Zum Einfluss magnetischer Felder auf das Wachstum und die Qualität von Proteinkristallen

The influence of magnetic fields on protein crystal growth and quality

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Physik der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alke Meents

aus Liverpool

Hamburg, 2005

Gutachter der Dissertation:	1. PD Dr. Edgar Weckert
	2. Prof. Dr. Robert Johnson
Gutachter der Disputation:	1. PD Dr. Edgar Weckert
	2. Prof. Dr. Bernd Sonntag
Datum der Disputation:	02. August 2005
Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. Günter Huber
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Dr. Michael Martins
Dekan des Fachbereichs Physik:	Prof. Dr. Günter Huber

Kurzfassung

Magnetfelder können das Wachstum von Proteinkristallen auf verschiedene Arten beeinflussen. In homogenen Magnetfeldern richten sich einzelne Moleküle und vor allem größere Kristallite aufgrund ihrer magnetischen Anisotropie in Richtung des Magnetfeldes aus. In stark inhomogenen Magnetfeldern erfahren diamagnetische Substanzen eine abstoßende und paramagnetische Substanzen eine anziehende Kraft zu Orten kleinerer bzw. größerer Feldstärke. Bei ausreichend starken Inhomogenitäten lässt sich daher für diamagnetische Proteine ein der Mikrogravitation und für paramagnetische Proteine ein der Hypergravitation vergleichbarer Zustand auf der Erde herstellen. Insbesondere für die Proteinkristallisation in homogenen Magnetfeldern und die Kristallisation diamagnetischer Proteine in inhomogenen Magnetfeldern wird in der Literatur über einen positiven Effekt auf die Kristallqualität berichtet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine systematische Untersuchung des Effektes der Proteinkristallisation in Magnetfeldern auf die Kristallqualität durchgeführt. Die Bestimmung der Kristallqualität erfolgte dabei durch Bestimmung der Mosaizität mittels hochaufgelöster Röntgenbeugung. Von einigen Kristallen wurden zudem Intensitätsdatensätze aufgezeichnet. Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte durch *Wilcoxon*-Rangsummentests.

Eine Untersuchung des Effektes homogener Magnetfelder von $5\,T$, $8.8\,T$ und $15.8\,T$ auf die Kristallqualität erfolgte an den diamagnetischen Proteinen Thaumatin, Trypsin und Lysozym sowie an paramagnetischem Myoglobin. Während für die diamagnetischen Proteine kein deutlicher Effekt zu erkennen ist, sind die Myoglobin Kristalle aus dem Magnetfeld bis zu 14 mal größer als die Kristalle der Kontrollgruppe und weisen signifikant kleinere Mosaizitäten auf. Die Kristalle aus dem Magnetfeld beugten zudem zu deutlich höheren Auflösungen als der beste in der Literatur beschriebene Datensatz.

Zum Erreichen stark inhomogener Magnetfelder wurden für einen Elektromagneten spezielle Polschuhe berechnet und konstruiert. Der Aufbau erlaubt die Magnetolevitation kleiner Mengen Wasser und von Lösungen diamagnetischer Proteine. Dies war bisher nur mit *Bitter*- oder supraleitenden Magneten möglich.

Der Effekt der Kristallisation in einer der Mikrogravitation vergleichbaren Umgebung wurde an den diamagnetischen Proteinen Lysozym und Insulin untersucht. Mosaizitätsmessungen zeigen jedoch, wenn überhaupt einen leicht negativen Effekt der Kristallisation in inhomogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität. In inhomogenen Magnetfeldern kristallisierte paramagnetische Myoglobinkristalle weisen eine signifikant höhere Mosaizität auf und zeigen bereits unter dem Polarisationsmikroskop deutliche Störungen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Kristallisation von Proteinen mit einer großen magnetischen Anisotropie wie z.B. Myoglobin eine vielversprechende Methode zu einer deutlichen Verbesserung der Kristallqualität darstellt.

Abstract

Magnetic fields can affect protein crystal growth in several ways. In homogeneous magnetic fields molecules and crystallites lign up themselves along the magnetic field direction due to their magnetic anisotropy. Inhomogeneous magnetic fields exert a force on diamagnetic and paramagnetic compounds towards regions of lower or higher field strength. This effect can be used to create a microgravity-like environment for diamagnetic proteins and an environment comparable to hypergravity for paramagnetic proteins. Crystallization in homogeneous magnetic fields and a microgravity-like environment are reported to have a positive effect on crystal quality.

The aim of this work was to systematically investigate the effect of protein crystallization in magnetic fields on the crystal quality by comparing a large number of crystals grown under identical conditions with- and without magnetic fields. Crystal quality was determined by means of high resolution rocking-curve measurements. Furthermore in certain cases complete diffraction datasets were collected. Any possible influence of magnetic fields on the mosaicity and the quality of the diffraction data was evaluated statistically by applying *Wilcoxon*-ranksum tests.

To investigate the effect of protein crystallization in homogeneous magnetic fields the diamagnetic proteins Thaumatin, Trypsin, and Lysozyme and paramagnetic Myoglobin were crystallized in magnetic fields of $5\,T$, $8.8\,T$, and $15.8\,T$. The analysis of crystal mosaicity and quality of the diffraction data of the diamagnetic proteins did not reveal a significant influence on the crystal quality. In contrast the crystals of paramagnetic Myoglobin grew up to 14 times larger than the ones in the control experiment. In addition they had a significant lower mosaicity, and diffracted to a higher resolution than ever reported before.

Special pole pieces for an existing magnet were designed and build to grow protein crystals in an inhomogeneous magnetic field The experimental setup generates gradients of up to $1400\,T^2/m$, which were previously only realized with *Bitter*- and superconducting magnets. It levitates microliter amounts of water and diamagnetic proteins in solution.

The influence on protein crystallization of an inhomogeneous magnetic field which generated a microgravity-like environment was studied on Lysozyme and Insulin. Surprisingly, mosaicity measurements did not reveal any improvement in crystal quality. Paramagnetic Myoglobin crystals grown inside this field configuration were of significantly inferior quality compared to the ones from the control group.

In conclusion the crystallization of proteins with a large magnetic anisotropy, such as Myoglobin, in homogeneous magnetic fields is a promising method for growing better quality crystals.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **9**

2 Grundlagen **13**

2.1 Proteinkristallzüchtung 13

2.1.1 Thermodynamik 13

2.1.2 Konvektion 15

2.1.3 Wachstumsparameter 18

2.1.4 Methoden zur Proteinkristallzüchtung 19

2.2 Röntgenkristallographie 22

2.2.1 Kristallgitter und reziprokes Gitter 22

2.2.2 Röntgenbeugung 22

2.2.3 *Darwin*-Breite 24

2.2.4 Intensität der gebeugten Strahlung 24

2.2.5 *Wilson*-Plot 28

2.2.6 Messung von Reflexintensitäten 28

2.3 Qualität von Proteinkristallen 31

2.3.1 Kristallbaufehler 31

2.3.2 Evaluation der Kristallqualität 37

2.3.3 Mosaizitätsmessungen 38

2.3.4 Informationen aus Intensitätsdaten 44

2.3.5 Mosaizitätsmessungen versus Intensitätsdaten 47

2.4 Grundlagen des Magnetismus 49

2.4.1 Magnetisierung 49

2.4.2 Magnetische Suszeptibilität 49

2.4.3 Ausrichtung von Stoffen in Magnetfeldern 50

2.4.4 Inhomogene Magnetfelder 51

2.5 Magnetolevitation 52

2.5.1 Grundlagen 52

2.5.2 Magneto-Archimedes Levitation 53

2.5.3 Experimentelle Realisation 53

2.6 Spezielle Aspekte der Proteinkristallzüchtung 55
2.6.1 Reinheit des Ausgangsmaterials 55
2.6.2 Homogene Magnetfelder 56
2.6.3 Mikrogravitation 61
2.6.4 Inhomogene Magnetfelder 64

3 Experimentelle Arbeiten 69
3.1 Der Gradientenmagnet PROLET 69
3.1.1 Technische Daten 69
3.1.2 Anforderungen 69
3.1.3 Verwendete Materialien 70
3.1.4 Berechnung der Polschuhe 70
3.1.5 Polschuhanordnung 71
3.1.6 Berechnete Feldverläufe 76
3.1.7 Gemessener Feldverlauf 78
3.1.8 Zusammenfassung 82
3.2 Kristallisationsexperimente 84
3.2.1 Auswahl der Modellsubstanzen 84
3.2.2 Vergleichende Kristallisationsuntersuchungen 84
3.2.3 Kristallzüchtung in Magnetfeldern 86
3.2.4 Durchgeführte Kristallisationexperimente 91
3.3 Bestimmung der Kristallmosaizität 93
3.3.1 PETRA-1 Messplatz 93
3.3.2 SNBL-Strahlführung 99
3.3.3 Mosaizitätsmessungen 100
3.3.4 Auswertung 102
3.3.5 Statistische Auswertung 105
3.4 Intensitätsdaten 107
3.4.1 X11-Messplatz 107
3.4.2 Datensammlung 107
3.4.3 Datenanalyse 108

4 Ergebnisse 109
4.1 Einfluss von Verunreinigungen 109
4.1.1 Aufreinigung und Kristallisation 109
4.1.2 Mosaizität 110
4.1.3 Intensitätsdaten 113
4.1.4 Zusammenfassung 116
4.2 Homogene Magnetfelder 117
4.2.1 Thaumatin 117

4.2.2 Trypsin . . . 125
4.2.3 Lysozym . . . 131
4.2.4 Myoglobin . . . 134
4.3 Mikrogravitation . . . 150
4.3.1 Qualitätsuntersuchungen an TIM-Kristallen . . . 150
4.3.2 Zusammenfassung . . . 155
4.4 Inhomogene Magnetfelder . . . 157
4.4.1 Tetragonales Lysozym . . . 157
4.4.2 Insulin . . . 161
4.4.3 Myoglobin . . . 163

5 Diskussion **167**
5.1 Proteinaufreinigung . . . 167
5.2 Homogene Magnetfelder . . . 167
5.2.1 Diamagnetische Substanzen . . . 168
5.2.2 Paramagnetische Substanzen . . . 169
5.3 Mikrogravitation . . . 170
5.4 Inhomogene Magnetfelder . . . 171
5.4.1 PROLET . . . 171
5.4.2 Diamagnetische Substanzen . . . 171
5.4.3 Paramagnetische Substanzen . . . 172
5.4.4 Qualitätsuntersuchungen an Proteinkristallen . . . 172

6 Ausblick **175**

A Hall-Sonden Kalibration **179**

B Kristallisationsvorschriften **180**
B.1 tetragonales Lysozym, *hanging drop vapour diffu-sion* . . . 180
B.2 tetragonales Lysozym, *Batch*-Kristallisation . . . 180
B.3 Pottwal-Myoglobin, *Batch*-Kristallisation . . . 181
B.4 Schweine-Insulin, Temperaturzüchtung . . . 181
B.5 Rinder-Trypsin, *hanging drop vapour diffusion* . . . 181
B.6 Thaumatin, *hanging drop vapour diffusion* . . . 182

C Säulenchromatographische Proteinaufreinigung **183**

D Gitterparameter der Modellproteine **184**

E Reflexe der Mosazititätsmessungen **187**

F Parameter der Intensitätsdatensammlungen **189**

Kapitel 1

Einleitung

Auf dem Gebiet Röntgenstrukturanalyse von biologischen Makromolekülen konnten in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt werden. Neue und weiter verfeinerte Methoden in der Molekularbiologie erlauben die schnellere Expression von Proteinen bei zugleich höheren Ausbeuten. Zudem erlauben neue brillantere Synchrotronstrahlungsquellen der dritten Generation in Kombination mit schnell auslesbaren 2D-Detektoren erheblich schnellere Datensammlungen an deutlich kleineren Kristallen. Durch die fortschreitende Automatisierungstechnik ist zudem eine erheblich effizientere Nutzung der Kapazitäten von Synchrotronstrahlungsquellen möglich. Auch auf dem Gebiet der Strukturlösung wurden durch die Etablierung neuer Methoden, wie z.B. der SAD-Methode, erheblich effizientere Abläufe möglich.

Ein nach wie vor jedoch nicht zufriedenstellend gelöstes Problem stellt die Kristallisation von biologischen Makromolekülen dar. Oft lassen sich von einem bestimmten Protein überhaupt keine Einkristalle züchten und wenn Einkristalle erhalten werden können, weisen diese oft ein für die Strukturbestimmung nicht ausreichendes Streuvermögen auf. Daher wurden auf dem Gebiet der Proteinkristallisation in den letzten Jahren erhebliche Anstrengungen unternommen, um auch dieses Problem in den Griff zu bekommen.

Neben molekularbiologischen Methoden, bei denen versucht wird durch Veränderungen der Aminosäuren-Sequenz eine verbesserte Kristallisierbarkeit des entsprechenden Proteins zu erreichen, lassen sich die weiteren Ansätze in zwei Gruppen unterteilen. Dabei wird zum einen versucht, durch Veränderung der chemischen Umgebung und zum anderen durch veränderte physikalische Parameter eine bessere Kristallisierbarkeit der Proteine zu erreichen.

Bei ersteren Methoden soll durch den Zusatz von verschiedenen Hilfsstoffen wie z.B. organischen und anorganischen Substanzen oder durch die Veränderung des pH-Wertes eine bessere Kristallisierbarkeit erreicht werden. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Substanzen in die sogenannten '*screening kits*' integriert. Zur Kristallisation eines neuen Proteins werden heutzutage üblicherweise oft mehr als 1000 unterschiedliche

Kristallisationsbedingungen ausprobiert. Zwar konnten durch diese neuen Kristallisationsbedingungen von einigen zuvor nicht kristallisierten Proteinen Kristalle erhalten werden, doch blieb dieser Erfolg auf eine relativ geringe Zahl von Proteinen beschränkt.

Die prominenteste Methode der zweiten Gruppe, die auf eine Verbesserung der Kristallisierbarkeit durch Veränderung physikalischer Parameter abzielt, dürfte wohl die Proteinkristallisation im Weltraum unter Mikrogravitation darstellen. Auf der Erde findet bei der Proteinkristallisation ein weitgehend durch Konvektion dominierter Stofftransport zum wachsenden Kristall hin statt. Im Weltraum dagegen wird die auf der Erde durch die Gravitationskraft hervorgerufene Konvektion weitestgehend unterdrückt und es ist ein diffusiver Stofftransport zu erwarten. Die durch diffusiven Stofftransport entstandenen Kristalle sollen dabei von besserer Qualität sein. Neben der Mikrogravitation wurde der Einfluss vieler weiterer physikalischer Parameter, wie z.B. der Kristallisationstemperatur, der Viskosität durch Kristallisation in Gelen oder der Effekt der Kristallisation in einem elektrischen Feld auf die Kristallqualität untersucht.

Besonders häufig wurde auch über einen positiven Effekt durch die Kristallisation in homogenen und inhomogenen Magnetfeldern auf die Qualität von Proteinkristallen berichtet. Durch das Anlegen eines homogenen Magnetfeldes soll es dabei über die Ausrichtung der magnetisch anisotropen Moleküle und deren Kristalliten durch verschiedenen Mechanismen zu einer Verbesserung der Kristallqualität kommen. In inhomogenen Magnetfeldern erfahren diamagnetische Substanzen zusätzlich eine abstoßende Kraft, mit der bei ausreichend großer Feldinhomogenität die Schwerkraft kompensiert werden kann. Daher sollten bei der Kristallisation von diamagnetischen Proteinen in stark inhomogenen Magnetfeldern ähnliche Effekte wie bei der Kristallisation unter Mikrogravitation zu erwarten sein.

Eine Untersuchung der Qualität von Proteinkristallen ist mit Röntgenbeugungsmethoden gut möglich. Neben herkömmlichen Intensitätsdatensammlungen stellen insbesondere Mosaizitätsmessungen eine besonders gut geeignete Methode zum Vergleich der Kristallqualität verschiedener Kristalle dar. Allerdings wurde der Einfluss physikalischer Parameter auf die Qualität von Proteinkristallen, bis auf sehr wenige Ausnahmen zum Einfluss von Mikrogravitation, bisher nicht systematisch untersucht. Die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte über den Einfluss magnetischer Felder auf die Kristallqualität basieren, wenn überhaupt, immer nur auf dem Vergleich der Qualität von jeweils einem oder bestenfalls zwei Kristallen einer Versuchs- und einer entsprechenden Kontrollgruppe. Der Vergleich von derartig kleinen Stichproben erlaubt dabei jedoch auch nicht nur ansatzweise signifikante Schlüsse. Daher sind die Ergebnisse der bisher angestellten Untersuchungen eher als Spekulationen denn als fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse anzusehen.

Ziel dieser Arbeit ist daher, eine systematische Untersuchung des vielfach in der Literatur beschriebenen aber bisher nur unzufriedenstellend untersuchten positiven Effektes der Proteinkristallisation in homogenen und inhomogenen Magnetfeldern auf die

Kristallqualität vorzunehmen. Ein möglicher Effekt soll dabei an verschiedenen Modellsystemen untersucht werden.

Hierzu ist zunächst die Auswahl geeigneter Modellsubstanzen und die Etablierung von Kristallzüchtungsmethoden zum Erhalt von Einkristallen der gewählten Proteine notwendig. Zur Kristallisation in homogenen Magnetfeldern müssen Kristallzüchtungseinsätze für die unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Magneten entwickelt werden. Stark inhomogene Magnetfelder, ausreichend zur Magnetolevitation von wässrigen Proteinlösungen, lassen sich bisher nur durch *Bitter*-Magneten, spezielle supraleitende Magnete oder eine Kombination dieser beiden Typen erzielen. Da solche Magnete jedoch nicht zur Verfügung standen, ist zur Kristallzüchtung in stark inhomogenen Magnetfeldern die Entwicklung eines auf einem klassischen Elektromagneten basierenden eigenen Magnetaufbaus angestrebt.

Die in den unterschiedlichen Magnetfeldern zu züchtenden Proteinkristalle sollen durch Mosaizitätsmessungen mittels hochaufgelöster Röntgendiffraktometrie und in einigen Fällen durch das Aufzeichnen von Intensitätsdatensätzen hinsichtlich ihrer Qualität charakterisiert werden. Um abschließend statistisch belegbare Aussagen über den Einfluss von Magnetfeldern auf die Kristallqualität erhalten zu können, ist der Vergleich einer größeren Zahl von Kristallen aus den unterschiedlichen Magnetfeldern mit Kristallen der entsprechenden Kontrollgruppen vorgesehen.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden zur Bestimmung der Kristallqualität von Proteinkristallen wurde zudem der Effekt der Aufreinigung des Proteinmaterials und der Effekt der Kristallisation unter Mikrogravitation auf die Mosaizität und die Beugungseigenschaften von Proteinkristallen untersucht.

Im folgenden Kapitel werden zunächst die zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen Grundlagen der Kristallzüchtung, der Röntgenbeugung und dem Verhalten von dia- und paramagnetischen Substanzen in Magnetfeldern kurz dargelegt. Ausführlicher wird auf die Qualität von Proteinkristallen und die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Methoden zur Verbesserung der Qualität von Proteinkristallen eingegangen. Im dritten Kapitel werden die experimentellen Arbeiten beschrieben. Neben den Kristallzüchtungsversuchen in Magnetfeldern werden insbesondere die Entwicklung des Magnetaufbaus zur Kristallzüchtung in inhomogenen Magnetfeldern PROLET und die Beugungsexperimente ausführlicher beschrieben. Im vierten Kapitel werden die durch Beugungsuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse vorgestellt. Daran schließt sich die Diskussion der Ergebnisse an. Im letzten Kapitel werden mögliche Anwendungen und weitere Experimente basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen vorgeschlagen.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Proteinkristallzüchtung

Im folgenden Abschnitt werden die zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen Grundlagen der Proteinkristallzüchtung kurz dargelegt. Zunächst werden die thermodynamischen Grundlagen der Keimbildung und des Kristallwachstums vorgestellt. Da viele Methoden der Proteinkristallzüchtung, wie z.B. die Kristallisation unter Mikrogravitation aber auch in Magnetfeldern, durch Unterdrückung der Konvektion auf eine Verbesserung der Kristallqualität abzielen, wird diese in einem eigenen Abschnitt behandelt. In einem weiteren Abschnitt wird dann auf weitere wichtige Parameter der Proteinkristallzüchtung eingegangen. Da diese z.T. erhebliche Auswirkungen auf die Kristallqualität haben können, spielt deren genaue Kenntnis insbesondere für vergleichende Untersuchungen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurden, eine wichtige Rolle. Abschließend werden die wichtigsten Techniken zur Kristallisation von Proteinen vorgestellt. Ausführlichere Abhandlungen dieses Themas mit z.T. wertvollen praktischen Hinweisen und Anleitungen finden sich z.B. in [1] und [2].

2.1.1 Thermodynamik

Im folgenden werden die wichtigsten thermodynamischen Aspekte der Nukleation und des Kristallwachstums kurz umrissen. Eine ausführliche Abhandlung des Themas findet sich z.B. in [3], eine gute Übersicht mit dem Schwerpunkt Proteinkristallwachstum findet sich in [4].

Übersättigung

Zur Kristallisation muss eine wässrige Proteinlösung in einen thermodynamisch instabilen Zustand überführt werden. Dies kann auf unterschiedliche Arten erfolgen, z.B. durch die Zugabe eines Stoffes zur Erniedrigung der Löslichkeit, durch Veränderung des pH-Wertes, durch Verdunstung des Lösungsmittels oder durch Absenken der Tem-

peratur. Die Antriebskraft für Nukleation und Kristallwachstum sind die unterschiedlichen chemischen Potentiale zwischen den Molekülen in einer übersättigten und einer gesättigten Lösung. Ist C die aktuelle und C_s die Gleichgewichtskonzentration, so gilt für die entsprechende Energiedifferenz der Moleküle

$$\Delta\mu = k_B T \ln(C/C_s). \tag{2.1}$$

Die Übersättigung wird meist als das Verhältnis $\beta = C/C_s$ oder auch als $\sigma = (C - C_s)/C_s$ definiert.

Nukleation

Bei ausreichend hoher Übersättigung bilden sich Kristallkeime. Dabei werden zwei Arten der Nukleation unterschieden: die homogene und die heterogene Nukleation. Bei ersterer findet die Nukleation innerhalb der Lösung statt, bei letzterer erfolgt sie an Phasengrenzflächen, z.B. der Gefäßoberfläche oder an Staubpartikeln. Im folgenden soll nur auf die homogene Nukleation eingegangen werden. Zur Bildung eines Kristallkeims mit dem Volumens V und der Oberfläche S muß die Energie

$$\Delta G = -\frac{V}{\Omega} k_B T \ln\beta + S\,\gamma \tag{2.2}$$

aufgebracht werden, wobei Ω das Volumen eines Moleküls und γ die freie Oberflächenenergie zwischen Kristall und Lösung sind. Unter der Annahme eines kugelförmigen Nukleus mit dem Radius r läßt sich für Gleichung 2.2 auch

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} k_B T \ln\beta + 4\pi r^2 \gamma \tag{2.3}$$

schreiben. Ein Kristallkeim ist entsprechend Gleichung 2.3 erst dann thermodynamisch stabil, d.h. die Anlagerung weiterer Moleküle führt zu einem Energiegewinn, wenn er die kritische Größe

$$r^\star = \frac{2\Omega\gamma}{k_B T \ln\beta} \tag{2.4}$$

überschritten hat. Hierzu muss jedoch zuvor die freie Energie

$$\Delta G^\star = \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(k_B T \ln\beta)^2} \tag{2.5}$$

durch Energiefluktuationen innerhalb der Lösung aufgebracht werden. Anschaulich bedeutet dies, dass zunächst eine ausreichend große Anzahl von Molekülen koagulieren muß, bevor ein stabiler Keim entsteht. Homogene Nukleation ist daher umso wahrscheinlicher, je höher die Konzentration der Moleküle in der Lösung ist bzw. je näher sich die Moleküle einander in der Lösung kommen. Hierzu ist anzumerken, dass zur homogenen Nukleation erheblich größere Übersättigungen erforderlich sind als zur heterogenen Nukleation.

Kristallwachstum

Bei einem perfekten bzw. störungsfreien Kristall findet das Flächenwachstum über 2D-Nukleation statt. Hierzu muß ein Molekül zunächst von der Kristallfläche adsorbiert werden. Werden weitere Moleküle adsorbiert und lagern sich durch Oberflächendiffusion zusammen, entsteht analog zur 3D-Nukleation ein sog. 2D-Flächenkeim. Hat der Flächenkeim seine kritische Größe erreicht, so ist er thermodynamisch stabil und die Anlagerung weiterer Moleküle führt zu einem Energiegewinn. Schließlich ist die gesamte Kristallfläche mit einer neuen Schicht bedeckt. Weitere Schichten entstehen nach dem gleichen Prinzip. Das Wachstum über einen solchen 2D-Nukleationsmechanismus ist allerdings relativ selten, da hier analog zur 3D-Nukleation relativ hohe Übersättigungen benötigt werden.

Häufiger dagegen ist Spiralwachstum zu beobachten (z.B. [5, 2]). Voraussetzung für das Spiralwachstum ist das Vorhandensein von Schraubenversetzungen. Durch eine Schraubenversetzung stehen den Molekülen an der Wachstumsfläche ständig Stufen zur Verfügung, an denen sie sich energetisch besonders günstig anlagern können.

2.1.2 Konvektion

Der Konvektion kommt in der Proteinkristallisation, vor allem in der Literatur, eine relativ große Bedeutung zu. In einem konvektionsfreien System ist ein rein diffusiver Stofftransport zu erwarten. Unter herkömmlichen Kristallisationsbedingungen tritt jedoch neben diffusivem auch konvektiver Stofftransport auf. Numerische Simulationen zeigen, dass der konvektive Stofftransport einen um 1-2 Größenordnungen größeren Beitrag zum Gesamtstofftransport leistet als der diffusive Stofftransport [6, 7] und damit einen erheblichen Einfluss auf das Kristallwachstum haben sollte. Einige Methoden wie z.B. das Kristallwachstum in der Schwerelosigkeit [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14] oder die Kristallisation in Gelen [15, 12] zielen daher auf eine Verminderung bzw. Unterdrückung der Konvektion. Grundsätzlich lassen sich zwei Arten der Konvektion unterscheiden: Die durch Auftriebskräfte verursachte *Rayleigh*-Konvektion und die durch Oberflächenspannungseffekte verursachte *Marangoni*-Konvektion.

Rayleigh-Konvektion

Bei der Kristallisation findet ein Stofftransport aus der Lösung hin zu dem wachsenden Kristall statt. Durch den Einbau von Molekülen in das Kristallgitter kommt es in der Umgebung des wachsenden Kristalls zu einer Verarmung an Molekülen: Es bildet sich ein Konzentrationsgradient und damit ein Dichtegradient um den wachsenden Kristall aus. Durch diesen Dichtegradienten kommt es unter dem Einfluss der Gravitation neben diffusivem zu konvektivem Stofftransport (s. Abb.2.1).

In einem System tritt die durch Dichtegradienten hervorgerufene *Rayleigh*-Konvektion auf, wenn die sog. *Rayleigh*-Zahl Ra einen kritischen Wert erreicht. Die

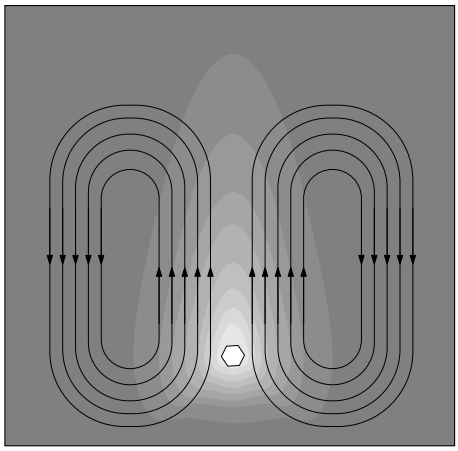

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der *Rayleigh*-Konvektion bei einem wachsenden Proteinkristall: Die an Protein verarmte Lösung (heller Bereich) weist eine geringere Dichte als die übrige Lösung auf und steigt nach oben auf. Gleichzeitig findet im unteren Bereich des Gefäßes ein Stofftransport zum Kristall hin statt. In der Lösung kommt es hierdurch zu turbulenten Strömungen und dadurch zu der durch Pfeile angedeuteten Konvektion.

Rayleigh-Zahl ist definiert als:

$$Ra = \frac{-\frac{\delta\rho}{\delta c} c_0 g H^3}{\mu D}. \tag{2.6}$$

In dieser Gleichung ist $\frac{\delta\rho}{\delta c}$ die Abhängigkeit der Dichte ρ eines Stoffes von dessen Konzentration c_0, H die Abmessung des Systems, g die Erdbeschleunigung, μ die Viskosität der Lösung und D die Diffusionskonstante [16]. Bei Betrachtung von Gleichung 2.6 ergeben sich einige naheliegende Möglichkeiten, *Rayleigh*-Konvektion zu unterdrücken: Durch Kristallzüchtung unter Mikrogravitation, durch Erhöhung der Viskosität, z.B. durch die Zugabe von Gelen, oder auch durch eine Verkleinerung des Systems, wobei solch einer Verkleinerung durch die zur Kristallisation notwendige Stoffmenge allerdings Grenzen gesetzt sind.

Marangoni-Konvektion

Durch dieselben Konzentrations- und auch Temperaturgradienten, die zur Ausbildung von Dichtegradienten führen, kommt es gleichzeitig zur Ausbildung von Gradienten der Oberflächenspannung. Abbildung 2.2 verdeutlicht diesen Zusammenhang. Um einen wachsenden Proteinkristall bilden sich an Protein verarmte Zonen. Solche Verarmungszonen treten besonders deutlich unter Mikrogravitation bei fehlender *Rayleigh*-Konvektion auf. Aus den daraus resultierenden unterschiedlichen Proteinkonzentrationen an der Oberfläche bilden sich Gradienten der Oberflächenspannung aus, welche zu konvektivem Stofftransport an der Grenzfläche führen.

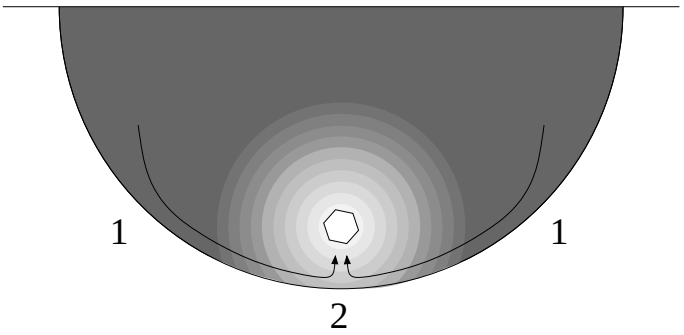

Abbildung 2.2: *Marangoni*-Konvektion um einen wachsenden Proteinkristall: Die an Protein verarmten Zonen sind hell dargestellt. Die Proteinkonzentration bei 2 ist kleiner als bei 1. Durch *Marangoni*-Konvektion kommt es im Bereich der flüssig-gasförmig Grenzfläche zu einem beschleunigten konvektiven Stofftransport zu der der Oberfläche am nächsten gelegenen Kristallfläche (in Anlehnung an [16]).

Analog zu der *Rayleigh*-Zahl 2.6 läßt sich die *Marangoni*-Zahl Ma eines Systems angeben [16]:

$$Ma = \frac{-\frac{\delta\gamma}{\delta c} c_0 H}{\mu D}. \tag{2.7}$$

Die Bedeutung der Variablen ist dabei die gleiche wie in Gleichung 2.6. $\delta\gamma/\delta c$ stellt die Abhängigkeit der Oberflächenspannung von der Konzentration dar. Wie aus der Gleichung 2.7 hervorgeht, sollte *Marangoni*-Konvektion im Unterschied zur *Rayleigh*-Konvektion auch unter Mikrogravitation auftreten. Eine Erhöhung der Viskosität dagegen sollte auch hier zu einer Unterdrückung der Konvektion führen. Im Unterschied zur *Rayleigh*-Konvektion, bei der die Abmessung des Systems mit der dritten Potenz in die *Rayleigh*-Zahl eingeht, geht die Abmessung des Systems nur einfach in die *Marangoni*-Zahl ein. Daher sollte in großen Behältnissen die *Rayleigh*- und in kleinen die *Marangoni*-Konvektion dominieren. Eine sehr ausführliche Behandlung der *Marangoni*-Konvektion mit besonderem Bezug zur Proteinkristallisation findet sich in [16]. Allerdings wird ihr Einfluss auf die Proteinkristallisation im Vergleich zur *Rayleigh*-Konvektion als sehr gering angesehen. Zudem ist zu beachten, dass *Marangoni*-Konvektion nur in flüssig-flüssig und flüssig-gasförmigen Systemen auftritt.

Zusammenfassung

Bei konvektivem Stofftransport wird der wachsende Kristall ständig von der Mutterlösung umspült und ist an verschiedenen Stellen bzw. Kristallflächen unterschiedlichen Protein- und Salzkonzentrationen ausgesetzt. Es wird angenommen, dass diese Fluktuationen zu einem unregelmäßigen Wachstum und damit zu einer Verschlechte-

rung der Kristallqualität führen. Durch Unterdrückung der Konvektion während des Kristallwachstums findet dagegen ein rein diffusiver Stofftransport zum wachsenden Kristall hin statt und der Kristall wächst unter konstanteren Bedingungen, was zu einer besseren Kristallqualität führen soll. Eine ausführlichere Behandlung des Themas findet sich im Abschnitt 2.6.3, in dem die Effekte von Mikrogravitation auf die Kristallqualität diskutiert werden.

2.1.3 Wachstumsparameter

Der Ausgang eines Proteinkristallisationsexperimentes hängt empfindlich von den Umgebungsparametern wie z.B. Vibrationen oder der Kristallisationstemperatur ab. Im folgenden werden daher einige wichtige Parameter und ihr Einfluss auf die Kristallqualität diskutiert. Die Einflüsse der in dieser Arbeit genauer untersuchten Parameter 'Reinheit des Ausgangsmaterials', Mikrogravitation und der Effekt durch homogene und inhomogene Magnetfelder werden ausfürlich in Abschnitt 2.6 behandelt.

Vibrationen

Auch Vibrationen können einen Einfluss auf den Kristallisationsprozess und damit auf die Kristallqualität haben. Im Zusammenhang mit der Kristallisation unter Mikrogravitation wird z.B. das Problem von Vibrationen durch Crew-Manöver oder das Andocken von Raumfahrzeugen an die internationale Raumstation (ISS) diskutiert [17]. Zur Unterdrückung dieser Einflüsse wurde für die Proteinkristallisation auf der ISS ein spezielles Schockdämpfungssystem (ARIS) entwickelt. Dagegen konnte kein Einfluss einer im Kristallisationslabor betriebenen Zentrifuge auf das Kristallisationsverhalten von Proteinen beobachtet werden [2]. Allerdings wurden hierzu bisher keine systematischen Untersuchungen, insbesondere nicht in Bezug auf die Beugungseigenschaften der Kristalle, vorgenommen.

Temperatur

Die Temperatur hat einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit von Proteinen und damit auf die Nukleations- und Wachstumsraten [18, 19]. Aus diesem Grunde können unterschiedliche Temperaturen in Kristallisationsexperimenten zu Kristallen unterschiedlicher Qualität führen.

Von ebensolcher Bedeutung ist die zeitliche und räumliche Temperaturkonstanz. Insbesondere während des Kristallwachtums haben Temperaturschwankungen Auswirkungen auf die Kristallwachstumsraten und damit auf die Kristallqualität [20]. Durch besonders starke Temperaturschwankungen kann es sogar zu zeitweisen Auflösungsprozessen des Kristalls kommen. Temperaturgradienten innerhalb der Lösung führen zudem zu einer verstärkten Konvektion. Desweiteren können schnelle Temperaturände-

rungen zu thermischen Spannungen und damit zu Brüchen in bereits gewachsenen Kristallen führen.

Lösungseigenschaften

Der pH-Wert und die Konzentrationen von Salzen und anderen Stoffen beeinflussen ebenfalls empfindlich die Proteinlöslichkeit und damit das Kristallisationsverhalten von Proteinlösungen [18]. Abrupte Wechsel des pH-Wertes oder der Salzkonzentration haben dabei einen negativen Einfluss auf die Kristallqualität [20].

Auch Verunreinigungen haben einen Einfluss auf die Kristallwachstumsgeschwindigkeit. Insbesondere beeinflussen sie die Kinetik des Wachstums. Werden nur wenige Wachstumsstufen durch Verunreinigungen blockiert, kann dies die Wachstumsgeschwindigkeit um Größenordnungen verlangsamen. Im allgemeinen reichen hierzu schon geringste Mengen an Verunreinigungen aus, daher nimmt mit zunehmender Konzentration der Verunreinigungen auch ihr Einfluss auf das Wachstum zu.

Staubpartikel und andere Feststoffe in der Lösung beeinflussen vor allem den Nukleationsmechanismus. So können in der Lösung vorhandene Staubpartikel und nicht gelöstes Proteinmaterial als Kristallisationskeime dienen. In solchen Fällen erfahren die Kristalle andere Übersättigungen als dies bei homogener Nukleation der Fall ist.

Probengeometrie

Die Geometrie der Kristallisationsgefäße beeinflusst zum einen das Konvektionsverhalten [16], zum anderen hat z.B. bei den *vapor diffusion*-Methoden (siehe folgenden Abschnitt) der Abstand zwischen Reservoir und Proteinlösung einen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit und damit auf die Nukleationsrate und die Wachstumsgeschwindigkeit [21]. Das Tropfen- und Reservoirvolumen haben ebenfalls einen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit [22].

Zusammenfassung

Wie hier dargelegt, wird die Proteinkristallisation von vielen Parametern beeinflusst. Einige davon, wie z.B. die Temperatur, lassen sich relativ einfach und präzise regeln. Andere, wie z.B. die Konvektion, lassen sich dagegen nur schwer kontrollieren. Insgesamt sind bei der Proteinkristallisation wohl definierte, konstante Bedingungen anzustreben.

2.1.4 Methoden zur Proteinkristallzüchtung

Zur Züchtung von Proteinkristallen existieren viele Methoden. Allerdings haben sich in der Praxis einige Methoden als besonders vorteilhaft erwiesen, die im folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

vapor diffusion-Methoden

Die beiden wohl am häufigsten angewandten Methoden zur Proteinkristallisation sind die *hanging-* bzw. *sitting-drop vapor diffusion*. Bei diesen Methoden diffundiert Lösungsmittel von einem hängenden oder sitzenden Tropfen Proteinlösung, wie in Abbildung 2.3 gezeigt, über die Gasphase in ein Flüssigkeitsreservoir. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels kommt es in dem Tropfen zu einer langsamen Erhöhung der Protein- und Salzkonzentration. Dies führt zu einer Übersättigung der Proteinlösung und es wachsen Kristalle. Die treibende Kraft für diesen Diffusionsprozess ist der Dampf-

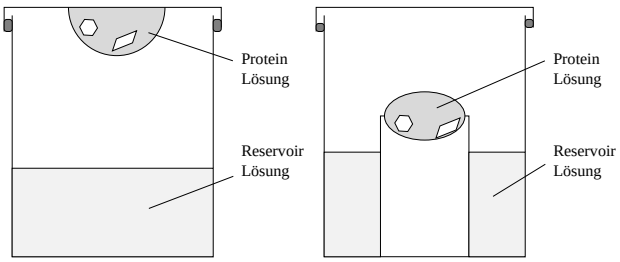

Abbildung 2.3: Experimenteller Aufbau zur Kristallzüchtung nach der *hanging-drop* (links) bzw. *sitting-drop vapor diffusion* Methode (rechts). Kommerziell erhältliche Kristallisationsplatten enthalten i.d.R. 24 - 96 solcher Probenkammern.

druckunterschied, der sich durch unterschiedliche Salzkonzentrationen in Tropfen und Reservoir ergibt. Der Einfluss des Proteins auf den Dampfdruck ist dabei vernachlässigbar gering. Bei manueller Präparation werden typischerweise Tropfen von $1-20\,\mu l$ mit einer bestimmten Salzkonzentration gegen $250-1000\mu l$ Reservoirlösung der doppelten Salzkonzentration equilibriert. Die Tropfengröße verringert sich bei diesem Prozess auf nahezu die Hälfte. Der Einsatz von Kristallisationsrobotern erlaubt den Einsatz wesentlich kleinerer Tropfen mit Volumina von $\leq 1\,\mu l$. Die *hanging-drop*-Methode hat hierbei gegenüber der *sitting-drop*-Methode den Vorteil, dass sich die sedimentierenden Kristalle an der Phasengrenze flüssig-gasförmig befinden, und dadurch leicht und unbeschadet zu entnehmen sind, während sie bei letzterer oft am Gefäßboden haften bleiben.

Batch-Kristallisation

Eine weitere relativ häufig angewandte Methode ist die sog. *Batch*-Kristallisation. Bei dieser Methode wird die Proteinlösung mit einer Fällungslösung gemischt, was zu einer Übersättigung des Proteins in der Lösung führt. Nach einiger Zeit entstehen aus dieser Lösung Proteinkristalle. Im Unterschied zu den *vapor diffusion*-Methoden, bei denen es langsam zu einer Übersättigung der Lösung kommt, führt bei der *Batch*-Kristallisation das Mischen unmittelbar zur Übersättigung. Dies führt in vielen Fällen zu einer höheren

Nukleationsrate und dadurch zur Ausbildung vieler, kleiner Kristalle. Ist die durch das Mischen erzielte Übersättigung zu groß, kann es, eher als bei der *vapor diffusion*, zur Ausbildung von amorphem Präzipitat anstelle von Kristallen kommen. Die *Batch*-Kristallisation weist jedoch den Vorteil auf, dass sie mit relativ geringem Aufwand betrieben werden kann und viele Proben auf einem kleinen Volumen untergebracht werden können. Das kann vor allen Dingen in speziellen Umgebungen mit geringem Platzangebot, wie z.B. in Magneten oder elektrischen Feldern von Vorteil sein.

Dialyse

Seltener erfolgt die Proteinkristallisation durch Dialyse. Wie in Abbildung 2.4 gezeigt, befindet sich hierbei die Proteinlösung, durch eine Dialysemembran getrennt, in Kontakt mit einer Fällungslösung. Durch die Membran diffundieren nun kleine Moleküle bzw. Ionen von der Fällungslösung in die Reservoirlösung. Durch diese Moleküle bzw. Ionen kommt es in der Proteinlösung zu einer Übersättigung und es wachsen Kristalle. Umgekehrt verhindert die Membran die Diffusion von den erheblich größeren Proteinmolekülen in die Fällungslösung. Da bei der Dialyse keine flüssig-flüssig und

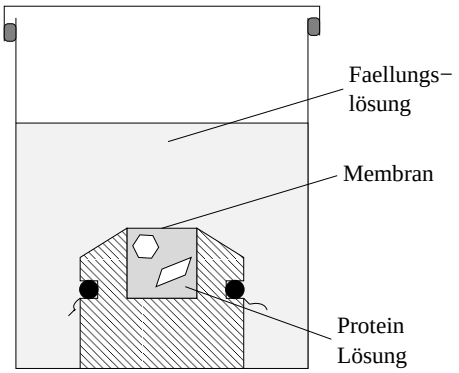

Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines Dialyseexperimentes zur Proteinkristallzüchtung am Beispiel eines kommerziell erhältlichen sog. *microdialysis-button*.

flüssig-gasförmig Phasengrenze und damit auch keine *Marangoni*-Konvektion auftritt, wird diese Methode bevorzugt zur Kristallisation in *Rayleigh*-konvektionsfreien Umgebungen wie z.B. unter Mikrogravitation eingesetzt. Werden bei dieser Methode geringe Mengen Proteinlösung ($5 - 50\mu l$) eingesetzt, so spricht man auch von *microdialysis*. Die Dialyse ist eine der aufwendigeren Methoden zur Proteinkristallzüchtung und wird daher vergleichsweise selten eingesetzt.

2.2 Röntgenkristallographie

In diesem Abschnitt werden die zum Verständnis der Arbeit notwendigen Grundlagen der Kristallographie und insbesondere der Röntgenbeugung kurz dargelegt. Vollständige Darstellungen des Themas finden sich z.B. in [23, 24]. Da Proteinkristalle in den meisten Fällen kleiner als die Extinktionslängen sind und zudem i.A. eine hohe Dichte von Kristalldefekten aufweisen, kommt hier die kinematische Theorie der Röntgenbeugung zur Anwendung. Lediglich der Abschnitt über die *Darwin*-Breite, also die Reflexbreite eines perfekten Kristalls, ist der dynamischen Theorie entnommen.

2.2.1 Kristallgitter und reziprokes Gitter

Der kristalline Zustand zeichnet sich durch eine dreidimensional-periodische Anordnung der Atome aus. Die Elementarzelle wird durch die drei Basisvektoren $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ und $\mathbf{c}$ aufgespannt. Dabei werden je nach Symmetrie der Anordnung der Atome oder Moleküle innerhalb der Elementarzelle sieben Kristallsysteme und 230 Raumgruppen unterschieden.

