissen weitergearbeitet werden muß.

3. AUSWERTUNG

Das Datenmaterial, das in den Meßreihen entsteht, muß dann in überlappenden Meßbereichen zur Deckung gebracht werden, um Interferenzbilder des ganzen Raumwinkels zu bekommen. Des weiteren wird aus den Serien für verschiedene Schwerionenderivate für jeden Reflex die Phase bestimmt. Bevor man diese Datensammlung zurücktransformiert um die Elektronendichtemappe (electron density map, eigentlich Elektronendichtekarte) zu erhalten empfiehlt es sich, aufgrund von Symmetrien Bereiche zu suchen, in denen das Datenmaterial ungewöhnlich starke Meßfehler aufweist und diese herauszunehmen. Das Ergebnis des Vorgangs ist dann eine dreidimensionale Elektronendichtemappe, in die man dann anhand der bekannten Sequenz des Proteins die Aminosäuren hineinfittet. Typische Anhaltspunkte sind in etwa die großen hydrophoben Reste (Ringstrukturen); Zuletzt wird durch numerische Variation der Grobstruktur und dem Vergleich des sich aus der gerechneten Struktur ergebenden Interferenzmusters mit dem gemessenen (Energiefunktion, z.B. mittlere quadratische Abweichung) das Modell optimiert.

Da das Arbeiten mit Elektronendichtemappen, die aus Messungen stammen, sehr mühsam ist, wurde im Praktikum nur mit einer theoretisch für ein α -Helix-Segment berechneten Elektronendichtemappe gearbeitet, die sehr viel schärfer ist.

4. FRAGEN ZUM VERSUCH

4.1. **Breite der Reflexe:** Verglichen mit den Streureflexen eines Silizium-Kristalls sind die des Proteinkristalls stark verschmiert. Das liegt daran, daß Proteine im Gegensatz zu reinem Silizium (oder anderen Atom- oder Ionenkristallen) relativ schlecht kristallisieren. Wirkliche Protein-Einkristalle wachsen üblicherweise nur bis zu Größen, mit denen man noch keine Strukturuntersuchungen durchführen kann. Glücklicherweise langern sich diese Kristallite mit *nahezu* der Kristall-Translationssymmetrie aneinander, es entsteht also ein 'Kristall', in dem die kleinen Bereiche minimal gegeneinander versetzt oder verkippt sind. Damit ist auch die perfekte Regelmäßigkeit des Kristalls 'aufgeweicht' (aber im Mittel nicht wirklich gebrochen) und dementsprechend sind die Reflexe stark verbreitert.

4.2. **Symmetrieoperationen innerhalb der Einheitszelle:** Eine zweizahlige Schraubachse bedeutet, daß das Protein zweimal (prinzipiell auch vier- oder sechsmal) in jeder Einheitszelle vorhanden ist. Dabei ist das zweite Molekül parallel zu einem der Basisvektoren um eine halbe Zelllänge verschoben und um 180° um diese Achse gedreht.

Ein Atom bei $\vec{R} = (u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c})$ wird also - bei Annahme eines orthogonalen Gitters im Orts- wie Impulsraum, sowie einer Schraubachse parallel zu \vec{b} - auf $\vec{R}' = (-u\vec{a} + (v + 1/2)\vec{b} - w\vec{c})$ gedreht.

Ebenso lassen sich n-zählige Schraubachsen konstruieren: Drehung um $360^\circ/n$ und Translation um \vec{a}/n ;

Nun gilt für den Strukturfaktor der Einheitszelle: (f_i ist der Atomare Streufaktor, \vec{R}_i der Ort des Atoms und $\vec{k} = h\vec{a}' + k\vec{b}' + l\vec{c}'$ der Streuvektor)

$$F_{hkl} = \sum_{i=1}^N f_i e^{2\pi i \vec{R}_i \vec{k}}$$

Beschränkt man sich auf Reflexe in \vec{b}' -Richtung (0k0), so verändert sich das zu: (mit $\vec{b}\vec{b}' = 1$)

$$F_k = \sum_{i=1}^N f_i e^{2\pi i k v_i \vec{b}\vec{b}'} = \sum_{i=1}^N f_i e^{2\pi i k v_i}$$

Führt man das gedrehte Molekül mit ein:

$$F_{hkl} = \sum_{i=1}^N f_i (e^{2\pi i \vec{R}_i \vec{k}} + e^{2\pi i \vec{R}'_i \vec{k}})$$

und bei Beschränkung auf (0k0)

$$F_k = \sum_{i=1}^N f_i (e^{2\pi i k v_i} + e^{2\pi i k (v_i + 1/2)}) = \sum_{i=1}^N f_i e^{2\pi i k v_i} (1 + e^{\pi i k})$$

Für $k=2n$ ergibt die letzte Klammer $(1+1)$, je zwei durch Schraubung entstandene Streuzentren streuen in Phase, der (0k0)-Reflex ist sichtbar und verstärkt. Für $k=2n+1$ wird die Exponentialfunktion -1 und die Klammer null, die gestreuten Wellen löschen sich gerade aus, jeder Summand des Zell-Strukturfaktors wird null, der Reflex mit ungeradem k verschwindet. Die Einschränkung auf ganzzahlige k stammt aus der Notwendigkeit der konstruktiven Interferenz der einzelnen Zellen des ganzen Kristalls.

4.3. **Zahl der Moleküle pro Einheitszelle.** Die Masse eines Myoglobin-Moleküls beträgt:

$$m_{\mu} = \frac{M_{\mu}}{N_a} = \frac{17800g/mol}{6,022 \cdot 10^{23}1/mol} = 2,956 \cdot 10^{-20}g$$

Die Masse der einzelnen Zelle ergibt sich als:

$$m_Z = \rho \cdot V = \rho \cdot a \cdot b \cdot c \cdot \sin\beta = 1,25 \cdot 10^6 g/m^3 \cdot 6,684 \cdot 10^{-26} m^3 = 8,68 \cdot 10^{-20} g \approx 2,9m_{\mu}$$

In dieses Ergebnis (ca. 3 Myoglobin / Zelle) fließt allerdings die Information über das Kristallwasser noch nicht mit ein. Bei einem Anteil von 30% blieben zwei Myoglobin-Moleküle, bei einem Anteil von 70% nur noch eines. Da allerdings in der zweiten Aufgabe angedeutet ist, daß sich eine gerade Anzahl von Molekülen in der Zelle findet (2-zählige Schraubenachse), so sind es vermutlich zwei Moleküle pro Zelle.