Analog zum Kristallgitter im realen Raum spannen die reziproken Gittervektoren $\mathbf{a}^\star$, $\mathbf{b}^\star$ und $\mathbf{c}^\star$ ein Gitter im reziproken Raum auf, dessen Gitterpunkte sich durch den reziproken Gittervektor

$$\mathbf{h} = h\mathbf{a}^\star + k\mathbf{b}^\star + l\mathbf{c}^\star \tag{2.8}$$

beschreiben lassen. Das reziproke Gitter steht dabei mit dem Kristallgitter in folgendem Zusammenhang:

$$\begin{aligned} &\mathbf{a}^\star \cdot \mathbf{a} = 1 \quad \mathbf{a}^\star \cdot \mathbf{b} = 0 \quad \mathbf{a}^\star \cdot \mathbf{c} = 0, \\ &\mathbf{b}^\star \cdot \mathbf{a} = 0 \quad \mathbf{b}^\star \cdot \mathbf{b} = 1 \quad \mathbf{b}^\star \cdot \mathbf{c} = 0, \\ &\mathbf{c}^\star \cdot \mathbf{a} = 0 \quad \mathbf{c}^\star \cdot \mathbf{b} = 0 \quad \mathbf{c}^\star \cdot \mathbf{c} = 1. \end{aligned} \tag{2.9}$$

2.2.2 Röntgenbeugung

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit Wellenlängen in der Größenordnung von typischerweise $0.1 - 10\,\text{Å}$. Zwischen Röntgenstrahlung und Materie treten zahlreiche Wechselwirkungen auf. Für die Röntgenbeugung ist hierbei insbesondere die *Thomson*-Streuung von Bedeutung. Dabei regt das elektromagnetische Feld $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ mit der Frequenz ν der einfallenden Röntgenstrahlung

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 \exp^{2\pi i\nu(t - \mathbf{r}/c)} \tag{2.10}$$

die Elektronen des Streuobjektes zu Oszillationen an. Diese beschleunigten Ladungen emittieren ihrerseits Röntgenstrahlung der gleichen Wellenlänge wie die anregende Strahlung. Die Atomkerne können aufgrund ihrer größeren Masse den Oszillationen

nicht folgen und tragen daher nur unwesentlich zum Streuprozeß bei. Der *Thomson*-Streuprozeß ist dabei kohärent, d.h. es gibt einen feste Phasenbeziehung zwischen der einfallenden und der gebeugten Strahlung.

Streuvektor

Dem Streuvektor $\mathbf{s}$ kommt bei der Beugung eine besondere Bedeutung zu. Er ist, wie in Abbildung 2.5 gezeigt, als der Differenzvektor zwischen dem unter dem Winkel 2θ gebeugtem Strahl $\mathbf{S}$ und dem einfallendem Strahl $\mathbf{S_0}$ mit $|\mathbf{S}| = |\mathbf{S}_0| = 1/\lambda$ definiert:

$$\mathbf{s} = \mathbf{S} - \mathbf{S_0}. \tag{2.11}$$

Während die Beugung an einer aperiodischen Anordnung von Atomen zu einer modulierten, kontinuierlichen Intensitätsverteilung im reziproken Raum führt, kommt es durch die Periodizität des Kristallgitters an bestimmten Stellen durch konstruktive Interferenz zu intensiven Beugungsmaxima während an den übrigen Stellen keine Intensität zu beobachten ist.

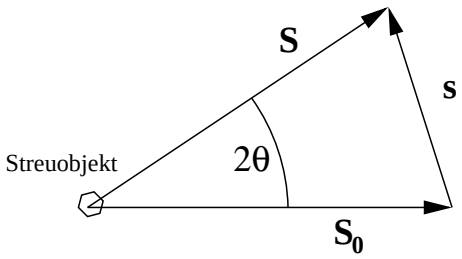

Abbildung 2.5: Definition des Streuvektors in einem Beugungsexperiment.

Laue-Gleichungen

Eine konstruktive Interferenz ist bei der Beugung an einkristallinen Proben immer dann zu beobachten, wenn die sog. *Laue*-Gleichungen

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{s} = h, \quad \mathbf{b} \cdot \mathbf{s} = k \quad \text{und} \quad \mathbf{c} \cdot \mathbf{s} = l \tag{2.12}$$

mit $h, k, l \in \mathbb{N}_0$ alle gleichzeitig erfüllt sind. Die Zahlentripel h, k, l werden auch als *Miller*-Indizes bezeichnet. Diese Bedingungen sind für alle Punkte des reziproken Gitters, d.h. $\mathbf{s} = \mathbf{h}$ erfüllt. Bei der Beugung am Einkristall ist also immer dann konstruktive Interferenz zu beobachten, wenn der Streuvektor $\mathbf{s}$ mit einem reziproken Gittervektor $\mathbf{h}$ zusammenfällt.

Bragg-Gleichung

Eine skalare Betrachtung der *Laue*-Gleichungen führt zur sog. *Bragg*-Gleichung. Diese gibt den Zusammenhang zwischen dem Beugungswinkel 2θ und dem Netzebenenabstand zweier benachbarter Netzebenen $d_{\mathbf{h}}$ bei gegebener Wellenlänge λ an:

$$\lambda = 2d_{\mathbf{h}} \sin\theta \tag{2.13}$$

Ist die *Bragg*-Gleichung erfüllt, kommt es zu konstruktiver Interferenz der an den verschiedenen Netzebenen gebeugten Strahlung und damit zum Auftreten von sog. *Bragg*-Reflexen.

2.2.3 *Darwin*-Breite

Aus der dynamischen Theorie der Röntgenbeugung läßt sich für einen perfekten, d.h. einen störungsfreien Kristall, die Breite eines Reflexprofils theoretisch bestimmen [25]. Diese *Darwin*-Breite $\omega_D(\mathbf{h})$ errechnet sich für einen unendlich dicken Kristall in Transmissionsgeometrie zu

$$\omega_D(\mathbf{h}) = \frac{2\,\lambda^2}{\pi\,V_0} r_0 \frac{P}{\sin 2\theta} \mid F_{\mathbf{h}} \mid, \tag{2.14}$$

wobei V_0 das Volumen der Elementarzelle, $F_{\mathbf{h}}$ der Strukturfaktor und P der Polarisationsfaktor ist. $r_0 = 2.81 \cdot 10^{-15}\,m$ stellt den klassischen Elektronenradius dar. Einige ausgewählte *Darwin*-Breiten von Silizium und Proteinkristallen sind im Abschnitt 2.3.1 in Tabelle 2.1 angegeben.

2.2.4 Intensität der gebeugten Strahlung

In diesem Abschnitt sollen kurz die die Intensität der *Bragg*-Reflexe bestimmenden Faktoren im Rahmen der kinematischen Theorie vorgestellt werden.

Strukturfaktor

Das Röntgenbeugungsexperiment liefert den Betrag der Fouriertransformierten der Elektronendichteverteilung $\rho(\mathbf{r})$ des Streuobjektes in Einheiten der Streuamplitude eines einzelnen Elektrons:

$$F_{ges}(\mathbf{s}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \exp\left[2\pi i \mathbf{r}\cdot\mathbf{s}\right] dv. \tag{2.15}$$

$F(\mathbf{s})$ ist dabei die im Allgemeinen komplexe Amplitude der gestreuten Strahlung, $\mathbf{r}$ der Ortsvektor und V das Volumen des Streuobjektes. Wie im vorherigen Abschnitt dargelegt, kommt es bei der Beugung am Einkristall nur an den Punkten des reziproken

Gitters zu konstruktiver Interferenz. Das Integral in Gleichung 2.15 läßt sich daher für diesen Fall durch eine Fouriersummation der Form

$$F_{ges}(\mathbf{h}) = F(\mathbf{h}) \sum_{g} \exp\left[2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{g}\right] \tag{2.16}$$

ersetzen, wobei über alle Elementarzellen, beschrieben durch deren Gittervektor $\mathbf{g}$, summiert wird. Der Term $F(\mathbf{h})$ in Gleichung 2.16 stellt die Fouriertransformierte der Elektronendichteverteilung einer Elementarzelle dar und wird auch als Strukturfaktor bezeichnet. Für ihn gilt:

$$F(\mathbf{h}) = \sum_{j=1}^{N} f_j(\mathbf{h}) \exp\left[2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j\right] \tag{2.17}$$

In dieser Gleichung ist $f_j(\mathbf{h})$ der sog. Atomformfaktor, der das atomare Streuvermögen beschreibt, und $\mathbf{r}_j$ der Ortsvektor des j-ten Atoms in der Einheitszelle.

Atomformfaktor

Der Atomformfaktor beschreibt das Streuvermögen eines einzelnen freien Atoms in Ruhelage bezogen auf ein Elektron und ist die Fouriertransformierte der Elektronendichte ρ_a des entsprechenden Atoms:

$$f_j(\mathbf{s}) = \int \rho_a(\mathbf{r}) \exp\left[2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{s}\right] d\mathbf{r}^3 = 4\pi \int_{r=0}^{\infty} \rho_a(r)\, r^2 \frac{\sin\left(2\pi r \mathbf{s}\right)}{2\pi r \mathbf{s}} dr \tag{2.18}$$

In dieser Gleichung stellt der Atomformfaktor eine reelle Grösse dar und hängt lediglich von der Länge des Streuvektors $|\mathbf{s}|$ ab. Dieser einfache Zusammenhang trifft jedoch nur für ausreichend kleine Wellenlängen jenseits der Absorptionskanten des entsprechenden Atoms zu. Befindet sich die Wellenlänge der einfallenden Strahlung in der Nähe von Absorptionskanten, so treten Resonanzeffekte auf. Resonanzeffekten wird durch das Hinzufügen eines reellen Korrekturfaktors $f'(\lambda)$ und eines imaginären $if''(\lambda)$ Rechnung getragen. Für den Strukturfaktor gilt dann

$$f_j(\mathbf{s}, \lambda) = f_j^0(\mathbf{s}) + f_j'(\lambda) + i f_j''(\lambda), \tag{2.19}$$

wobei der Teil $f_j^0(\mathbf{s})$ dem Atomformfaktor aus Gleichung 2.18 entspricht. Atomformfaktoren für neutrale Atome und Ionen sind z.B. in [26] in tabellierter Form angegeben.

Friedelsches Gesetz

Bedingt durch den Streuprozess weisen die Reflexe $\mathbf{h}$ und $\bar{\mathbf{h}}$ i.A. die gleichen Intensitäten auf, es gilt also

$$I(\mathbf{h}) = I(\bar{\mathbf{h}}). \tag{2.20}$$

Dieser Zusammenhang wird auch als *Friedelsches* Gesetz bezeichnet. Im Falle resonanter Streuung gilt das *Friedelsche* Gesetz allerdings nicht mehr. Die Abweichungen vom *Friedelschen* Gesetz können dann zur Bestimmung der absoluten Konfiguration eines Moleküls dienen. D.h. in einer nicht zentrosymmetrischen Raumgruppe kann zwischen den Strukturen mit den Atomkoordinaten $\mathbf{r}_j$ und der mit den Atomkoordinaten $-\mathbf{r}_j$ unterschieden werden.

B-Faktor

Die bisherige Betrachtung des Streuvermögens geht von einer perfekt kristallinen Anordnung von Atomen in Ruhelage aus. Tatsächlich schwingen die Atome durch thermische Anregung um ihre energetisch günstigsten Ruhelagen. Zudem liegt insbesondere bei Proteinkristallen keine perfekte 3-dimensional-periodische Anordnung der Moleküle vor, vielmehr ist diese durch statische Fehlordnung gestört. Beide Effekte führen zu einer Abnahme des Streuvermögens insbesondere bei höheren Beugungswinkeln. Eine Unterscheidung dieser beiden Effekte ist nicht ohne weiteres möglich. Daher wird ihnen gemeinsam durch den sog. B-Faktor oder auch Temperaturfaktor Rechnung getragen. Der Name Temperaturfaktor geht darauf zurück, daß die Theorie zunächst für kleine Moleküle ohne nennenswerte Fehlordnung entwickelt wurde, bei denen das veränderte Streuvermögen vor allem auf die thermische Auslenkung zurückzuführen ist.

Die Berücksichtigung beider Effekte erfolgt über die Korrektur des Streuvermögens f_j der Atome um den Beitrag $T_j(\mathbf{h})$:

$$f_j^{dyn} = f_j^{stat} \cdot T_j(\mathbf{h}). \tag{2.21}$$

Unter der Annahme isotroper harmonischer Schwingungen gilt vereinfachend:

$$T_j = \exp\left[-8\pi^2 U_j^2 \frac{\sin^2\theta}{\lambda^2}\right], \tag{2.22}$$

wobei U_j^2 das mittlere Auslenkungsquadrat des j-ten Atoms mit der Dimension $\left[\text{Å}^2\right]$ ist. Der Term

$$B = 8\pi^2 U_j^2 \tag{2.23}$$

wird auch Temperaturfaktor des j-ten Atoms bezeichnet. Unter der Annahme gleicher thermischer Auslenkungsparameter für alle Atome und isotropen Schwingungsverhaltens ergibt sich für die Intensität der gestreuten Strahlung bei der Temperatur T

$$I(\mathbf{h})_T = I(\mathbf{h}) \exp\left(-2B \sin^2\theta/\lambda^2\right). \tag{2.24}$$

Der Exponentialterm in dieser Gleichung wird auch als *Debye-Waller*-Faktor bezeichnet. Wie aus Gleichung 2.24 hervorgeht, führen thermische Schwingungen und Fehlordnung insbesondere bei großen Streuvektoren bzw. hohen Beugungswinkeln zu einer Verringerung des Streuvermögens.

Im Rahmen einer Strukturverfeinerung werden meistens individuelle Temperaturfaktoren für die Atome angenommen. Bei besonders hochaufgelösten Datensätzen können anisotrope thermische Auslenkungsparameter bestimmt werden.

Die Gleichungen wurden aus historischen Gründen für den Fall thermischer Auslenkungen abgehandelt. Im Falle statischer Fehlordnung geben die Auslenkungsparameter die Verteilung der Atome um ihren Mittelwert an, der im Falle thermischer Auslenkung der energetisch günstigsten Ruhelage entspricht. Eine ausführlichere Abhandlung des B-Faktors von Proteinkristallen findet sich im Abschnitt 2.3.4.

Lorentz- und Polarisationskorrektur

Die gemessenen Reflexintensitäten hängen neben strukturellen Parametern auch von den experimentellen Bedingungen ab. Dabei sind vor allem die Lorentz- und Polarisationskorrektur von Bedeutung. Die Lorentzkorrektur berücksichtigt den Effekt, dass Reflexe bei höheren Beugungswinkeln die Ewaldkugel bei konstanter Winkelgeschwindigkeit ω mit einer veränderten Lineargeschwindigkeit schneiden. Für die häufig vorliegende sog. *Weissenberg* 0. Schicht-Geometrie gilt:

$$L = \frac{\lambda^2}{\sin 2\theta}. \tag{2.25}$$

Die ebenfalls winkelabhängige Polarisationskorrektur P berücksichtigt den Dipolcharakter des Streuprozesses. Durch den Dipolcharakter und die Polarisation der einfallenden Strahlung kommt es in einer Richtung zu einer winkelabhängigen Schwächung der gebeugten Strahlung. Lorentz- und Polarisationskorrektur werden meist gemeinsam als LP-Korrektur bezeichnet.

Integral gestreute Intensität

Die von einem Kristall integral gestreute Energie E für einen Reflex $\mathbf{h}$ hängt neben den bereits erwähnten Parametern noch von der Winkelgeschwindigkeit ω mit der der Reflex durch die Ewaldkugel gedreht wird, dem Kristallvolumen V_x und dem Volumen V der Elementarzelle ab. Es gilt:

$$E_{\mathbf{h}} = \frac{\lambda}{\omega} I_0 \left(\frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 c^2 m} \right)^2 L\, P\, \frac{V_x}{V^2} \mid F_{hkl} \mid^2 . \tag{2.26}$$

Dabei ist das Streuvermögen proportional zu $1/V^2$. Für sehr große Elementarzellen, wie sie bei Proteinkristallen vorkommen, sind daher pro Reflex relativ wenig gestreute Photonen zu erwarten. Für Beugungsuntersuchungen an Proteinkristallen werden deshalb große Primärintensitäten I_0 benötigt.

2.2.5 *Wilson*-Plot

Der *Wilson*-Plot stellt eine elegante Methode dar, den globalen B-Faktor einer Struktur aus Intensitätsdaten zu bestimmen. Nach erfolgter Lorentz- und Polarisationskorrektur und ggf. einer Absorptionskorrektur gilt für die gemessene Intensität eines Reflexes

$$I_{\mathbf{h}} = K \mid (F_{\mathbf{h}})_r \mid^2 \exp\left(-2B \sin^2\theta/\lambda\right). \tag{2.27}$$

K ist in dieser Gleichung ein Skalenfaktor und $F(\mathbf{h})_r$ der Strukturfaktor für Atome in Ruhelage. Unter der Annahme einer statistischen Verteilung der Atome in der Elementarzelle ergibt sich für den Erwartungswert des Strukturfaktors für N-Atome

$$\langle \mid F(h)_r \mid \rangle^2 = \sum_{j=1}^{N} f(h)_j^2 = \Sigma. \tag{2.28}$$

Für den Mittelwert der Intensität in einen kleinen Winkelbereich I_θ gilt demnach

$$\langle I_\theta \rangle = K \langle \mid F_r \mid^2 \rangle \exp\left(-2B \sin^2\theta/\lambda^2\right) = K\Sigma_\theta \exp\left(-2B \sin^2\theta/\lambda^2\right). \tag{2.29}$$

Logarithmierung von Gleichung 2.29 ergibt

$$\ln\{\frac{\langle I_\theta \rangle}{\Sigma_\theta}\} = \ln K - 2B \sin^2\theta/\lambda^2. \tag{2.30}$$

Eine Auftragung der $\ln\{\langle I_\theta \rangle/\Sigma_\theta\}$-Werte gegen $\sin^2\theta/\lambda^2$ sollte eine Gerade mit der Steigung $-2B$ und dem Achsenabschnitt $\ln K$ ergeben.

2.2.6 Messung von Reflexintensitäten

Die Messung der Intensität eines Reflexes kann mit Punkt- oder Flächendetektoren erfolgen. Da mit dem Punktdetektor immer nur einzelne Reflexe gemessen werden können, eignen sich solche Messungen weniger zur Intensitätsdatensammlung an Kristallen größerer Moleküle wie z.B. Proteinen. Solche Messungen erfolgen vorteilhafterweise mit Rotationsaufnahmen in Kombination mit Flächendetektoren wie CCD-Kameras oder Bildplattensystemen. Diese Methode erlaubt pro Bild die parallele Aufzeichnung von bis zu mehreren tausend Reflexprofilen.

Intensitätsmessungen mit Punktdetektoren

Abbildung 2.6 (links) zeigt schematisch den Aufbau zur Messung von Reflexintensitäten mit einem Punktdetektor. Der Kristall befindet sich dabei im Zentrum eines Vier- oder auch eines Sechs-Kreis-Diffraktometers. Zur Messung der Intensität $I(\mathbf{h})$ eines Reflexes wird der Detektor unter dem sich aus dem d-Wert des Reflexes und der Wellenlänge ergebenden Winkel 2θ positioniert. Nun wird der entsprechende reziproke Gittervektor $d^*_{\mathbf{h}}$ mit Hilfe eines Diffraktometers nahe an seine Beugungsposition (P1) gebracht. Durch

Drehung um einen Kreis des Diffraktometers (hier des ω-Kreises) wird der reziproke Gittervektor anschließend über die Beugungsposition (P2) hinweg durch die Ewaldkugel gedreht und die im Detektor registrierte Intensität $I(\omega)$ als Funktion des Drehwinkels aufgezeichnet. Die Auftragung $I(\omega)$ wird auch als Reflexprofil oder *rocking*-Kurve bezeichnet. Die Fläche unter der Kurve ist dabei der Reflexintensität proportional.

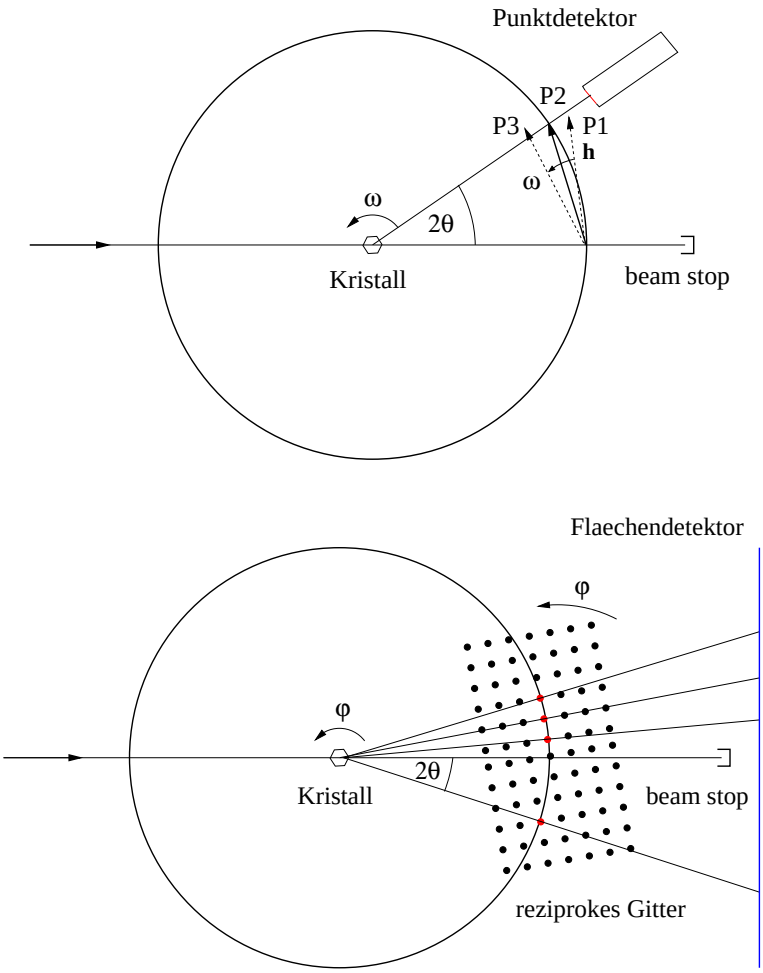

Abbildung 2.6: Methoden zur Messung von Reflexintensitäten: Messung einzelner Reflexintensitäten mit dem Punktdetektor (oben) und simultane Messung vieler Reflexintensitäten nach der Rotationsmethode mit einem Flächendetektor (unten).

Rotationsaufnahmen mit Flächendetektoren

Für die Intensitätsdatensammlung mit der Rotationsmethode wird, wie in Abbildung 2.6 (unten) gezeigt, nur ein Drehkreis benötigt. Dieser wird meist als ϕ-Kreis bezeichnet. Im Zentrum dieses Drehkreises befindet sich der Kristall. Die gebeugte Strahlung wird

mit einem hinter dem Kristall angeordneten Flächendetektor registriert. Ein Datensatz besteht aus einer bestimmten Anzahl von Bildern. Zur Aufnahme eines Bildes wird der Kristall um einen gewählten Drehwinkel $\Delta\phi$ mit konstanter Winkelgeschwindigkeit gedreht. Genau während dieser Zeit wird der Kristall durch Öffnen und Schließen des *shutters* mit Röntgenlicht bestrahlt. Immer wenn ein reziproker Gitterpunkt, beschrieben durch den Vektor **h**, während der Kristallrotation die Ewaldkugel schneidet, kommt es zu konstruktiver Interferenz der Röntgenstrahlung die mit dem Detektor erfaßt wird. Für die Aufnahme der folgenden Bilder wird der Kristall um den Winkel $\Delta\phi$ weitergedreht bis die Bilder den gewünschten Winkelbereich umfassen. Die Indizierung der Reflexe und die Ermittlung der Reflexintensitäten erfolgt anschließend mit Computerprogrammen.

2.3 Qualität von Proteinkristallen

Es existieren eine Reihe von Kriterien zur Beschreibung der Qualität eines bestimmten Kristalls. Welche Kriterien dabei von Relevanz sind, hängt im Wesentlichen von der späteren Anwendung des Kristalls ab. Während bei Edelsteinen vor allem Größe, Farbe und Klarheit eine Rolle spielen, kommt es bei Halbleiterkristallen vor allem auf einen störungsfreien Bau des Kristalls und einen möglichst geringen Grad von unerwünschten Verunreinigungen an.

Für experimentell arbeitende Strukturbiologen kommt es weniger auf den Kristall selbst an, als vielmehr auf die durch den entsprechenden Kristall gewinnbaren Strukturinformationen. Morphologie oder Farbe sind daher für ihn nur von untergeordneter Bedeutung. Als Qualitätskriterien dienen in diesem Fall vor allem aus Intensitätsdatensammlungen zugängliche Parameter wie z.B. das maximal erreichbare Auflösungsvermögen, das Signal-Rausch-Verhältnis der Daten, der interne R-Wert und nicht zuletzt die abschließend erhaltene Elektronendichtekarte bzw. das Strukturmodell. Allerdings hängen all diese Parameter neben der Kristallqualität auch stark von den experimentellen Bedingungen wie z.B. der Primärstrahlintensität, der Empfindlichkeit der Kamera und vielen weiteren Parametern ab.

Eine mehr intrinsische Größe der Proteinkristalle stellt die Kristallmosaizität dar. Bei ausreichender instrumenteller Auflösung sollte sie weitestgehend unabhängig von den experimentellen Bedingungen sein und stellt daher für vergleichende Qualitätsuntersuchungen eine geeignete Methode zur Evaluation der Kristallqualität dar.

In den folgenden Abschnitten wird auf die verschiedenen Kristallbaufehler von Proteinkristallen und deren Auswirkungen auf das Beugungsverhalten näher eingegangen. Zudem werden einige Methoden zur Bestimmung der Qualität von Proteinkristallen vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Wachstumsparameter, und hier insbesondere der Einfluss von Magnetfeldern, auf die Qualität von Proteinkristallen untersucht. Den Schwerpunkt in den folgenden Abschnitte bilden daher die auch im Rahmen dieser Arbeit experimentell eingesetzten Methoden der Mosaizitätsmessung und Intensitätsdatensammlung.

2.3.1 Kristallbaufehler

Ein perfekter Kristall zeichnet sich durch seine exakt dreidimensional-periodische Anordnung der Atome über das gesamte Kristallvolumen aus. Allerdings sind nur sehr wenige Substanzen bekannt, wie z.B. hochreines Silizium, von denen solch perfekte Einkristalle erhalten werden können. Die meisten Kristalle weisen eine mehr oder weniger hohe Dichte an Kristallbaufehlern auf. Allgemein werden dabei zwei Arten von Defekten unterschieden: Punktdefekte und ausgedehnte Gitterdefekte [23]. Erstere führen durch das Fehlen, den Ersatz oder den falschen Einbau einzelner Moleküle zu einer Verletzung der Translationssymmetrie. Bei letzteren ist die Periodizität des Gitters gestört, d.h.

der Kristall besteht aus zwei oder mehr perfekten Bereichen, deren Gitter jedoch eine Fehlorientierung zueinander aufweisen.

Besonderheiten von Proteinkristallen

Im Allgemeinen werden bei Proteinkristallen die gleichen Defekte wie bei Kristallen kleinerer organischer Moleküle, anorganischer Salze oder Halbleitern beobachtet [27]. Proteinkristalle weisen jedoch einige Besonderheiten auf. Der wesentliche Unterschied besteht in den erheblich schwächeren Kontakten zwischen den Molekülen in Proteinkristallen und der daraus resultierenden geringeren mechanischen und thermodynamischen Stabilität der Kristalle [28]. Sie sind daher meist sehr weich und empfindlich gegenüber mechanischen Einwirkungen, Temperaturschwankungen und trocknen an der Luft sehr schnell aus.

Punktdefekte - Molekulare Fehlordnung

Bei Proteinkristallen kommen verschiedene Arten von Punktdefekten vor. In erster Linie handelt es sich hierbei um Fehlordnungsphänomene. In Abbildung 2.7 sind drei mögliche Punktdefekte in Proteinkristallen schematisch gezeigt. Bei der Positionsfehlordnung sind die Moleküle leicht versetzt in das Gitter eingebaut, bei der Orientierungsfehlordnung weisen die Moleküle eine Fehlorientierung zu den anderen Molekülen auf und bei der Konformationsfehlordnung weisen die in den Kristall eingebauten Moleküle eine veränderte Konformation gegenüber den anderen Molekülen auf. Einen ähnlichen Effekt wie die Konformationsfehlordnung sollte auch die Inkorporation von Verunreinigungen vergleichbarer Größe haben. All diese kurzreichweitigen Fehlordnungserscheinungen sollten sich vor allem auf den B-Faktor (s. Abschn. 2.2.4) und damit auf das erreichbare Auflösungsvermögens der Kristallstrukturbestimmung auswirken [29, 30]. Neben der Verringerung der kohärent gestreuten Intensität sollten diese Kristalldefekte

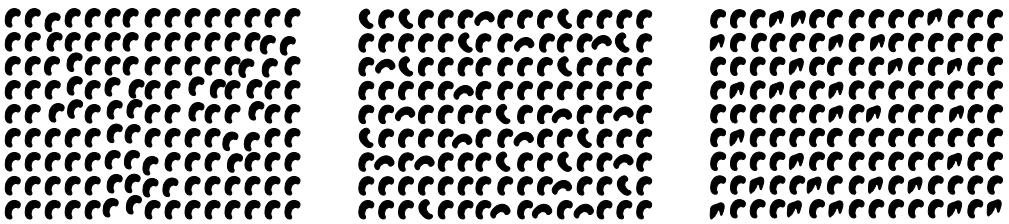

Abbildung 2.7: Verschiedene Formen der Fehlordnung in Proteinkristallen (v.l.n.r.): Positionsfehlordnung, Orientierungsfehlordnung und Konformationsfehlordnung (in Anlehnung an [30]).

zusätzlich zu einer Erhöhung der diffusen Streuung und damit letztendlich zu einem schlechteren Signal/Rauschverhältnis bei der Datensammlung führen.

Gitterdefekte - Kristallmosaizität

Ein perfekter Kristall weist ein Kristallgitter ohne Störungen der Periodizität auf. Für solch einen Kristall sollte die Breite eines Reflexes (s. Abschn. 2.3.3) bei der Untersuchung mit einer ebenen monochromatischen Welle und bei halbunendlicher Dicke der Kristalle der *Darwin*-Breite (s. Abschn. 2.2.3) entsprechen. In Tabelle 2.1 sind die *Darwin*-Breiten ausgewählter Reflexe von Silizium, tetragonalem Lyoszym, tetragonalem Thaumatin und monoklinem Pottwal-Myoglobin für Dicken von $10\,\mu m$ und $500\,\mu m$ angegeben. Für dünne Kristallplatten sind die berechneten *Darwin*-Breiten

Tabelle 2.1: Nach Gleichung 2.14 berechnete *Darwin*-Breiten ω_D ausgewählter Reflexe von Silizium, tetragonalem Lyoszym, tetragonalem Thaumatin und monoklinem Pottwal-Myoglobin für symmetrische Lauefälle paralleler plattenförmiger Kristalle mit endlichen Dicken von $10\mu m$ und $500\mu m$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 0.6888\,\text{Å}$. Die Gitterparameter der Proteine sind in den Tabellen D.1, D.2 und D.4 angegeben. Die Berechnung der Halbwertsbreiten erfolgte mit dem Programm DREIST nach dem in [31] angegebenen Algorithmus.

Substanz	Reflex	$\mid F_{\mathbf{h}} \mid$	$\omega_d\, 10\mu m\,[^\circ]$	$\omega_d\, 500\mu m\,[^\circ]$
Silizium	1 1 1	58.26	0.00088	0.00084
	1 1 3	41.94	0.00038	0.00030
	2 2 2	1.456 [32]	0.00018	$1.05 \cdot 10^{-5}$
tetragonales Lysozym	16 16 0	970	0.00180	$3.53 \cdot 10^{-5}$
	0 0 8	915	0.00240	$4.45 \cdot 10^{-5}$
	7 7 6	1157	0.00254	$4.84 \cdot 10^{-5}$
tetragonales Thaumatin	0 0 40	4179	0.00193	$3.56 \cdot 10^{-5}$
	20 0 0	2408	0.00147	$2.67 \cdot 10^{-5}$
	10 10 24	2190	0.00173	$3.58 \cdot 10^{-5}$
monoklines Myoglobin	0 0 6	44	0.00278	$5.34 \cdot 10^{-5}$
	$0\,\overline{12}\,0$	402	0.00133	$2.66 \cdot 10^{-5}$
	14 0 0	463	0.00222	$4.44 \cdot 10^{-5}$
	$1\,\overline{5}\,5$	218	0.00222	$4.45 \cdot 10^{-5}$

von Proteinkristallen mit Werten zwischen $1.47 \times 10^{-3\circ} - 2.78 \times 10^{-3\circ}$ leicht größer als für Siliziumkristalle mit Breiten von unter $0.9 \times 10^{-3\circ}$. Für Kristallplatten mit einer Dicke von $500\mu m$ sind die Breiten der Proteinkristalle mit Werten von $2.67 \cdot 10^{-5\circ}$ und $5.34 \cdot 10^{-5\circ}$ um nahezu zwei Größenordnungen kleiner als die *Darwin*-Breiten der (1 1 1)- und (1 1 3)-Siliziumreflexe. Lediglich der Si-(2 2 2)-Reflex weist aufgrund sei-

nes kleinen Strukturfaktors hier einen extrem kleinen Wert von $1.05 \times 10^{-5\circ}$ auf. Die *Darwin*-Breiten der Siliziumreflexe verringern sich aufgrund der sehr kleinen Extinktionslänge bei einer Kristalldickenänderung von $10\,\mu m$ auf $500\,\mu m$ nur minimal, während sich die der Proteinkristalle um etwa 3 Größenordnungen verkleinern. In Abbildung 2.8 ist dieser Einfluss der Kristallgröße auf die *Darwin*-Breite noch einmal anschaulich am Beispiel des (0 0 8)-Reflexes von tetragonalem Lyoszym dargestellt. Im Allgemeinen wei-

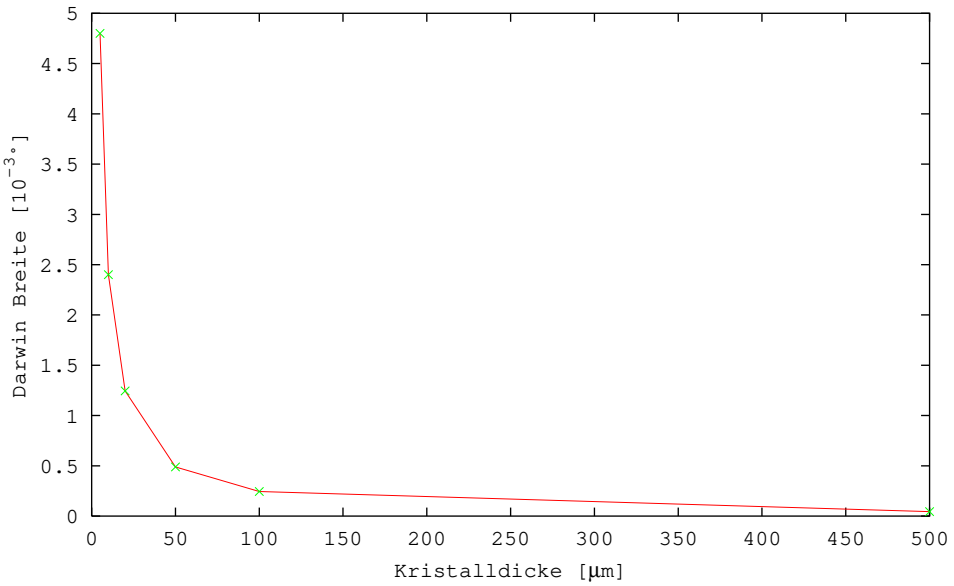

Abbildung 2.8: Abhängigkeit der *Darwin*-Breite des (0 0 8) Reflexes von tetragonalem Lysozym von der Kristalldicke. Die Berechnung der Halbwertsbreiten erfolgte mit dem Programm DREIST unter der Annahme symmetrischer *Laue*-Fälle und plattenförmiger Kristalle nach dem in [31] angegebenen Algorithmus für einen Wellenlänge von $\lambda = 0.6888\,\text{Å}$.

sen an Proteinkristallen gemessene Reflexprofile erheblich größere Halbwertsbreiten als die theoretisch berechneten *Darwin*-Breiten auf [33, 34, 35]. Das schmalste an einem Proteinkristall beobachtete Reflexprofil weist eine Breite von 0.0007° auf [36]. Diese Diskrepanz zwischen gemessener und theoretischer Reflexbreite ist dabei nicht allein auf die instrumentelle Auflösung zurückzuführen und ist auch von anorganischen und organischen Kristallen her bekannt. Diese Diskrepanz führt zu dem Konzept des Mosaikkristalls [25]. Dabei wird angenommen, dass der Kristall aus vielen kleinen mehr oder weniger perfekten Bereichen aufgebaut ist, die leicht gegeneinander verkippt sind [37]. Solche Gitterstörungen werden auch als Kristallmosaizität bezeichnet. Zu einer Reflexverbreiterung durch die Kristallmosaizität tragen dabei zwei Effekte bei. Zum einen hat, wie in Abbildung 2.8 gezeigt, die Größe der einzelnen Kristallblöcke einen

Einfluss auf die Reflexbreite [38] und zum anderen beugt der Kristall durch die Verkippung der einzelnen Mosaikblöcke gegeneinander über einen größeren Rotationswinkel, was ebenfalls zu einer Verbreiterung der Reflexprofile führt. Eine Unterscheidung der beiden Effekte ist dabei nicht oder nur schwer möglich.

Je nach Größe der einzelnen Mosaikblöcke wird in der Literatur zwischen Makro- und Mikromosaizität, wie in Abbildung 2.9 (links) gezeigt, unterscheiden [20, 30]. Besitzen die einzelnen Mosaikbereiche in etwa die Größe des Gesamtkristalls, i.d.R. also Abmessungen von etwa $50 - 500\mu m$, so wird dies als Makromosaizität bezeichnet. Als Ursache für die Makromosaizität werden dabei vor allem Verzwilligungen, Kleinwinkelkorngrenzen, Wachstumssektoren und Brüche angenommen. Die Mikromosaizität dagegen umfasst Gitterstörungen von Bereichen mit Ausdehnungen von einigen Mikrometern und weniger. Zur Mikromosaizität tragen Effekte wie z.B. Versetzungen und der Einbau von Verunreinigungen bei. Im mittleren Bild von Abbildung 2.9 ist solch ein möglicher Einfluss von Stufenversetzungen auf die Mikromosaizität eines Mosaikblocks gezeigt.

Die Mosaizität von Proteinkristallen ist dabei meist anisotrop, d.h. Proteinkristalle weisen in bestimmten Richtungen höhere und in anderen Richtungen geringere Mosaizitäten auf [39, 40, 37, 36].

Durch Konzentrationsgradienten während des Wachstums oder durch den Einbau von Verunreinigungen kann es bei Proteinkristallen zudem zur Ausbildung von Spannungen und d-Wert-Variationen innerhalb des Kristalls kommen (s. Abb. 2.9 (rechts)) [37]. Allerdings sind diese d-Wert-Variationen zumindest bei Messungen an Lysozymkristallen bei Raumtemperatur relativ klein [20, 36]. Auch eine Verbiegung von plättchen- oder nadelförmigen Kristallen z.B. in einer Glaskapillare führt zu Spannungen innerhalb des Kristalls [30]. Langreichweitige Effekte wie die Kristallmosaizität und d-Wert-

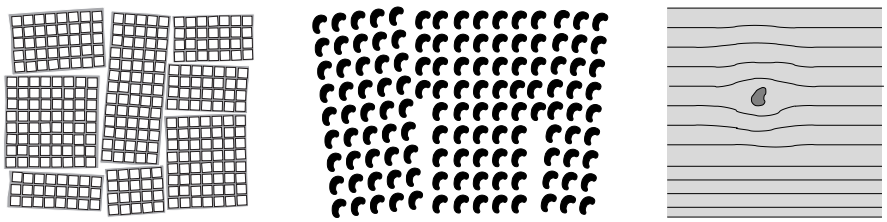

Abbildung 2.9: Gitterdefekte und d-Wert-Variationen in Proteinkristallen. Links: Konzept des Mosaikkristalls. Der Kristall ist aus größeren (Makromosaizität) und kleineren Mosaikblöcken (Mikromosaizität) aufgebaut. Mitte: Einfluss von Stufenversetzungen auf die Mikromosaizität (in Anlehnung an [30]). Rechts: Durch die Inkorporation von Verunreinigungen und eines Gradienten innerhalb des Kristalls kommt es zu d-Wert Variationen (in Anlehnung an [37]).

Variationen spielen bei der Intensitätsdatensammlung und hier insbesondere bei der Integration der Daten eine Rolle. Sie haben dabei Auswirkungen auf die azimutale

Reflexbereite auf dem Detektor und die Reflexbreite im Rotationswinkel ω. In beiden Fällen führt eine verringerte Mosaizität zu einer Konzentration der gebeugten Photonen auf wenige Detektorpixel bzw. einen kleinen Rotationswinkel (s.a. Abschn. 2.2.6). Dies macht sich zum einen in einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis bemerkbar, zum anderen kommt es insbesondere bei großen Elementarzellen zu weniger Reflexüberlappungen. Durch das bessere Signal/Rausch-Verhältnis sollten sich auch noch schwache Reflexe bei hohen Beugungswinkeln aus dem Untergrund hervorheben und damit zu einem verbesserten Auflösungvermögen führen [33]. Untersuchungen zeigten zudem, dass ein der Kristallmosaizität angepasster Rotationswinkel pro Bild bei Rotationsaufnahmen (s. Abschn. 2.2.6) zu einer besseren Datenqualität führt [41]. Aufnahmen, bei denen der Rotationswinkel erheblich größer war als die Kristallmosaizität, waren dabei von deutlich schlechterer Qualität. Allerdings führt eine Anpassung des Rotationswinkels an die Kristallmosaizität insbesondere bei Kristallen mit kleiner Mosaizität durch die im Vergleich zur Belichtungszeit sehr lange Auslesezeit zu einem erheblichen Anstieg der benötigten Messzeit. Durch den Einsatz von Pixel-Detektoren sollte das Problem der langen Auslesezeiten jedoch in näherer Zukunft gelöst sein [42]. Bei all diesen Betrachtungen ist jedoch anzumerken, dass die meisten Intensitätsdatensammlungen heutzutage bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden und das hierzu notwendige Abkühlen der Kristalle i.A. zu einer erheblichen Erhöhung der Spannungen im Kristall und der Mosaizität führen (s. Abschn. 2.3.1). Zudem wird die Reflexbreite für Kristalle sehr guter Qualität an dem meisten Synchrotronstrahlungsmessplätzen nicht durch die Mosaizität sondern vielmehr durch die Wellenlängendispersion und die Divergenz bestimmt (s. Abschn. 2.3.3).

Erste Untersuchungen zur Mosaizität von Proteinkristallen wurden 1981 von Shaikevitch und Kam vorgenommen [28]. Sie beobachteten dabei an Lysozym- und Myoglobinkristallen Reflexbreiten bzw. Mosaizitätswerte von 0.03° bis 0.05°. Neben einigen weiteren exemplarischen Messungen [43, 44, 45], wurden Mosaizitätsmessungen erstmals 1995 zur Untersuchung des Effektes von Mikrogravitation auf die Kristallqualität von Lysozymkristallen eingesetzt [33]. In der Untersuchung wurde die Mosaizität eines unter Mikrogravitation gezüchteter Kristalls mit der eines auf der Erde gewachsenen Kristall verglichen. In weiteren Untersuchungen wurde der Effekt von Mikrogravitation auf die Mosaizität von Apocrustacyanin C_1 und Thaumatinkristallen untersucht [34, 35]. In diesen Untersuchungen wurden drei bzw. zwei unter Mikrogravitation gezüchtete Kristalle mit jeweils 2 Kristallen einer Kontrollgruppe von auf der Erde gezüchteten Kristallen verglichen. Mosaizitätsmessungen wurden zudem zur Untersuchung des Effektes von Verunreinigungen, von veränderten Wachstumsbedingungen und von magnetischen Feldern auf die Kristallqualität eingesetzt [29, 40, 20, 46, 47]. Allgemein ist die Aussagekraft all dieser Untersuchungen durch die geringe Zahl der untersuchten Kristalle stark eingeschränkt. Nur in zwei Fällen wurde bisher die Mosaizität einer größeren Zahl von Kristallen untersucht, die eine statistisch signifikantere Aussage erlauben. Zum einen

zur Untersuchung des Effektes von Mikrogravitation auf die Mosaizität von Insulinkristallen [48] und zum anderen zum Einfluss von Magnetfeldern und der Kristallisation in Agarose-Gelen auf die Qualität von Lysozymkristallen [36].

Kristallmosaizität bei tiefen Temperaturen

Die meisten Intensitätsdatensammlungen werden heutzutage standardmäßig bei Temperaturen um 100K durchgeführt [49, 50]. Zum einen lassen sich dadurch Strahlenschäden reduzieren (s. Abschn. 2.3.4) und zum anderen führen die reduzierten thermischen Schwingungen zu einem besseren Beugungsverhalten insbesondere bei höheren Auflösungen [49]. Zum Abkühlen werden die Kristalle zunächst mit einem sog. *cryo-protectant* wie z.B. Glycerol oder anorganischen Salzen behandelt [51, 52, 53] und anschließend schockgefroren. Durch die Behandlung mit einem *cryo-protectant* in Verbindung mit einem schnellen Abkühlen (engl. *flash freezing*) wird die Nukleation von Eis-Kristallen [49] und damit eine vollständige Zerstörung des Kristalls verhindert. Allerdings führt diese Prozedur zu starken Spannungen innerhalb der Kristalle und damit zu einer stark erhöhten Mosaizität [51, 54, 55]. Untersuchungen an Insulin-Kristallen zeigten jedoch, dass die Domänenstruktur der Kristalls bei diesem Prozess erhalten bleibt [56]. Durch ein (wiederholtes) gezieltes Aufwärmen und anschließendes erneutes Schockgefrieren, dem sog. *annealing*, lässt sich die durch das Gefrieren der Kristalle hervorgerufene erhöhte Mosaizität in manchen Fällen stark reduzieren [57].

2.3.2 Evaluation der Kristallqualität

Es existieren viele Methoden zur Analyse der Qualität eines (Protein-)Kristalls. Eine relativ einfache aber sehr effiziente Methode stellt z.B. die optische Untersuchung der Kristalle unter dem Polarisationsmikroskop dar. Mit dieser Methode lassen sich Defekte wie z.B. makroskopische Risse oder Verzwilligungen schnell erkennen. Die Untersuchung der doppelbrechenden Eigenschaften von Proteinkristallen ermöglicht sogar Vorhersagen über die Beugungseigenschaften [58]. Kristallbaufehler unterhalb der Auflösungsgrenze des optischen Mikroskops lassen sich jedoch nicht erkennen. Hierzu zählen insbesondere Kristallbaufehler wie Stufen- und Schraubenversetzungen und andere Gitterstörungen durch den Einbau von Verunreinigungen sowie feine Risse bzw. Brüche im Kristall mit sehr kleinen Verkippungswinkeln. Solche Kristalldefekte lassen sich jedoch mittels hochaufgelöster Röntgendiffraktometrie und -topographie erkennen.

Kristalldefekte haben zudem Auswirkungen auf die Beugungseigenschaften und damit auf die durch Beugungsuntersuchungen zugänglichen Strukturinformationen. Die Qualität dieser Intensitätsdatensätze lässt zwar keine direkten Schlüsse auf die Ursache der die Kristallqualität limitierenden Faktoren zu, sie stellt jedoch ein durchaus geeignetes Mittel dar, Qualitätsunterschiede von Proteinkristallen aufzuzeigen.

2.3.3 Mosaizitätsmessungen

Es existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung der Mosaizität eines Kristalls. Bei diesen Beugungsuntersuchungen spielen experimentelle Parameter wie die Strahldivergenz und die Wellenlängendispersion eine erheblich Rolle. Daher werden zunächst diese Parameter und ihr Einfluss auf die Kristallmosaizität behandelt. Anschließend werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Kristallmosaizität vorgestellt. Diese kann neben herkömmlichen Reflexprofilmessungen mit einem 4- oder mehrkreisigem Diffraktometer auch durch das sog. *ϕ-fine-slicing* bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Extraktion eines Mosaizitätsparameters aus Intensitätsdatensätzen dar. Dabei weisen all diese Methoden Vor- und Nachteile auf, die in den einzelnen Abschnitten diskutiert werden. Auf polychromatische Methoden zur Bestimmung der Kristallmosaizität soll hier aufgrund ihrer geringen Verbreitung nicht eingegangen werden [43, 33].

In Abbildung 2.10 ist der Zusammenhang zwischen der Kristallmosaizität und den gemessenen Reflexprofilen schematisch gezeigt. Auf der rechten Seite sind drei experimentell gemessene Reflexprofile gezeigt. Die linke Seite zeigt einen möglichen zugrundeliegenden Mosaikaufbau des Kristalls.

Experimentelle Auflösung

Für den (hypothetischen) Fall eines exakt parallelen, monochromatischen Röntgenstrahls sollte bei der Beugung an einem perfekten halbunendlich dicken Einkristall die experimentell bestimmte Halbwertsbreite (FWHM) der theoretisch berechneten *Darwin-Breite* $\omega_D(\mathbf{h})$ (s. Abschn. 2.2.3) entsprechen [43, 25]. In der Praxis jedoch weist der Kristall eine Mosaizität η und der Röntgenstrahl eine Divergenz δ_x und eine Wellenlängendispersion $\Delta\lambda/\lambda$ auf. Die Breite des experimentell bestimmten Reflexprofils $\omega_{exp.}$ ergibt sich aus der Überlagerung dieser Parameter. Unter der Annahme von *Gauß*-Funktionen gilt [59, 36]:

$$\omega_{exp}^2 = \eta^2 + \delta_x^2 + \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2 \tan^2\theta_B + \omega_D(\mathbf{h})^2. \tag{2.31}$$

Die Gleichung gilt in dieser Form nur für herkömmliche Reflexprofilmessungen in vertikaler oder horizontaler Beugungsgeometrie. In Abbildung 2.11 wird der Einfluss der Kristallmosaizität, der Strahldivergenz und der Wellenlängendispersion auf das gemessene Reflexprofil anhand der *Ewald*-Konstruktion noch einmal verdeutlicht. Da Strahldivergenz und Wellenlängendispersion ebenso wie die Kristallmosaizität zu einer Verbreiterung des experimentell bestimmten Reflexprofils führen und eine nachträgliche Korrektur dieser Einflüsse mit einem erheblichen Aufwand verbunden und zudem mit einem großem Fehler behaftet ist, sollten diese beiden Parameter möglichst vernachlässigbar klein gegenüber der Kristallmosaizität sein. D.h. neben einem Diffraktometer mit hoher Winkelauflösung ist zu Mosaizitätsmessungen ein wenig divergenter Röntgenstrahl mit kleiner Wellenlängendispersion erforderlich.

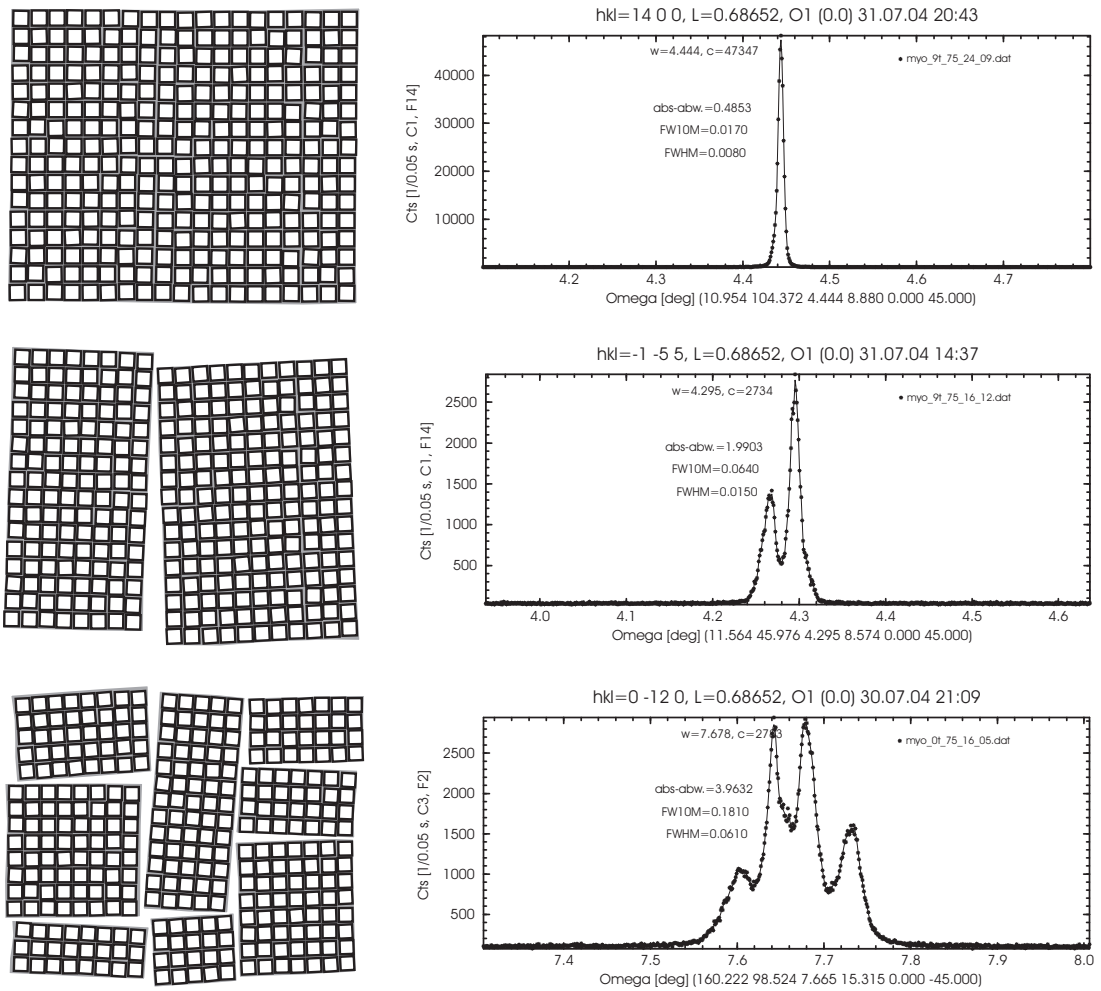

Abbildung 2.10: Schematischer Zusammenhang zwischen der Kristallmosaizität (links) und den daraus resultierenden Reflexprofilen (rechts): Kristall bestehend aus einem Mosaikblock mit geringer Mosaizität (oben), Kristall aus 2 größeren Mosaikblöcken (Mitte) und ein Kristall bestehend aus mehreren kleineren Mosaikblöcken (unten). Die abgebildeten Reflexprofile stammen von Pottwal-Myoglobinkristallen und wurden am Petra-1 Messplatz bei einer Energie von $18\,keV$ aufgezeichnet

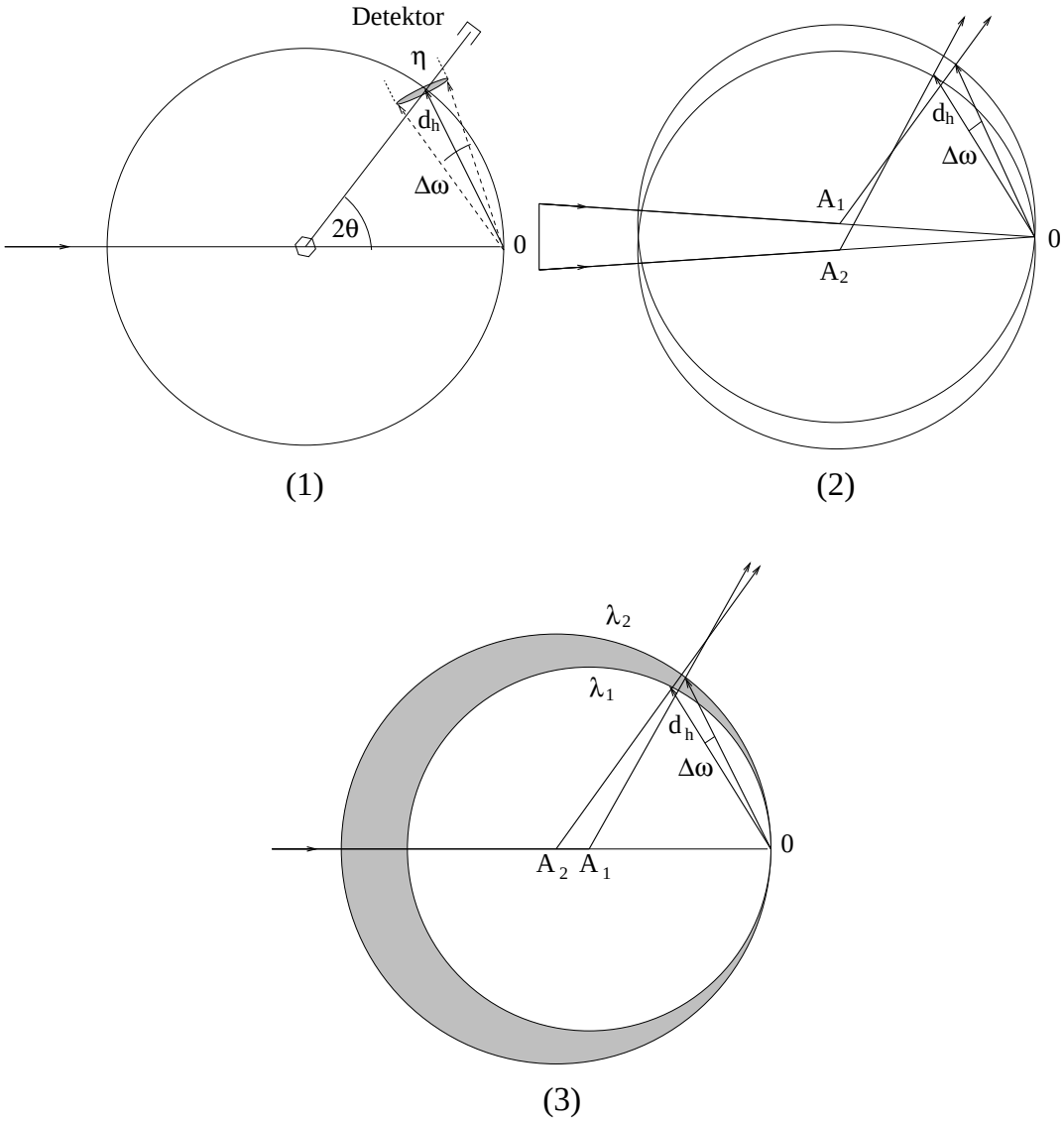

Abbildung 2.11: Einfluss experimenteller Parameter auf die Breite von Reflexprofilen: 1. Verbreiterung des Reflexprofils durch die Kristallmosaizität. Die Mosaizität des Kristalls führt zu einer Ausdehnung des reziproken Gitterpunktes senkrecht zur Richtung des Streuvektors **h** und dadurch zu einer Verbreiterung des Reflexprofils. 2. Verbreiterung des Reflexprofils durch die Strahldivergenz. 3. Reflexverbreiterung durch Wellenlängendispersion. Durch die Wellenlängendispersion weist die Ewaldkugel eine räumliche Ausdehnung auf (grauer Bereich) und der Reflex beugt über einen größeren Winkelbereich.

Reflexprofilmessungen mit dem Einkristalldiffraktometer

Reflexprofil- bzw. *rocking-curve*-Messungen werden mit einem 4- oder mehrkreisigem Diffraktometer und einem Punktdetektor nach der in Abschnitt 2.2.6 (Messung mit Punktdetektor) beschriebenen Methode durchgeführt. Sie stellen die älteste und gängigste Methode zur Bestimmung der Kristallmosaizität dar. Diese Methode weist viele Vorteile auf. So können bei bekannter Orientierung des Kristalls auf dem Diffraktometer gezielt Reflexe angefahren und Reflexprofile gemessen werden. Insbesondere für vergleichende Untersuchungen ist wichtig, immer Reflexe in gleiche Richtungen des reziproken Raumes aufzuzeichnen, da die Anisotropie der Mosaizität hier schnell zu Verfälschungen führen kann [60, 36]. Zudem können alle Reflexe in der gleichen Beugungsgeometrie gemessen werden und es kann dadurch auf viele geometrische Korrekturen verzichtet werden. Die Verwendung eines 6-Kreisdiffraktometers erlaubt dabei zusätzlich die Aufzeichnung von Profilen desselben Reflexes unter verschiedenen Azimutwinkeln [36]. Ein Nachteil dieser Methode besteht in den hohen experimentellen Anforderungen. Um gezielt Reflexe anfahren zu können muß die Orientierungsmatrix des Kristalls bekannt sein. Vorteilhafterweise sollte hierzu an dem Instrument ein Flächendetektor zur Verfügung stehen, um die Orientierungsmatrix durch Rotationsaufnahmen zügig bestimmen zu können. Zudem wird zu den Messungen ein 4- oder mehrkreisiges Diffraktometer benötigt, wie es an den wenigsten Proteinkristallographie-Messplätzen zur Verfügung steht.

*phi-**fine-slicing***

Eine alternative Methode zu herkömmlichen Reflexprofilmessungen ist das sog. *phi-fine-slicing* [39, 61]. Der Versuchsaufbau entspricht dabei dem, der auch zur Datensammlung mit Rotationsaufnahmen eingesetzt wird (s. Abschn. 2.2.6). Ebenso wie zur zur herkömmlichen Datensammlung mit Rotationsaufnahmen wird dabei eine Serie von aufeinander folgenden Aufnahmen aufgezeichnet. Im Unterschied dazu wird der Kristall hier jedoch nur pro Aufnahme um einen möglichst kleinen Winkel $\Delta\phi \leq 0.001°$ gedreht. Das Profil eines einzelnen Reflex wird dadurch erhalten, dass für jede Aufnahme die Intensität über alle einen bestimmten Reflex enthaltenen Pixel integriert wird. Trägt man die Reflexintensität pro Bild als Funktion des Drehwinkels auf, wird das entsprechende Reflexprofil erhalten.

Der große Vorteil des *phi-fine-slicing* besteht darin, dass die Messung mit herkömmlichen Einkreisdiffraktometern, wie sie an den meisten Proteinkristallographie-Messplätzen vorhanden sind, erfolgen kann und kein 4- oder mehrkreisiges Diffraktometer benötigt wird. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass mit wenigen hundert aufeinanderfolgenden Bildern ausgesprochen viele Reflexe auf einmal erfasst werden können.

Allerdings hat diese Methode auch Nachteile. So weisen viele

Proteinkristallographie-Messplätze für Mosaizitätsuntersuchungen ungeeignete experimentelle Bedingungen auf (siehe dazu auch den nächsten Abschnitt) und fokussierende optische Elemente müssen für solche Untersuchungen ggf. aus dem Strahlengang entfernt werden. Für Mosaizitätsmessungen relativ gut geeignet sind MAD-Strahlführungen, da diese zumindest eine sehr kleine Wellenlängendispersion aufweisen [37]. Zudem sind für die verschiedenen Reflexe in Abhängigkeit von der Position auf dem Detektor z.T. komplizierte beugungsgeometrische Korrekturen nötig [62]. Zwar werden mit dieser Methode viele Reflexe auf einmal erfasst, allerdings entstammen alle Reflexe nur einer Schicht des reziproken Raumes. Sollen mehr als zwei Richtungen des reziproken Raumes erfasst werden, z.B. um Anisotropieeffekte zu untersuchen oder zu berücksichtigen, müssen mindestens zwei solcher Serien aufgezeichnet werden. Dies führt zum einen zu einem riesigen Datenvolumen und zum anderen, bedingt durch die lange Auslesezeit des Detektors, zu langen Messzeiten pro Kristall.

Mosaizitätsparameter aus Intensitätsdaten

Eine dritte Methode zur Bestimmung der Kristallmosaizität ist die Extraktion eines Mosaizitätsparameters aus den Bildern eines Intensitätsdatensatzes. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass aus jedem Intensitätsdatensatz durch die gängige Integrationssoftware routinemäßig ein Mosaizitätsparameter extrahiert wird und dazu keine separate Messung notwendig ist [63, 64]. Allerdings werden bei der Ermittlung des Mosaizitätsparameters oft keine geometrischen Korrekturen vorgenommen. Zudem wird nur ein mittlerer Mosaizitätsparameter für alle Reflexe ermittelt. Der größte Nachteil dieser Methode ergibt sich jedoch aus den experimentellen Bedingungen. Um eine möglichst hohe Primärintensität zu erzielen, werden an Proteinkristallographie Strahlführungen meist fokussierende optische Elemente wie fokussierende Röntgenspiegel oder gebogene Monochromatorkristalle verwendet. Die hohe Primärintensität wird dabei mit einer großen Strahldivergenz und einer großen Wellenlängendispersion bezahlt. Während dies für einfache Intensitätsdatensammlungen nur von geringem Nachteil ist, verschlechtert dies entsprechend Gleichung 2.31 die experimentelle Auflösungsfunktion. In den meisten Fällen, und hier insbesondere bei Kristallen geringer Mosaizität, wird der Mosaizitätsparameter daher durch die experimentellen Bedingungen dominiert und hat wenig mit der 'echten' Kristallmosaizität zu tun.

reciprocal space maps

Einfache Mosaizitätsmessungen, wie sie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden, weisen den Nachteil auf, dass sich mit ihnen nicht zwischen Mosaizität und d-Wert-Variationen innerhalb des Kristalls (Spannungen) unterscheiden lässt. d-Wert-Variationen $\Delta d/d$ führen ebenso wie die Mosaizität zu einer Verbreiterung der Re-

flexprofile. Aus der *Braggschen* Gleichung ergibt sich für den Beitrag solcher d-Wert-Variationen zur Reflexbreite

$$\Delta\omega = \frac{\Delta d}{d} \tan\theta. \tag{2.32}$$

Sollen d-Wert-Variationen ebenfalls berücksichtigt werden, muß Gleichung 2.31 um diesen Beitrag erweitert werden. Eine gleichzeitige Erfassung der Kristallmosaizität und von d-Wert Variationen ist durch das Aufzeichnen von sog. *reciprocal space maps* möglich. Der Aufbau entspricht dabei weitgehend dem zum Aufzeichnen von Reflexprofilen. Allerdings befindet sich hierbei, wie in Abbildung 2.12 gezeigt, ein weiterer Analysatorkristall zwischen Probe und Detektor um ebenfalls eine ausgangsseitige Winkelauflösung zu erreichen. Zum Aufzeichnen einer *reciprocal space map* werden, wie in

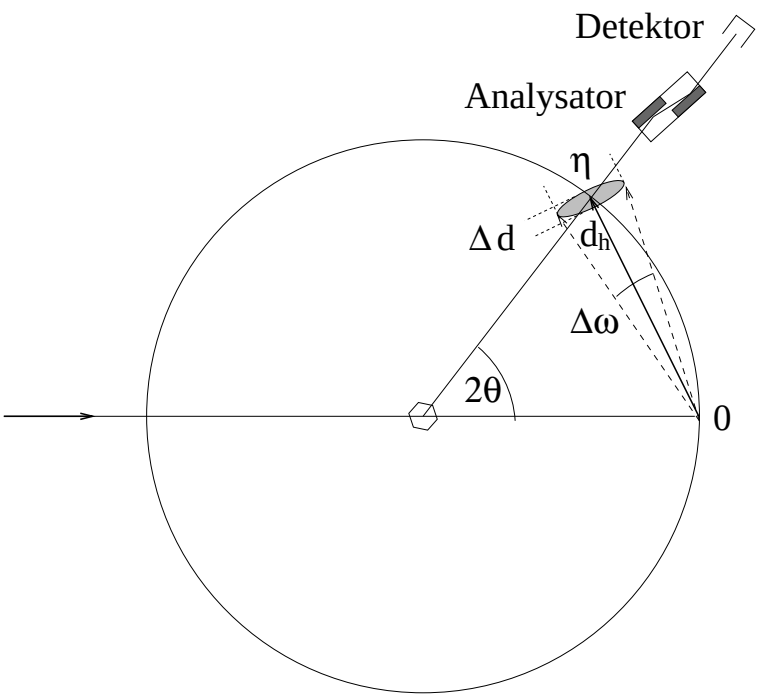

Abbildung 2.12: Experimenteller Aufbau zur Aufzeichnung von *reciprocal space maps*. Zur Auflösung der d-Wert-Variationen befindet sich zwischen Probe und Detektor zusätzlich ein Analysator-Kristall.

Abbildung 2.12 gezeigt, für verschiedene 2θ-Stellungen des Analysators- bzw. Detektors Reflexprofile durch Drehung des Probenkristalls in ω aufgezeichnet. Eine Auftragung der gemessenen Intensität gegen die entsprechenden ω- und 2θ-Werte ergibt eine *reciprocal space map*. Dabei repräsentieren Schnitte entlang des Streuvektors $\mathbf{h}$ d-Wert Variationen und solche senkrecht dazu die Kristallmosaizität.

Reciprocal space maps wurden in einigen Fällen exemplarisch zur Untersuchung der Qualität von Proteinkristallen eingesetzt [65, 66, 36]. Allerdings wurden dabei jeweils

immer nur wenige Kristalle untersucht, was in erster Linie auf den anspruchsvollen experimentellen Aufbau und die lange Messzeit zurückzuführen sein dürfte.

2.3.4 Informationen aus Intensitätsdaten

Für Strukturbiologen sind die aus den Intensitätsdaten zugänglichen Strukturinformationen von großem Interesse. Je höher die Datenqualität und die erreichbare Auflösung, desto detaillierter sind auch die zugänglichen Strukturinformationen. Wie bereits im Abschitt 2.3.1 diskutiert, hängt die Qualität dieser Daten eng mit der Nahordnung im Kristall zusammen. Kristalle mit starker Fehlordnung und einem großen Anteil an Verunreinigungen sollten daher deutlich schlechtere Intensitätsdaten liefern als ein wenig fehlgeordneter Kristall der wenig Verunreinigungen enthält.

Im Unterschied zu der Mosaizität, welche eine intrinsische Größe des Kristalls darstellt, sind die integralen Beugungseigenschaften eines Kristalls jedoch stark durch das Beugungsexperiment selbst bestimmt. Wie aus Gleichung 2.26 hervorgeht, hängt die integral gestreute Energie maßgeblich von der Primärintensität der Röntgenstrahlung, der Kristallgröße bzw. dem beleuchteten Kristallvolumen und nicht zuletzt von der verwendeten Energie ab. Zudem haben z.B. die Detektoreffizienz [67], die Belichtungszeit und der Rotationswinkel pro Bild, der Abstand zwischen Probe und Detektor, Schädigungen des Kristalls durch die Röntgenstrahlung und viele weitere Parameter einen Einfluss auf die Datenqualität. Daher ist ein Vergleich der Kristallqualität aus Intensitätsdaten, die an verschiedenen Instrumenten gewonnen wurden, nur bedingt möglich. Werden die Daten am gleichen Instrument und bei gleichen Datensammlungsparametern gesammelt, sollte ein Vergleich jedoch möglich sein (s.a. Abschn. 2.3.5).

Um neben einem möglichen Einfluss von Magnetfeldern auf die Fernordnung bzw. Kristallmosaizität auch mögliche Auswirkungen auf die Nahordnung in Proteinkristallen zu untersuchen, wurden von einigen Kristallen Intensitätsdatensätze aufgezeichnet und bezüglich ihrer Qualität untersucht. Im Folgenden sollen kurz die aus Intensitätsdaten ableitbaren Qualitätsparameter vorgestellt werden. Da es vor allem bei Raumtemperaturmessungen zu massiven Schädigungen des Kristalls durch die Röntgenstrahlung kommen kann, wird auf diese im letzten Abschnitt kurz eingegangen.

$I/\sigma(I)$ - Verhältnis

Das $I/\sigma(I)$ -Verhältnis eines Datensatzes wird zum einen durch die Intensität und die Ausdehnung der Reflexe auf dem Detektor und zum anderen durch den umgebenden Untergrund bestimmt. Alle Parameter hängen dabei sowohl von den experimentellen Bedingungen als auch von der Qualität der Probe selbst ab. Für einen Kristall guter Qualität ist ein intensiver *Bragg*-Peak mit einer geringen räumlichen Ausdehnung auf dem Detektor bei einem zugleich geringen Anteil von (thermisch) diffuser Strahlung zwischen den Peaks und damit ein großes $I/\sigma(I)$ -Verhältnis zu erwarten. Umgekehrt

sollte von einem schlechten Kristall ein schwächerer *Bragg*-Peak bei zugleich höherem diffusen Untergrund und damit ein kleineres $I/\sigma(I)$ -Verhältnis zu erwarten sein. Durch die Abnahme des atomaren Streuvermögens und den zunehmenden Einfluss des B-Faktors (s.a. Abschn. 2.2.4) nimmt zudem die Intensität der gestreuten Strahlung zu höheren Beugungswinkeln bzw. höherer Auflösung hin ab. Diese Abnahme bedingt ein schlechteres Signal-Rausch Verhältnis bei höheren Beugungswinkeln. Der Abfall des $I/\sigma(I)$ -Verhältnisses als Funktion der Auflösung liefert daher zusätzliche Informationen über den B-Faktor und damit über die Nahordnung im Kristall

Vollständigkeit der Datensätze

Die Vollständigkeit eines Datensatzes (im folgenden nur noch als 'Vollständgkeit' bezeichnet) gibt das Verhältnis der Zahl der beobachteten Reflexe zu der Zahl der unter der gegebenen Beugungsgeometrie theoretisch beobachtbaren Reflexe in Prozent an. Ob ein Reflex als beobachtet oder nicht beobachtet gilt, wird dabei durch ein Signifikanzkriterium wie z.B. $I/\sigma(I) \geq 2$ definiert. Die Gesamt-Vollständigkeit bezieht sich dabei auf den ganzen Auflösungsbereich einer Messung. Wie auch beim Signal-Rausch-Verhältnis erlaubt insbesondere eine auf die Auflösung bezogene Analyse der Vollständigkeit Hinweise auf die Daten- und somit auch die Kristallqualität.

Auflösungsvermögen

Die durch eine Röntgenstrukturanalyse zugängliche Information hängt jedoch maßgeblich von dem sogenannten Auflösungsvermögen ab, welches sich bei einem Diffraktionsexperiment erreichen lässt. Dieses Auflösungsvermögen d wird durch den kleinsten Netzebenenabstand der im Diffraktionsexperiment noch sichtbaren Reflexe definiert. In einer mehr quantitativen Form ist es als der d-Wert (Bereich) definiert, für den die Vollständigkeit bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von $I/\sigma(I) \geq 2$ z.B. 50% beträgt [68].

B-Faktoren

Eng mit den drei zuvor beschriebenen Parametern verbunden ist auch der B-Faktor. Seine mathematische Bedeutung ist in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Bei Proteinkristallen ist er in erster Linie ein Maß für die molekulare Fehlordnung. B-Faktoren sind dabei insbesondere ein Maß für Störungen der Nahordnung (s.a. 2.3.1). Langreichweitige Kristalldefekte sollten dagegen keinen Einfluss auf den B-Faktor haben [30]. Typische B-Faktoren von Proteinkristallen liegen zwischen 5 Å^2 für einen sehr gut und 100Å^2 für einen schlecht geordneten Proteinkristall. Ein globaler B-Faktor lässt sich aus Intensitätsdatensätzen durch einen *Wilson*-Plot ermitteln (s. Abschn. 2.2.5).

Interner R-Wert

Ein weiteres Maß zur Beurteilung der Datenqualität von Intensitätsdaten stellt in der Kristallographie der interne R-Wert oder auch R_{sym} dar. Er stellt ein Maß für die Übereinstimmung mehrfach gemessener oder symmetrieäquivalenter Reflexe i dar:

$$R_{sym} = \frac{\sum_h \mid \hat{I}_h - I_{h,i} \mid}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}}, \tag{2.33}$$

mit

$$\hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}. \tag{2.34}$$

Die Reflexe eines guten Kristalls sollten ein großes $I/\sigma(I)$-Verhältnis aufweisen und ihre gemessenen Intensitäten sollten daher mit einem kleinen Fehler behaftet sein. Der R_{sym} sollte daher für Kristalle guter Qualität kleiner sein als für schlecht beugende Kristalle. Durch die Abnahme des $I/\sigma(I)$-Verhältnis hin zu höheren Beugungswinkeln ist auch hier ein ungünstigerer R_{sym} zu erwarten.

Ein Problem des R_{sym} besteht jedoch darin, dass dieser mit der Anzahl der gemessenen Reflexe bzw. der Multiplizität eines Datensatzes ansteigt, auch wenn die Datenqualität gleichbleibend gut ist. Diederichs und Karplus schlagen daher die Einführung eines neuen R_{merge} vor, bei dem dieses Problem nicht auftritt [69]. Dazu werden die n_h mehrfach gemessenen oder symmetrieäquivalenten Beobachtungen eines Reflexes h entsprechend $n_{h,P} = int(n_h/2)$ und $n_{h,Q} = n_h - n_{h,P}$ auf zwei Gruppen P und Q verteilt. Für diese beiden Gruppen werden die gemessenen Intensitäten getrennt gemittelt. Der R_{merge} errechnet sich dann entsprechend zu

$$R_{mergeI} = \frac{\sum \mid I_{h,P} - I_{h,Q} \mid}{0.5 \cdot \sum I_{h,P} + I_{h,Q}}, \tag{2.35}$$

mit

$$I_{h,P} = \frac{1}{n_{h,P}} \sum_{i \epsilon P}^{n_{h,P}} I_{h,i} \quad \text{und} \quad I_{h,Q} = \frac{1}{n_{h,Q}} \sum_{i \epsilon Q}^{n_{h,Q}} I_{h,i}. \tag{2.36}$$

In diesen Gleichungen stellen die $I_{h,P}$ und $I_{h,Q}$ bereits teilweise gemittelte und damit bessere Schätzungen der Intensität eines Reflexes als die Einzelbeobachtungen $I_{h,i}$ dar. Analog zu Gleichung 2.35 lässt sich auch ein auf die Strukturamplituden $A = |F(\mathbf{h})|$ bezogener R_{mergeF} berechnen:

$$R_{mergeF} = \frac{\sum \mid A_{h,P} - A_{h,Q} \mid}{0.5 \cdot \sum A_{h,P} + A_{h,Q}}, \tag{2.37}$$

wobei $A_{h,P}$ und $A_{h,Q}$ sich sinngemäß aus den Gleichungen 2.36 ergeben. In dieser Arbeit wird ausschließlich der auf die Strukturamplituden bezogene R_{mergeF} verwendet.

Elektronendichtekarte

Das eigentliche Ziel von biologischen Röntgenstrukturanalysen ist der Erhalt einer möglichst detailierten Elektronendichtekarte bzw. eines Strukturmodells. Dieses wird nach der Strukturlösung im Rahmen einer Strukturverfeinerung durch Anpassung der Modellgrößen an die Beobachtungsgrößen erhalten.

Strahlenschäden

Einen weiteren Einfluss auf die Qualität von Intensitätsdaten haben Strahlenschäden an den untersuchten Proteinkristallen, siehe z.B. [43, 70]. Während die ersten Rotationsaufnahmen von einem nicht bzw. schwach geschädigten Kristall stammen, weist der Kristall bei einer späteren Aufnahme meist schon erhebliche strukturelle Änderungen und dadurch ein vermindertes Streuvermögen auf [71]. Strahlenschäden spielen insbesondere bei Raumtemperaturmessungen eine große Rolle, lassen sich jedoch durch Datensammlung bei tiefen Temperaturen erheblich reduzieren [72, 50]. Die Schädigung hängt dabei nicht nur von der Dosis sondern auch von der Energie ab [73]. Da Intensitätsdatensätze oft bei unterschiedlichen Energien gesammelt werden, erschweren Strahlenschäden zusätzlich die Vergleichbarkeit der Qualität der Daten.

2.3.5 Mosaizitätsmessungen versus Intensitätsdaten

Tabelle 2.2 zeigt einen Vergleich der experimentellen Einflüsse auf die Profilparameter und die Intensitätsdaten. Anhand der Tabelle wird deutlich, dass Mosaizitätsmessungen weitgehend unabhängig von experimentellen Parametern sind. Mosaizitätsparameter von verschiedenen Messplätzen erlauben daher eine bessere Vergleichbarkeit als Qualitätsparameter aus Intensitätsdatensätzen. Unter Verwendung der exakt gleichen Datensammlungsparameter sind allerdings auch Intensitätsdaten für vergleichende Untersuchungen geeignet. Hier hat neben der Kristallqualität selbst nur die Kristallgröße als zusätzlicher Parameter einen Einfluss auf die Datenqualität.

Tabelle 2.2: Abhängigkeit der aus Reflexprofilen und Intensitätsdatensammlungen zugänglichen Kristallqualitätsinformationen von experimentellen Parametern.

Parameter	Profilparameter	Intensitätsdatensammlung
Wellenlänge	bedingt [a]	ja
Divergenz	ja [b]	bedingt
Wellenlängendispersion	ja [b]	bedingt
Rotationsgeschwindigkeit	nein	ja
Primärintensität	nein	ja
Kristallvolumen	nein [c]	ja
Detektor	nein	ja
Strahlenschäden	nein [d]	ja

[a] Abhängigkeit von der Energie berechenbar.

[b] Divergenz bzw. Wellenlängendispersion müssen klein im Vgl. zur Mosaizität sein.

[c] unter der Annahme, dass die Mosaizität unabhängig vom Kristallvolumen ist.

[d] benötigte Dosis beträgt ca. 1-2% im Vgl. zu Intensitätsdaten.

.

2.4 Grundlagen des Magnetismus

In dem folgenden Abschnitt sollen die im Rahmen dieser Arbeit relevanten allgemeinen Aspekte des Magnetismus kurz beschrieben werden. Eine ausführliche Darstellung des Themas findet sich z.B. in [74]. In der Literatur werden magnetische Größen oft in CGS-Einheiten angegeben. In dieser Arbeit werden ausschließlich SI-Einheiten verwendet.

2.4.1 Magnetisierung

Ein Strom der Stärke I, der durch eine zylinderförmige Spule der Länge l mit n-Windungen fliesst, induziert im Inneren der Spule ein Magnetfeld der Stärke

$$\mathbf{H} = \frac{n\ I}{l}. \tag{2.38}$$

Die magnetische Induktion oder Flussdichte **B** ist gemäß der Gleichung

$$\mathbf{B} = \mu_0\ \mathbf{H} \tag{2.39}$$

definiert, und wird in der Einheit Tesla ($1T = 1Vs/m^2$) angegeben. Der Proportionalitätsfaktor $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} VsA^{-1}m^{-1}$ wird als magnetische Feldkonstante des Vakuums bezeichnet. Wird Materie in ein Magnetfeld gebracht, so liegt in dieser eine gegenüber der Materie im freien Raum um den Beitrag der Magnetisierung **M** geänderte Flussdichte vor:

$$\mathbf{B} = \mu_0\ (\mathbf{H} + \mathbf{M}). \tag{2.40}$$

Daraus ergibt sich die Definition der Magnetisierung zu

$$\mathbf{M} = \frac{\mathbf{B} - \mu_0\ \mathbf{H}}{\mu_0}. \tag{2.41}$$

2.4.2 Magnetische Suszeptibilität

Die Magnetisierung eines Stoffes ist, einmal abgesehen von sehr starken Magnetfeldern, i.a. der Feldstärke proportional:

$$\mathbf{M} = \chi \mathbf{H} \tag{2.42}$$

Die dimensionslose Konstante χ wird als Volumensuszeptibilität bezeichnet und stellt für anisotrope Stoffe einen Tensor 2. Stufe dar [75]. Allgemein lassen sich Stoffe nach ihrer Suszeptibilität in 2 Stoffklassen einteilen:

diamagnetische Stoffe	$\chi < 0$,
(Vakuum	$\chi = 0$),
paramagnetische Stoffe	$\chi > 0$.

Zusätzlich zur Volumensuszeptibilität werden oft die Massensuszeptibilität $\chi_g = \chi\,\rho^{-1}$ und die Molsuszeptibilität $\chi_{mol} = \chi\,M_r^{-1}$ angegeben. ρ ist die Dichte ($kg\,m^{-3}$) und M_r die Molmasse ($kg\,mol^{-1}$). Diamagnetische Substanzen weisen mit Ausnahme der Supraleiter Suszeptibilitäten zwischen -10^{-4} bis -10^{-6} auf. Stoffe, die aus Atomen mit abgeschlossenen Elektronenschalen aufgebaut sind, wie z.B. viele Salzverbindungen, die meisten Molekülverbindungen und ein Teil der Metalle sind diamagnetisch. Paramagnetische Stoffe weisen Suszeptibilitäten zwischen 10^{-5} bis 10^{-2} auf. Diese Substanzen enthalten Atome mit ungepaarten Elektronen in nicht vollständig gefüllten Unterschalen.

2.4.3 Ausrichtung von Stoffen in Magnetfeldern

Die magnetischen Eigenschaften von Molekülen wie auch von Kristallen sind in den meisten Fällen anisotrop. Wird ein Stoff mit dem Volumen V und der Suszeptibilität χ einem Magnetfeld der Stärke $\mathbf{B}$ ausgesetzt, so ändert sich dessen innere Energie um den Beitrag [76]

$$\Delta U = -\frac{\chi\,\mathbf{B}^2 V}{2\mu_0}\,. \tag{2.43}$$

Magnetisch anisotrope Stoffe, wie z.B. Kristalle oder auch einzelne Moleküle, lassen sich durch ein Magnetfeld ausrichten. Weist ein Stoff in axialer Richtung die Suszeptibilität χ_{ax} und dazu senkrecht die Suszeptibilität χ_{sr} auf, so gilt für den Energieunterschied zwischen den beiden Orientierungen entlang der Hauptachsen

$$\Delta U = -\frac{(\chi_{ax} - \chi_{sr})\,\mathbf{B}^2 V}{2\mu_0}. \tag{2.44}$$

Für einen diamagnetischen Stoff ($\chi < 0$) ist es energetisch günstiger sich in Richtung der kleinsten diamagnetischen Suszeptibilität ($|\chi|$) entlang der Magnetfeldrichtung auszurichten. Umgekehrt ist es für einen paramagnetischen Stoff ($\chi > 0$) günstiger sich in Richtung seiner größten Suszeptibilität entlang der Magnetfeldrichtung zu orientieren. Durch einen *Boltzmann*-Ansatz läßt sich die Verteilungsfunktion der Ausrichtung angeben [77]:

$$P(\theta', \phi) = \frac{1}{N}\,\frac{1+B^2}{4kT}\left[\frac{2}{3}\Delta\chi_{ax}\left(3\cos^2\theta' - 1\right) + \Delta\chi_{sr}\left(\sin^2\theta'\cos 2\phi\right)\right], \tag{2.45}$$

$\Delta\chi_{ax}$ und $\Delta\chi_{sr}$ sind die Abweichungen der beiden Hauptachsenanisotropien von der isotropen Suszeptibilität und θ' bzw ϕ die Winkel zwischen den Richtungen von χ_{ax} bzw. χ_{sr} des Stoffes und der Magnetfeldrichtung. N ist die Verteilungsfunktion für einen isotropen Stoff und dient hier zur Normierung. Ein hoher Ausrichtungsgrad wird entsprechend Gleichung 2.45 bei großen Anisotropien der Suszeptibilität und hohen Magnetfeldern erreicht. Der Ausrichtungsgrad ist dabei dem Quadrat der Feldstärke proportional.

2.4.4 Inhomogene Magnetfelder

Weist der Verlauf eines Magnetfeldes einen Gradienten auf, so erfahren Substanzen in diesem eine Kraft. Differentiation von Gleichung 2.43 führt zu

$$\mathbf{F} = -\frac{\chi V}{2\mu_0} \nabla \mathbf{B}^2. \tag{2.46}$$

Wie aus dieser Gleichung ersichtlich, erfahren diamagnetische Substanzen eine abstoßende Kraft hin zu Orten geringerer Feldstärke, während paramagnetische Substanzen eine Kraft zu Orten höherer Feldstärke hin erfahren.

2.5 Magnetolevitation

Diamagnetische Substanzen erfahren in inhomogenen Magnetfeldern eine abstoßende Kraft. Ist diese aus den Feldinhomogenitäten resultierende Kraft groß genug und wirkt sie in entgegengesetzter Richtung zur Schwerkraft, so läßt sich die Schwerkraft kompensieren. Für diamagnetische Substanzen ist es daher möglich, einen der Mikrogravitation vergleichbaren Zustand auf der Erde zu erzeugen [78].

Insbesondere für die Proteinkristallzüchtung in konvektionsreduzierter Umgebung (s. Abschn. 2.6.3), die bisher mit großem (finanziellen) Aufwand im Weltraum betrieben wurde, z.B. [17], stellt die Magnetolevitation eine interessante und preiswerte Alternative dar [79, 80, 81, 82]. Im folgenden sollen daher kurz die theoretischen Grundlagen der Magnetolevitation von Wasser und Proteinen dargelegt werden.

2.5.1 Grundlagen

Für die potentielle Energie U einer Substanz im Vakuum in einem Magnetfeld gilt:

$$U = -\frac{\chi B^2 V}{2\mu_0} + mgz, \tag{2.47}$$

wobei V das Volumen der Probe, m deren Masse, z die Höhe der Probe und g die Erdbeschleunigung ist. Zur Kompensation der Schwerkraft muß daher die folgende Gleichung erfüllt sein:

$$\frac{\chi\, V}{2\mu_0}\nabla B^2 = mg\hat{\mathbf{e}}_z \;\text{ bzw. }\; B\nabla B = \mu_0 g\frac{\rho}{\chi}\hat{\mathbf{e}}_z, \tag{2.48}$$

wobei $\hat{\mathbf{e}}_z$ der Einheitsvektor in vertikaler Richtung ist. Für eine stabile Levitation müssen zudem im Punkte der Levitation für die vertikale bzw. seitliche Stabilisierung die Bedingungen

$$\frac{\partial^2 B^2}{\partial z^2} > 0 \; bzw. \; \frac{\partial^2 B^2}{\partial x^2} \; und \; \frac{\partial^2 B^2}{\partial y^2} > 0 \tag{2.49}$$

gleichzeitig erfüllt sein. Thomson, der spätere Lord Kelvin, zeigte bereits im Jahre 1847, daß die stabile Levitation diamagnetischer Substanzen theoretisch möglich sein sollte [83]. In Tabelle 2.3 sind die Suszeptibilitäten ausgewählter diamagnetischer Substanzen, deren Dichte und die zu ihrer Levitation nötigen $\nabla B^2/2$-Werte in SI-Einheiten angegeben.

Tabelle 2.3: Magnetische Suszeptibilitäten ausgewählter diamagnetischer Substanzen, deren Dichte und zur Levitation benötigte $\nabla B^2/2$-Werte bei $293\,K$.

Substanz	$\chi \times 10^{-6}$	$\rho \times 10^{-3}$ $[kg/m^3]$ [b]	$\nabla B^2/2$ $[T^2/m]$
Graphit-Stab [a]	-160	2.25	164
Bismut [b]	-165	9.8	732
Wasser [b]	-9.08	1.00	1363
Methionin [b]	-10.3	1.34	1608
Glycin [b]	-10.8	1.61	1827
Tryptophan [b]	-10.9	1.34	1518
Lysozym [c]	-10.3	≈ 1.2	≈ 1436

[a] Suszeptibilitätswerte stammen aus [76];
[b] Werte stammen aus [84];
[c] Suszeptibilitätswerte stammen aus [85].

2.5.2 Magneto-Archimedes Levitation

Gleichung 2.48 bezieht sich auf eine Substanz im Vakuum. Befindet sich die Probe jedoch nicht im Vakuum sondern in Luft, führt dies durch die Masse der Luft zu einer sehr geringen Auftriebskraft. Gravierender wirken sich jedoch die paramagnetischen Eigenschaften des in der Luft vorhandenen Sauerstoffes aus. Seien ρ_P bzw. ρ_U die Dichte der Probe bzw. der Umgebung und χ_P bzw. χ_U die entsprechenden Suszeptibilitäten, so wird Gleichung 2.48 zu:

$$\frac{\chi_P - \chi_U}{2\mu_0}\nabla B^2 = (\rho_P - \rho_U)\, g\hat{\mathbf{e}}_z. \tag{2.50}$$

Der Term auf der linken Seite führt für eine Wasserprobe in einer Luftumgebung unter Normaldruck gegenüber einer Vakuumumgebung zu einer Verringerung des zur Levitation nötigen $\nabla B^2/2$-Wertes um ca. 4% auf $1305\,T^2/m$. Durch Verwendung von Sauerstoff unter Druck anstelle von Luft lassen sich durch die sog. Magneto-Archimedes Levitation für den Fall $\chi_P < \chi_U$ sogar paramagnetische Stoffe stabil levitieren [86].

2.5.3 Experimentelle Realisation

Der experimentelle Nachweis der Magnetolevitation diamagnetischer Substanzen erfolgte im Jahre 1939 durch Braunbek [87]. Ihm gelang mit der in Abbildung 2.13 gezeigten

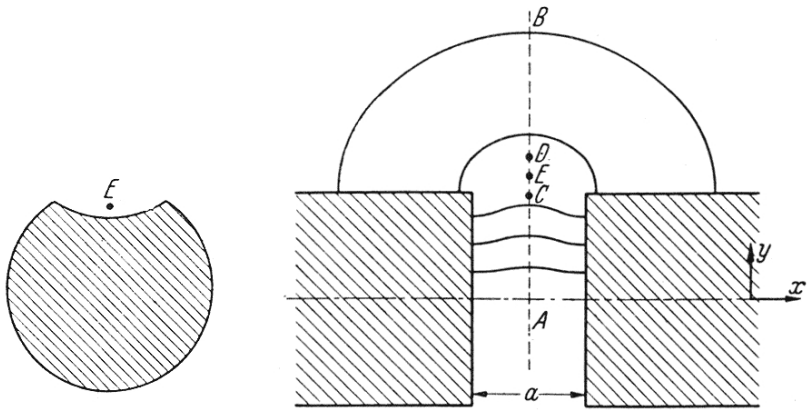

Abbildung 2.13: Von Braunbek benutzte Polschuhanordnung zur stabilen Magnetolevitation von kleinen Graphitstücken und Bismutkristallen. Aufsicht auf die Polschuhe mit dem eingezeichneten Levitationspunkt E (links) und Seitenansicht der Polschuhanordnung (rechts). Quelle: [87].

Polschuhanordnung die stabile Levitation von kleinen Graphitstücken und Bismutkristallen. Der verwendete Magnet hatte eine Leistung von 530 Watt und Polschuhe von 7 cm Durchmesser. Bei den Versuchen mit Bismut betrug die Feldstärke $2.3 - 2.4 T$ bei einem Polschuhabstand von $2\,mm$.

Wie aus Tabelle 2.3 zu entnehmen ist, werden zur Levitation von Wasser und organischen Substanzen $\nabla B^2/2$-Werte von etwa $1300 - 2000 T^2/m$ benötigt. Solche starken inhomogenen Magnetfelder lassen sich mit sog. *Bitter*-Magneten erzielen [88, 78, 76]. Allerdings ist der Betrieb solcher Magnete aufgrund elektrischer Leistungen von einigen Megawatt sehr kostspielig [89]. Neuerdings lassen sich auch mit sog. Hybridmagneten, einer Kombination aus normalleitenden und supraleitenden Spulen [90], und rein supraleitenden Magneten solch große $\nabla B^2/2$-Werte realisieren [91, 82]. Diese weisen jedoch gegenüber den *Bitter*-Magneten den Nachteil eines schlecht zugänglichen Probenraumes auf. Alle diese Magneten arbeiten bei sehr hohen Feldstärken von 12-20 Tesla und relativ moderaten Gradienten von etwa $100\ T/m$.

2.6 Spezielle Aspekte der Proteinkristallzüchtung

In diesem Abschnitt sollen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Methoden zur Verbesserung der Kristallqualität kurz vorgestellt werden. Neben dem Effekt der Aufreinigung des Ausgangsmaterials und der Kristallisation unter Mikrogravitation wird insbesondere auf die Kristallisation in homogenen und inhomogenen Magnetfeldern eingegangen.

2.6.1 Reinheit des Ausgangsmaterials

Verunreinigungen gelten als einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Kristallqualität und die Beugungseigenschaften [2, 1]. Unter Proteinkristallographen gilt daher die Einhaltung der 'drei P-Regel' als Voraussetzung für die erfolgreiche Kristallisation von Proteinen: *purity, purity, purity.*

Kristallisationslösungen von Proteinen enthalten oft bis zu einigen Prozenten an Verunreinigungen [29, 30]. Bei diesen Verunreinigungen kann es sich dabei sowohl um strukturverwandte Proteine, die durch genetische Veränderungen oder durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Deglykolisierung, Deaminierung, partielle Denaturierung oder Di- und Oligomerisierung entstanden sind, als auch um nichtstrukturverwandte Proteine handeln [29].

Verunreinigungen sind eine der häufigsten Ursachen für fehlgeschlagene Kristallisationsversuche bzw. Kristalle von schlechter Qualität. Lagern sich während des Kristallwachstums viele Verunreinigungen an der Wachstumsfläche eines Kristalls an, so können sich ab einem bestimmten Verunreinigungsgrad keine Moleküle des zu kristallisierenden Proteins mehr anlagern, die Kristallfläche ist 'vergiftet' [92, 93]. Kommt es an allen Kristallflächen zu solchen Vergiftungen, können oft gar keine (sichtbaren), nur stark verzwillingte oder Mikrokristalle erhalten werden [94]. Können dennoch große Kristalle erhalten werden, weist der Kristallkeim einen höheren Anteil an Verunreinigungen auf als der äussere Teil des Kristalls [95, 29].

Durch den Kristallisationsprozess findet zwar eine Aufreinigung statt, dennoch wird ein Teil der Verunreinigungen auch in den Kristall eingebaut [96, 97, 29].

Untersuchungen zum Einfluss von Verunreinigungen auf die Beugungseigenschaften von Proteinkristallen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So beugten Kristalle aus kommerziell erhältlichem Hühnereiweiß-Lysozym (HEWL) bis zu einer Auflösung von 2.0 Å und solche aus aufgereinigtem HEWL bis zu 1.55 Å [98]. Absichtlich zugesetzte Puteneiweiß-Lysozym (TEWL) Verunreinigungen bei der Kristallisation von HEWL wurden zwar, wie durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte, in die Kristalle inkorporiert, zeigten dagegen jedoch keine oder nur sehr geringe Auswirkungen auf die Qualität der an diesen Kristallen gesammelten Röntgenintensitätsdaten [97, 29, 40].

Der Einfluss von Verunreinigungen auf die Mosaizität von Proteinkristallen wurde

erstmals von Caylor *et al.* untersucht. Dabei beobachteten sie an HEWL-Kristallen, welche aus mit 5% − 20% TEWL und 5% Ovotransferrin verunreinigten Lösungen gezüchtet wurden, Halbwertsbreiten von $0.01° - 0.03°$ [29]. Zudem bestanden die Reflexprofile dabei aus mehreren Maxima. An Kristallen aus nicht verunreinigtem HEWL dagegen wurden Halbwertsbreiten von $0.002° - 0.006°$ gemessen [20]. In weitere Untersuchungen führten TEWL- und Ovotransferrin-Verunreinigungen ebenfalls zu einer erhöhten Mosaizität von HEWL-Kristallen [40]. Der Effekt von TEWL-Verunreinigungen wirkt sich dabei anisotrop auf die Mosaizität aus. Während sich kleinere Anteile an Verunreinigungen nur auf die Mosaizität der $(hk0)$-Reflexe auswirken, führen höhere Anteile an Verunreinigungen zudem zu einer erhöhten Mosaizität der $(00l)$-Reflexe [40].

Durch das Aufzeichnen von $\omega - 2\theta$-Scans konnten Caylor *et al.* zudem zeigen, dass Ovotransferrin-Verunreinigungen keinen auflösbaren Einfluss auf die d-Wert-Variationen zeigten, während mit TEWL verunreinigte Kristalle d-Wert Variationen von etwa 0.2% aufwiesen. Diese unterschiedlichen Effekte werden darauf zurückgeführt, dass TEWL-Moleküle HEWL-Moleküle ersetzen und es durch das unterschiedliche Molekülvolumen zu Spannnungen kommt. Für die Ovotransferrin-Verunreinigungen wird dagegen angenommen, dass sie nicht homogen auf HEWL-Plätzen in den Kristall eingebaut werden sondern vielmehr inhomogen an bestimmten Wachstumsflächen anlagern und daher nur Auswirkungen auf die Mosaizität nicht aber auf d-Wert Variationen haben.

Einschränkend sollte hierbei jedoch erwähnt werden, dass allen hier vorgestellten Ergebnissen zum Einfluss von Verunreinigungen auf die Kristallqualität immer nur wenige untersuchte Kristalle (i.d.R. 1-2 Kristalle pro Gruppe) zugrundeliegen. Eine systematische Untersuchung basierend auf einer größeren Anzahl von Kristallen wurde bisher nicht vorgenommen.

2.6.2 Homogene Magnetfelder

Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Kristallisation von Proteinen in homogenen Magnetfeldern in einigen Fällen zu einer Verbesserung der Kristallqualität führt [46, 80, 47, 99, 100]. Dieser Effekt wird auf die Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität der Moleküle und ihrer Kristalle zurückgeführt. Im Magnetfeld kommt es durch diese Anisotropie zu einer Ausrichtung der Moleküle und Kristalle. Diese Ausrichtung beeinflusst den Kristallisationsprozess durch mehrere Effekte.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst kurz auf die strukturellen Ursachen der magnetischen Anisotropie und die Ausrichtung von Molekülen und Kristallen in Magnetfeldern eingegangen. In den weiteren Abschnitten werden dann die durch Kristallisation in Magnetfeldern beobachteten Effekte und die in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismen, die zu einer Verbesserung der Kristallqualität führen sollen, beschrieben. Im letzten Abschnitt werden die bisher an Proteinkristallen aus homogenen Magnetfeldern

vorgenommen Qualitätsuntersuchungen vorgestellt.

Magnetische Anisotropie

Zur Ausrichtung diamagnetischer Proteinmoleküle in Magnetfeldern tragen, neben den aromatischen Seitenketten [101, 102], vor allem die Anisotropie der Peptidbindung und hier insbesondere die der α-helicalen Bereiche [103] bei. Lonsdale zufolge tritt ein starker Diamagnetismus vor allem bei Systemen mit konjugierten Mehrfachbindungen und einer ebenen Anordnung der Atome senkrecht zu dieser Anordnung auf [102]. Genau diese Bedingungen werden von der Peptidbindung erfüllt. In α-Helices treten die Schichten mit den Peptidbindungen senkrecht zur helicalen Achse auf. Daher tritt senkrecht zu der Achse der Helices die stärkere diamagnetische Suszeptibilität auf. Entsprechend Gleichung (2.44) ist eine Ausrichtung der Helices mit ihrer Achse in Richtung des Magnetfeldes energetisch günstiger [103]. Experimente stützen diese These (siehe z.B. [104]). In β-Faltblatt-Strukturen sind die Peptidbindungen parallel zu den Schichten angeordnet. Daher sollte eine Ausrichtung senkrecht zu diesen Schichten erfolgen. Allerdings ist die magnetische Anisotropie von β-Faltblatt Strukturen dabei deutlich kleiner als die von überwiegend α-helicalen Strukturen [103].

Bei paramagnetischen Makromolekülen, die ebenfalls eine magnetische Anisotropie aufweisen, ist diese Anisotropie dagegen im Wesentlichen durch die magnetische Anisotropie des paramagnetischen Ions bestimmt [105, 77].

Magnetische Orientierung

Die Ausrichtung von aromatischen Molekülen und deren Kristallen durch Magnetfelder ist seit langem bekannt. Ausgiebige Studien zur Anisotropie des Diamagnetismus von organischen Kristallen und deren Relation zur Kristallstruktur wurden z.B. von Lonsdale durchgeführt [101, 102, 106]. Untersuchungen zur Ausrichtung biologischer Systeme in Magnetfeldern wurden erst später durchgeführt, so z.B. an Stäbchen der äußeren Retina von Froschaugen [107] und zur Polymerisation von Fibrin-Filamenten [108]. Auch in der Faser-Diffraktion macht man sich den ausrichtenden Effekt von Magnetfeldern zunutze: Durch das Anlegen eines Magnetfeldes während des Austrocknens oder Polymerisation der Probe richten sich die einzelnen Spezies aus. Durch die Ausrichtung lassen sich in Diffraktionsexperimenten zusätzliche Strukturinformationen über die Probe gewinnen (z.B. [109, 110, 111]).

Auch die Ausrichtung einzelner Makromoleküle durch ein äußeres Magnetfeld ist bekannt. So wird z.B. an wässrigen Lösungen von DNA-Molekülen in starken Magnetfeldern magnetische Doppelbrechung beobachtet [112]. Diese magnetisch induzierte Doppelbrechung ist auf eine Ausrichtung der Moleküle in der Lösung zurückzuführen. Dieser Effekt wird auch als *Cotton-Mouton*-Effekt bezeichnet [113]. In NMR-Untersuchungen lässt sich ebenfalls eine Ausrichtung von Makromolekülen durch das Magnetfeld beob-

achten. So richten sich z.B. Poly-L-Lysin-Hydrobromid-Moleküle, die zum großen Teil α-helical geordnet sind, in wässrigen Lösungen mit ihrer helicalen Achse in Richtung des angelegten Magnetfeldes aus [104]. Diese Ausrichtung einzelner Makromoleküle in Lösung durch das zur Untersuchung angewendete Magnetfeld ist heutzutage ein erwünschter Nebeneffekt in der NMR-Spektroskopie. Durch die Ausrichtung der Moleküle treten Signalaufspaltungen auf, durch die sich zusätzliche Strukturinformationen über das Molekül gewinnen lassen [104, 114, 77]. Durch Zugabe von Hilfssubstanzen wie z.B. Phagen, die durch ihre Ausrichtung in starken Magnetfeldern in einen geordneten Zustand übergehen, vergleichbar mit dem von Flüssigkristallen, lassen sich auch magnetisch weniger stark anisotrope Makromoleküle ausrichten bzw. der Effekt der Ausrichtung verstärken [115, 116].

Die Kristallisation von Proteinen in Magnetfeldern wurde 1979 von Torbet vorgeschlagen [109]. Erste Untersuchungen zur Kristallisation von Met-Myoglobin unter dem Einfluss eines Magnetfeldes folgten dann von Oldfield und Rothgeb im Rahmen von Festkörper NMR-Untersuchungen an Met-Myoglobin [117]. Von ihnen wurde auch erstmals die Ausrichtung von Proteinkristallen durch ein Magnetfeld beobachtet. Weitere systematische Untersuchungen zur Kristallisation von Proteinen in homogenen Magnetfeldern erfolgten dann ab 1997 von Ataka *et al.*, Sazaki *et al.* und Wakayama *et al.* [118, 119, 79].

Ataka *et al.* untersuchten die Kristallisation von tetragonalem Lysozym in homogenen Magnetfeldern der Stärken $0 - 1.2\,T$. Dabei beobachteten sie eine Ausrichtung der Kristalle mit ihrer tetragonalen c-Achse entlang der Magnetfeldrichtung. Als Ursache für die Ausrichtung geben Sazaki *et al.* eine magnetische Anisotropie von $5 \times 10^{-27}\,J\,T^{-1}$ pro Elementarzelle tetragonalem Lysozyms an. Sie beobachteten zudem eine Abhängigkeit des Anteils von ausgerichteten Kristallen von der Feldstärke: Bei einer Feldstärke von $0.1\,T$ sind etwa 25%, bei einer Feldstärke von $0.6\,T$ sind etwa 80% und bei einer Feldstärke von $1.2\,T$ sind ca. 95% aller Kristalle entlang der Feldrichtung orientiert. Dieser Wert stimmt gut mit den von Tanimoto *et al.* gemachten Beobachtungen, die bei einer Feldstärke von $0.64\,T$ einen Ausrichtungsgrad von 90% fanden, überein [120]. Yanagiya *et al.* dagegen beobachteten in ihren Untersuchungen bei höheren Feldstärken einen geringeren Ausrichtungsgrad [121]. Astier *et al.* beobachteten neben der Ausrichtung von tetragonalen Lysozym Kristallen auch die Ausrichtung von *bovine pancreatic trypsin inhibitor*- und *porcine pancreatic* α-Amylase-Kristallen in einem Magnetfeld von $1.25\,T$ [122]. Weiterhin wurde eine fast vollständige Ausrichtung von monoklinen Lysozym-, Ribonuclease A- und Met-Myoglobin-Kristallen bei einer Feldstärke von $0.6\,T$ beobachtet [123, 124].

Nukleation und Kristallwachstum

Bei der Kristallisation von Proteinen in Magnetfeldern konnte eine veränderte Nukleationsrate beobachtet werden. So wurde bei der Kristallisation von tetragonalen Lysozym- und kubischen Ferritinkristallen in einem homogenen $10\,T$ Magnetfeld eine stark verminderte Kristallzahl gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Magnetfeld beobachtet [119]. Die Kristallisation in einem $10\,T$ Magnetfeld führte ebenfalls zu einer Verringerung der Zahl von pro Gefäß gewachsenen orthorhombischem Lysozymkristallen [47]. Ein Magnetfeld von $0.6\,T$ zeigt dagegen keinen Einfluss auf die Anzahl der pro Gefäß gewachsenen tetragonalen Lysozymkristalle [79].

Ein Einfluss von Magnetfeldern auf die Kristallmorphologie konnte ebenfalls beobachtet werden. So weisen in einem $10\,T$ Magnetfeld gezüchtete tetragonale Lysozymkristalle eine geringere Ausdehnung entlang ihrer tetragonalen c-Achse auf [119]. Lysozymkristalle, die unter Zusatz paramagnetischer Salze gezüchtet wurden, zeigten ebenfalls eine veränderte Kristallmorphologie, wenn sie im Feld eines $10\,T$ Magneten gezüchtet wurden [125].

Untersuchungen zeigen zudem, dass Magnetfelder die Wachstumsgeschwindigkeit von Proteinkristallen beeinflussen. So führt ein $11\,T$-Magnetfeld zu einer gegenüber der Kristallisation ohne Magnetfeld um $10\% - 60\%$ reduzierten Flächenwachstumsgeschwindigkeit von tetragonalen Lysozymkristallen [126]. Bei der Beobachtung des Kristallisationsvorgangs von tetragonalem Lyoszym in einem $6\,T$-Magnetfeld mit einem Mach-Zehnder Interferometer konnte ebenfalls eine verringerte Kristallwachstumsgeschwindgkeit im Magnetfeld festgestellt werden [127]. Mit dem gleichen experimentellen Aufbau konnte zudem eine verminderte Auflösungsgeschwindigkeit von Lysozymkristallen durch ein homogenes Magnetfeld von $6\,T$ festgestellt werden [128].

Konvektion

In der Halbleiter-Einkristallzüchtung werden Magnetfelder während des Kristallwachstums erfolgreich zur Verbesserung der Kristallqualität eingesetzt [129]. Durch die Lorentz-Kraft auf die elektrisch leitende Schmelze lässt sich die Konvektion durch äußere Magnetfelder maßgeblich verringern. Im Unterschied zu Proteinlösungen ($\sigma =$ einige $\Omega^{-1}\mathrm{m}^{-1}$) weist eine Silizium-Schmelze jedoch eine um mehrere Größenordnungen höhere Leitfähigkeit ($\sigma = 2 \times 10^6 \Omega^{-1} m^{-1}$) auf. Daher ist der Effekt der Lorentz-Kraft auf Proteinlösungen vernachlässigbar klein und sollte damit auch keinen Einfluss auf die Konvektion haben.

Viskositätsmessungen mit der Fallkugelmethode zeigten jedoch, dass sich auch die Viskosität einer gesättigten Lysozymlösung durch das Anlegen eines homogenen $10\,T$-Magnetfeldes um bis zu 34% erhöht [130]. Wurde das Magnetfeld für mehrere Stunden angelegt, blieb diese erhöhte Viskosität auch nach Abschalten des Magnetfeldes bestehen. Als Ursache für diese Erhöhung der Viskosität wird die Orientierung der Moleküle

in der Lösung angenommen [131, 99]. Als Folge dieser Ausrichtung soll es bei hohen Proteinkonzentrationen zur Ausbildung eines gelartigen 3-dimensionalen Netzwerkes der Proteinnmoleküle kommen, was zu einer erhöhten Viskosität der Lösung führt. Rechnungen zeigen zudem, dass die durch ein Magnetfeld erhöhte Viskosität auch zu einer Verminderung der Konvektion führen sollte [132].

Solch eine Verminderung der Konvektion um einen Faktor 2 durch ein Magnetfeld mit einer Stärke von $10\,T$ konnte an einer 25%-igen NaCl-Lösung beobachtet werden [133]. In der Untersuchung dienten Polystyren-Kugeln mit einem Durchmesser von $5\mu m$ als Marker, deren Bewegungen mit einem Mikroskop beobachtet wurden. In der Untersuchung bleibt allerdings offen, ob nicht die direkte Wechselwirkung des Magnetfeldes mit den Polystyren-Kugeln für deren beobachtete verminderte Bewegung verantwortlich ist.

Auf die Auswirkungen der Konvektion auf die Qualität von Proteinkristallen wird in Abschnitt 2.6.3 näher eingegangen.

3D-Nukleation

Als weiterer positiver Effekt homogener Magnetfelder auf die Kristallqualität wird die 3D-Flächennukleation diskutiert [99]. Durch AFM-Beboachtungen während des Kristallwachstums konnte dieses Phänomen, bei dem sich ein kleiner 3D-Nukleus auf einer Kristallfläche anlagert und in den wachsenden Kristall inkorporiert wird, erstmals an Virenkristallen beobachtet werden [134]. Dieser Effekt tritt auch bei der Kristallisation von Proteinen auf. So beobachteten Malkin *et al.* bei der Kristallisation von Canavalin die Anlagerung eines $15 \times 8\,\mu m$ großen 3D-Nukleus mit einer Dicke von $0.3\,\mu m$. Die Anlagerung dieses Mikrokristalls, mit einer anderen Gitterorientierung als der Wirtskristall, führte zur Ausbildung einer Störungszone in dem untersuchten Kristall [135]. Die Entstehung eines Makrodefektes durch Inkorporation eines Mikrokristalls wurde ebenfalls an α-Amylase Kristallen beobachtet [136]. Diese Makrodefekte könnten eine Erklärung für die relativ schlechten Beugungseigenschaften von Conavalin und α-Amylase Kristallen sein [135, 136]. Eine - wenn auch nur eindimensionale - Ausrichtung dieser eingelagerten Mikrokristalle könnte diese Störungszonen erheblich reduzieren und damit die Beugungseigenschaften von im Magnetfeld gewachsenen Kristallen verbessern [99]. Da die kritische Größe, bei der sich die Kristallite ausrichten, von dem Quadrat der Feldstärke abhängt (s. Gleichung 2.45), sollte dieser Effekt umso stärker sein, je stärker das Magnetfeld ist, unter dem die Kristalle gezüchtet wurden. Zudem sollte der Effekt nur bei solchen Kristallen zu beobachten sein, bei denen bereits eine Ausrichtung der Wirtskristalle vorhanden war.

Kristallqualität

Von einigen Arbeitsgruppen wurden Beugungsuntersuchungen zur Evaluation der Kristallqualität durchgeführt. Mosaizitätsuntersuchungen an 2 orthorhombischen Lysozymkristallen zeigten, dass der in einem Magnetfeld von $10\,T$ gezüchtete Kristall im Vergleich zu dem Kristall der $0\,T$-Kontrollgruppe im Schnitt um 30.8% schmalere Reflexprofile aufwies [46, 47]. An dem Kristall aus dem Magnetfeld betrug der durchschnittliche FWHM-Wert 0.0058° und an dem der Kontrollgruppe 0.0081°. Intensitätsdatensammlungen an zwei weiteren Kristallen zeigten, dass der Kristall aus dem Magnetfeld bis zu einer Auflösung 1.13Å beugte, während der Kristall der Kontrollgruppe nur bis 1.33Å beugte. Kritisch anzumerken ist hierbei, dass für die beiden Kristalle unterschiedliche Datensammlungsparameter wie z.B. verschiedene Rotationswinkel pro Bild gewählt wurden. Eine spätere Verfeinerung der Datensätze zeigte, dass der Kristall aus dem Magnetfeld zum Teil um 1.8Å^2 kleinere B-Faktoren aufweist. Zudem sind einige Seitenketten in dem Kristall aus dem Magnetfeld besser geordnet [100].

An Kristallen aus Schlangenmuskel-Fructose-1,6-biphosphatase konnte ebenfalls eine Verbesserung des erreichbaren Auflösungsvermögens durch die Kristallisation in einem $10\,T$-Magnetfeld beobachtet werden [80]. Letztere Ergebnisse basieren dabei auf jeweils 4 Kristallen aus dem Magnetfeld und 4 Kristallen der Kontrollgruppe.

Insgesamt basieren die Ergebnisse, die einen positiven Effekt von homogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität belegen sollen, auf sehr wenigen Kristallen. Aussagen, die auf dem Vergleich von insgesamt nur 2 Kristallen beruhen, sind dabei mehr als fragwürdig.

2.6.3 Mikrogravitation

Die Kristallzüchtung in der Schwerelosigkeit zählt zu den am besten untersuchten Proteinkristallzüchtungsmethoden und kann als ein Motor für viele Entwicklungen auf diesem Gebiet angesehen werden [17]. Erstmalig wurden 1982 von Littke Versuche zur Kristallisation von Proteinen an Bord des *space shuttle* unternommen [8]. Die unter Mikrogravitation gezüchteten Kristalle waren dabei um ein vielfaches größer als die auf der Erde gezüchteten Kristalle und zeigten bei lichtmikroskopischer Betrachtung weniger Defekte. In den folgenden beiden Jahrzehnten wurde ein großer Aufwand mit z.T. erheblichen Kosten betrieben, um die Möglichkeiten der Proteinkristallzüchtung unter Mikrogravitation zu untersuchen [17]. Eine mögliche, positive Beeinflussung des Kristallisationprozesses in der Schwerelosigkeit wird vor allem auf 2 Effekte zurückgeführt: Die Unterdrückung von Konvektion (s. Abschn. 2.1.2) und die Verhinderung der Sedimentation der entstandenen Kristalle [13]. Allerdings wird nur an ca. 20% der im Weltraum gezüchteten Proteinkristalle eine Verbesserung der Kristallqualität beobachtet [137]. In den folgenden Abschnitten soll kurz auf die Effekte von Mikrogravitation auf das Kristallwachstum und die Kristallqualität eingegangen werden.

Unterdrückung der Konvektion

Bei der Kristallisation unter Gravitationsbedingungen steigt an Protein verarmte Lösung, die eine geringere Dichte aufweist, über dem wachsenden Kristall auf. Gleichzeitig findet im unteren Bereich ein Stofftransport zum Kristall hin statt. Diese beiden Prozesse verstärken sich gegenseitig und es kommt zu einem konvektiven Stofftransport (s.a. Abschn. 2.1.2).

Unter Gravitationsbedingungen der Erde dominiert daher die Konvektion den Stofftransport zum wachsenden Kristall hin [17]. Durch den *Schlieren*-Effekt in der Umgebung eines wachsenden tetragonalen Lysozymkristalls konnte die Konvektion während des Proteinkristallwachstums unter Gravitationsbedingungen direkt beobachtet werden [138, 139]. Dabei stieg eine Fahne aufsteigender Proteinlösung geringerer Dichte über den wachsenden Lysozymkristallen auf. Durch lichtmikroskopische Beobachtung von präzipitiertem Protein als Marker ließ sich die Konvektion während des Proteinkristallwachstums ebenfalls direkt beobachten [140, 141].

Unter Mikrogravitationsbedingungen dagegen wird die Konvektion weitestgehend unterdrückt und in der Umgebung wachsender Kristalle bilden sich an Protein 'verarmte' Zonen aus. Solche 'Verarmungszonen' konnten durch Beobachtung eines farbigen Proteins mit einer CCD-Kamera [142] nachgewiesen werden.

Positive Auswirkungen von verminderter Konvektion auf die Qualität von Proteinkristallen werden dabei vor allem auf zwei Effekte zurückgeführt [17]. Eine Verringerung der Orientierungsfehlordnung der Moleküle und eine verminderte Inkorporation von Verunreinigungen.

Beim konvektiven Stofftransport ist die Transportrate meist größer als die Inkorporationrate der Moleküle in den Kristall. In diesem Fall ist der Kristall von einer hohen Proteinkonzentration, wie sie auch im übrigen Teil der Lösung vorliegt, umgeben. Das Wachstum findet in diesem Fall aus einer stark übersättigten Lösung statt. Bei diesem schnellen Wachstum wird angenommen, dass die Moleküle nicht immer die richtige Orientierung einnehmen können, bevor sie in den Kristall eingebaut werden. Dies sollte zu einer erhöhten Orientierungsfehlordnung im Kristall führen. Beim rein diffusiven Stofftransport dagegen ist die Anlagerungsrate an den Kristall erheblich größer als die Stofftransportrate. Die Proteinkonzentration an der Grenzfläche sollte in diesem Fall der Sättigungskonzentration entsprechen und das Kristallwachstum findet im metastabilen Bereich des Phasendiagramms statt. Bei diesem langsameren Wachstum sollten die Moleküle die richtige Orientierung einnehmen können, bevor sie sich an die Wachstumsfläche anlagern [17].

Beim konvektiven Stofftransport werden der Wachstumsfläche zudem ständig Verunreinigungen und Oligomere zugeführt. In der Umgebung des Kristalls sollte daher die Konzentration an Verunreinigungen derjenigen im übrigen Teil der Lösung entsprechen. Unter Mikrogravitation, also beim diffusiven Stofftransport werden dagegen Oligomere

des entsprechenden Proteins oder höhermolekulare Verunreinigungen dem Kristall mit verminderter Geschwindigkeit zugeführt, da diese größeren Moleküle kleinere Diffusionskoeffizienten als die kleineren Monomere aufweisen. Hierdurch ist die Konzentration der höhermolekularen Verunreinigungen um den wachsenden Kristall herum kleiner als in der übrigen Lösung und die Verunreinigungen sollten im Vergleich zum konvektiv kontrollierten Stofftransport nur in geringerer Konzentration in den Kristall eingebaut werden [17, 143]. Dies sollte zu besseren und ggf. größeren Kristallen führen (s.a. Abschnitt 2.6.1).

Sedimentation

Auf der Erde neigen Kristalle aufgrund ihrer gegenüber der Mutterlösung höheren Dichte zur Sedimentation. Unter Mikrogravitation ist dies nicht der Fall. Im Idealfall sind die wachsenden Kristalle von allen Seiten sehr homogen von der Mutterlösung umgeben und können ohne Behinderung durch Phasengrenzen in alle Richtungen wachsen [17]. Die fehlende Sedimentation soll zudem Verwachsungen verschiedener Kristallindividuen verhindern. So sind bei der Kristallisation von Canavalin auf der Erde immer Verwachsungen von einzelnen Kristallen zu beobachten, während unter Mikrogravitation morphologisch gut ausgebildete nicht zusammengewachsene Kristalle beobachtet wurden [10]. Mikrogravitation ermöglicht es zudem durch ein nahezu freies Schweben der Tropfen, den Einfluss von Behältnissen auf die Kristallisation weitestgehend zu unterdrücken [10, 144].

Auswirkungen auf die Kristallqualität

In vielen Fällen führte die Kristallisation unter Mikrogravitation zu besseren [145, 146, 147, 12, 148, 149, 150, 137, 151, 152, 153] und größeren Kristallen [10, 145, 154, 147, 148, 149, 8, 9, 150, 137, 151, 153]. Für einige Proteine wurden unter Mikrogravitation die besten Kristalle überhaupt erhalten [150, 137, 152, 145]. Zudem konnten von einigen Proteinen nur unter Mikrogravitation Kristalle erhalten werden [154, 9]. Hilgenfeld fand dagegen in einem Fall einen reproduzierbar negativen Effekt auf die Kristallqualität [155].

Neben einigen exemplarischen Beugungsuntersuchungen (z.B. [9, 12, 35]) wurden erste methodischere Untersuchungen über den Einfluss von Mikrogravitation auf die Beugungseigenschaften erstmals von DeLucas *et al.* vorgenommen [10]. Durch Analyse von γ-Interferon D^1-, *porcine* Elastase- und Isocitrat-Lyase-Intensitätsdatensätzen fanden sie einen positiven Effekt von Mikrogravitation auf das erreichbare Auflösungsvermögen. Durch (relative) *Wilson-Plot*-Analysen fanden sie zudem einen positiven Einfluss auf die B-Faktoren (s. Abschn. 2.2.5 bzw. 2.2.4). Eine systematische Untersuchung an insgesamt 12 Kristallen des Tabakmosaik-Satelliten-Virus zeigte ebenfalls einen deutlich positiven Effekt der Mikrogravitation auf die Beugungseigenschaften [156]. An

bovine und menschlichem Insulin [157] und Phospholipase A_2-Kristallen [158] konnte ebenfalls ein deutlich positiver Effekt auf die Beugungseigenschaften festgestellt werden. Der Einfluss von Mikrogravitation auf die Mosaizität wurde erstmals von Snell *et al.* an tetragonalen Lysozymkristallen untersucht [33]. Die Evaluation der Mosaizität erfolgte durch *rocking-curve*-Messungen bei sehr hoher Auflösung. Die im Weltraum gezüchteten Kristalle zeigten dabei alle eine relativ geringe Mosaizität, während nur etwa jeder vierzigste auf der Erde gezüchtete Kristall eine vergleichbar geringe Mosaizität aufwies. Bei Untersuchungen an Thaumatin-Kristallen konnten Ng *et al.* ebenfalls einen positiven Effekt von Mikrogravitation auf die Kristallmosaizität feststellen [35]. Allerdings ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen durch die geringe Zahl der untersuchten Kristalle in den beiden Fällen (tetragonales Lysozym: 3 bzw. 2 Kristalle; Thaumatin: jeweils 2 Kristalle) stark eingeschränkt. Mosaizitätsmessungen an Apocrustacyanin-C_1-Kristallen zeigten dagegen keinen deutlich positiven Effekt von Mikrogravitation auf die Kristallqualität [34]. Auch in dieser Untersuchung wurden nur 3 unter Mikrogravitation gezüchtete Kristalle mit 2 auf der Erde gezüchteten Kristallen verglichen.

Eine systematischere Untersuchung erfolgte erstmals von Borgstahl *et al.* Sie verglichen die Mosaizität von jeweils 6 im Weltraum und auf der Erde gezüchteten Insulin-Kristallen. Die unter Mikrogravitation gezüchteten Kristalle wiesen dabei eine deutlich geringere Mosaizität auf [48].

Simulation von Mikrogravitation - Kristallisation in Gelen

Die Methode der Gelkristallisation ist zur Züchtung von Kristallen anorganischer Salze eine etablierte Methode. Durch Zusatz von Gelen wird die Viskosität der Kristallisationslösung erhöht. Wie aus den Gleichungen 2.6 und 2.7 hervorgeht, sollte dies, analog zur Mikrogravitation, zu einer Verminderung bzw. weitgehenden Unterdrückung der Konvektion führen. Gleichzeitig verhindert die hohe Viskosität die Sedimentation der entstandenen Kristalle - einem weiteren Vorteil von Mikrogravitation. Erste Versuche zur Züchtung von Proteinkristallen in Gelen wurden von Robert und Lefaucheux [15] unternommen.

2.6.4 Inhomogene Magnetfelder

Das Interesse an Kristallzüchtungsversuchen in inhomogenen Magnetfeldern rührt daher, dass sich diamagnetische Substanzen in ausreichend starken inhomogenen Magnetfeldern in einem der Mikrogravitation ähnlichen Zustand befinden. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass Mikrogravitation in vielen Fällen einen positiven Einfluss auf die Qualität von Proteinkristallen hat. Eine ausführlichere Behandlung des Themas Proteinkristallzüchtung unter Mikrogravitation findet sich im Abschnitt 2.6.3. Allerdings erfordern Experimente unter Mikrograviation einen erheblichen (finanziellen) Aufwand und bedürfen eines großen zeitlichen Vorlaufes. Daher wird die Kristallisa-

tion in inhomogenen Magnetfeldern als erheblich preiswertere, leichter und schneller zugängliche Alternative zur Mikrogravitation angesehen [78, 82]. Eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen der Magnetolevitation findet sich in Kapitel 3.1. Im folgenden soll daher nur auf die für die Kristallzüchtung relevanten Aspekte inhomogener Magnetfelder eingegangen werden.

Analogien und Unterschiede zur Mikrogravitation

Ebenso wie Mikrogravitation soll ein magnetischer Feldgradient in vertikaler Richtung für diamagnetische Lösungen zu einer Verringerung bzw. Unterdrückung der Konvektion und zu homogeneren Wachstumsbedingungen der Kristalle führen. Rechnungen zeigen, dass $\nabla B^2/2$-Werte von $-685\,T^2/m$ zu einer 24%-igen Verringerung und ein Wert von $-1370\,T^2/m$ zu einer vollständigen Unterdrückung der Konvektion führen soll [81]. Allerdings wurden in den Rechnungen die unterschiedlichen Suszeptibilitäten der in der Lösung vorhandenen Substanzen nicht berücksichtigt und es wurde nur eine mittlere Suszeptibilität für die Lösung angenommen.

Neben der Anwendung magnetischer Feldgradienten in vertikaler Richtung wird auch die Anwendung in horizontaler Richtung zur Verminderung der Konvektion diskutiert [159, 160]. Allerdings sind hier weniger deutliche Effekte zu erwarten.

Als weitere Analogie zur Mikrogravitation vermindert die Kompensation der Schwerkraft durch inhomogene Magnetfelder, zumindest bei ähnlichen diamagnetischen Suszeptibilitäten von Lösung und Kristall, die Kraft, die zur Sedimentation der wachsenden Kristalle führt. Diese sind daher von allen Seiten von der Mutterlösung umgeben, was ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Kristallqualität haben soll.

Als wesentlicher Unterschied zur Kristallisation unter Mikrogravitation ist die Gegenwart des Magnetfeldes selbst und dessen Auswirkung auf das Kristallisationsverhalten zu berücksichtigen (s.a. Abschnitt 2.6.2). Insbesondere die ausrichtenden Effekte müssen bei der Diskussion vermeintlicher Effekte durch inhomogene Magnetfelder stets mit berücksichtigt werden.

Nukleation und Wachstum

Erste Kristallzüchtungsversuche von Proteinen in inhomogenen Magnetfeldern wurden im Jahre 1997 von Wakayama et al. unternommen [79]. Sie untersuchten den Effekt eines magnetischen Feldgradienten bzw. $\nabla B^2/2$-Wertes von $\pm 64\,T^2/m$ auf die Kristallisation von Kristallen tetragonalem Lysozyms. Die Kraft, die dieser Feldgradient auf Wasser ausübt, entspricht $\pm 5\%$ der Gravitationskraft. Dabei beobachteten sie in ihren Experimenten einen Einfluss des inhomogenen Magnetfeldes auf die Zahl der pro Gefäss gewachsenen Kristalle. Sie fanden dabei, dass in den Bereichen 'verminderter' Schwerkraft ($0.95\,g$) weniger und in den Bereichen 'erhöhter' Schwerkraft ($1.05\,g$) mehr Kristalle als ohne Magnetfeld auftraten. Ein ähnlicher Effekt wurde auch an Kristal-

len von Schlangenmuskel-Fructose-1,6-Bisphosphatase, die bei $\pm 400\,T^2/m$ gezüchtet wurden, beobachtet. Hier traten in dem Bereich 'verminderter' Schwerkraft ($\approx 0.7\,g$) weniger und im Bereich 'erhöhter' Schwerkraft ($\approx 1.3\,g$) mehr Kristalle im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf [80]. Zudem wiesen die Kristalle aus dem Bereich 'erhöhter' Schwerkraft oft eine gestörte Morphologie auf. Andere Autoren beobachteten dagegen bei der Untersuchung der Kristallisation von Ribonuclease S in stärkeren inhomogenen Feldern einen umgekehrten Effekt [161]. Im oberen Teil des Magneten ($0.2\,g$) entstanden mehr Kristalle, im unteren Teil ($1.8\,g$) dagegen weniger Kristalle. Zudem waren die unter 'Hypergravitation' im unteren Teil des Magneten gewachsenen Kristalle von besserer optischer Qualität.

Kristallqualität

Untersuchungen zum Einfluss inhomogener Magnetfelder auf die Qualität von Proteinkristallen wurden bisher nur in 2 Fällen durchgeführt. Bei der Kristallisation von Schlangenmuskel-Fructose-1,6-Bisphosphatase führte die Kristallisation bei $\nabla B^2/2$-Werten von $-400\,T^2/m$, also von etwa $0.7\,g$, zu einer Verbesserung des Auflösungsvermögens der Kristalle [80]. Im Mittel wiesen die unter $0.7\,g$ gewachsenen Kristalle eine Auflösungsgrenze von 3.06 ± 0.14 Å und die der $1\,g$-Kontrollgruppe eine Auflösungsgrenze von 4.24 ± 1.24 Å auf. Hierbei wurden jeweils 4 Kristalle miteinander verglichen. Untersuchungen zur Kristallisation von orthorhombischem Lysozym bei einem $\nabla B^2/2$-Wert von $1370\,T^2/m$, also in etwa $0\,g$, zeigen ebenfalls einen positiven Effekt auf die Kristallqualität [82]. Eine Analyse der B-Faktoren liefert hier Werte von 14.95(29) für die '$0\,g$'-Kristalle und 16.01(9) für die Kristalle der Kontrollgruppe. In dieser Untersuchung wurden jeweils 3 Kristalle miteinander verglichen. Mosaizitätsuntersuchungen zur Evaluation des Effektes inhomogener Magnetfelder auf die Kristallqualität wurden bisher nicht vorgenommen.

Magneto-Archimedes-Levitation

In einer weiteren Untersuchung wurden in einem inhomogenen Magnetfeld tetragonale Lysozym-Kristalle aus einer paramagnetischen Gadoliniumchloridlösung gezüchtet [162]. Nach dem Prinzip der *Magneto-Archimedes*-Levitation (s.a. Abschnitt 2.5.2) reichen bei diesem Versuchsaufbau relativ moderate $\nabla B^2/2$-Wert von $-24.1\,T^2/m$ aus, um diamagnetische Lysozymkristalle auf der Oberfläche der paramagnetischen Gadoliniumlösung schwimmen zu lassen. Allerdings findet bei solch einem Versuch weder eine maßgebliche Unterdrückung der Konvektion statt, noch sind die entstehenden Kristalle an allen Seiten hin Mutterlösung ausgesetzt und erfahren dadurch homogenere Wachstumsbedingungen. Zudem dürfte die Übertragbarkeit auf andere Proteine stark eingeschränkt sein, da sich die wenigsten aus einer Gadolimiumchloridlösung züchten lassen werden.

Paramagnetische Substanzen

Bisher nicht untersucht wurde der Effekt von inhomogenen Magnetfeldern auf die Kristallisation von paramagnetischen Proteinen. Aufgrund der erheblich stärkeren Wechselwirkung sind hier jedoch interessante Effekte denkbar.

Kapitel 3

Experimentelle Arbeiten

3.1 Der Gradientenmagnet PROLET

Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, lässt sich für diamagnetische Substanzen durch stark inhomogene Magnetfelder ein der Schwerelosigkeit vergleichbarer Zustand auf der Erde erzeugen. Derart große $\nabla B^2/2$-Werte, wie sie zur Magnetolevitation von Wasser und diamagnetischen Proteinen notwendig sind, liessen sich bisher nur mit *Bitter*-Magneten und supraleitende Gradientenmagneten erzeugen. Solche Magneten standen zur systematischen Untersuchung des Effektes stark inhomogener Felder während des Wachstums auf die Qualität von Proteinkristallen jedoch nicht zur Verfügung. Daher wurden in Anlehnung an Braunbeks Arbeit [87] für einen bei *DESY* vorhandenen, aber ungenutzten Elektromagneten spezielle Polschuhe berechnet und konstruiert. Die Feldverläufe dieses **Pro**tein **Le**vitation **T**ool, kurz PROLET, wurden abschließend durch Messung mit einer *Hall*-Sonde charakterisiert.

3.1.1 Technische Daten

Die wichtigsten technischen Daten des zum Aufbau des PROLET eingesetzten C-förmigen Elektromagneten der Fa. *Bruker* sind in Tabelle 3.1 angegeben.

3.1.2 Anforderungen

Wie aus Tabelle 2.3 hervorgeht, sind zur Magnetolevitation von Wasser und diamagnetischen Proteinen $\nabla B^2/2$-Werte von etwa $1370 - 1500\,T^2/m$ erforderlich. Theoretische Rechnungen für Wasser zeigen, daß Werte von $685\,T^2/m$ nur zu einer Reduzierung der Auftriebskraft bedingten Konvektion um 24% führen, während sie bei Werten von $1370\,T^2/m$ vollständig unterdrückt wird [127]. Daher sollten sich mit den zu konstruierenden Polschuhen möglichst homogen über das gesamte Probenvolumen $\nabla B^2/2$-Werte von $\approx 1400 - 1500\,T^2/m$ erreichen lassen. Zudem sollte der Aufbau folgende weitere Anforderungen erfüllen:

Tabelle 3.1: Technische Daten des C-fömigen Elektromagneten der Fa. *Bruker*.

Polkerndurchmesser	450 mm
max. Magnetspalt	300 mm
Wicklungen	2×400
Widerstand	$2 \times 0.4\ \Omega$
max. Leistung	2×30 KW
max. Stromstärke	250 A
Gewicht	7.8 t

- Der Probenraum sollte gut zugänglich sein.
- Das Probenvolumen sollte möglichst groß sein.
- Es sollten möglichst viele Proben auf einmal untergebracht werden können.
- Die einzelnen Probenorte sollten möglichst ähnliche Feldverläufe aufweisen.

3.1.3 Verwendete Materialien

Um mit einem klassischen Elektromagneten möglichst hohe Feldstärken zu erzielen, wurden Materialien mit hohen Sättigungsmagnetisierungen eingesetzt: ARMCO-Reineisen der Fa. REMAG und VACOFLUX50 der Firma VAKUUMSCHMELZE HANAU, einer Eisen-Kobalt Legierung mit der höchsten z.Zt. bekannten Sättigungsmagnetisierung. In Abbildung 3.1 sind die im Programm RADIA implementierten Magnetisierungskurven für Weicheisen ('*low carbon steel*') und für VACOFLUX50 gezeigt. Zusätzlich ist eine von der Firma VACUUMSCHMELZE HANAU zur Verfügung gestellte, experimentell bestimmte Magnetisierungskurve von VACOFLUX50 gezeigt [163]. In der Abbildung ist die deutlich höhere Sättigungsmagnetisierung M_s von VACOFLUX50 mit $M_S \approx 2.35\,T$ im Vergleich zu Weicheisen zu erkennen. Zum Erreichen optimaler magnetischer Eigenschaften wurden alle Teile nach der mechanischen Bearbeitung entsprechend den Herstellerangaben einer magnetischen Schlussglühung unterzogen.

3.1.4 Berechnung der Polschuhe

Die Berechnung der Polschuhe erfolgte mit dem Finite Elemente Programm RADIA[164], welches auf dem Programm MATHEMATICA [165] basiert. Die Abmessungen der zu berechnenden Polschuhe wurden dabei durch die Geometrie des Magneten mit einem

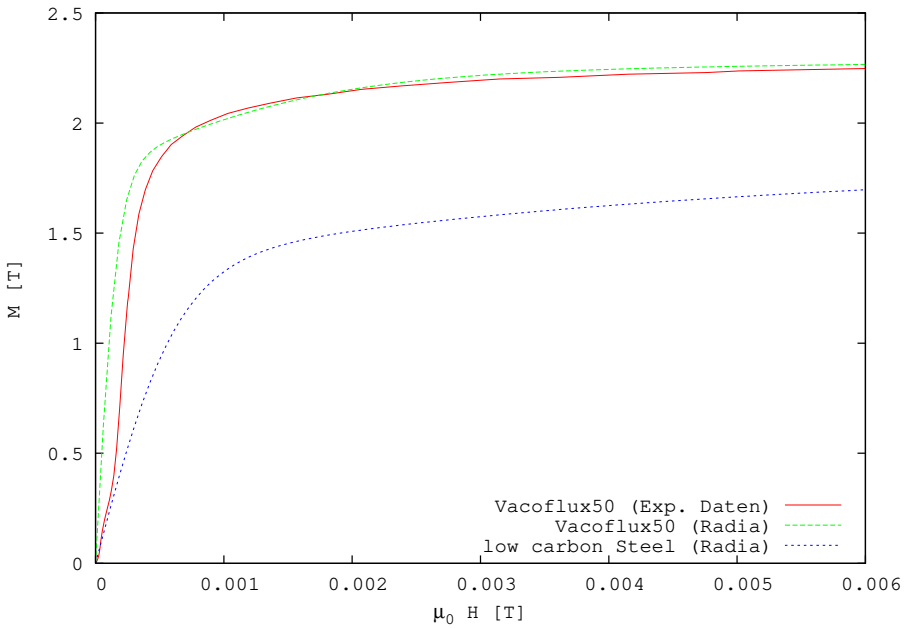

Abbildung 3.1: In dem Programm RADIA implementierte Magnetisierungskurven von Weicheisen mit einem Kohlenstoffgehalt $\leq 0.06\%$ (blau) und VACOFLUX50 (grün) und experimentell bestimmte Magnetisierungskurve von VACOFLUX50 (rot) [163].

Polkerndurchmesser von $450\,mm$ und einem maximalen Magnetspalt von $300\,mm$ begrenzt. Zur Vereinfachung der Rechnungen wurde die Symmetrie des Magnetaufbaus berücksichtigt. Als Konvergenzkriterium der Rechnungen wurde eine Feldstärkendifferenz $\leq 0.05\,mT$ zwischen zwei Zyklen gewählt. Abbildung 3.2 zeigt schematisch den Aufbau des Magneten einschließlich der berechneten Polschuhe. Zudem ist die gewählte Segmentierung gezeigt.

3.1.5 Polschuhanordnung

Mit herkömmlichen Elektromagneten lassen sich durch geeignete Polschuhe und bei einem Magnetspalt von wenigen Millimetern Feldstärken von bis zu 5 Tesla erreichen [166]. Zum Erreichen des gewünschten $\nabla B^2/2$-Wertes von etwa $1400 - 1500\,T^2/m$ muss also gleichzeitig ein Gradient von etwa $300\,T/m$ erreicht werden.

Konzept zur Erzeugung starker inhomogener Magnetfelder

Rechnungen zeigen, daß eine maximale Konzentration der Feldlinien bzw. höchste Feldstärken mit kegelförmig-spitz zulaufenden Polschuhen mit einem halben Öffnungswinkel von 60°, wie sie in Abbildung 3.3 links gezeigt sind, erzielt wird. Mit einer solchen Konfiguration lassen sich allerdings nicht die ebenfalls erforderlichen Feldgradienten von $300\,T/m$ erreichen. Zudem ist der Probenraum einer solchen Anordnung

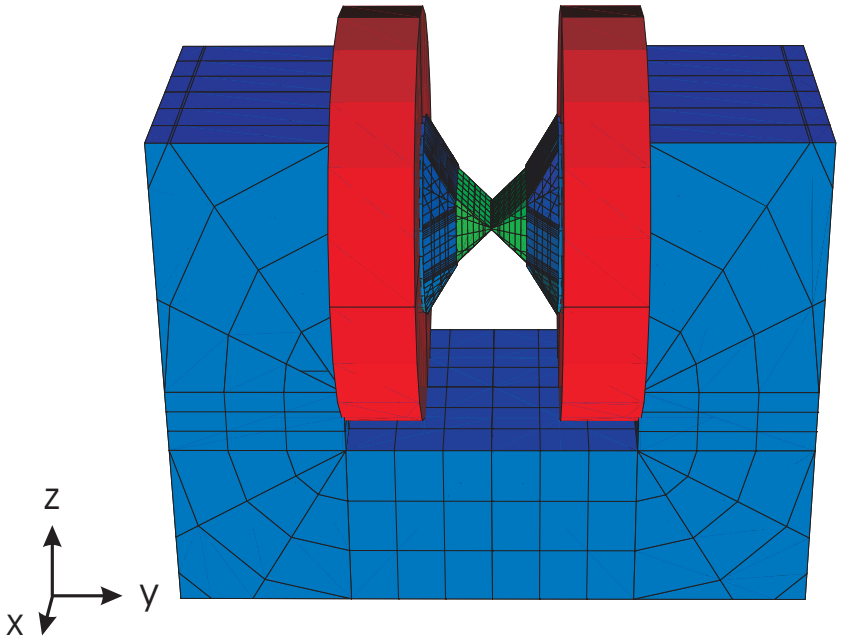

Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau und Segmentierung des Magneten PROLET und Definition des Koordinatensystems (links).

nur schwer zugänglich. Große Gradienten bei gleichzeitig relativ hoher Feldstärke lassen sich dagegen idealerweise bei halben Öffnungswinkeln von etwa 45° erzielen. Nur eine Kombination dieser beiden Anordnungen wurde in den Rechnungen den Anforderungen gerecht. Die abschließend berechnete Polschuhanordnung besteht aus 3 Teilen auf jeder Seite.

Unmittelbar an die Polkerne mit 450 mm Durchmesser schließen sich kegelstumpfähnliche Elemente P1 mit einer Höhe von 68 mm und einer rechteckigen Stirnfläche von 235 $mm \times 160\,mm$ und abgerundeten Kanten mit einem Krümmungsradius von 30 mm (in Abbildung 3.4 dunkelgrau dargestellt) an. In diesen Elementen P1 mit einem relativ großen Öffnungswinkel werden die Feldlinien stark konzentriert. Aus Kostengründen sind diese Elemente aus vergleichsweise preiswertem ARMCO-Reineisen gefertigt, da in diesem Bereich noch relativ moderate Feldstärken vorliegen. Rechnungen zeigen, daß die Verwendung von VACOFLUX50 hier nur zu einer geringen Erhöhung der erreichbaren Feldstärke führen würde. An die Elemente P1 schließen sich die Elemente P2 und P3 an. Diese beiden Elemente weisen einen geringeren Öffnungswinkel auf, wodurch sich größere Feldgradienten erzielen lassen. Zugleich erlauben sie einen guten Zugang zum Probenraum. Das Element P2 und dann P3 geht in eine 160 mm breite Stirnfläche mit einer Höhe von 6 mm über. Diese breite Stirnfläche weist im Unterschied zu einer kreisförmigen Stirnfläche den Vorteil auf, daß ein sich über die gesamte Breite der Stirnfläche erstreckendes Probenvolumen erhalten wird. Zum Erhalt homogenerer

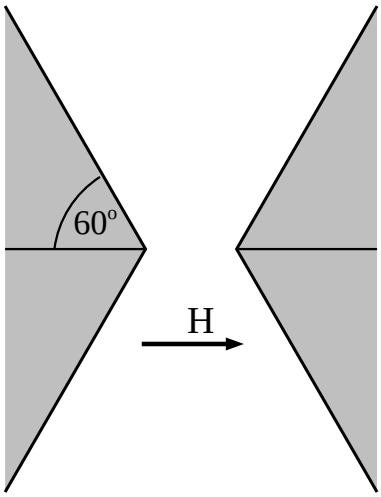

Abbildung 3.3: Polschuhanordnung mit einem halben Öffnungswinkel von 60° zum Erzielen hoher Magnetfelder.

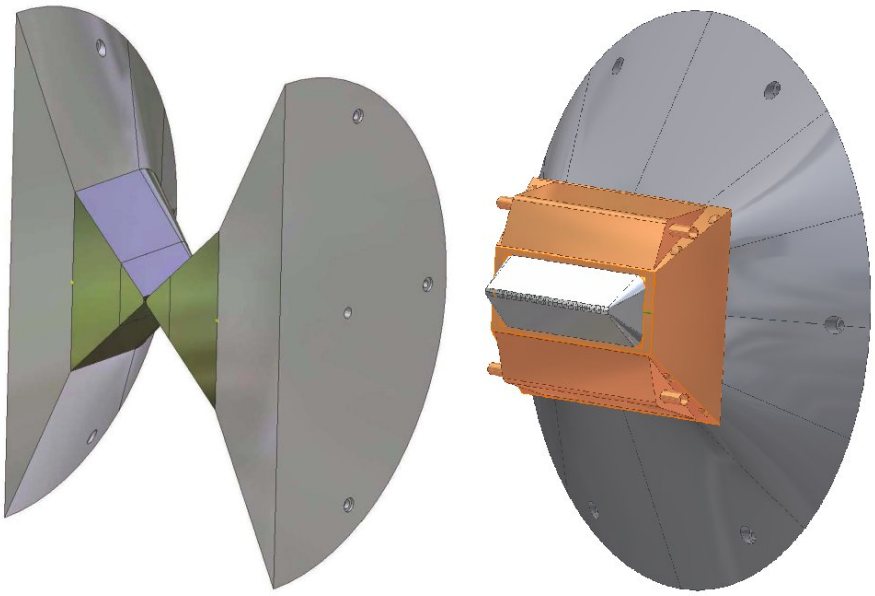

Abbildung 3.4: Berechnete Polschuhanordnung für den PROLET: Aus ARMCO-Reineisen (dunkelgrau) gefertigte Polschuhelemente P1 mit großem Öffnungswinkel zur Konzentration der Feldlinien und sich anschließende VACOFLUX50-Teile P2 und P3 (chromfarben) zur Erzeugung starker Feldgradienten im Querschnitt (links) und mit aufgesetztem Thermostat (kupferfarben) (rechts).

$\nabla B^2/2$-Werte über einen größeren Bereich (siehe dazu auch den folgenden Abschnitt) befindet sich auf der Stirnfläche zusätzlich ein im Querschnitt dreieckiges Dach mit

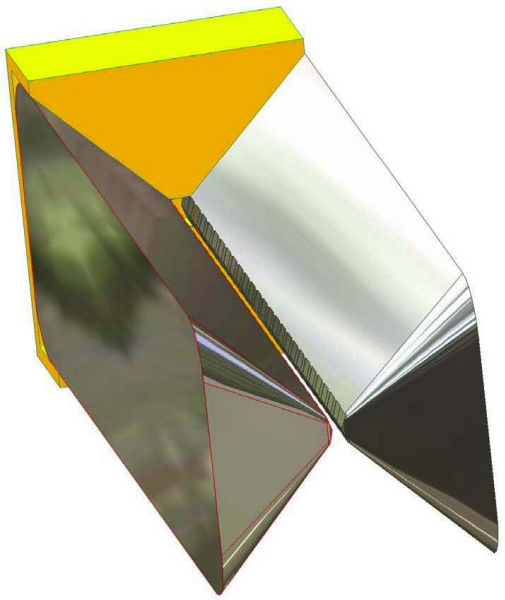

Abbildung 3.5: Anordnung der sich gegenüberliegende Polschuhelemente P3. Die genaue Ausrichtung zueinander erfolgt durch durch das beidseitige Anlegen von Polschuhlehren. In der Abbildung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur eine der beiden Polschuhlehren (gelb) gezeigt.

einer Höhe von einem Millimeter. Die Höhe der Elemente P2 und P3 (inklusive Dach) beträgt $52\,mm$ bzw. $26\,mm$. Die Unterteilung der Elemente P2 und P3 hat den Vorteil, daß sich Element P3 gegenüber dem Element P2 leicht verschieben und ggf. leicht verkippen lässt. Da die Elemente P1 und damit auch P2 an den Polkernen befestigt sind, würden mögliche Verdrehungen und Verkippungen der Polkerne unmittelbar zu Veränderungen der Geometrie der Polschuhanordnung führen. Bereits kleinste Verdrehungen und Verkippungen haben hier erhebliche Veränderungen der Feldverläufe zur Folge. Eine exakte Orientierung der Elemente P3 zueinander wird durch das Einklemmen der Elemente in die in Abbildung 3.5 gezeigten Polschuhlehren erreicht. Zusätzlich erlaubt die Unterteilung einen relativ einfachen Austausch des Elementes P3 um ggf. leicht veränderte Polschuhkonfigurationen testen zu können. Die Elemente P2 und P3 sind aus VACOFLUX50 gefertigt, da es gerade in diesem Bereich auf hohe Feldstärken ankommt.

Erzeugung homogener $\nabla B^2/2$-Bereiche

An der Spitze des Elementes P3 haben bereits kleine Veränderungen an der Polschuhform erhebliche Auswirkungen auf die Feldverläufe. In Abbildung 3.6 sind exemplarisch einige mögliche Polschuhformen und in Abbildung 3.7 die zugehörigen $\nabla B^2/2$-Werte in

der Mitte des Magnetspaltes in vertikaler Richtung gezeigt. Zur Simulation von Mikro-

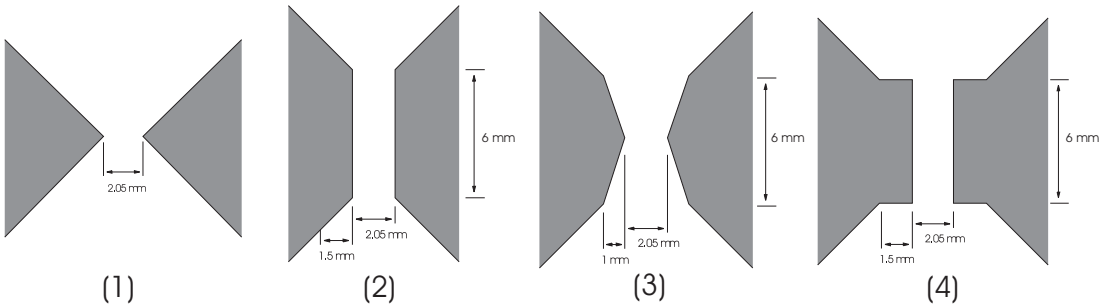

Abbildung 3.6: Verschiedene Polschuhformen zur Erzeugung starker inhomogener Magnetfelder: (1) Spitz zulaufende Polschuhe mit 90° Öffnungswinkel. (2) Polschuhe mit abgeflachter Stirnfläche. (3) Polschuhform mit $1\,mm$ hohem Dach zur Erzeugung homogener $\nabla B^2/2$-Werte. (4) Polschuhform mit aufgesetztem $1.5\,mm$ hohem Quader zur Erzeugung extrem hoher $\nabla B^2/2$-Werte.

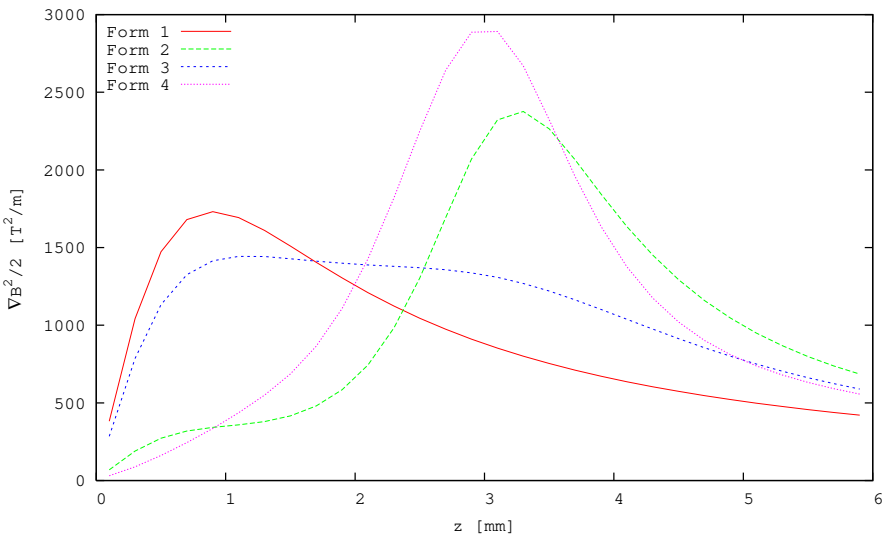

Abbildung 3.7: Berechnete Verläufe der z-Komponente der $\nabla B^2/2$-Werte in der Mitte des Magnetspaltes in vertikaler (z-) Richtung für die in Abbildung 3.6 gezeigten Polschuhformen bei einer Stromstärke von $150\,A$.

gravitation sollte die Kraft homogen über das gesamte Probenvolumen hinweg auf die Probe wirken. In der technischen Umsetzung wurde Form 3 realisiert, da sie speziell auf diese Anforderung hin optimiert ist und in einer Höhe von etwa $0.8\,mm - 3.1\,mm$ über der Polschuhmitte relativ homogene $\nabla B^2/2$-Werte von $1376\,T^2/m \pm 4.4\%$ aufweist. Zweidimensionale Darstellungen der $\nabla B^2/2$-Verläufe für diese Polschuhform finden sich in Abschnitt 3.1.6.

Mit einfacheren Formen wie Form 1 und Form 2 lassen sich zwar höhere $\nabla B^2/2$-Werte erzielen, jedoch wiesen diese Homogenitätsbereiche von $\pm 5\%$ nur auf wenigen Zehntelmillimetern auf. Bemerkenswert erscheint zudem Form 4, mit der sich bei einem Magnetspalt von $2.05\,mm$ und einer Stromstärke von $150\,A$ $\nabla B^2/2$-Werte von nahezu $3000\,T^2/m$ erreichen lassen.

Seitliche Stabilisierung

Durch die gewählte Polschuhform ist in einer bestimmten Höhe nicht nur die Kompensation der Schwerkraft möglich, sondern zusätzlich wirkt, wie in Gleichung 2.49 für die stabile Magnetolevitation angegeben, in der gleichen Höhe eine stabilisierende Kraft in y-Richtung auf die Probe (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.6). Diese Stabilisierung kommt dadurch zustande, daß die Feldstärke von den Polschuhen zur Mitte des Magnetspaltes hin abnimmt. Durch den daraus resultierenden Feldgradienten erfahren diamagnetische Proben in y-Richtung eine Kraft hin zur Mitte des Magnetspaltes.

Ebenso lässt sich eine Stabilisierung in x-Richtung erzielen. Hierzu weist das 'Dach' des Elementes P3 in x-Richtung mit einer Periode von $6\,mm$ Erhöhungen von $0.1\,mm$ und einer Breite von $2\,mm$ auf. Es schließt sich also jeweils an einen nicht erhöhten Bereich von $4\,mm$ Breite immer eine $2\,mm$ breite Erhöhung an. Im Bereich dieser Erhöhungen verringert sich der Magnetspalt um $0.2\,mm$ auf $1.85\,mm$, wodurch mit einer Periode von $6\,mm$ zu einer Erhöhung der Feldstärke in x-Richtung kommt. Zwischen dieses Erhöhungen nimmt die Feldstärke jeweils auf ein Minimum ab. Diese Minima fallen räumlich mit denen in y-Richtung zusammen, wodurch sich eine stabile Magnetolevitation von Wasser erzielen lassen sollte.

Die Polschuhelemente wiesen 26 Positionen mit Feldminima in x-Richtung auf. Allerdings wirkt bei den beiden äußeren Positionen aufgrund von in x-Richtung zu den Polschuhenden hin abnehmender Feldstärke keine stabilisierende Kraft mehr auf die Probe, so daß der Aufbau insgesamt an 24 Positionen die seitlich stabilisierte Magnetolevitation von Wasser und anderer diamagnetischer Proben erlauben sollte.

3.1.6 Berechnete Feldverläufe

Zur graphischen Veranschaulichung der zuvor beschriebenen Feldverläufe zeigen die Abbildungen 3.8 und 3.9 die auf die Probe wirkenden Gradientenfelder in der x, z- bzw. y, z-Ebene bei $y = 0$ bzw. $x = 0$ und in der x, y-Ebene exemplarisch für die Höhe $z = 2.4\,mm$ bei einer Stromstärke von $150\,A$ (zur Definition des Koordinatensystems siehe Abbildung 3.2 (rechts)). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden von den z-Komponenten der in etwa zur Magnetolevitation von Wasser benötigte Wert von $1400\,T^2/m$ abgezogen.

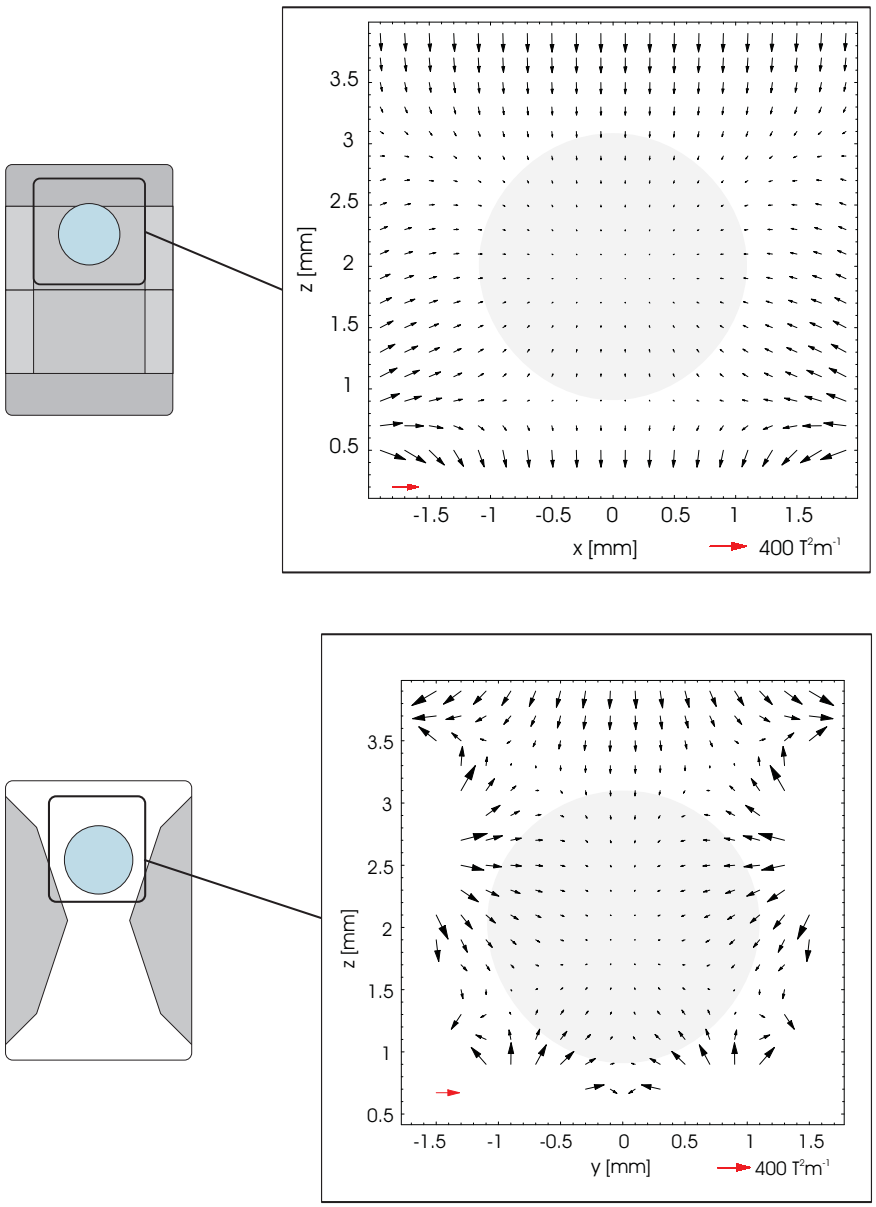

Abbildung 3.8: Berechnete $\nabla B^2/2$-Vektoren für das mittlere Probenvolumen in x,z-Richtung bei y=0 (oben) und y,z-Richtung bei x=0 (unten) bei einer Stromstärke von $150\,A$. Von den z-Komponenten wurden der Übersichtlichkeit halber $1400\,T^2/m$ (in etwa der zur Levitation von Wasser benötigte $\nabla B^2/2$-Wert) abgezogen. Ebenfalls aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die maximal dargestellte Vektorlänge auf $500\,T^2/m$ begrenzt, wodurch im Randbereich einige Vektoren nicht abgebildet sind. Der Volumenausschnitt, in dem sich später die Probe ($V \approx 4\,\mu l$) befinden soll, ist grau hinterlegt.

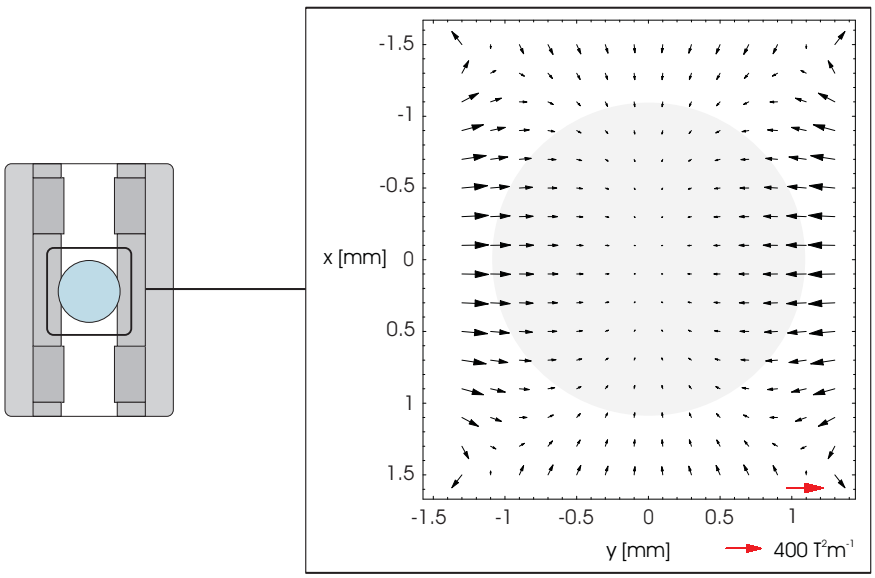

Abbildung 3.9: Berechnete $\nabla B^2/2$-Vektoren für das mittlere Probenvolumen in x,y-Richtung für $z = 2.4\,mm$ bei einer Stromstärke von $150\,A$. Die maximal gezeigte Vektorlänge beträgt $500\,T^2/m$, wodurch im Randbereich einige Vektoren nicht abgebildet sind. Der Volumenausschnitt, in dem sich die Probe befindet, ist grau hinterlegt.

3.1.7 Gemessener Feldverlauf

Hall-Sonden Kalibration

Aufgrund des kleinen Magnetspaltes der gewählten Polschuhanordnung ($1.95\,mm$ an der engsten Stelle) konnte keine kommerziell erhältliche, bereits kalibrierte *Hall*-Sonde zur Ausmessung des Magnetfeldes eingesetzt werden. Daher wurde zunächst ein *Hall*-Generator des Typs FH-301 der Fa. Bell mit besonders kleinen Abmessungen im Feld eines supraleitenden Magneten mit einer $280\,mm$ warmen Bohrung (s. Abschn. 3.2.3) bis zu einer Feldstärke von $5.3\,T$ gegen das Signal einer NMR-Sonde (NMR Teslameter PT 2025 der Firma Metrolab) kalibriert.

Die Messung des NMR-Signals und der *Hall*-Spannung erfolgten simultan. Die Kalibration erfolgte im Zentrum des Magneten, da die Feldinhomogenitäten hier im Bereich einiger Zentimeter vernachlässigbar gering sind. Messungen mit der NMR-Probe zeigten, daß der räumliche Abstand von NMR-Probe und *Hall*-Generator von $10\,mm$ zu einem Fehler $< 0.1\,mT$ führt.

Da die *Hall*-Probe die Stärke des Magnetfeldes in nur eine Richtung erfasst, spielt ihre Orientierung zur Magnetfeldrichtung eine entscheidende Rolle. Zu Beginn der Kalibration wurde daher der Hall-Generator zunächst bei einem Feld von $5.3\,T$ so zur Feldrichtung des Magneten ausgerichtet, daß die Hall-Spannung bei konstanter Feldstärke einen Maximalwert erreichte. Die Kalibration erfolgte anschließend bei ansteigender

Feldstärke. Um Temperatureinfüsse auf die Hall-Spannung weitestgehend auszuschließen, wurde der Probenraum zudem auf $293\,K$ temperiert. Die abschließend erhaltene Kalibrationskurve findet sich im Anhang in Abschnitt A.

Messung

Die Ausmessung des Magnetfeldes des PROLETEN erfolgte rechnergesteuert mit zwei Lineartranslationen in x- und z-Richtung (s. Abbildung 3.13). Es konnte jedoch auch mit dem vergleichsweise kleinen *Hall*-Generator lediglich die Hauptkomponente (y-Komponente) des Magnetfeldes bestimmt werden, da eine Drehung des *Hall*-Generators aufgrund des kleinen Magnetspaltes nicht möglich war. Da die Messung in y-Richtung in der Mitte des Magnetspaltes erfolgte ($y = 0$), sollte aus Gründen der Symmetrie die z-Komponente des Magnetfeldes ohnehin keinen Beitrag leisten und der Beitrag der x-Komponente ist, wie aus den Rechnungen hervorgeht, vernachlässigbar gering. Die Ausrichtung des *Hall*-Generators erfolgte im Zentrum des Magnetspaltes wie schon zur Kalibration über die Maximierung der *Hall*-Spannung.

Abbildung 3.10 zeigt die relativen Abweichungen der gemessenen gegenüber der berechneten y-Komponente des Magnetfeldes als Funktion des Ortes für den mittleren Probenplatz und $y = 0$ in Prozent. Wie aus der Abbildung hervorgeht, stimmen

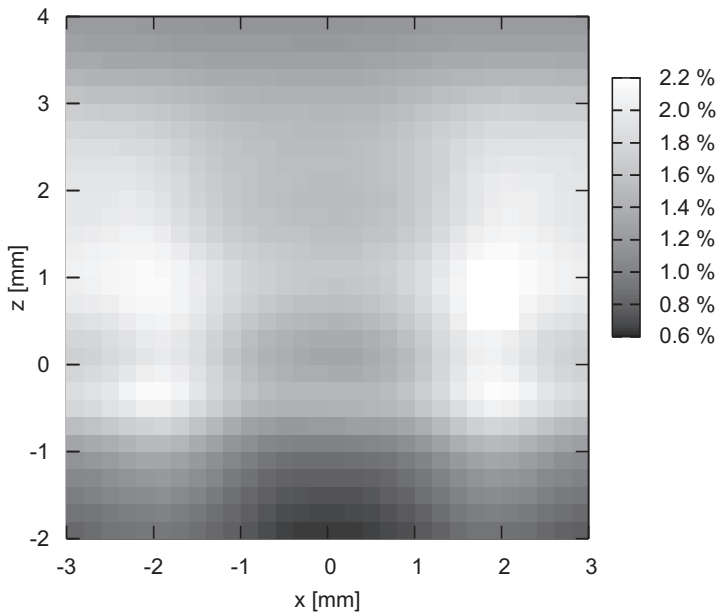

Abbildung 3.10: Relative Abweichungen der gemessenen von der berechneten y-Komponente des Feldverlaufes $(B_{y,m} - B_{y,c})/B_{y,c}$ für den mittleren Probenplatz bei einer Stromstärke von $150\,A$ in Prozent. Dabei sind die gemessenen Werte im Schnitt 1% größer als die berechneten Werte.

die gemessenen Feldstärken gut mit den berechneten überein. Die Abweichungen be-

tragen zwischen 0.6% und 2.2%. Die größten Abweichungen treten bei x-Werten von $-2\,mm$ und $+2\,mm$ genau am Übergang zu den $0.1\,mm$ dicken Erhöhungen zur Stabilisierung in x-Richtung auf. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in den Rechnungen ein stufenförmiger Übergang angenommen wurde, dieser jedoch produktionsbedingt einen Radius aufweist. Bei näherer Betrachtung fällt zudem eine leichte Asymmetrie der Abweichungen in z-Richtung auf: Die Abweichungen im unteren Bereich für $z < 0$ sind kleiner als die im oberen Bereich für $z > 0$. Die Ursache hierfür dürfte ein Fehler bei der Wahl des Nullpunktes in z-Richtung der Messung sein. Aufgrund des sehr starken Gradienten gerade in der Mitte des Magnetspaltes haben hier bereits Fehler von $25\,\mu m$ einen erheblichen Einfluss. Die insgesamt im Vergleich zur Rechnung leicht zu hohen Messwerte dürften von zu konservativen Materialparametern insbesondere für große Feldstärken im Programm RADIA herrühren. Abbildung 3.11 zeigt die aus den Messdaten erhaltenen Gradientenvektoren. Ein Vergleich mit den in Abbildung 3.8 (oben) gezeigten Verläufen zeigt eine gute Übereinstimmung. Im Unterschied zu den experimentellen Daten wurden hier jedoch die Gradienten aller drei Komponenten des Magnetfeldes und nicht nur der y-Komponente berücksichtigt. Einen direkten Vergleich

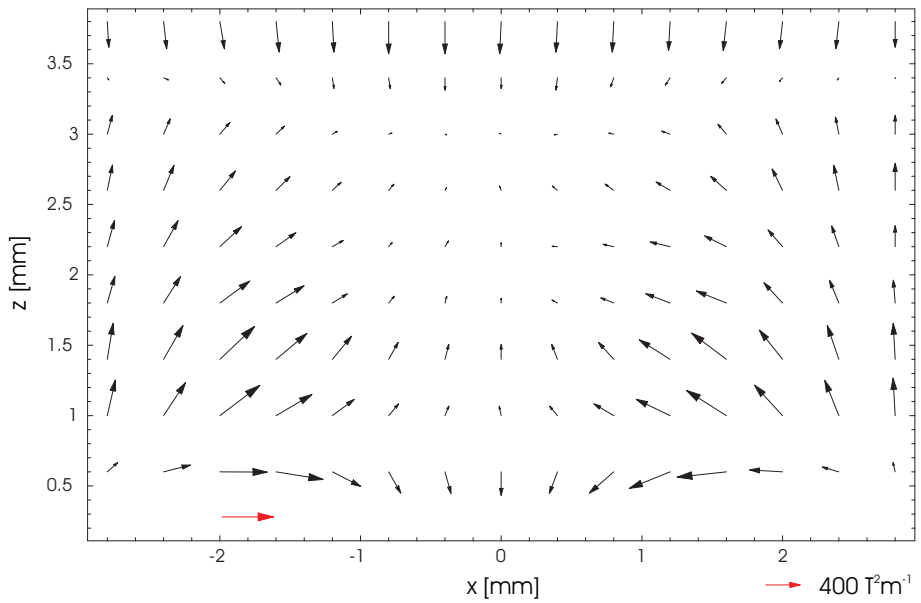

Abbildung 3.11: Experimentell bestimmte Gradientenvektoren der y-Komponente des Magnetfeldes des mittleren Probenplatzes bei einer Stromstärke von $150\,A$. Von den z-Komponenten wurden der Übersichtlichkeit halber $1400\,T^2/m$ (in etwa der zur Levitation von Wasser benötigte $\nabla B^2/2$-Wert) abgezogen.

der experimentell bestimmten und berechneten Gradienten der y-Komponente des Feldes in z-Richtung ($x = 0$, $y = 0$) zeigt Abbildung 3.12. Die Übereinstimmung der aus dem Modell berechneten mit den experimentell bestimmten Daten ist sehr gut.

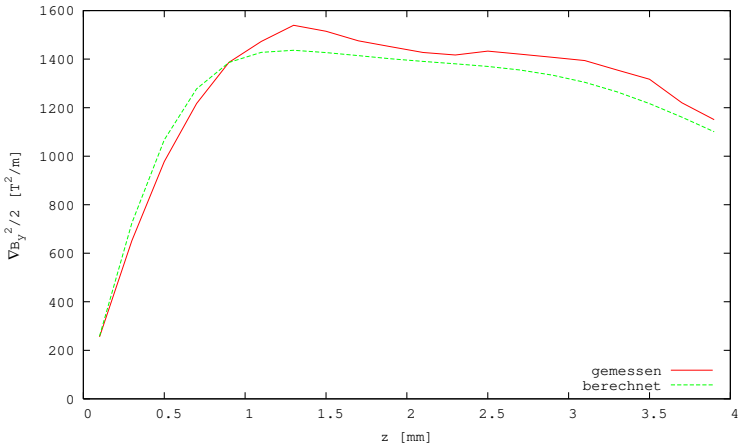

Abbildung 3.12: Vergleich der experimentell bestimmten (rot) mit den aus Rechnungen bestimmten (grün) $\nabla_{\mathbf{z}} B_y^2/2$-Werten für den mittleren Probenplatz bei $x = y = 0$ und einer Stromstärke von 150 A.

Abbildung 3.13: Messaufbau aus x, z-Translationen zum automatischen Ausmessen des Magnetfeldes des PROLET.

Magnetolevitation von Wassertropfen

Durch die Magnetolevitation eines Wassertopfens sollte zusätzlich überprüft werden, ob die Kraft durch das inhomogene Magnetfeld auch in der Praxis dazu ausreicht, einen

Wassertropfen zu levitieren. Zwar konnte eine Kompensation der Schwerkraft durch das inhomogene Magnetfeld beobachet werden, aber eine stabile Magnetolevitation eines Wassertropfens ließ sicht nicht erreichen. Vor allem bereitete es bei entsprechenden Versuchen Schwierigkeiten, die Wassertropfen nach dem Einbringen in das Magnetfeld mit Hilfe von Spritzennadeln oder Pipettenspitzen von diesen Gegenständen zu lösen. Während dies außerhalb des Magnetfeldes durch die Einwirkung der Schwerkraft kein Problem darstellte, verhinderten die Adhäsionskräfte zwischen dem Wassertropfen und dem verwendeten Gegenstand unter den Bedingungen reduzierter Schwerkraft ein Ablösen des Tropfens. Auch durch die Verwendung von Materialien mit sehr großer Oberflächenspannung wie z.B. Teflon konnte das Problem nicht gelöst werden. Bei Versuchen, den Tropfen durch Abschütteln von den Gegenständen zu lösen, kamen die Tropfen immer in Kontakt mit den Polschuhen und blieben dort haften. Da das primäre Ziel der Arbeit jedoch in der Kristallzüchtung in Magnetfeldern und nicht in der stabilen Magnetolevitation von Wasser bestand, wurden keine weitergehenden Anstrengungen in diese Richtung unternommen. Um den Effekt der Kompensation der Schwerkraft von Wasser dennoch anschaulich darzustellen, wurde durch die Mitte eines Probenplatzes in vertikaler (z-)Richtung ein in gleichen Abständen farblich markierter Faden gespannt. An diesen Faden wurde ca. $50\,mm$ über der Polschuhmitte ein Wassertropfen angebracht. Bei einem Strom von $150\,A$ rutscht der Tropfen bis zu dem Punkt nach unten, an dem die Feldinhomogenitäten ausreichen, die Schwerkraft zu kompensieren. Wird der gespannte Faden nun langsam nach unten bewegt, bewegt sich der daran haftende Tropfen durch die auf ihn ausgeübte Kraft nicht mit, sondern bleibt immer an der gleichen Stelle. In Abbildung 3.14 sind zur Veranschaulichung dieses Effektes Ausschnitte einer entsprechenden Filmsequenz gezeigt.

3.1.8 Zusammenfassung

Durch Berechnung und Konstruktion spezieller Polschuhe konnten mit einem klassischen Elektromagneten erstmals Feldgradienten vom mehr als $1400\,T^2/m$ erreicht werden. Solche Feldgradienten, wie sie zur Magnetolevitation von Wasser benötigt werden, konnten bisher nur mit *Bitter*- und supraleitenden Magneten oder einer Kombination dieser beiden Typen erhalten werden. Durch die Form der Polschuhe konnten 24 Probenplätze für die Kristallzüchtung in einer der Mikrogravitation ähnlichen Umgebung. erhalten werden. Für jeden dieser Plätze wird für ein kugelförmiges Volumen von etwa $4\,\mu l$ ein relativ homogener Feldgradient von $1376\,T^2/m \pm 4.4\%$ erreicht.

In Rechnungen konnte zudem gezeigt werden, daß sich mit einem solchen Aufbau auf kleinen Volumina Gradienten von bis zu $3000\,T^2/m$ erzielen lassen. Solche Gradienten erlauben die Magnetolevitation der meisten diamagnetischen Substanzen. Eine interessante Anwendung hierfür könnte z.B. in einer probenhalterfreien Umgebung für spektroskopische Versuche bei hohen Temperaturen bestehen.

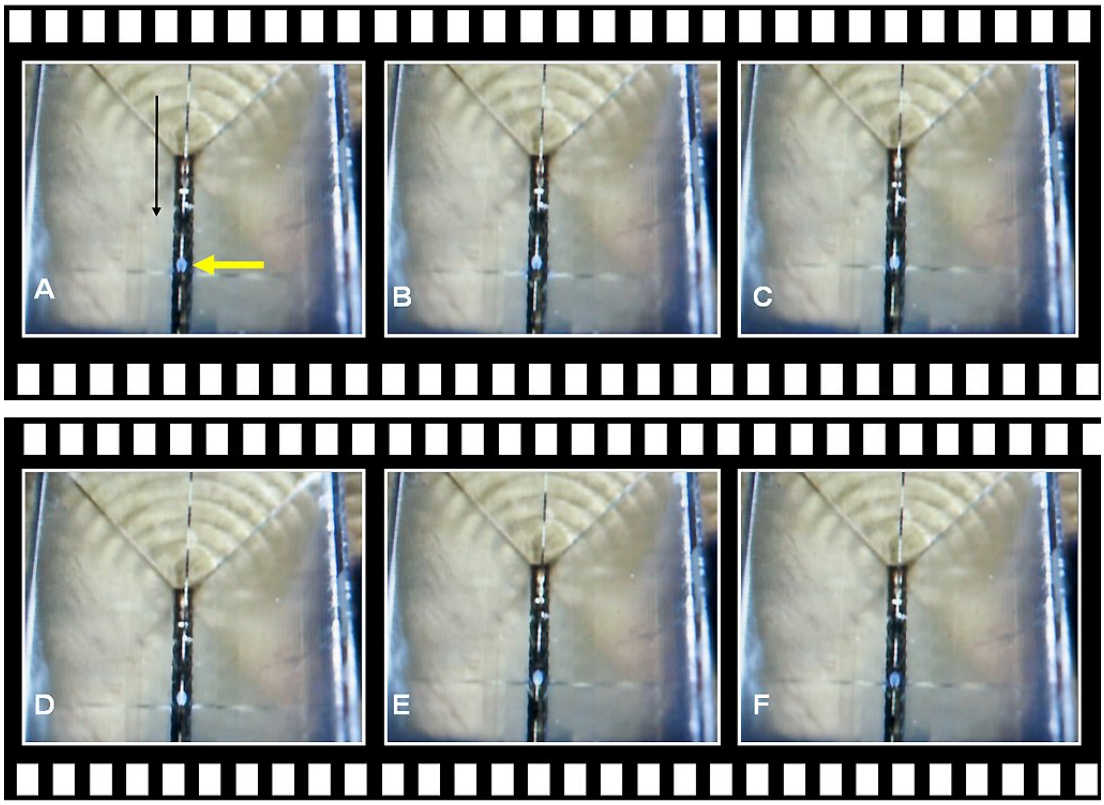

Abbildung 3.14: Ausschnitte aus einer Videosequenz zur Veranschaulichung der Kompensation der Schwerkraft eines Wassertropfens im PROLET bei einer Stromstärke von 150 A. Der blau gefärbte Wassertropfen ist mit einem gelben Pfeil angedeutet. Eine ausführliche Beschreibung des Versuches findet sich im Text. Es ist auf die schwarz-weiße Markierung des Fadens zu achten.

3.2 Kristallisationsexperimente

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationsexperimente beschrieben. Dabei werden zunächst die Überlegungen, die zur Auswahl der Modellproteine führten, kurz dargelegt. Im Anschluß werden die Versuchsaufbauten und -abläufe zur Kristallisation von Proteinen in Magnetfeldern beschrieben.

3.2.1 Auswahl der Modellsubstanzen

Bei der Auswahl der Modellproteine wurde darauf geachtet, daß eine ausreichende Menge der Substanzen zur Verfügung stand. Zum einen um genügend Material zu Vorversuchen zur Verfügung zu haben und zum anderen um etwaige Effekte reproduzieren zu können. Eine wichtige Rolle spielte die Kristallisierbarkeit der Proteine. Da die verwendeten $5\,T$-, $9\,T$- und $16\,T$-Magneten stets nur für begrenzte Zeiträume zur Verfügung standen und auch nur einer begrenzten Zahl von Proben Platz boten, wurden Modellproteine gewählt, die mit hoher Kristallausbeute und reproduzierbar zu kristallisieren sind.

Zudem wurden solche Proteine ausgewählt, die bereits hinreichend strukturell charakterisiert waren und bei denen in der Literatur zuvor bereits Effekte durch Mikrogravitation, Magnetfelder oder andere physikalische Parameter auf die Kristallisation bzw. die Kristallqualität beobachtet wurden. Dies sollte insbesondere bei der Kristallisation in inhomogenen Magnetfeldern die Wahrscheinlichkeit erhöhen, auch hier einen Effekt beobachten zu können.

Neben diesen Überlegungen spielten auch die magnetischen Eigenschaften der Proteine eine große Rolle. Je nach Art des Magnetismus der Proteine sind unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit dem angelegten Magnetfeld zu erwarten. Daher wurden neben diamagnetischen auch zwei paramagnetische Proteine ausgewählt. In Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit untersuchten und nach den zuvor beschriebenen Kriterien ausgewählten Modellproteine, deren Molekulargewicht und magnetischen Eigenschaften angegeben.

3.2.2 Vergleichende Kristallisationsuntersuchungen

Die Qualität von Proteinkristallen wird von vielen Parametern beeinflust (s. Abschn. 2.1). Während sich einige Parameter wie z.B. die Temperatur, der pH-Wert der Lösungen und die Stoffkonzentration relativ einfach und reproduzierbar einstellen lassen, ist dies für andere Parameter wie z.B. Vibrationen oder den Anteil von mikroskopischen Staubpartikeln nur mit erheblichem Aufwand möglich.

Zur Untersuchung des Einflusses eines bestimmten Parameters auf die Qualität von Proteinkristallen wurde daher zu jeder Versuchsgruppe eine eigene Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurde in allen Untersuchungen der Vergleich von mindestens 8-10

Tabelle 3.2: Im Rahmen dieser Arbeit für vergleichende Untersuchungen ausgewählte Modellproteine.

Protein	Herkunft	Mol. Gew. $[kD]$	Magnetismus
Lysozym	*Hühnereiweiß*	14.4	dia
Thaumatin	*Thaumatococcus daniellii*	21.4	dia
Trypsin	*Rinder-Bauchspeicheldrüse*	16.6	dia
Insulin	*Schweine-Bauchspeicheldrüse*	5.8	dia
Myoglobin	*Pottwal*	17.2	para
Catalase	*Rinderleber*	240	para

Kristallen der Versuchsgruppe mit 8-10 Kristallen der entsprechenden Kontrollgruppe angestrebt. Um nur den Einfluss des einen Versuchsparameters zu untersuchen und nicht versehentlich zusätzlich den eines anderen Parameters, wie z.B. unterschiedlichen Kristallisationstemperaturen, wurden bei allen Versuchen die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Maßnahmen berücksichtigt.

Kristallisationstemperatur

Um unterschiedliche Temperaturen und Temperaturschwankungen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auszuschließen, wurden bei allen durchgeführten Kristallisationsexperimenten mit PT-100-Elementen Temperaturmessungen durchgeführt. Bei den meisten Experimenten wurde die Probentemperatur kontinuierlich in Abständen von $1-2$ Minuten automatisch aufgezeichnet.

Vibrationen

Bei der Kristallisation in Magnetfeldern wäre ein separate Vibrationsdämpfung nur mit erheblichem Aufwand möglich gewesen. Die beiden supraleitenden $9\,T$- und $16\,T$-Magneten am IFW in Dresden sind jedoch ohnehin an vibrationsarmen Orten (Keller bzw. Erdgeschoß) aufgestellt wurden, so daß hier nur von geringen Vibrationen ausgegangen werden kann. Bei der Kristallisation im PROLET (s. Abschn. 3.1) wäre eine Vibrationsdämpfung vor allem aufgrund des großen Gewichtes ($7.8\,t$) mit einem erheblichen Aufwand verbunden gewesen. Daher wurde hier die Kristallisation der Kontrollgruppe in unmittelbarer räumlicher Nähe zur Versuchsgruppe durchgeführt, um beide Gruppen den gleichen Vibrationen und anderen Umgebungsparametern auszusetzen. Bei dem $5.3\,T$-Magneten am *DESY* war eine Vibrationsdämpfung aufgrund des fest montierten Aufbaus nicht möglich. Da der Magnet in einer Halle aufgestellt ist, in der zugleich viele Kompressoren und größere Motoren betrieben werden, waren diese

Kristallisationsexperimente erheblichen Vibrationen ausgesetzt.

Kristallisation der Kontrollgruppe

Die Kristallisation der Kontrollgruppe erfolgte in den meisten Fällen in einem Kühlbrutschrank KB-720 der Fa. BINDER. Dieser erlaubt in seinem Inneren die Einstellung von Temperaturen zwischen $-10°$ bis $100°C$, bei einer zeitlichen Temperaturkonstanz von $\leq 0.3°C$. Zur weiteren Dämpfung der Temperaturschwankungen wurden alle Kristallisationsgefäße in geschlossenen Styroporkisten untergebracht. Messungen zeigten, daß hierdurch eine zeitliche Temperaturkonstanz von $\pm 0.1°C$ erreicht wird.

Zur Dämpfung der insbesondere durch das Kühlaggregat und die Lüfter hervorgerufenen Vibrationen wurden die Einschübe des Kühlbrutschrankes mechanisch von dem Gehäuse entkoppelt. Die Aufhängung der Einschübe erfolgt über zwei Edelstahlstangen, die durch Bohrungen in der Rückwand des Kühlbrutschrankes reichen und dort an einem durch Luftfedern gedämpften Gestell befestigt sind. Da die Bohrungen eine größeren Durchmesser als die Edelstahlstangen aufweisen, besteht zwischen ihnen und dem Gehäuse kein mechanischer Kontakt. Zur thermischen Isolation ist der Raum zwischen Stangen und Bohrungen mit Watte gefüllt.

Kristallisationslösungen und -gefäße

Um den Einfluss unterschiedlicher Kristallisationslösungen auf die Kristallqualität auszuschließen, wurden in allen Versuchen für die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe Kristallisationslösungen der gleichen Zubereitung eingesetzt. Lediglich zur Untersuchung des Effektes der Aufreinigung auf die Qualität von Lysozymkristallen wurden notwendigerweise unterschiedliche Proteinlösungen eingesetzt. Zur Entfernung von Staubpartikeln, Proteinaggregaten, nicht gelöstem Protein, Bakterien, Viren und anderen Verunreinigungen wurden die Lösungen (bis auf eine Ausnahme) vor der Kristallisation zusätzlich durch einen Filter mit $0.22\,\mu m$ Porengröße filtriert. Da solch eine Filtration der Proteinlösung die Kristallisation von Myoglobin in den meisten Fällen verhinderte, wurde in diesem Fall auf eine Filtration verzichtet.

Um Einflüsse unterschiedlicher Kristallisationsgefäße von Versuchs- und Kontrollgruppe auf die Kristallqualität auszuschließen, fanden die Kristallisation von Versuchs- und Kontrollgruppe in den selben Kristallisationsgefäßen unter Verwendung gleicher Tropfen- und Reservoirvolumina statt.

3.2.3 Kristallzüchtung in Magnetfeldern

Die Kristallzüchtung in homogenen Magnetfeldern erfolgte in 3 supraleitenden Magneten mit maximalen Feldstärken von $5.3\,T$, $9\,T$ und $16\,T$, die im folgenden kurz vorgestellt werden sollen. Während für die Kristallisation im $5.3\,T$-Magneten kommerziell

erhältliche Kristallisationsplatten verwendet werden konnten, mußten für die beiden anderen Magneten aufgrund des geringen Platzangebotes spezielle Kristallisationseinsätze entwickelt werden. Zur Kristallzüchtung im PROLET war ebenfalls die Entwicklung spezieller Kristallisationseinsätze erforderlich.

5.3 T-Magnet

Der supraleitende 5.3 T-Magnet befindet sich auf dem DESY-Gelände und dient vornehmlich dazu, den Einfluss starker Magnetfelder auf Detektoren der Hochenergiephysik zu untersuchen. Dieser Magnet stand jedoch für einige Zeit für Kristallisationsexperimente zur Verfügung. Der Magnet benötigt eine ständige Stromzuführung und wird im Unterschied zu den anderen beiden Magneten, die ihr zur Kühlung benötigtes Helium aus einem Reservoir beziehen, durch einen kontinuierlichen Fluß mit Helium versorgt.

Der Magnet weist eine warme Bohrung mit 280 mm Durchmesser auf. Die Feldrichtung liegt in horizontaler Ebene. Durch die großen Abmessungen weist dieser Magnet im Zentrum einen ausgesprochen homogenen Feldverlauf und eignet sich daher besonders gut für Kalibrationszwecke.

Temperaturregelung Zur exakten Temperierung des Magneten wurde ein passender Kupferthermostat konstruiert, durch den sich die nutzbare Bohrung auf 220 mm verringert. Die Temperaturregelung erfolgte durch einen mit Wasser betriebenen Umlaufkühler, der eine zeitliche Temperaturkonstanz $\pm 0.1^{\circ}C$ erlaubt.

Kristallisation Die Kristallzüchtungsversuche konnten aufgrund der großen Bohrung des Magneten in kommerziell erhältlichen *Q-plates* der Fa. *Hampton-Research* durchgeführt werden. Alle Kristallisationsversuche erfolgten bei einer Feldstärke von 5 T nach der *hanging-drop vapor diffusion*-Methode. Die Kristallisation der entsprechenden Kontrollgruppen wurde im Kühlbrutschrank KB-720 vorgenommen.

9 T-Magnet

Zur Kristallzüchtung in homogenen Magnetfeldern wurde zudem ein 9 T supraleitender Magnet der Firma OXFORD INSTRUMENTS mit vertikaler Feldrichtung des Instituts für Werkstoffforschung (IFW) in Dresden eingesetzt. Dieser Magnet weist den Vorteil auf, daß er einmal mit Strom gefüllt, diesen Strom halten kann und nicht ständig von einem Netzteil versorgt werden muß. Dadurch kommt es zu einem geringeren Wärmeeintrag und der Magnet benötigt weniger Helium zur Kühlung. Daher kann dieser Magnet bis zu 2 Wochen lang bei einem Feld von 8.8 T betrieben werden.

Temperaturregelung Dieser Magnet weist eine 100 mm warme Bohrung auf. Zur genauen Temperaturregelung wurde ein Kupfer-Thermostat gefertigt. Die Temperierung erfolgt mit einem Umlaufkühler. Dieser Aufbau erlaubt ebenfalls eine zeitliche Temperaturkonstanz von $\leq \pm 0.1°C$. Durch den Thermostaten wird die nutzbare Bohrung des Magneten auf 80 mm begrenzt.

Kristallisation Zur Kristallzüchtung nach der *hanging-drop vapour diffusion*-Methode im Feld des 9 T-Magneten wurden spezielle Probenhalter aus Acrylglas gefertigt. Die in Abbildung 3.15 gezeigten Kristallisationseinsätze erlauben eine optimale Ausnutzung des Probenraumes. Jeder Kristallisationseinsatz hat einen Außendurchmesser von 78 mm und enthält 38 Probengefässe. In dem Probenraum des Magneten lassen sich bis zu 6 dieser Einsätze übereinander stapeln. Jedes einzelne Probengefäß weist ein 19 mm tiefe Bohrung mit 6 mm Durchmesser auf, die sich mit einen Stopfen luftdicht verschließen läßt. Die Abdichtung erfolgt über einen O-Ring.

Zur Proteinkristallzüchtung wird das Probengefäß mit 250 μl Reservoirlösung gefüllt. Anschließend wird ein Tropfen mit einem Volumen von bis zu 12 μl auf die Unterseite des Stopfens aufgebracht und das Reservoir damit luftdicht verschlossen. Relativ einfach lassen sich in dem temperierten Probenraum auch Kristallisationen

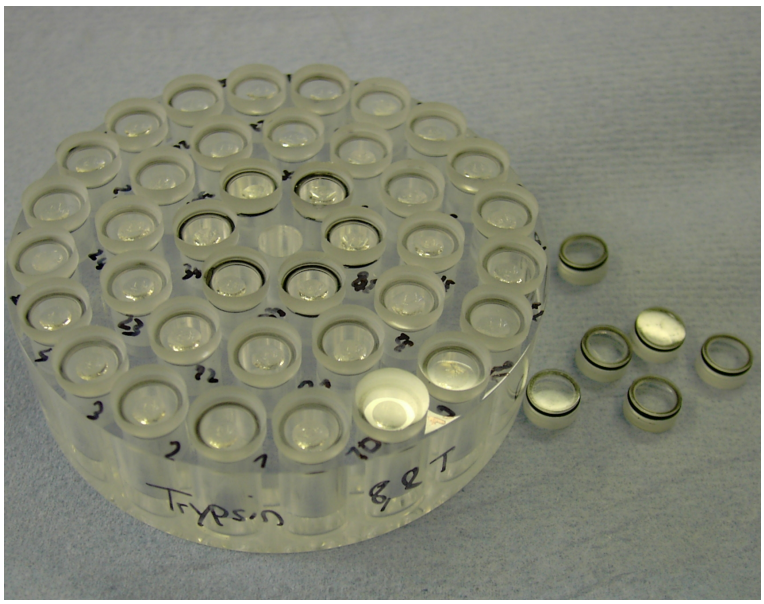

Abbildung 3.15: Probenhalter aus Acrylglas mit einem Außendurchmesser von 90 mm zur Proteinkristallzüchtung nach der *hanging-drop vapor diffusion* Methode im Feld des 9 T-Magneten.

nach der *batch*-Methode durchführen. Hierzu wird die entsprechend vorbereitete Kristallisationslösung in kleine, zuvor silikonisierte, Reagenzgläser mit einem Außendurchmesser von 6 mm gefüllt und diese werden mit *Parafilm* oder entsprechenden Stopfen

verschlossen und im Probenraum untergebracht. Alle Kontrollexperimente, bis auf die Myoglobin-Kristallisation bei 77% Ammmoniumsulfat (AS), wurden im KB-720 durchgeführt. Bei letzterer wurde die Kristallisation der Kontrollgruppe in einer mit einem Umlaufkühler temperierten Probenkammer am IFW in Dresden durchgeführt.

$16\,T$-Magnet

Der zu Kristallisationsexperimenten genutzte $16\,T$-Magnet mit vertikaler Feldrichtung befindet sich ebenfalls am IFW Dresden. Da dieser Magnet nicht im Konstantstrommodus betrieben werden kann, sondern der Strom ständig über nicht supraleitende Stromzuführungen zugeführt werden muss, hat dieser Magnet einen höheren Wärmeeintrag. Daher konnte der Magnet im Kristallisationsversuch ein Feld von $15.8\,T$ für etwa $70\,h$ halten. Dann wurde das Feld auf $4\,T$ heruntergefahren um Helium nachzufüllen. Nach $1\,h$ konnte das Feld wieder auf den ursprünglichen Wert von $15.8\,T$ hochgefahren werden.

Temperaturregelung Die Temperierung des Probenraumes erfolgt bei diesem Magneten über einen sog. *variable temperature insert (VTI)*. Dabei befindet sich am unteren Ende des Probenraumes ein Ventil, daß mit dem Heliumreservoir verbunden ist. Aus diesem Ventil strömt nun Helium in den Probenraum, daß über eine Widerstandsheizung auf bis zu $300\,K$ erwärmt werden kann. Dadurch lassen sich im Probenraum Temperaturen zwischen $1\,K$ (durch zusätzliches Evakuieren des Probenraumes) bis etwa $300\,K$ realisieren. Bei dem durchgeführten Kristallisationsexperiment betrug die Temperaturstabilität bei einer Solltemperatur von $20°C$ allerdings nur $19.5 \pm 1°C$. Die Aufzeichnung der Temperatur erfolgte dabei über ein an der Probenkammer (s. nächster Abschnitt) angebrachtes PT-100 Element.

Kristallisation Der Magnet weist ein nutzbares Probenvolumen von $30\,mm$ Durchmesser bei einer Höhe von etwa $30\,mm$ auf. Allerdings ist der Probenraum nur von oben über ein ca. $900\,mm$ langes Rohr zugänglich. Zur Proteinkristallisation im Magnetfeld wurde daher die in Abbildung 3.16 gezeigte Probenkammer eingesetzt. Diese bietet Platz für 9 *batch*-Kristallisationsexperimente in Reagenzgläsern mit einem Außendurchmesser $\leq 6\,mm$. Um Einflüsse durch die Heliumatmosphäre und eventuellen Unterdruck im *VTI* zu verhindern, läßt sich die Probenkammer luftdicht verschließen. Zur Temperaturkontrolle ist zusätzlich ein PT-100 Element an der Probenkammmer angebracht. Zur Kristallisation von Myoglobin aus 77% AS nach der *batch*-Methode wurde wie im vorherigen Abschnitt beschrieben verfahren. Die Kristallisation der Kontrollgruppe erfolgte in der mit einem Umlaufkühler temperierten Probenkammer am IFW.

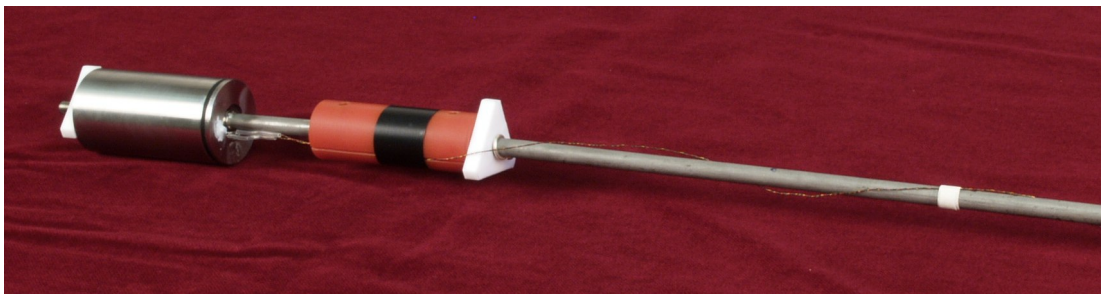

Abbildung 3.16: Probenhalter zur Proteinkristallzüchtung nach der *batch*-Methode im *VTI* des 16 T-Magneten. Die sich im Bild links befindende Probenkammer läßt sich gasdicht verschließen.

Prolet

Eine ausführliche Beschreibung des PROLET findet sich in Kapitel 3.1. In diesem Abschnitt wird daher nur auf die zur Kristallzüchtung relevanten Aspekte eingegangen.

Temperaturregelung Die Temperierung des Probenraumes erfolgt mit einem F8 Umlaufkühler der Firma THERMO HAAKE. Wie in Abschnitt 3.1 in Abbildung 3.4 rechts gezeigt, sind an den Elementen P2 jeweils an der Ober- als auch der Unterseite kühlwasserdurchflossene Kupferthermostate angebracht. Zur thermischen Isolation des inneren Teils der Polschuhanordnung (Elemente P2 und P3) und des Probenraumes gegen den übrigen Teil des Magneten wurden zwischen den Elementen P1 und P2 1 mm starke Kunststoffplatten eingefügt. Durch diese Isolation konnte eine erheblich bessere Temperierbarkeit des Probenraumes erreicht werden.

Kontrollgruppe Um für die Kontrollgruppe identische Züchtungsparameter wie für die Kristallisation im Magnetfeld zu gewährleisten, wurde der Probenraum mit zwei zuvor in einer Machbarkeitsstudie bereits hergestellten Elementen P3 aus Aluminium nachgebildet. Dies erlaubt die Verwendung identischer Probenhalter sowohl für die Kristallisation im Magnetfeld als auch für die Kristallisation der Kontrollgruppe. Um auch den Einfluß unterschiedlicher Umgebungsparameter wie z.B. Vibrationen auf die Kontrollgruppe auszuschließen, wurde der Probenhalter der Kontrollgruppe über einen Aluminiumarm an dem Eisenjoch des PROLETEN befestigt. Er befindet sich dadurch in etwa 50 cm Abstand neben dem eigentlichen Probenraum. Feldstärkemessungen ergaben an diesem Ort bei einer Stromstärke von 150 A Werte von nur einigen mT. Zur Temperierung der Kontrollgruppe wurden die P3 Elemente aus Aluminium jeweils mit einer Längsbohrung versehen, die ebenfalls von Kühlwasser durchflossen wird.

Kristallisation In Abbildung 3.8 (Abschn.3.1.7) ist der zur Kristallisation zur Verfügung stehende Platz im Querschnitt gezeigt. Alle Kristallisationsexperimente er-

folgten in Quarzglaskapillaren, die an beiden Seiten mit Wachs verschlossen wurden. Die Platzierung der Kapillaren im stark inhomogenen Teil des Magnetfeldes erfolgte, wie in Abbildung 4.21 (Abschn. 4.4) gezeigt, durch einen Probenhalter aus Acrylglas. Die Temperatur der Lysozym- und Myoglobinkristallisation betrug $20°C$. Zur Züchtung der Insulinkristalle wurde die Temperatur der Versuchs- und der Kontrollgruppe in einem Zeitraum von $48\,h$ von $45°C$ auf $20°C$ gesenkt.

3.2.4 Durchgeführte Kristallisationexperimente

In Tabelle 3.3 sind alle durchgeführten Kristallisationsexperimente zusammengefaßt. Lediglich in zwei Experimenten konnten zu wenige bzw. keine Kristalle erhalten werden. So sind bei der Kristallisation der Catalase in beiden Gruppen zu wenige, für Beugungsuntersuchungen geeignete Kristalle gewachsen. Diese Kristalle wurden daher nicht durch Beugungsuntersuchungen bezüglich ihrer Qualität charakterisiert.

Tabelle 3.3: Übersicht aller durchgeführten Kristallisationsexperimente zur Untersuchung des Einflusses der Aufreinigung und der Kristallisation in homogenen und inhomogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität (*hdvd* = *hanging-drop-vapour-diffusion*, AS = Ammoniumsulfat).

Protein	B [T]	Besonderheit	Methode	Krist.gefäß	Kontr.gruppe
Lysozym	0	[a]	*hdvd*	*Q-plates*	KB-720
Lysozym	8.8	-	*hdvd*	Krist.einsatz $9\,T$	KB-720
Lysozym	PROLET	-	*batch*	Quarzkapillare	PROLET
Trypsin	5	-	*hdvd*	*Q-plates*	KB-720
Trypsin	8.8	-	*hdvd*	Krist.einsatz $9\,T$	KB-720
Thaumatin	5	-	*hdvd*	*Q-plates*	KB-720
Thaumatin	8.8	-	*hdvd*	Krist.einsatz $9\,T$	KB-720
Thaumatin	8.8	aufger.	*hdvd*	Krist.einsatz $9\,T$	KB-720
Myoglobin	8.8	73% AS	*batch*	Reagenzglas	KB-720
Myoglobin	8.8	75% AS	*batch*	Reagenzglas	KB-720
Myoglobin	8.8, 15.8	77% AS	*batch*	Reagenzglas	Umlaufk.[c]
Catalase	8.8	[c]	*hdvd*	Krist.einsatz $9\,T$	KB-720
Myoglobin	PROLET	-	*batch*	Quarzkapillare	PROLET
Insulin	PROLET	-	T-Abs.[d]	Quarzkapillare	PROLET

[a] Experiment zur Untersuchung des Effektes der Aufreinigung des Ausgangsmaterials auf die Kristallqualität. Beide Gruppen wurden im KB-720 kristallisiert.

[b] Die Kristallisation der Kontrollgruppe wurde ebenfalls am IFW in Dresden durchgeührt. Die Temperaturregelung der Kontrollgruppe erfolgte mit einem Umlaufkühler

[c] Es konnten in beiden Gruppen nur sehr wenige Catalasekristalle erhalten werden.

[d] Die Temperatur wurde über einen Zeitraum von $48\,h$ von $45°C$ auf $20°C$ abgesenkt.

3.3 Bestimmung der Kristallmosaizität

Die Bestimmung der Kristallmosaizitäten erfolgte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der in Abschnitt 2.3.3 diskutierten Vorteile ausschließlich durch das Aufzeichnen von Reflexprofilen. Die entsprechenden Messungen wurden im Wesentlichen an der PETRA-1 Strahlführung am HASYLAB in Hamburg vorgenommen. Einige Mosaizitätsuntersuchungen erfolgten zudem an der *Swiss Norwegian beamline* (SNBL) an der ESRF in Grenoble. Im folgenden Abschnitt wird daher der PETRA-1 Messplatz ausführlicher dargestellt. Der Messplatz an der SNBL wird kurz beschrieben.

Im Anschluß wird das praktische Vorgehen bei den Mosaizitätsmessungen beschrieben. In einem weiteren Abschnitt werden drei unterschiedliche Mosaizitätsparameter vorgestellt und im letzten Abschnitt wird auf die statistische Auswertung der Mosaizitätsdaten eingegangen.

3.3.1 PETRA-1 Messplatz

Der PETRA-Ring dient zur meisten Zeit als Vorbeschleuniger für Experimente der Hochenergiephysik, steht jedoch in der übrigen Zeit für Synchrotronstrahlungsexperimente zur Verfügung. Er weist einen Umfang von $2304\,m$ auf. Zur Erzeugung von Synchrotronstrahlung kann PETRA mit Positronen oder Elektronen mit einer Energie von bis zu $11.3\,GeV$ betrieben werden. Zur Erzeugung brillanter Röntgenstrahlung befindet sich in einer geraden Strecke des Rings ein Undulator. Dieser Undulator versorgt 2 Messplätze: Die PETRA-1 Strahlführung mit einem Energiebereich von $12 - 36\,keV$ und die PETRA-2 Strahlführung für Experimente mit hochenergetischer Röntgenstrahlung im Bereich von $60 - 300\,keV$. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden an der PETRA-1 Strahlführung vorgenommen.

Strahlengang

Abbildung 3.17 zeigt schematisch den Aufbau der PETRA-1 Strahlführung. Die Monochromatisierung der Strahlung erfolgt über den (1 1 1)-Reflex eines wassergekühlten Diamanten als erstem Kristall in *Laue*-Geometrie und dem (2 2 0)-Reflex eines Germanium Kristalls in *Bragg*-Geometrie als zweitem Monochromator. Aufgrund der Strahlteilung für den PETRA-1 und PETRA-2 Messplatz sind die Monochromatorkristalle in horizontaler Beugungsgeometrie angeordnet.

Instrumentelle Auflösung

Mit einer horizontalen Quellgröße von $2.75\,mm$ (FWHM) und einer Blendenöffnung von $0.4\,mm \times 0.4\,mm$ in $116\,m$ Abstand zur Quelle ergibt sich eine Strahldivergenz von $0.027\,mrad$ in der horizontalen Ebene. In Abbildung 3.18 ist ein *DuMond*-Diagramm der Monochromatorkristallanordnung für $18\,keV$ gezeigt. Aus dem *DuMond*-Diagramm

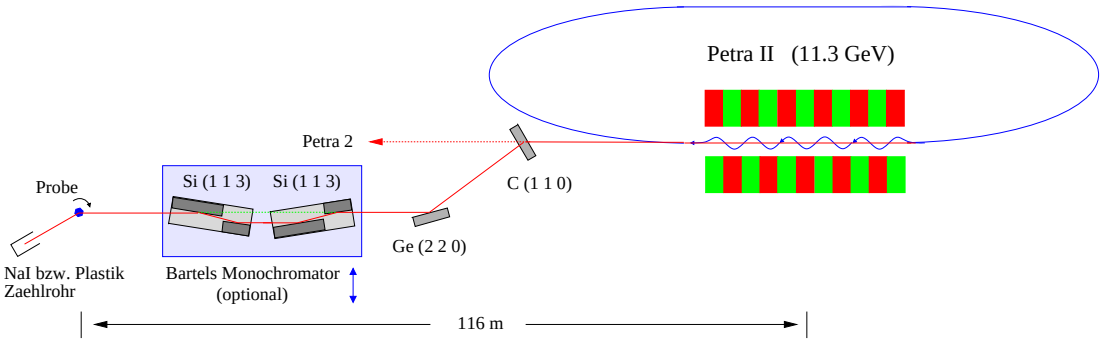

Abbildung 3.17: Strahlengang am PETRA-1 Messplatz: Der Bartels Monochromator kann für extrem hochauflösende Messungen optional in den Strahlengang gefahren werden.

ergibt sich näherungsweise eine Wellenlängendispersion von $\Delta\lambda/\lambda = 1.8 \times 10^{-4}$. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit Auflösungsmessungen in vertikaler Beugungsgeometrie, die eine Wellenlängendispersion von $\Delta\lambda/\lambda = 1.7 \times 10^{-4}$ ergaben. In

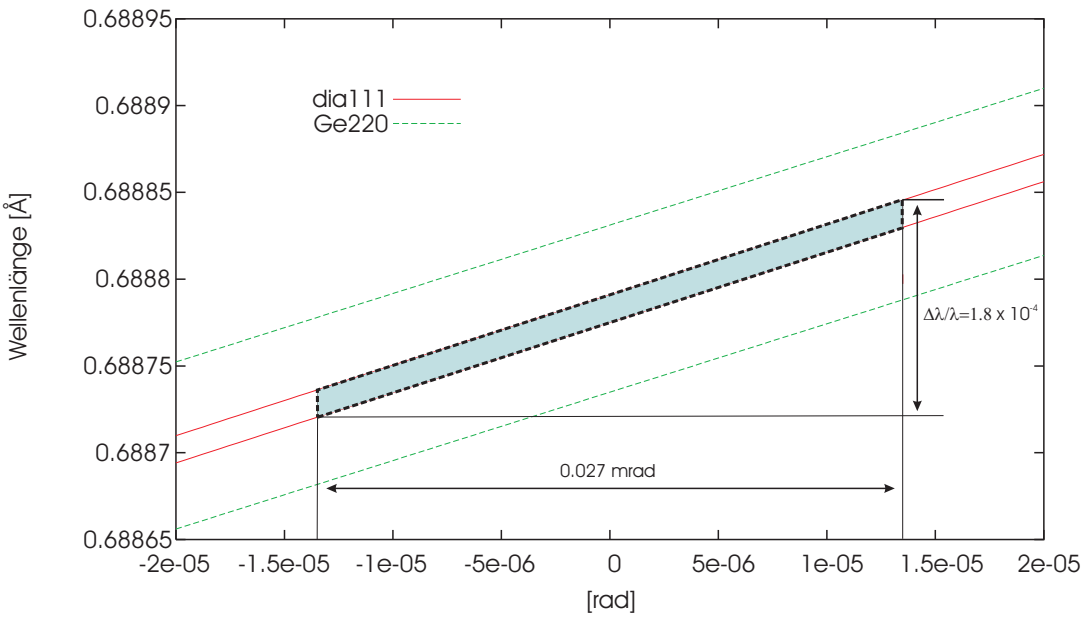

Abbildung 3.18: *DuMond*-Diagramm der PETRA-1 Monochromatorkristallanordnung ohne *Bartels*-Monochromator (Energie: $18\,keV$).

Abbildung 3.19 sind die Reflexprofile des (1 1 3)-Reflexes eines zu einer Kugel geätzten Si-Einkristalls mit einem Durchmesser von $0.25\,mm$ in dispersiver und nicht-dispersiver Anordnung gezeigt. Die gemessenen Halbwertsbreiten betragen 0.0032° für die dispersive bzw 0.0012° für die nicht-dispersive Messanordnung. Mosaizitätsmessungen sollten aufgrund der höheren Auflösung daher vorteilhafter Weise in nicht-dispersiver Beu-

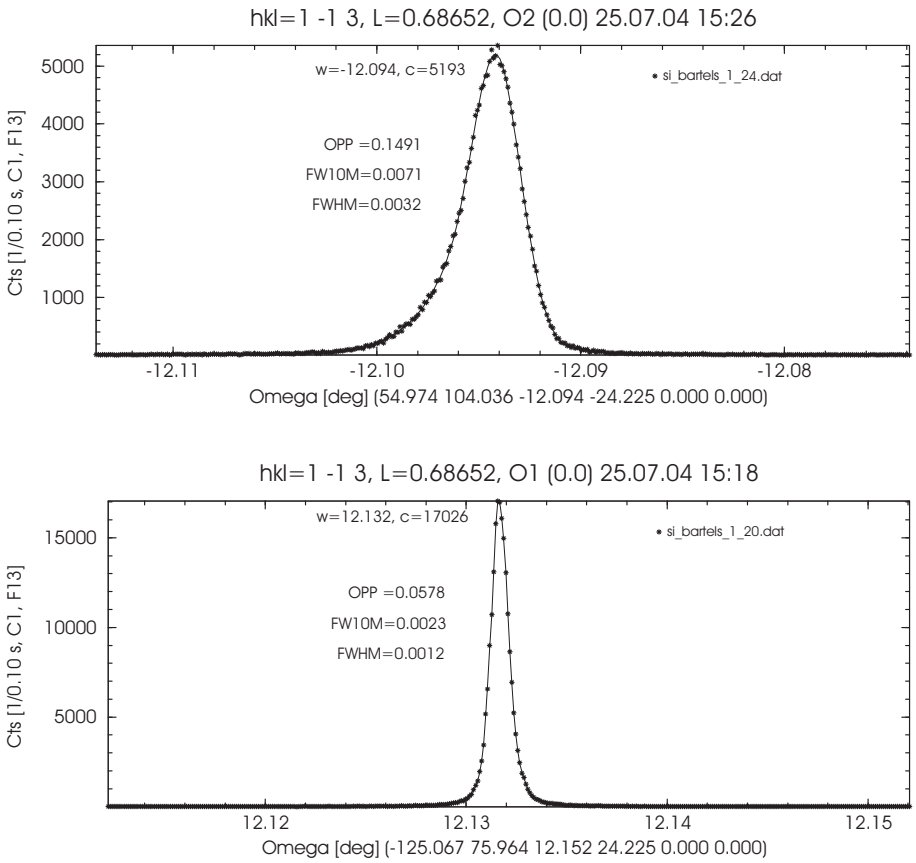

Abbildung 3.19: Reflexprofile eines Si (1 1 3)-Reflexes in *Laue*-Geometrie in dispersiver (oben) und nicht-dispersiver Messanordnung (unten).

gungsgeometrie erfolgen. Zudem sollte die mit dieser Anordnung erreichbare Auflösung für Mosaizitätsmessungen an den meisten Proteinen mehr als ausreichend sein.

Bartels Monochromator

Zur Verbesserung der instrumentellen Auflösung, lässt sich optional, wie auch in Abbildung 3.17 gezeigt, ein Si-(1 1 3)-*Bartels*-Monochromator in den Strahlengang fahren. Dieser besteht aus zwei Si-(1 1 3) Nutmonochromatorkristallen. Ein Photo dieses Aufbaus zeigt Abbildung 3.20. Der erste Nutmonochromatorkristall befindet sich in dispersiver Anordnung zu dem (1 1 1)-Diamant- und (2 2 0)-Germanium-Monochromatorkristall. Durch die nicht-dispersive Anordnung des zweiten Nutmonochromatorkristalls wird, wie ein in Abbildung 3.21 gezeigtes *DuMond*-Diagramm verdeutlicht, eine erhebliche Reduzierung der Divergenz und des Wellenlängenbandes erreicht.

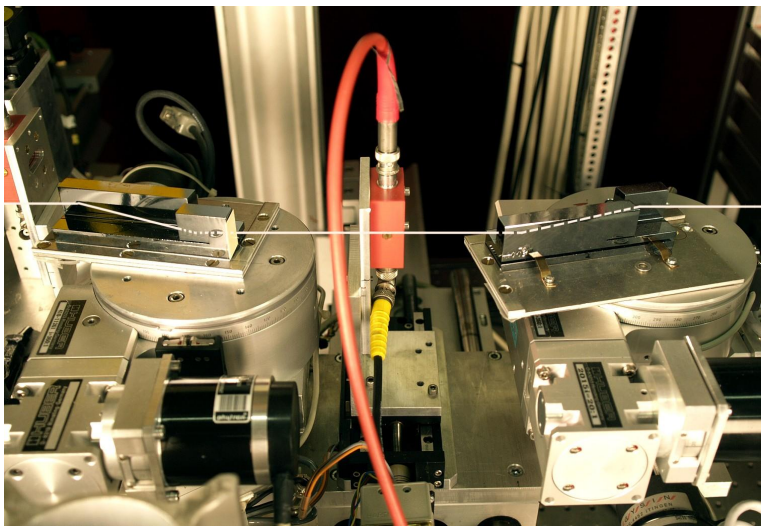

Abbildung 3.20: Si-(1 1 3)-*Bartels*-Monochromatoraufbau an der PETRA-1 Strahlführung zum Erzielen einer extrem hoher Auflösung. Der Weg des Röntgenstrahls ist weiß eingezeichnet.

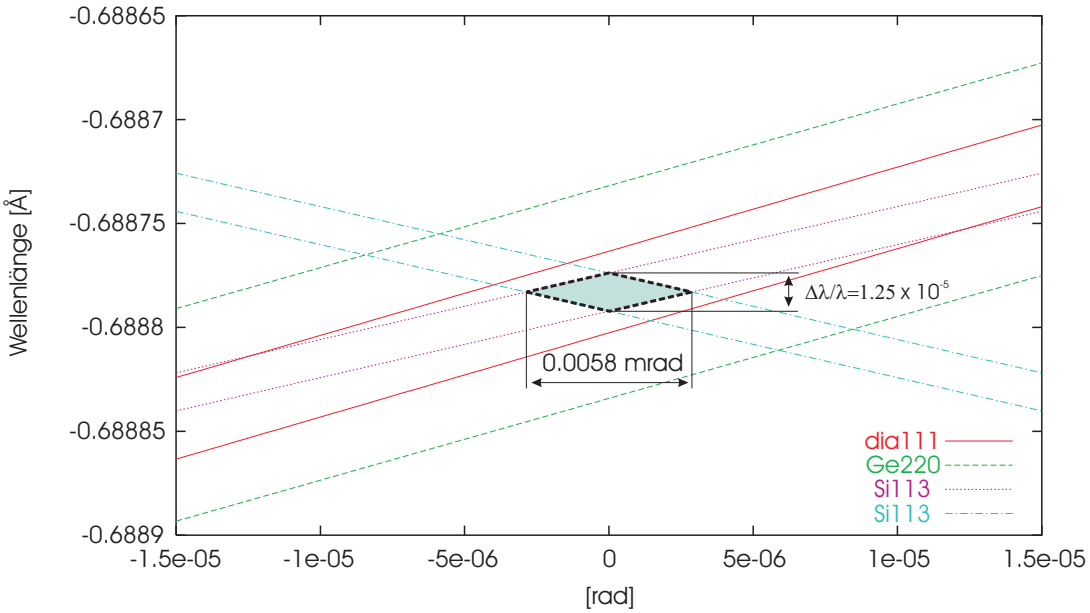

Abbildung 3.21: *DuMond*-Diagramm des Monochromatoraufbaus an der PETRA-1 Strahlführung mit Si-(1 1 3) *Bartels*-Monochromator zum Erzielen einer hohen instrumentellen Auflösung (Energie: 18 keV).

In Abbildung 3.22 links ist das Reflexprofil des (2 2 2)-Reflexes des auch zuvor gemessenen Si-Einkristalls mit einem Durchmesser von 0.25 mm unter Verwendung des *Bartels*-Monochromators gezeigt. Die experimentell bestimmte Halbwertsbreite des Reflexes beträgt 0.0003° und zeigt die extrem hohe experimentelle Auflösung, die durch

Verwendung des *Bartels*-Monochromators erreicht werden kann. Die theoretische *Darwin*-Breite für diesen Reflex beträgt 1.16×10^{-5}°. Rechts in der Abbildung ist ein ebenfalls mit dem *Bartels*-Monochromator gemessenes extrem schmales Reflexprofil des (0 0 8)-Reflexes eines tetragonalen Lysozymkristalls gezeigt. Intensitätsmessungen mit einer PIN-Diode ergaben, dass der Photonenfluss durch die Verwendung des *Bartels*-Monochromators auf ca. 1% abnimmt.

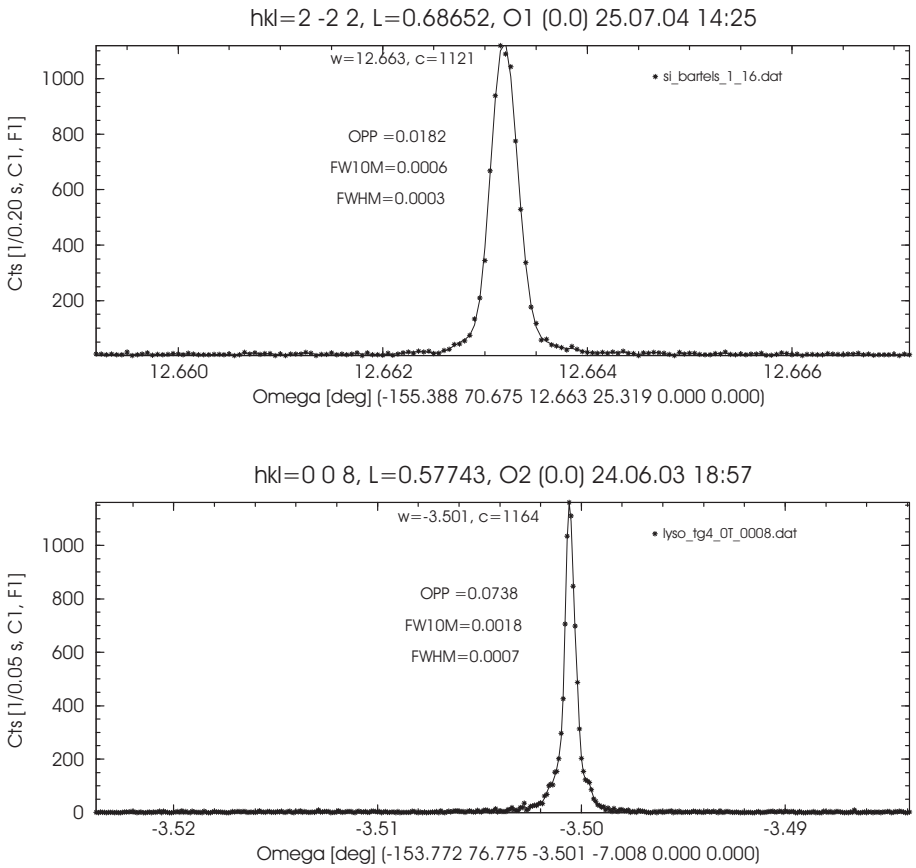

Abbildung 3.22: Profil des extrem schmalen Si-(2 2 2)-Reflexes (oben) und eines ebenfalls schmalen und nahezu *Gauß*-förmigen (0 0 8)-Lysozymreflexes in *Laue*-Geometrie unter Verwendung des Si-(1 1 3)-*Bartels*-Monochromators. Die *full width at half maximum* (FWHM) beträgt 0.0003° bzw. 0.0007°.

6-Kreisdiffraktometer

Für Diffraktionsuntersuchungen steht an der PETRA-1 Strahlführung ein 6-Kreisdiffraktometer zur Verfügung. Eine schematische Zeichnung des Diffraktometers ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Das Diffraktometer besitzt 2 Kreise zur Bewegung des Detektors (ν und 2θ) und 3 Kreisen zur Orientierung des Kristalls (ϕ, χ und ω). Der

ω-Kreis besitzt dabei eine sehr hohe mechanische Präzision und eine Winkelauflösung von $5 \times 10^{-5\,\circ}$. Als Besonderheit weist das Diffraktometer einen zusätzlichen Ψ-Kreis auf. Dieser erlaubt die Drehung des Kristalls um den Streuvektor $\mathbf{h}$ mit einem eigenen Kreis. Insbesondere für die Messung von Mehrstrahlinterferenzen weist solch ein eigener Drehkreis erhebliche Vorteile auf. Für Mosaizitätsmessungen erlaubt ein derartiger Drehkreis, Profile des gleichen Reflex in verschiedene Richtungen des Kristalls aufzuzeichnen und so zusätzliche Informationen über die Mosaizität und insbesondere deren Anisotropie zu erhalten. Zur Detektion der gebeugten Röntgenstrahlung ist das

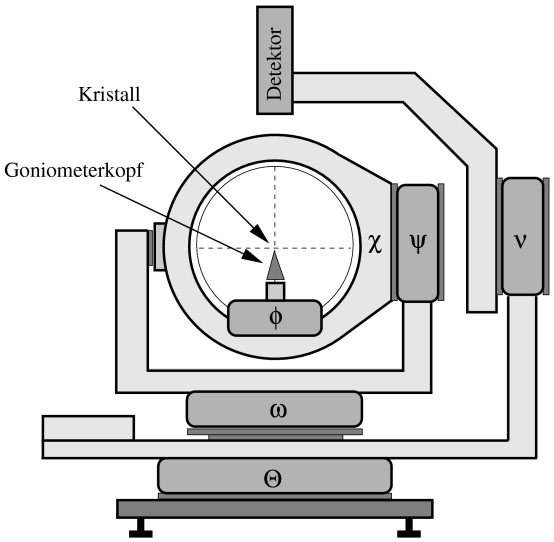

Abbildung 3.23: Skizze des 6-Kreisdiffraktometer an der PETRA-1 Strahlführung mit Benennung der einzelnen Drehkreise.

Diffraktometer mit zwei Punktdetektoren ausgestattet. Der NaI-Szintillationsdetektor weist dabei ein niedriges thermisches Rauschen aber auch eine relativ große Totzeit auf und ist daher für die Messung schwacher Reflexe geeignet. Starke Reflexe werden vorteilhafterweise mit einem Plastik-Szintillationsdetektor gemessen. Dieser weist eine erheblich geringere Totzeit jedoch auch ein größeres thermisches Rauschen auf.

Zudem ist das Diffraktometer mit einer CCD-Kamera der Fa. *Mar Research* mit einem Durchmesser von 165 mm ausgestattet. Diese erlaubt Intensitätsdatensammlungen und die Bestimmung der Orientierungsmatrix des Kristalls durch Rotationsaufnahmen. Die CCD-Kamera kann hierzu, wie in Abbildung 3.24 gezeigt, über eine Lineartranslation an das Diffraktometer heran gefahren werden. Durch Verwendung eines Analysatorkristalls erlaubt das Diffraktometer auch die Messungen von d-Wert-Variationen und das Aufzeichnen von *reciprocal space maps*.

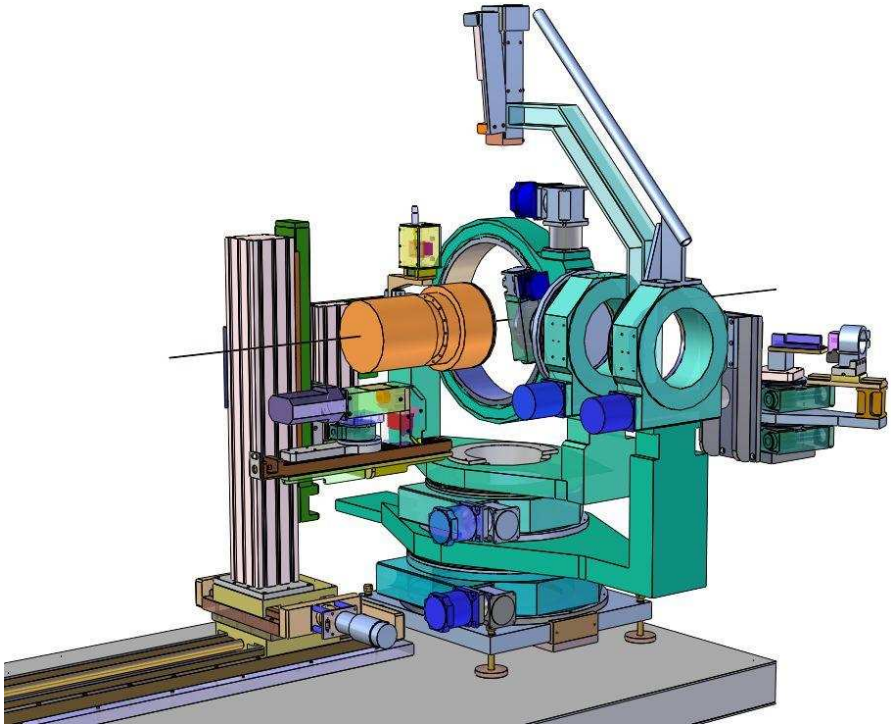

Abbildung 3.24: 6-Kreisdiffraktometer an der PETRA-1 Strahlführung im CCD-Modus zur Bestimmung der Orientierungsmatrix und zur Intensitätsdatensammlung

3.3.2 SNBL-Strahlführung

Einige Experimente wurden an der *Swiss Norwegian beamline* (SNBL) an einem Ablenkmagneten an der europäischen Synchrotronstrahlungsquelle ESRF in Grenoble vorgenommen. Daher wird dieser Messplatz hier auch kurz beschrieben. Der weiße Strahl trifft hier zunächst auf einen Rhodium beschichteten Röntgenspiegel. Die Monochromatisierung der Strahlung erfolgt anschließend über einen Si-(1 1 1)-Doppelkristallmonochromator in vertikaler Anordnung. Über einen sagittalen Bieger am zweiten Monochromatorkristalls lässt sich der Röntgenstrahl in der horizontalen Ebene fokussieren. Zudem erlaubt ein zweiter hinter den Monochromatorkristallen angeordneter Röntgenspiegel eine Fokussierung in der vertikalen Ebene. Für die Mosaizitätsmessungen an den Proteinkristallen wurde der Strahl mit dem sagittalen Bieger des zweiten Kristalls in der horizontalen Ebene fokussiert, um einen höheren Photonenfluss an der Probe zu erzielen. Auf eine Fokussierung in vertikaler Richtung wurde aufgrund der daraus resultierenden Auflösungsverschlechterung verzichtet. Die Mosaizitätsmessungen erfolgten hier in dispersiver Beugungsgeometrie. Allerdings ist an der ESRF der Unterschied zwischen dispersiver und nicht-dispersiver Beugungsgeometrie aufgrund der kleinen vertikalen Quellgröße und der sich daraus ergebenden kleineren

Divergenz im Vergleich zum Petra-1 Messplatz deutlich kleiner.

An der Strahlführung befindet sich ein 6-Kreisdiffraktometer in κ-Geometrie. Wie auch bei dem zuvor beschrieben 6-Kreisdiffraktometer an der PETRA-1 Strahlführung in *Euler*-Geometrie erlaubt der Ψ-Kreis an diesem Instrument ebenfalls die Drehung des Kristalls um den Streuvektor mit einem eigenen Kreis. Aufgrund eines bislang an diesem Instrument fehlenden zuverlässigen Kollisionsmodells waren die Bewegungsmöglichkeiten des Diffraktometers durch konservativ gewählte Einstellungen z.T. stark eingeschränkt. In vielen Fällen konnten bei den Messungen daher nicht alle gewünschten Reflexe angefahren werden. Die Strahlgröße betrug bei den Messungen $0.5\,mm \times 0.5\,mm$.

3.3.3 Mosaizitätsmessungen

Im folgenden Abschnitt soll kurz das experimentelle Vorgehen zur Bestimmung der Mosaizität von Proteinkristallen beschrieben werden. Zunächst wird dabei auf die Kristallauswahl und Probenpräperation und anschließend auf die Mosaizitätsmessung selbst eingegangen. Abschließend wird die Datenauswertung und statistische Analyse der Mosaizitätsdaten beschrieben.

Kristallauswahl und Probenpräperation

Für die Mosaizitätsmessungen wurden aus den jeweiligen Gruppen unter dem Stereomikroskop möglichst große Kristalle ohne makroskopische Störungen und mit möglichst gut ausgeprägter Morphologie ausgewählt.

Um die wachstumsbedingte Mosaizität der Kristalle nicht nachträglich durch Effekte des Schockgefrierens zu verändern (siehe Abschnitt 2.3.1), erfolgten alle Mosaizitätsmessungen bei Raumtemperatur. Da Proteinkristalle an der Luft schnell austrocknen, wurden die Kristalle für die Messungen in Quarzglaskapillaren montiert. Hierzu wurden Quarzglaskapillaren mit einem der Kristallgröße angepassten Durchmesser von $1 - 2\,mm$ und einer Länge von ca. $30\,mm$ verwendet. Die Montage der Kristalle erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Nach der ersten Methode wird der Kristall, wie in Abbildung 3.25 links gezeigt, zusammen mit der umgebenden Mutterlauge über die Kapillarkraft in die Kapillare gesogen. Anschließend wird so viel überschüssige Mut-

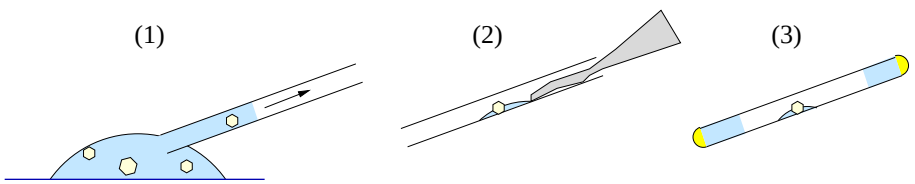

Abbildung 3.25: Montage von Proteinkristallen in Quarzglaskapillaren: (1) Aufsaugen des Kristalls in eine Quarzglaskapillare; (2) Aufsaugen überschüssiger Mutterlösung mit einem Streifen Filterpapier; (3) Mit Wachs verschlossene Kapillare mit darin montiertem Proteinkristall.

terlauge mit einem schmalen Streifen Filterpapier oder mit einer Kapillare kleineren Durchmessers entfernt, bis der Kristall nicht mehr frei in der Kapillare schwimmt sondern an der Kapillarwand anhaftet. Der Kristall sollte sich dabei, wie in der mittleren Abbildung gezeigt, in der Mitte der Kapillare befinden. Vorteilhafterweise wird mit einer Spritzennadel oder einer feinen Pipettenspitze an beiden Seiten der Kapillare ein wenig Mutterlauge in die Kapillare gegeben, bevor diese an beiden Enden, wie in der Abbildung rechts gezeigt, mit Wachs verschlossen wird. Sollen die Kristalle über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, ist es sinnvoll, die mit Wachs verschlossenen Enden der Kapillare zusätzlich mit einer Schicht Nagellack zu versehen. Alternativ lassen sich die Proteinkristalle auch mit einer kleinen Schlaufe aus Nylonfaden oder einem Haar aufnehmen und zusammen mit der umgebenden Mutterlauge in die Kapillare transferieren. Hier erweist es sich als vorteilhaft, wenn ein Ende der Kapillare bereits mit wenig Mutterlauge gefüllt ist. Das weitere Vorgehen entspricht dem zuvor beschriebenen.

Reflexauswahl

Die Mosaizität von Proteinkristallen ist in den meisten Fällen anisotrop (siehe Abschnitt 2.3). Um ein repräsentatives Bild der Kristallmosaizität zu erhalten, sollten die ausgewählten Reflexe möglichst verschiedene Richtungen im reziproken Raum abdecken. Durch Messungen in verschiedene Richtungen des Kristalls wird zudem sichergestellt, dass bei Kristallen, die größer als der Röntgenstrahl sind, dennoch ein großer Teil des Kristalls vom Röntgenstrahl erfasst wird und dadurch auch in diesen Fällen ein repräsentative Bild der Mosizität erhalten wird. Für die Mosazitätsmessungen wurden pro Substanz vier Reflexe nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Die Reflexe sollen möglichst entlang der drei Raumrichtungen sowie der Raumdiagonalen im Kristall liegen.
- Die d-Werte der Reflexe sollten vorteilhafterweise zwischen 2.5Å und 5Å liegen. Da man hier in nahezu nicht-dispersiver Beugungsgeometrie misst, ist für diesen d-Wert-Bereich die instrumentelle Auflösung am höchsten.
- Um die Reflexe gut auffinden und schnell messen zu können, sollten diese relativ große Strukturfaktoren aufweisen.

Zudem wurde jeder Reflex bei 3 verschiedenen Ψ-Stellungen ($-45°$, $0°$ und $45°$) gemessen. Insgesamt ergibt sich damit eine Zahl von 12 Reflexprofilen pro Kristall. Um eine gute Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden an allen Kristallen einer Untersuchung stets die gleichen Reflexe gemessen. Die Gitterkonstanten der untersuchten Proteine sowie die ausgewählten Reflexe sind im Anhang in den Abschnitten D bzw. E angegeben.

Messung

Zum gezielten Anfahren von Reflexen muss die Orientierungsmatrix des zu untersuchenden Kristalls bekannt sein. Die Orientierungsmatrix wird hierzu aus 10-20 CCD-Rotationsaufnahmen mit dem XDS-Programmpaket [167] bestimmt. Diese mit XDS bestimmte Orientierungsmatrix wird anschließend in das Format 6-Kreis Diffraktometers konvertiert. Bei den Messungen am κ-Diffraktometer an der SNBL erfolgte die Bestimmung der Orientierung ebenfalls aus CCD-Rotationsaufnahmen. Die Umrechnung erfolgte hier mit der Software des dortigen Diffraktometers.

Ist die Orientierungsmatrix bekannt, können Reflexe gezielt angefahren werden. Hierzu wird durch einen grobe Drehung des Kristalls in Φ die genaue Reflexposition ermittelt, da durch die Rotationsaufnahmen eine gewisse Unsicherheit insbesondere bezüglich der Φ-Position besteht. Anschließend wird durch Drehung in Ω bei einer entsprechend der Mosaizität angepassten Schrittweite ein hochaufgelöstes Reflexprofil aufgezeichnet. Durch weitgehende Automatisierung der Rotationsaufnahmen, der Bestimmung der Orientierungsmatrix und dem Aufzeichnen der Reflexprofile konnte die benötigte Zeit für die gesamte Prozedur auf weniger als 20 Minuten pro Kristall reduziert werden.

Alle Mosazitätsmessungen erfolgten bei Raumtemperatur, da ein Schockgefrieren der Kristalle wie es für Messungen bei $100\,K$ nötig ist zu einer massiv erhöhten Mosazität führen würde (s. Abschn. 2.3.1). In einem derartigen Fall wäre die Mosaizität in vor allem durch den Prozess des Schockgefrierens bestimmt, und nicht durch den Kristallwachstumsprozess, dessen Auswirkungen auf die Mosazität in dieser Arbeit von Interesse sind.

Aufgrund der höheren experimentellen Auflösung erfolgten alle Mosaizitätsmessungen in nicht-dispersiver Anordnung. In den meisten Fällen konnte zudem auf den Einsatz des *Bartels*-Monochromators verzichtet werden, da die Mosaizität der Proteinkristalle hier deutlich größer als die instrumentelle Auflösung war, die ohne *Bartels*-Monochromator erreicht wurde.

3.3.4 Auswertung

Um eine gesicherte Aussage über den möglichen Einfluss eines bestimmten Wachstumsparameters auf die Kristallmosaizität machen zu können, ist eine statistische Auswertung der Mosaizitätsdaten unumgänglich. Hierzu wurden zunächst aus jedem gemessen Reflexprofil drei unterschiedliche Qualitätsparameter bestimmt. Die anschließende statistische Auswertung der Daten erfolgte im Wesentlichen mit dem *Wilcoxon*-Rangsummentest. Im folgenden Abschnitt werden zunächst die drei aus den Reflexprofilen bestimmten und der weiteren statistischen Auswertung zugrundeliegenden Mosaizitätsparameter vorgestellt. Anschließend wird auf die Grundlagen *Wilcoxon*-Rangsummentest und dessen Anwendung zur statistischen Analyse des Effektes un-

terschiedlicher Wachstumsparameter auf die Mosaizität von Kristallen eingegangen.

Mosaizitätsparameter

In Abbildung 3.26 sind exemplarisch drei Reflexprofile mit stark unterschiedlichen Formen gezeigt. Bei dem oben abgebildeten Reflexprofil handelt es sich um ein nahezu *Gauß*-förmiges Reflexprofil, das durch die rot eingezeichnete Halbwertsbreite (FWHM) hinreichend charakterisiert ist. Das mittlere Reflexprofil weist neben dem Hauptmaximum noch ein Nebenmaximum auf, welches durch die rot eingezeichnete Halbwertsbreite nicht erfasst wird. Eine Erfassung beider Maxima ist jedoch durch die Bestimmung der Reflexbreite bei 10% des Maximums ($FW10\%M$), in der Abbildung grün eingezeichnet, möglich. Ein Reflexprofil wie es in der Abbildung 3.26 unten gezeigt ist, das aus mehreren voneinander mehr oder weniger stark separierten Maxima besteht, wird jedoch auch durch die grün eingezeichnete $FW10\%M$ nicht hinreichend charakterisiert. Um auch solche Reflexprofile mit einem Parameter hinreichend erfassen zu können wurde ein *overall profile parameter* (OPP) definiert, der die gesamte Form des Profils berücksichtigt. Diese drei Qualitätsparameter sind dabei wie folgt definiert:

- Die Halbwertsbreite FWHM (*full width at half maximum*) ist die Breite des Reflexes in ω bei der Hälfte der Maximalintensität in Grad [°].
- Der $FW10\%M$ Parameter gibt die Breite [°] des Reflexes in ω bei 10% der Maximalintensität an.
- Der OPP (*overall profile parameter*) gibt die mit der Intensität gewichtete Ausdehnung des Profils um dessen Schwerpunkt in Grad [°] an:

$$OPP = \sum_i I(\omega_i) \frac{|\omega_i - \overline{\omega}|}{\sum_i I(\omega_i)}, \tag{3.1}$$

  wobei der Schwerpunkt der Verteilung $\overline{\omega}$ definiert ist als

$$\overline{\omega} = \frac{\sum_i I(\omega_i)\omega_i}{\sum_i I(\omega_i)}. \tag{3.2}$$

Der OPP ähnelt dabei in seiner Definition der Varianz, unterscheidet sich jedoch zudem in der fehlenden Quadrierung des Terms $|\omega_i - \overline{\omega}|$. Die Standardabweichung ist zur Beschreibung der Qualität von Reflexprofilen weniger geeignet, da diese eine *Gauß*-verteilungsförmige Profilform voraussetzt, was bei Kristallen schlechterer Qualität nicht erfüllt ist.

Eine graphische Darstellung und damit einen übersichtlichen Vergleich der Kristallmosaizitäten zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe erlauben die in dem nächten Kapitel gezeigten Histogramme. Um hier falsche Eindrücke durch die zum Teil unterschiedliche Zahl der gemessenen Kristalle bzw. Reflexprofile zu vermeiden, ist die Fläche unter den Histogrammen pro Gruppe auf eins normiert.

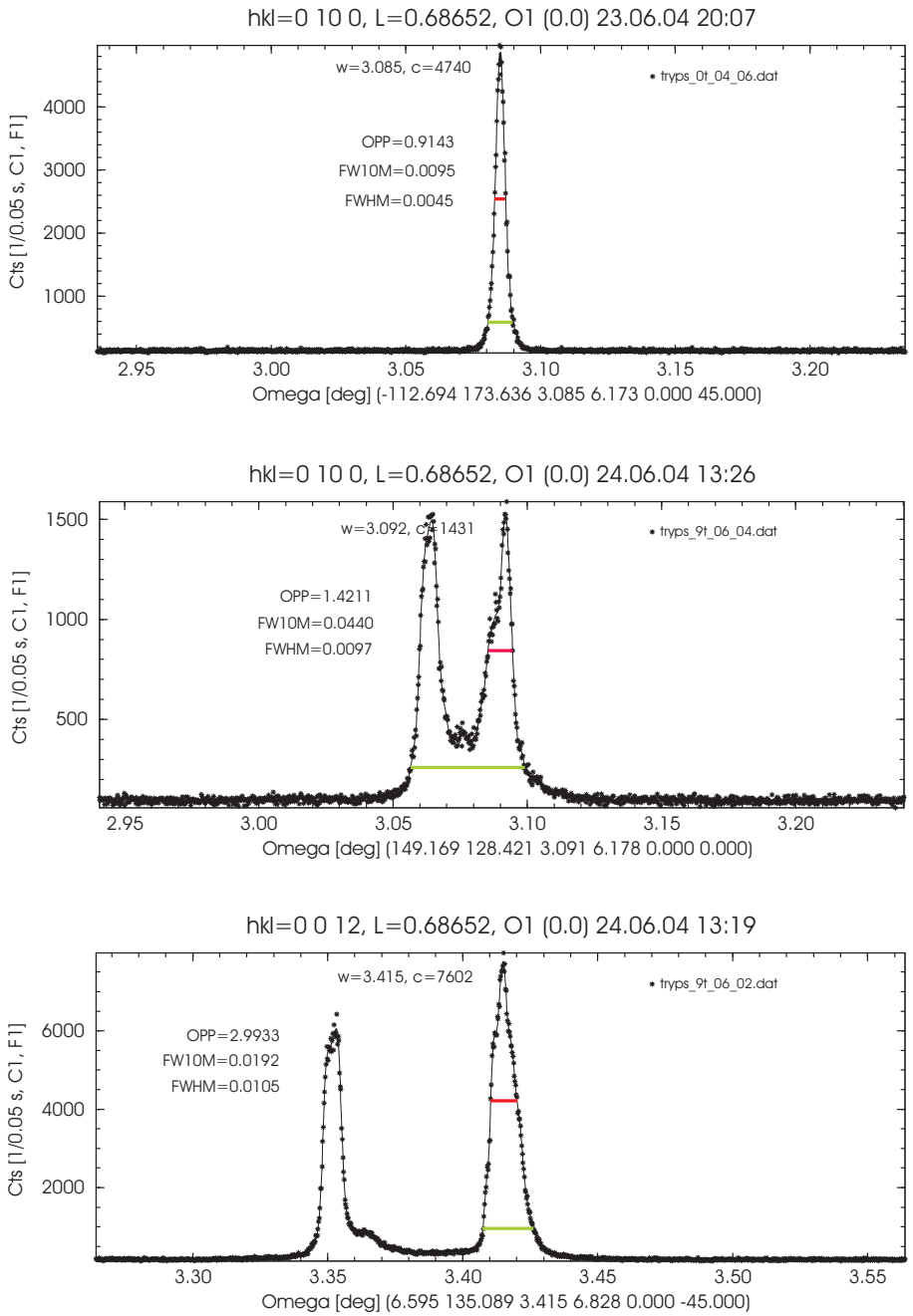

Abbildung 3.26: Ausgewählte Reflexprofile von Trypsinkristallen zur Veranschaulichung der 3 Mosaizitätsparameter: annähernd *Gauß*-förmiges Reflexprofil (oben); Reflexprofil aus 2 leicht voneinander separierten Maxima, von denen nur die Breite des Hauptpmaximums durch die FWHM berücksichtigt wird (mitte); aus 2 deutlich voneinander separierten Maxima bestehendes Reflexprofil, von denen die FWHM und FW10%M nur den rechten Peak erfasssen (unten).

3.3.5 Statistische Auswertung

Gängige auf normal-verteilte Daten basierende Verfahren können für die Analyse der Mosaizitätsdaten nicht angewandt werden, da die zugrundeliegende Verteilungsfunktion der Daten nicht bekannt ist. Das am besten geeignete Verfahren zur statistischen Behandlung der Mosaizitätsdaten stellt der *Wilcoxon*-Rangsummentest dar (siehe z.B. [168]).

Mittelwert und Standardabweichung

Aus den im Idealfall 12 Einzelbeobachtungen wurden für jeden Kristall durch Bildung des arithmetischen Mittels mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Parameter bestimmt. Zudem wurden aus allen Einzelbeobachtungen pro Gruppe (z.B. Thaumatinkristalle aus einem $8\,T$ Magnetfeld) mittlere Mosaizitätsparameter berechnet.

Hinter diesen Mittelwerten sind in Klammern die entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Hierbei ist anzumerken, dass die Standardabweichung eine Normalverteilung der Daten vorraussetzt, die hier nicht als gegeben vorausgesetzt werden kann. Aufgrund der weiten Verbreitung dieses Parameters wurde auf seine Angabe dennoch nicht verzichtet. Die z.T. sehr großen Standardabweichungen vor allem bei den mittleren Mosaizitätsparametern der einzelnen Kristalle sind dabei vor allem auf die Anisotropie der Mosaizität zurückzuführen.

Wilcoxon-Rangsummentest

Bei dem *Wilcoxon*-Rangsummentest handelt es sich um ein nichtparametrisches Verfahren zum Vergleich der Mittelwerte zweier Stichproben. Während parametrische Tests davon ausgehen, dass die beobachteten Stichprobendaten einer Grundgesamtheit entstammen, in der die Variablen bzw. die Merkmale ein bestimmtes Skalenniveau und eine bestimmte Verteilung aufweisen, kommen nichtparametrische Tests dann zur Anwendung, wenn die Voraussetzungen für einen parametrischen Test nicht erfüllt sind. Das heißt wenn die Verteilungsfunktion nicht bekannt ist oder die Varianzen der beiden Gruppen stark unterschiedlich sind. Zudem kann der *Wilcoxon*-Rangsummentest mit unterschiedlichen Stichprobengrößen umgehen. Allerdings geht der *Wilcoxon*-Rangsummentest von symmetrisch verteilten Daten aus. Diese Voraussetzung ist zumindest für die Einzelbeobachtungen nicht erfüllt, wie den im nächsten Kapitel gezeigten Histogrammen zu entnehmen ist. Für die gemittelten Mosaizitätsparameter ist die Symmetrie der Verteilung aufgrund der kleinen Beobachtungszahl nur schwer zu erkennen. Dennoch stellt der *Wilcoxon*-Rangsummentest mangels besser geeigneter Verfahren das wohl am besten geeignete Verfahren zur statistischen Analyse der Mosaizitätsdaten dar.

Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben $X_1, X_2, ..., X_n$ und $Y_1, Y_2, ..., Y_m$ nach dem *Wilcoxon*-Test werden allen Beobachtungen ihre entsprechenden Ränge R

zugeordnet. Hierzu werden alle Beoabachtungen in der Reihenfolge zunehmender Werte sortiert. Die kleinste Beobachtungsgröße erhält den Rang 1, die nächstgrößere den Rang 2 usw.. Weisen Einzelbeobachtungen dabei gleiche Werte auf, so wird allen betreffenden Beobachtungen das arithmetische Mittel der betreffenden Rangplätze zugeordnet. Anschließend wird die Rangsumme W_X für die Beobachtungen der Gruppe X gebildet:

$$W_X = \sum_{i=1}^{n} R(X_i). \tag{3.3}$$

Für zwei gleiche Stichproben X und Y wäre die Rangsumme

$$W_0 = n\frac{n+m+1}{2}. \tag{3.4}$$

zu erwarten. Die Nullhypothese H_0 sei, dass X und Y die gleiche Verteilung aufweisen ($H_0 : \mathbf{X} = \mathbf{Y}$). Aus der Rangsumme W_X und der Stichprobengröße läßt sich der P-Wert ($P(H_0)$) ermitteln. Dieser gibt an, auf welchem Signifikanzniveau sich die Verteilungen unterscheiden. Ein P-Wert von $P = 0.05$ z.B. bedeutet, dass sich die Verteilungen auf 5%-Niveau, das heißt mit einer 95%-igen Sicherheit, signifikant unterscheiden. Ein P-Wert von z.B. $P = 0.74$ macht dagegen deutlich, dass die Daten keinen Hinweis auf eine Abweichung von der Nullhypothese geben.

Zur Anwendung des *Wilcoxon*-Rangsummentests auf die Mosaizitätsdaten wurde der jeweilige Mittelwert der 3 Mosaizitätsparameter pro Kristall als Beobachtungsgröße gewählt. Die Einzelbeobachtungen, im Idealfall 12 Beobachtungen pro Parameter und Kristall sind hier ungeeignet, da sie nicht unabhängig voneinander sind. Das heißt Kristalle mit einer kleinen Mosaizität weisen in der Regel bei allen Reflexprofilen kleinere Mosaizitätsparameter als Kristalle mit einer höheren Mosaizität auf. Würde jede dieser Einzelbeobachtungen als eigenen Beobachtungsgröße gewählt, würde eine deutlich größere Stichprobe vorgetäuscht, was zu erheblich größeren Signifikanzniveaus führen würde.

Die Signifikanzniveaus für H_0 wurden dabei für Stichprobengrößen von $X \leq 12$ und $Y \leq 12$ einer Wahrscheinlichkeitstabelle entnommen [169]. Diese Werte sind in den entsprechenden Tabellen mit '$P(H_0)$ Tab.' gekennzeichnet. Für größere Stichproben wurden die Werte unter Annahme einer Normalverteilung nach der in [170] angegebenen Formel ermittelt. Diese Werte sind mit '$P(H_0)$ norm.' bezeichnet.

3.4 Intensitätsdaten

Sämtliche Intensitätsdatensammlungen erfolgten an der vom *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) betriebenen X11-Strahlführung am DORIS-Speicherring am DESY in Hamburg. In den folgenden Abschnitten werden kurz der X11-Messplatz vorgestellt, das Vorgehen zur Intensitätsdatensammlung und die Auswertung der Daten beschrieben

3.4.1 X11-Messplatz

Der X11-Messplatz des EMBL ist einer von drei Messplätzen die sich einen Ablenkmagneten teilen. Im Unterschied zu den beiden anderen im vorherigen Abschnitt beschriebenen Strahlführungen erfolgt die Monochromatisierung hier nur über einen Monochromatorkristall. Durch Biegung dieses Monochromatorkristalls wird der Strahl horizontal fokussiert. Ein nachfolgend angeordneter Spiegel ermöglicht zusätzlich eine vertikale Fokussierung. Durch den Verzicht auf einen zweiten Monochromatorkristall und die horizontale und vertikale Fokussierung wird dabei für eine Strahlführung an einem Ablenkmagneten ein ausgesprochen hoher Photonenfluss an der Probe realisiert. Allerdings führt dies zu einer ausgesprochen großen Wellenlängendispersion und einer großen Strahldivergenz. Die an einer derartigen Strahlführung ermittelte Kristallmosaizität sollte daher insbesondere bei Kristallen kleiner Mosaizität durch diese beiden Parameter und weniger durch den Kristall selbst bestimmt sein. Die Strahlführung wird bei einer festen Wellenlänge von 0.812 Å betrieben.

3.4.2 Datensammlung

Die Aufzeichnung der Intensitätsdaten erfolgte nach der Rotationsmethode (s. Abschn. 2.2.6) mit einem Einkreisgoniometer. Als Detektor kam eine CCD-Kamera der Fa. *Mar Research* mit einem Durchmesser von 165 mm zum Einsatz. Alle Messungen erfolgten im sog. *dose mode*. Im Unterschied zu einer festen Belichtungszeit von z.B. 1 $sec.$ wird hier die Rotationsgeschwindigkeit kontinuierlich der Dosisleistung angepasst. Dieses Verfahren weist den Vorteil auf, dass alle Aufnahmen die gleiche Dosis erfahren. Effekte wie der Abfall des Ringstromes und damit verbunden des Photonenflusses, die bei einer konstanten Belichtungszeit zu unterschiedlichen Dosen pro Bild führen, werden dadurch vermieden. Insbesondere für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ermöglicht die Datensammlung im *dose mode* eine bessere Vergleichbarkeit der Daten.

Bei der Datensammlung wurden für alle Kristalle der Versuchs- und Kontrollgruppe exakt die gleichen Datensammlungsparameter gewählt um Einflüsse durch unterschiedliche Parameter zu vermeiden. Die für die Untersuchungen gewählten Datensammlungsparameter sind im Anhang F angegeben.

3.4.3 Datenanalyse

Die Indizierung der Rotationsaufnahmen und anschließende Ermittlung der integralen Intensitäten erfolgten mit dem XDS-Programmpaket [167]. Die zur Beurteilung der Kristallqualität herangezogenen Parameter wie Vollständigkeit der Datensätze, das $I/\sigma(I)$-Verhältnis und der R_{merge} Wert als Funktion der Auflösung wurden der Ausgabedatei des XDS-Programms entnommen. Die Ermittlung der Auflösungsgrenze erfolgte durch lineare Interpolation aus der Vollständikgeit der Datensätze als Funktion der Auflösung für ein gegebenes $I/\sigma(I)$-Verhältnis. Die Ermittlung der B-Faktoren erfolgte mit dem Programm 'Wilson' aus dem Programmpaket CCP4 [171]. Auf eine detaillierte Auswertung der durch das XDS-Programmpaket extrahierten Kristallmosaizitäten wurde aufgrund zu hoher Werte, die in erster Linie auf die zuvor diskutierten Strahleigenschaften an der X11-Strahlführung zurückzuführen sind, verzichtet.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Einfluss von Verunreinigungen

Verunreinigungen haben einen empfindlichen Einfluss auf die Kristallqualität. In bisherigen Untersuchungen wurde allerdings immer nur der Effekt von in relativ hohen Konzentrationen zugesetzten Verunreinigungen auf die Kristallmosaizität und das Beugungsverhalten untersucht (siehe dazu Abschnitt 2.6.1). Der Effekt einer weiteren Aufreinigung von kommerziell erhältlichem Protein sowohl auf die Mosaizität als auch auf das globale Beugungsverhalten wurde bisher nicht untersucht. Zudem wurden in den bisherigen Studien maximal 2 Kristalle pro Versuchsgruppe miteinander verglichen.

In der folgenden Untersuchung wurde die Mosaizitäten von jeweils 7 bzw. 8 tetragonalen Lysozymkristallen aus aufgereinigtem und nicht aufgereinigtem Protein miteinander verglichen. Anschließend wurden an jeweils 4 der zuvor hinsichtlich ihrer Mosaizität charakterisierten Kristalle Intensitätsdatensätze gesammelt. Dieses Vorgehen erlaubt es, einen zwar vermuteten, aber bisher experimentell nicht belegten Zusammenhang zwischen der Kristallmosaizität und dem Auflösungsvermögen zu untersuchen.

4.1.1 Aufreinigung und Kristallisation

Die Aufreinigung des kommerziell erhältlichen Lysozyms erfolgte durch Gelfiltration nach der in C beschriebenen Prozedur. In Abbildung 4.1 ist ein SDS-Gel der nichtaufgereinigten und der aufgereinigten Probe gezeigt. Auf dem Gel ist eine deutliche Verringerung von höhermolekularen Verunreinigungen durch die Aufreinigung zu erkennen. Die Kristallisation erfolgte in *Q-plates* entsprechend den in B.1 angegebenen Vorschriften. Die Gesamtropfengröße betrug zu Beginn $40\,\mu l$, die Reservoirgröße $1000\,\mu l$. Die Kristallisation war nach 7 Tagen abgeschlossen.

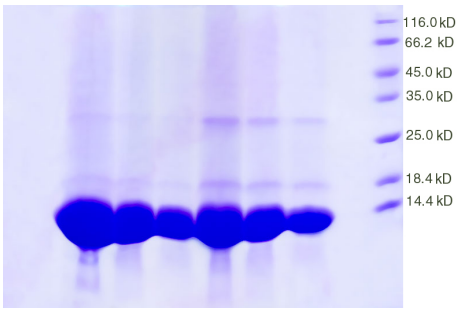

Abbildung 4.1: SDS-Gel von Lysozym, v.l.n.r: 1-3 aufgereinigtes Protein, 4-6 nicht aufgereinigtes Protein (jeweils in verschiedenen Konzentrationen) und 7 Marker mit Mol. Gew. in kD.

4.1.2 Mosaizität

Die Mosaizitätsmessungen an den Lysozymkristallen erfolgten an der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle (ESRF) in Grenoble an der Strahlführung BM-01 (SNBL) an einem Ablenkmagneten bei einer Energie von 17.46 keV. Insgesamt wurden 7 Kristalle aus aufgereinigtem Lysozym und 8 Kristalle aus nicht-aufgereinigtem Lysozym untersucht. Aufgrund experimenteller Beschränkungen durch die *kappa*-Geometrie des dort benutzten Diffraktometers (s.a. Abschn. 3.3.2) konnten von den pro Gruppe 84 bzw. 96 angestrebten Reflexen nur 54 Reflexe von aufgereinigtem und 73 Reflexe von nicht-aufgereinigtem Lysozymkristallen gemessen werden. Die Zellparameter sowie die zur Messung ausgewählten Reflexe sind im Anhang in den Tabellen D.1 bzw. E.1 angegeben.

In Tabelle 4.1 sind die mittleren Mosaizitätsparameter der jeweils drei *besten* Kristalle (mit den kleinsten OPP-Parametern) aus nicht-aufgereinigtem sowie aus aufgereinigtem Lysozym sowie die *Mittelwerte* der beiden Gesamtgruppen angegeben. Bei der Betrachtung der *besten* Kristalle fällt auf, dass die beiden Kristalle mit den kleinsten mittleren OPP-Parametern aus nicht-aufgereinigtem Proteinmaterial sind. Erst die beiden Kristalle mit den nächstgrößeren sind aus aufgereinigtem Protein, jedoch weisen diese beiden Kristalle kleinere FWHM- und FW10%M-Werte als die beiden Kristalle mit den kleinsten OPP-Parametern aus nicht-aufgereinigtem Proteinmaterial auf.

Im *Mittel* weisen die Kristalle aus aufgereinigtem Lysozym für alle drei Profilparameter (FWHM, FW10%M und OPP) kleinere Werte als Kristalle aus nicht-aufgereinigtem Protein auf. Ein *Wilcoxon*-Rangsummentest (s. Tab. 4.2) zeigt jedoch nur für die FWHM- und FW10%M-Werte auf 10%-Niveau signifikante Unterschiede zwischen den beiden Verteilungen. Die Unterschiede zwischen den Verteilungen der OPP-Parameter dagegen sind nicht signifikant. Eine Erklaŕung hierfür könnte die weiter unten näher diskutierte Kristallgröße sein. Da die Kristalle aus aufgereinigtem Proteinmaterial ein mehr als doppelt so großes Volumen aufweisen als die Kristalle aus

nicht-aufgereinigtem Proteinmaterial zeigen diese auch eine größere Anfälligkeit für Kristallbrüche, die z.T. auch erst nach dem Wachstum während der Montage der Kristalle aufgetreten sein können. Solche Brüche mit großen Verkippungswinkeln äußern sich vor allem im OPP-Parameter, während sie nicht in die FWHM- und FW10%M-Parameter mit eingehen.

In Abbildung 4.2 sind zudem die aus den Mosaizitätsmessungen der Lysozymkristalle erhaltenen Histogramme gezeigt. In allen drei Histogrammen (FWHM-, FW10%M und OPP-Werte) ist der sich auch in Mittelwerten ausdrückende Effekt der Aufreinigung hin zu kleinerer Mosaizität zu erkennen.

Tabelle 4.1: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte und Kristallgrößen der jeweils 3 besten Lysoymkristalle aus nicht-aufgereinigtem und aufgereinigtem Proteinmaterial in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden Gesamtgruppen angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$	Vol $[mm^3]$
*lyso_n_*03	0.0047(15)	0.007(2)	0.21(5)	0.53
*lyso_n_*04	0.0060(5)	0.008(1)	0.25(2)	0.33
*lyso_n_*06	0.0056(14)	0.009(2)	0.29(5)	0.38
*lyso_auf_*07	0.0046(8)	0.006(1)	0.26(12)	1.18
*lyso_auf_*02	0.0041(9)	0.006(3)	0.28(17)	1.65
*lyso_auf_*10	0.0071(20)	0.010(3)	0.32(8)	0.34
Mittelw. n. auf.	0.0083(31)	0.019(8)	0.45(26)	0.43(32)
Mittelw. auf.	0.0066(33)	0.014(6)	0.37(18)	1.10(87)

Tabelle 4.2: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zur Bestimmung des Signifikanzniveaus des Effektes der Proteinaufreinigung auf die Mosaizität von Lysozymkristallen (aufgereinigt: 7 Kristalle (Gruppe A), nicht-aufgereinigt: 8 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_a	$P(H_0)$ Tab.
$FWHM$	44	$0.05 - 0.10$
$FW10\%M$	43	$0.05 - 0.10$
OPP	50	> 0.20

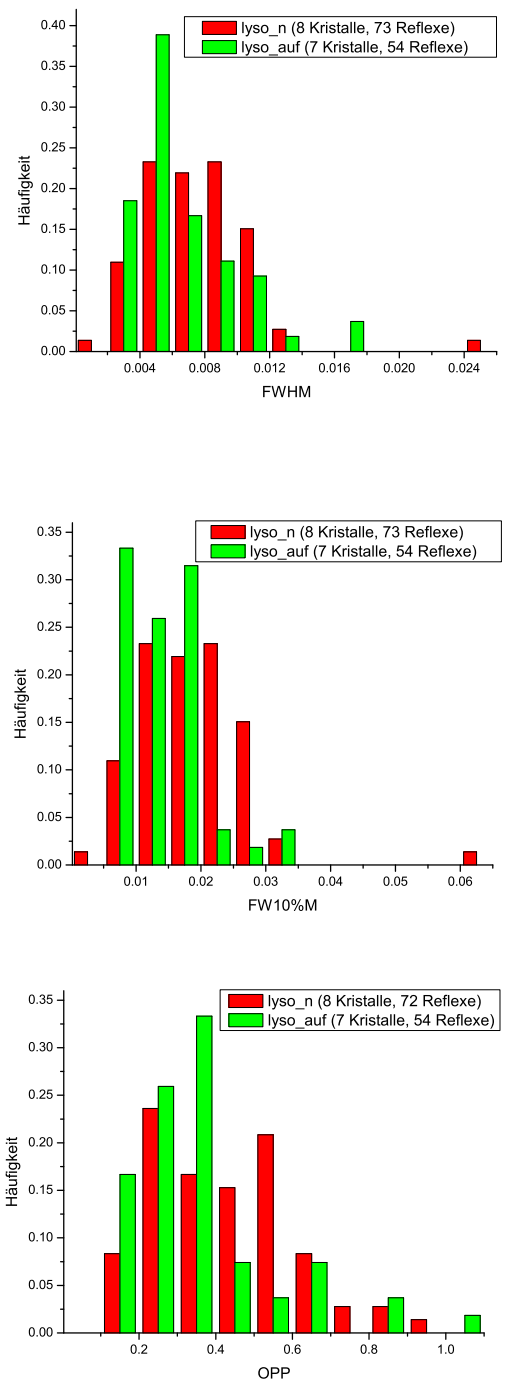

Abbildung 4.2: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Kristallen aus aufgereingtem (grün) und nicht-aufgereinigtem Lysozym (rot) Ein Reflex von nicht-aufgereinigtem Lysozym befindet sich ausserhalb des dargestellten Bereiches und wurde der Übersichtlichkeit halber weggelassen).

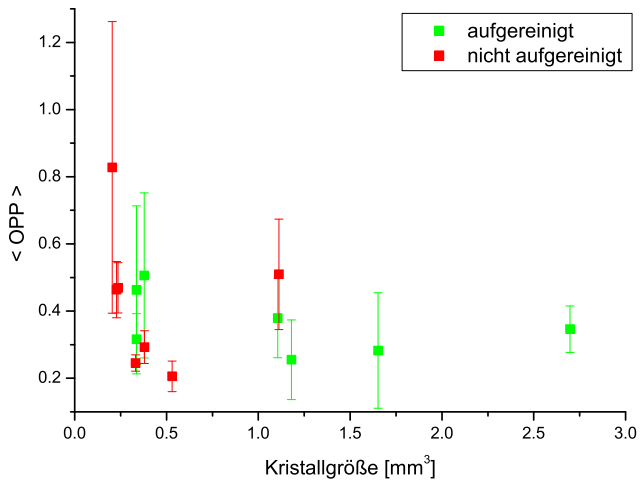

Abbildung 4.3: Zusammenhang zwischen den mittleren OPP-Werten (mit eingezeichneter mittlerer Standardabweichung) und der Kristallgröße von Lysozymkristallen aus aufgereinigtem (grün) und nicht-aufgereinigtem Lysozym (rot). Von einem Kristall aus nicht-aufgereinigtem Lysozym konnte die Kristallgröße nicht bestimmt werden.

Abbildung 4.3 zeigt zudem eine Auftragung der Kristallmosaizität (hier der OPP-Werte) gegen die Kristallgröße. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Kristalle aus nicht-aufgereinigtem Lysozym im Schnitt deutlich kleiner sind als die aus aufgereinigtem Proteinmaterial. Zudem ist ein leichter Trend zwischen der Mosaizität (hier OPP-Parameter) und der Kristallgröße zu erkennen. So weisen kleine Kristalle eine relativ hohe Mosaizität auf, während die größeren Kristalle von vergleichsweise kleiner Mosaizität sind. Eine Erklärung für diese Beobachtung ergibt sich aus den im Abschnitt 2.6.1 dargelegten Zusammenhang: Durch einen verringerten Anteil von Verunreinigungen in der Kristallisationslösung werden auch weniger Verunreinigungen an den Wachstumsflächen angelagert bzw. in den Kristall eingebaut. Dies führt zum einen zu einer verringerten Mosaizität und ermöglicht gleichzeitig das Wachstum größerer Kristalle, da es in geringerem Ausmaß zu einer 'Vergiftung' der Wachstumsflächen und damit zu einem Abbruch des Kristallwachstums kommt.

4.1.3 Intensitätsdaten

Von einigen der Kristalle wurden im Anschluß an die Mosaizitätsmessungen an der X11-Strahlführung in Hamburg zusätzlich Intensitätsdatensätze aufgezeichnet. Die Auswahl der Kristalle erfolgte dabei zufällig ohne Berücksichtigung der zuvor bestimmten Mosaizität. Die Datensammlungsparameter finden sich im Anhang in Tabelle F.1. In Abbildung 4.4 sind die Vollständigkeit, das durchschnittliche $I/\sigma(I)$-Verhältnis sowie die

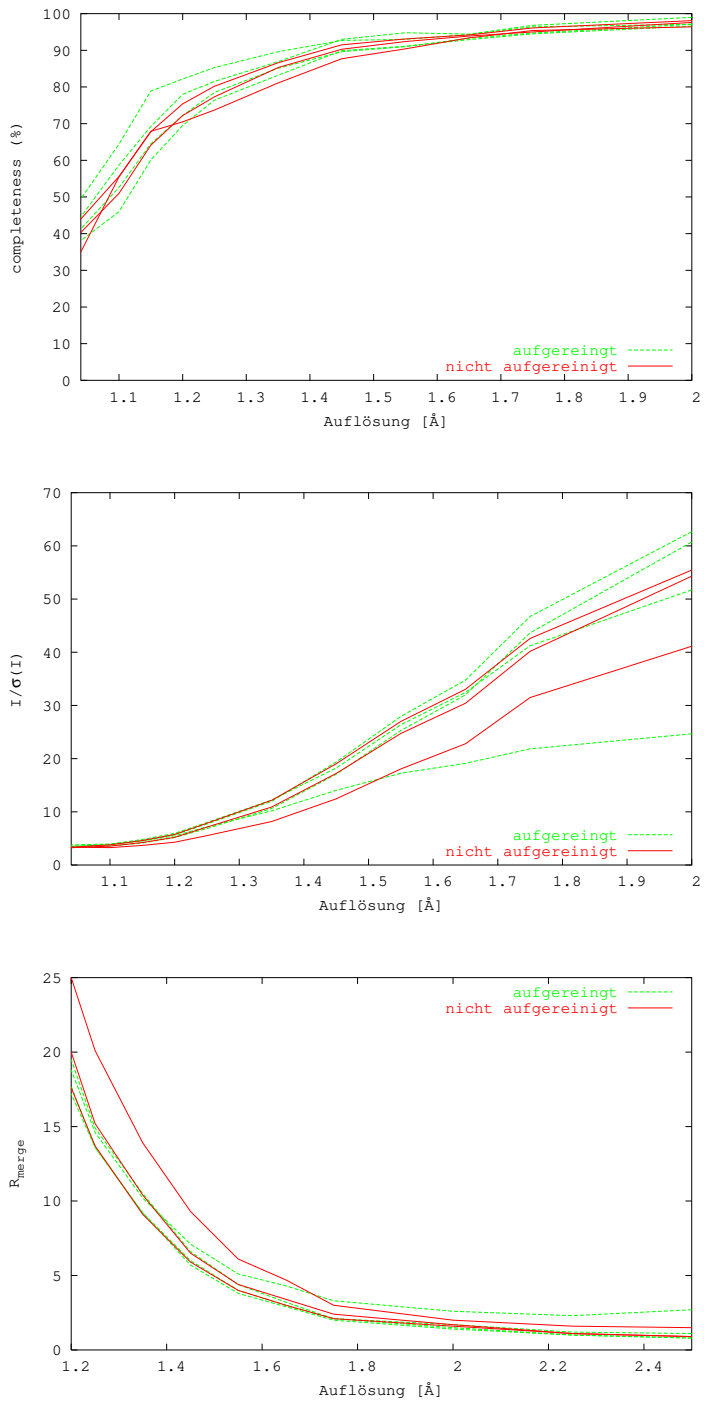

Abbildung 4.4: Auftragung der Vollständigkeit (oben), des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) und des R_{merge} Wertes (unten) als Funktion der Auflösung von Kristallen aus aufgereinigtem (grün) und nicht-aufgereinigtem Lysozym (rot), (Kriterium: $I/\sigma(I) \geq 2$).

R_{merge}-Werte der erhaltenen Datensätze als Funktion der Auflösung aufgetragen. Die Kristalle aus aufgereinigtem Lysozym weisen im Durchschnitt eine höhere *Completeness* und kleinere R_{merge}-Werte auf. In Tabelle 4.3 sind die wichtigsten Qualitätsparameter der Datensätze noch einmal zusammengefaßt. Die beiden Datensätze mit der größten Vollständigkeit stammen von Kristallen aus aufgereinigtem Lysozym. Diese weisen auch die höchste Auflösungsgrenze auf. Ein starke Korrelation zwischen der mittleren Mosaizität der Kristalle (OPP-Parameter) und der Auflösungsgrenze ist jedoch nicht zu erkennen. Allerdings kommt es durch die Aufreinigung im Mittel auch zu keiner Verbesserung des Auflösungsvermögens. Auch die anderen Qualitätsparameter zeigen nur sehr geringe, aber keine signifikanten, Verbesserungen.

Tabelle 4.3: Qualitätsparameter der jeweils 3 besten Datensätze von aufgereinigten und nicht-aufgereinigtem Lysozymkristallen, geordnet nach abnehmender *Completeness* der Datensätze. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden Gruppen angegeben.

Kristall	*Compl.*[a]	$< I/\sigma(I) >$ [b]	d_{min}[c]	B-Faktor[d]	$< OPP >$[e]
lyso_n_02	76.6	25.35	1.07	12.6(4)	0.83(43)
lyso_n_01	74.3	24.94	1.09	12.5(4)	0.47(7)
lyso_n_04	71.6	16.29	1.08	11.5(5)	0.25(2)
lyso_auf_07	79.8	11.97	1.04	11.6(4)	0.26(12)
lyso_auf_02	77.9	23.37	1.06	12.2(4)	0.28(17)
lyso_auf_05	74.5	27.88	1.09	12.4(4)	0.51(25)
Mittelw. n. auf.	74.2(2.5)	22.2(5.1)	1.08(1)	12.2(6)	0.45(26)
Mittelw. auf.	76.2(3.3)	23.1(7.9)	1.08(3)	12.1(4)	0.37(18)

[a] im Auflösungsbereich von 10 Å $-$ 1.04 Å und für $I/\sigma(I) \geq 2$.
[b] im Auflösungsbereich von 10 Å $-$ 1.04 Å und für $I/\sigma(I) \geq 0$.
[c] Kriterium: 50% *Completeness* bei $I/\sigma(I) \geq 2$.
[d] aus Wilson-Plot (Programm Wilson, CCP4 [171]) für den Auflösungsbereich bis 1.08 Å.
[e] Daten der Mosaizitätsmessungen an der SNBL.

In Abbildung 4.5 ist der Zusammenhang zwischen dem mittleren OPP-Wert der Kristalle und dem durch Wilson-Plot ermittelten B-Faktor gezeigt. Trotz großer Unsicherheiten ist ein deutlicher Trend zu erkennen: Kristalle mit kleineren OPP-Parametern (also einer geringeren Mosaizität), weisen auch kleinere B-Faktoren, also einen höheren kurzreichweitigen Ordnungsgrad, auf (siehe dazu auch Abschnitt 2.3.1). Allerdings hat dies keine signifikanten Auswirkungen auf das erreichbare Auflösungsvermögen.

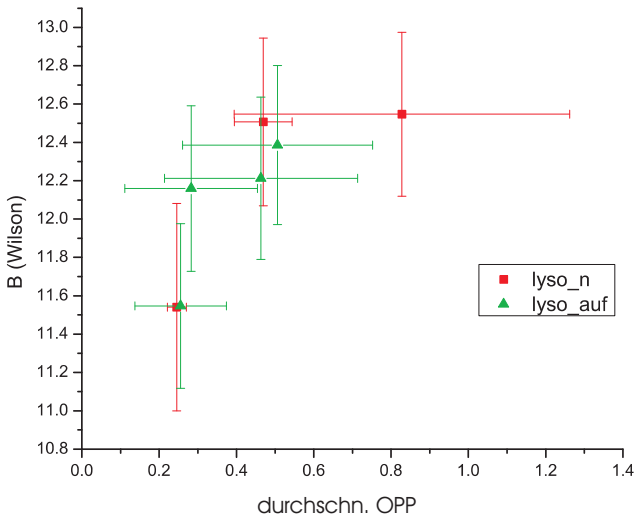

Abbildung 4.5: Zusammenhang zwischen den mittleren OPP-Werten (mit eingezeichneter mittlerer Standardabweichung) und dem B-Faktor (mit eingezeichnetem Fehler, ermittelt durch Wilson-Plot) von Lysozymkristallen aus aufgereinigtem (grün) und nicht-aufgreinigtem Lysozym (rot).

4.1.4 Zusammenfassung

Die Kristalle aus aufgereinigtem Lysozym weisen im Mittel eine geringere Mosaizität als die aus nicht-aufgereinigtem Protein auf und sind zudem deutlich größer. Die Qualität der an den Kristallen gesammelten Intensitätsätze wird dadurch im Mittel jedoch nur sehr geringfügig beeinflusst. Allerdings sind alle Datensätze ohnehin von guter bis sehr guter Qualität. Die nur geringen Unterschiede durch die Aufreinigung dürften wohl vor allem auf die bereits hohe Reinheit des nicht-aufgereinigten Probenmaterials als auch auf die für ein Protein ungewöhnlich gute Kristallisierbarkeit von Lysozym zurückzuführen [172].

Erwähnenswert ist ferner der beobachtete Zusammenhang zwischen der mittleren Kristallmosaizität (OPP-Parameter) und dem B-Faktor. Zwar wurde so ein Zusammenhang vielfach vermutet, konnte aber bisher nicht experimentell belegt werden.

4.2 Homogene Magnetfelder

Der Effekt homogener Magnetfelder auf die Qualität von Proteinkristallen wurde an den Modellproteinen Thaumatin, Lysozym, Trypsin und Myoglobin untersucht. Erstere drei sind diamagnetisch und letzteres ist paramagnetisch. An Thaumatinkristallen wurde dabei der Effekt auf die Kristallmosaizität und an Lysozymkristallen ein möglicher Einfluss auf die Qualität der Intensitätsdatensätze untersucht. An Trypsin- und Myoglobinkristallen wurden sowohl mögliche Effekte auf die Kristallmosaizität als auch auf die Qualität der Intensitätsdaten untersucht.

4.2.1 Thaumatin

Thaumatinkristalle wurden in homogenen Magnetfeldern von $5\,T$ und $8.8\,T$ durch *hanging-drop vapour diffusion* nach dem in Abschnitt B.6 angegebenen Rezept gezüchtet. Die Kristallisationsversuche im $8.8\,T$ Magnetfeld wurden zudem mit nicht-aufgereinigtem und aufgereinigtem Proteinmaterial (s. Abschn. C) durchgeführt.

Ausrichtung der Kristalle

Die in dem $5\,T$ Magnetfeld horizontaler Richtung gewachsenen Thaumatinkristalle zeigten bis auf wenige Ausnahmen eine perfekte Ausrichtung mit ihrer tetragonalen Achse entlang des Magnetfeldrichtung (s. 4.2.1). Bei den unter einem Magnetfeld von $8.8\,T$

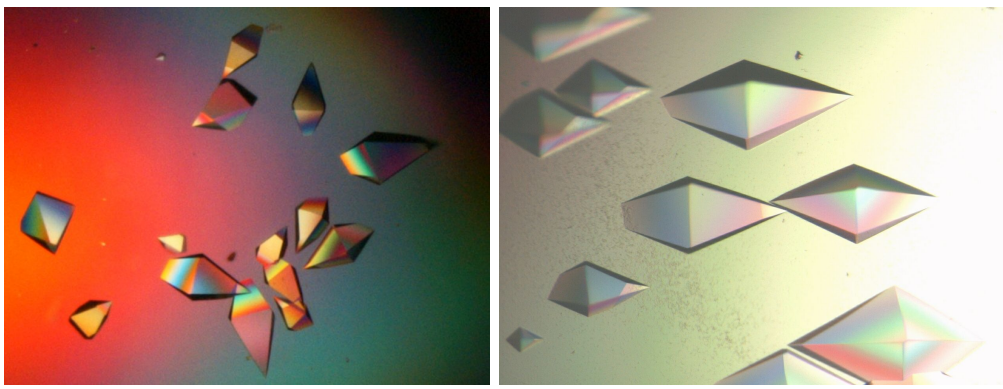

Abbildung 4.6: Thaumatinkristalle: ohne Magnetfeld gezüchtete Kristalle (links), Ausrichtung von unter einem Magnetfeld von $5\,T$ gewachsenen Kristallen mit ihrer tetragonalen c-Achse entlang der Magnetfeldrichtung (rechts).

in vertikaler Richtung gewachsenen Kristallen konnte zwar eine Vorzugsorientierung entlang des Magnetfeldes beobachtet werden, jedoch waren nur wenige Kristalle perfekt entlang der Magnetfeldrichtung ausgerichtet. Die ausgerichteten Kristalle traten

zudem nur selten als vollständig ausgebildete Bipyramiden sondern meistens als Pyramidenstümpfe auf. Die Ursache für diese Beobachtungen ist in der Probengeometrie zu suchen: Für die relativ langgestreckten bipyramidalen Thaumatinkristalle ist eine Ausrichtung in vertikaler Richtung wesentlich ungünstiger, da sie hier eine 'aufrechte' Position einnehmen müssen, während sie bei horizontaler Ausrichtung relativ zur Unterseite des Tropfens eine 'liegende' Position einnehmen können.

Mosaizität

Die Mosaizitätsmessungen an den Thaumatinkristallen aus nicht-aufgereinigtem Proteinmaterial ($5\,T$, $8.8\,T$ und den entsprechenden $0\,T$-Kontrollgruppen) wurden an der Petra-1 Strahlführung bei einer Energie von $18\,keV$ vorgenommen. Die Mosaizität der Kristalle aus aufgereinigtem Thaumatin ($8.8\,T$ und entsprechende $0\,T$-Kontrollgruppe) wurden an der SNBL in Grenoble bei einer Energie von $17.46\,keV$ untersucht. Alle Messungen erfolgten ohne zusätzlichen *Bartels*-Monochromator, da sich die Reflexbreiten mit FWHM-Werten von $\geq 0.004°$ deutlich oberhalb der instrumentellen Auflösung des herkömmlichen Experimentaufbaus befanden (s. Abschn. 3.3.1). Für die Messungen der Kristalle aus dem Magnetfeld wurden ausschließlich in Richtung des Magnetfeldes orientierte Kristalle ausgewählt. Die Gitterparameter des tetragonalen Thaumatins sowie die zu Mosaizitätsmessungen ausgewählten Reflexe sind im Anhang in den Tabellen D.2 bzw. E.2 angegeben.

Zur Untersuchung des Effektes eines $5\,T$ Magnetfeld mit horizontaler Feldrichtung auf die Qualität von Thaumatinkristallen wurden 225 Reflexprofile von 19 Kristallen aus dem $5\,T$-Magnetfeld und 156 Reflexprofile von 13 Kristallen der $0\,T$-Kontrollgruppe aufgezeichnet. In Tabelle 4.4 sind die mittleren Mosaizitätsparameter der jeweils 3 besten Thaumatinkristalle aus dem $5\,T$ Magnetfeld mit horizontaler Feldrichtung sowie der $0\,T$-Kontrollgruppe und die gemittelten Mosaizitätsparameter der beiden Gesamtgruppen $0\,T$ und $5\,T$ angegeben. Insgesamt fällt auf, dass sich die Mosaizitätsparameter der Kristalle nur geringfügig unterscheiden. Der *beste* Kristall stammt zwar aus dem $5\,T$-Magnetfeld, unterscheidet sich in seiner Mosaizität jedoch nur wenig von dem *besten* Kristall aus der Kontrollgruppe. Alle untersuchten Kristalle weisen ohnehin eine sehr geringe Bandbreite der Mosaizität (OPP von 0.36-0.56) auf. Die *Mittelwerte* der beiden untersuchten Gruppen stimmen in allen 3 Parametern fast exakt überein. Es ist also weder in Bezug auf einzelne Kristalle noch auf die gesamte untersuchte Gruppe ein Einfluss des $5\,T$-Magnetfeldes auf die Kristallmosaizität zu erkennen. In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse von *Wilcoxon*-Rangsummen Tests angegeben. Diese ergeben für keinen der drei Parameter signifikante Unterschiede der Verteilungen.

Abbildung 4.7 zeigt die Histogramme der FWHM-, der FW10%M und OPP-Werte. In allen drei Histogrammen sind nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Kristallen aus dem $5\,T$ Magnetfeld und der Kontrollgruppe zu erkennen. Es ist kein bzw. wenn

überhaupt ein sehr geringer negtiver Einfluss des Magnetfeldes auf die Mosaizität zu erkennen.

Tabelle 4.4: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der jeweils 3 besten Thaumatinkristalle aus einem Magnetfeld von $5\,T$ bzw. der $0\,T$ Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Am Ende der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden $0\,T$- (13 Kristalle) und $5\,T$ Gesamtgruppen (19 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
thaum_5t_08	0.0067(17)	0.011(2)	0.36(4)
thaum_5t_24	0.0094(36)	0.014(7)	0.38(16)
thaum_5t_14	0.0099(32)	0.014(6)	0.39(17)
thaum_0t_01	0.0074(26)	0.012(7)	0.38(15)
thaum_0t_10	0.0081(35)	0.013(6)	0.39(11)
thaum_0t_13	0.0081(38)	0.012(5)	0.40(10)
Mittelwert $5\,T$	0.0093(43)	0.0211(79)	0.45(17)
Mittelwert $0\,T$	0.0093(43)	0.0211(82)	0.44(16)

Tabelle 4.5: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zum Einfluss eines homogenen $5\,T$ Magnetfeldes in horizontaler Richtung auf die Mosaizität von Thaumatinkristallen ($5\,T$: 19 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 13 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_B	$P(H_0)$ norm.
$FWHM$	207	0.79
$FW10\%M$	195	0.47
OPP	195.5	0.48

Zusätzlich zu dem Einfluss eines $5\,T$-Magnetfeldes mit horizontaler Feldrichtung wurde der mögliche Einfluss eines $8.8\,T$ Magnetfeldes mit vertikaler Feldrichtung auf die Kristallmosaizität von Thaumatinkristallen untersucht. Hierbei wurde ein möglicher Effekt sowohl an herkömmlichem, nicht-aufgereinigtem als auch an durch Gelfiltration aufgereinigtem Protein untersucht. Dazu wurden 156 Reflexprofile von 13 Kristallen aus einem $8.8\,T$-Magnetfeld und 120 Reflexprofile von 10 Kristallen einer $0\,T$-Kontrollgruppe aus nicht-aufgereinigtem Protein sowie 104 Reflexprofile von 12 Kristallen aus dem $8.8\,T$-Magnetfeld und 98 Reflexprofile von 11 Kristallen der entsprechenden $0\,T$-Kontrollgruppe aus aufgereinigtem Protein aufgezeichnet. Die relativ geringe Zahl der pro Kristall aufgezeichneten Reflexprofile an aufgereinigtem Thaumatin ist auf die

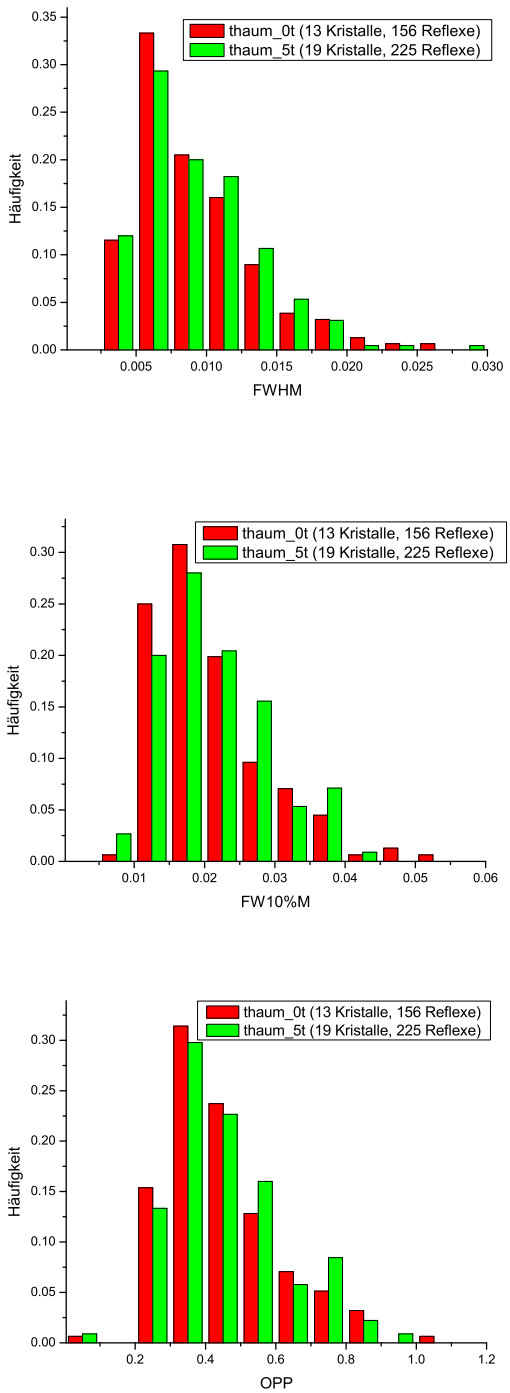

Abbildung 4.7: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Thaumatinkristallen gezüchtet in einem 5 T-Magnetfeld mit horizontaler Feldrichtung (grün) und in einer 0 T-Kontrollgruppe (rot).

bereits erwähnten experimentellen Einschränkungen des *Kappa*-Diffraktometers an der SNBL in Grenoble zurückzuführen.

In den Tabellen 4.6 bzw. 4.8 sind die Mosaizitätsparameter der jeweils 3 besten Kristalle aus dem Magnetfeld und der Kontrollgruppe mit der geringsten Mosaizität (kleinster OPP-Parameter) und die mittleren Mosaizitätsparameter der beiden Gesamtgruppen ($0\,T$ und $8.8\,T$) für Kristalle aus nicht-aufgereinigtem bzw. aufgereinigtem Proteinmaterial gezeigt. Sowohl bei den nicht-aufgereinigten wie auch bei den aufgereinigten Proben stammen die jeweils *besten* Kristalle aus dem Magnetfeld. Allerdings unterscheiden sich diese nur marginal von den Kristallen, die nicht aus dem Magnetfeld stammen. Eine Betrachtung der *Mittelwerte* zeigt einen leicht positiven Effekt des Magnetfeldes auf die FWHM- und FW10%M-Parameter und einen minimal negativen Einfluss auf den OPP-Parameter bei den nicht-aufgereinigten Kristallen. Bei den Kristallen aus aufgereinigtem Proteinmaterial dagegen ist im *Mittel* bei allen drei Parametern ein leicht negativer Effekt des Magnetfeldes auf die Kristallmosaizität zu erkennen, was vor allem auf zwei besonders schlechte Kristalle aus dem Magnetfeld zurückzuführen ist.

Allerdings sind die Unterschiede der Verteilungen, wie aus den in den Tabellen 4.7 und 4.9 angegebenen Ergebnissen der *Wilcoxon*-Rangsummentests hervorgeht, nur im Falle des OPP-Parameters bei Kristallen aus aufgereinigtem Proteinmaterial signifikant. Und in diesem Fall weist die Verteilung der Kristalle aus dem Magnetfeld die höheren OPP-Werte auf, d.h. diese Kristalle sind von schlechterer Qualität als die der Kontrollgruppe.

In Abbildung 4.8 sind die Histogramme der aus den Messdaten hervorgegangenen Mosaizitätsparameter gezeigt. Während bei den Kristallen aus nicht-aufgereinigtem Protein ein leicht positiver Effekt des Magnetfeldes auf die Kristallmosaizität zu erkennen ist, ist dies bei den Kristallen aus aufgereinigtem Protein genau umgekehrt. Hier ist in allen drei Histogrammen ein leicht negativer Effekt zu erkennen.

Zusammenfassung

Ein $5\,T$ Magnetfeld in horizontaler Feldrichtung hat keinen Effekt auf die Mosaizität von Thaumatinkristallen. Unter den im Magnetfeld gezüchteten Kristallen befinden sich weder einige ausnahmslos gute Kristalle noch hat das Magnetfeld im Mittel einen Einfluss auf die Kristallqualität. Die Mittelwerte der drei Mosaizitätsparameter stimmen fast exakt überein. Zudem sind alle untersuchten Kristalle von guter Qualität und weisen nur geringe Schwankungen auf.

Ein $8.8\,T$ Magnetfeld mit vertikaler Feldrichtung zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Mosaizität von Thaumatinkristallen aus nicht-aufgereinigtem Proteinmaterial. Jedoch weisen ebenfalls in einem $8.8\,T$ Magnetfeld gezüchtete Thaumatinkristalle aus aufgereinigtem Protein signifikant größere FW10%M- und OPP-Werte als die Kristalle

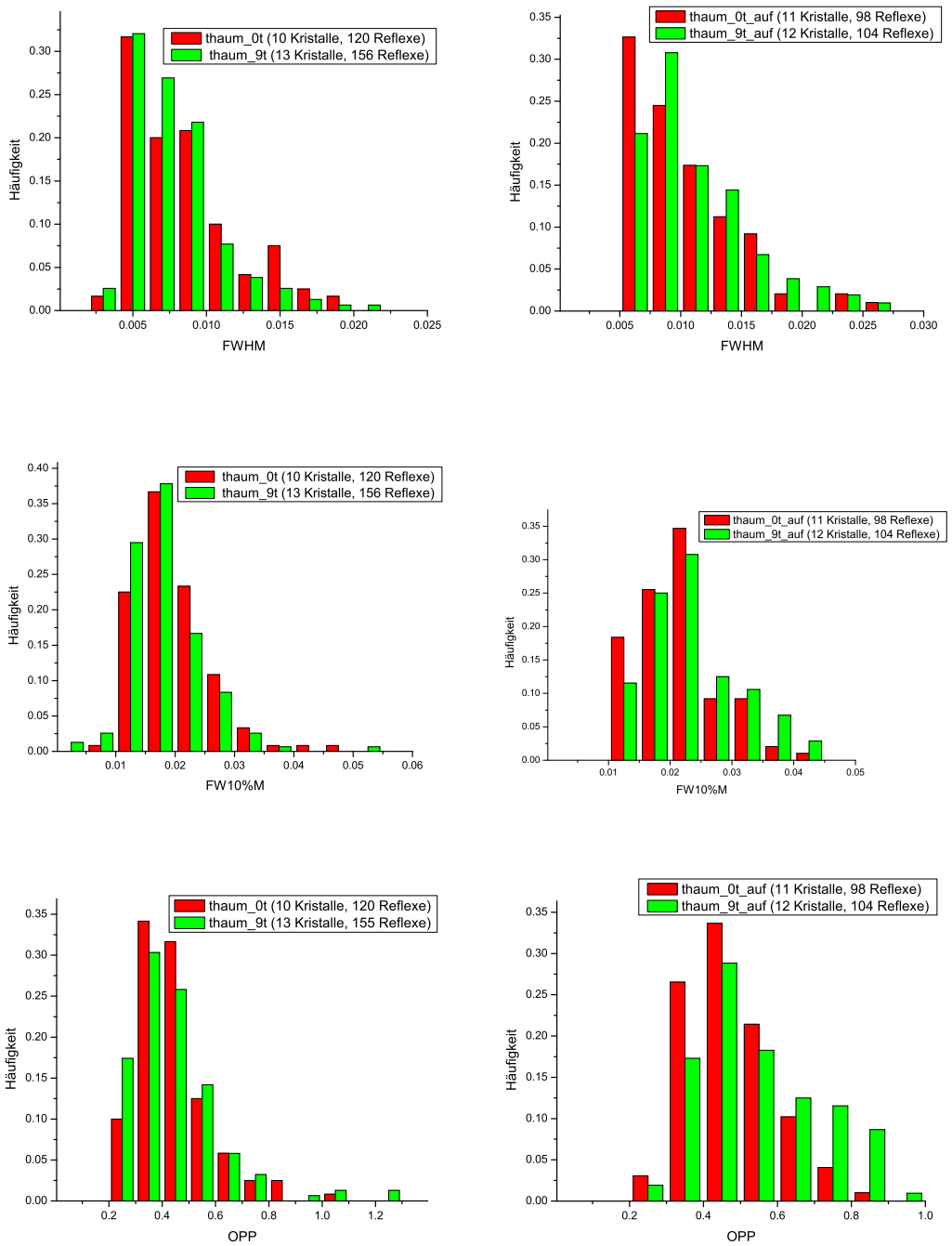

Abbildung 4.8: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Thaumatinkristallen aus nicht-aufgreinigtem Protein (links) und aus aufgereinigtem Protein (rechts), gezüchtet in einem 8.8 Tesla Magnetfeld mit vertikaler Feldrichtung (grün) und unter 0 Tesla (rot).

Tabelle 4.6: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der jeweils 3 Kristalle aus nicht-aufgereinigtem Thaumatin mit der kleinsten Mosaizität aus einem Magnetfeld von $8.8\,T$ bzw. der $0\,T$ Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden $0\,T$- (10 Kristalle) und $8.8\,T$ Gesamtgruppen (13 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
thaum_9t_15	0.0061(13)	0.010(2)	0.31(4)
thaum_9t_13	0.0075(16)	0.011(2)	0.35(6)
thaum_9t_11	0.0072(23)	0.011(3)	0.36(6)
thaum_0t_a_10	0.0067(20)	0.010(3)	0.34(5)
thaum_0t_a_13	0.0074(36)	0.012(7)	0.37(13)
thaum_0t_a_15	0.0088(37)	0.013(3)	0.40(6)
Mittelwert $8.8\,T$	0.0078(31)	0.018(6)	0.45(19)
Mittelwert $0\,T$	0.0086(37)	0.020(7)	0.44(14)

Tabelle 4.7: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zum Einfluss eines $8.8\,T$-Magnetfeldes in vertikaler Richtung auf die Mosaizität von Thaumatinkristallen ($8.8\,T$: 13 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 10 Kristalle (Gruppe B).

Parameter	W_A	$P(H_0)$ norm.
$FWHM$	133	0.40
$FW10\%M$	135	0.40
OPP	159	0.88

der Kontrollgruppe auf. Wie schon bei der Untersuchung der $5\,T$-Kristalle beobachtet sind die Kristalle auch hier von insgesamt guter Qualität.

Tabelle 4.8: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der 6 Thaumatinkristalle aus aufgereinigtem Proteinmaterial mit der kleinsten Mosaizität aus einem $8.8\,T$ Magnetfeld bzw. der $0\,T$ Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind die Mittelwerte der beiden $0\,T$- (11 Kristalle) und $8.8\,T$-Gesamtgruppen (12 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
thaum_auf_9t_21	0.0096(16)	0.013(1)	0.41(4)
thaum_auf_9t_10	0.0104(33)	0.014(5)	0.44(14)
thaum_auf_9t_22	0.0105(47)	0.015(6)	0.46(13)
thaum_auf_0t_06	0.0099(44)	0.014(5)	0.42(10)
thaum_auf_0t_02	0.0081(22)	0.012(4)	0.44(7)
thaum_auf_0t_13	0.0086(25)	0.013(3)	0.44(7)
Mittelwert $8.8\,T$	0.0112(45)	0.024(8)	0.54(16)
Mittelwert $0\,T$	0.0104(43)	0.021(6)	0.48(12)

Tabelle 4.9: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zum Einfluss eines $8.8\,T$-Magnetfeldes in vertikaler Richtung auf die Mosaizität von Thaumatinkristallen aus aufgereinigtem Proteinmaterial ($8.8\,T$: 12 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 11 Kristalle (Gruppe B).

Parameter	W_B	$P(H_0)$ Tab.
$FWHM$	131	> 0.20
$FW10\%M$	116	$0.10 - 0.20$
OPP	104	$0.05 - 0.10$

4.2.2 Trypsin

Kristalle aus Rindertrypsin wurden mit der *hanging drop vapour diffusion* Methode nach der in B.5 angegebenen Vorschrift in homogenen Magnetfeldern von $5\,T$ und $8.8\,T$ und in den entsprechenden $0\,T$ Kontrollgruppen gezüchtet. Bei den im Magnetfeld gewachsenen Kristallen konnte keine Vorzugsorientierung der Kristalle bezüglich der Magnetfeldrichtung gefunden werden. Die erhaltenen Kristalle wurden sowohl hinsichtlich ihrer Mosaizität als auch hinsichtlich ihrer integralen Beugungseigenschaften charakterisiert. Die Gitterparameter sowie die Symmetrie der Kristalle sind im Anhang in Tabelle D.3 angegeben.

Mosaizität

Die Mosaizitätsuntersuchungen an den Trypsinkristallen erfolgten an der Petra-1 Strahlführung bei einer Energie von $18\,keV$. Aufgrund der insgesamt relativ großen Mosaizität und der kleinen Kristallgröße wurden die Messungen ohne Bartels-Monochromator durchgeführt. Dabei konnten von 13 Trypsin Kristallen aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld insgesamt 152 von 156 möglichen Reflexprofilen und von 9 Kristallen der $0\,T$ Kontrollgruppe insgesamt 108 Reflexprofile (von 108 möglichen) aufgezeichnet werden. Die zur Mosaizitätsbestimmung gewählten Reflexe finden sich in Tabelle E.3.

In Tabelle 4.10 sind die mittleren Mosaizitätsparameter der jeweils 3 Kristalle mit den kleinsten OPP-Werten der beiden Gruppen und die gemittelten Mosaizitätsparameter der beiden Gesamtgruppen $0\,T$ und $8.8\,T$ angegeben. Dabei weisen die besten drei Kristalle der $0\,T$ Kontrollgruppe alle kleinere OPP-Werte als die besten Kristalle der $8.8\,T$-Gruppe auf. Anders verhält es sich bei den FWHM-Parametern. Hier zeigen die Kristalle aus dem Magnetfeld deutlich kleinere Werte. Bei den FW10%M-Werten der besten Kristalle der beiden Gruppen sind nur geringe Unterschied zu erkennen. Die Mittelwerte verhalten sich analog zu den jeweils 3 besten Kristallen der beiden Gruppen. Die Kristalle aus dem Magnetfeld weisen deutlich kleinere FWHM-Werte auf, die FW10%M-Werte sind in etwa ähnlich und bei den OPP-Parametern weisen die Kristalle aus dem Magnetfeld deutlich größere Werte auf. Dieses unterschiedliche Verhalten rührt daher, dass die einzelnen Mosaikblöcke der Kristalle aus dem Magnetfeld stärker gegeneinander verkippt sind als bei den Kristallen der $0\,T$ Kontrollgruppe. Durch diese größere Verkippung sind die Anteile der einzelnen Mosaikblöcke voneinander separiert. Bei der Ermittlung der FWHM-Werte wird jedoch nur der Anteil des größten bzw. am stärksten streuenden Mosaikblocks berücksichtigt während der OPP-Parameter dagegen die Beiträge aller Mosaikblöcke erfasst (s. dazu Abb. 3.26). Abbildung 4.9 zeigt die Histogramme der aus den Messdaten erhaltenen Mosaizitätsparameter der beiden untersuchten Gruppen.

In Tabelle 4.11 sind die Ergebnisse der *Wilcoxon*-Rangsummentests angegeben. Diese ergeben für die Verteilungen der FW10%M-Werte keine und für die FWHM- und

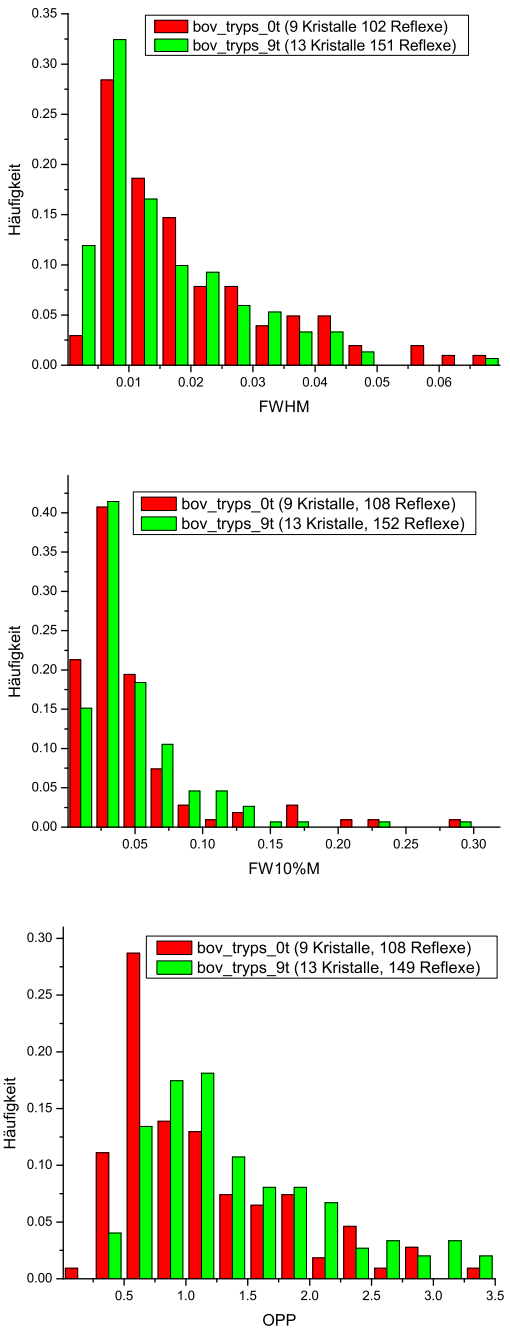

Abbildung 4.9: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von *bovine* Trypsinkristallen gezüchtet in einem 8.8 Tesla Magnetfeld (grün) und der 0 Tesla Kontrollgruppe (rot). Ist die Summe der in den Histogrammen berücksichtigten Häufigkeiten kleiner als 1 so liegen diese Werte außerhalb des dargestellten Bereiches.

OPP-Parameter auf 16% bzw 14% Niveau leicht signifikante Unterschiede. Während jedoch die Verteilung der FWHM-Werte für die Kristalle aus dem Magnetfeld zu kleineren Werten hin verschoben ist, ist dies für die OPP-Parameter genau umgekehrt. Hier weisen die Kristalle der Kontrollgruppe die geringeren Werte auf.

Tabelle 4.10: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte von *bovine* Trypsinkristallen der 6 besten Kristalle aus einem Magnetfeld von $8.8\,T$ und der $0\,T$ Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten sind zudem die Mittelwerte der beiden $0\,T$- (9 Kristalle) und $8.8\,T$-Gesamtgruppen (13 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
tryps_9t_08	0.007(2)	0.014(11)	0.68(32)
tryps_9t_09	0.006(2)	0.014(9)	0.95(17)
tryps_9t_19	0.0017(7)	0.024(9)	0.96(22)
tryps_0t_10	0.011(4)	0.016(5)	0.61(11)
tryps_0t_06	0.015(5)	0.019(7)	0.62(13)
tryps_0t_19	0.010(3)	0.016(7)	0.67(21)
Mittelwert $8.8\,T$	0.016(13)	0.049(39)	1.48(89)
Mittelwert $0\,T$	0.025(26)	0.047(47)	1.11(68)

Tabelle 4.11: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zum Einfluss eines $8.8\,T$-Magnetfeldes in vertikaler Richtung auf die Mosaizität von *bovine* Trypsinkristallen ($8.8\,T$: 13 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 9 Kristalle (Gruppe B).

Parameter	W_A	$P(H_0)$ norm.
$FWHM$	124	0.16
$FW10\%M$	155	0.74
OPP	172	0.14

Intensitätsdaten

Zudem wurde der Effekt eines $5\,T$-Magnetfeldes in horizontaler Richtung auf die Beugungseigenschaften von Trypsinkristallen untersucht. Die Datensammlung erfolgte an der X11-Strahlführung am DORIS-Speicherring in Hamburg. Die Datensammlungsparameter sind in Tabelle F.2 angegeben. Insgesamt wurden Datensätze von 12 Kristallen aus einem $5\,T$-Magnetfeld und 12 Kristallen der entsprechenden $0\,T$ Kontrollgruppe auf-

gezeichnet. Alle untersuchten Kristalle waren von ähnlicher Größe. In Abbildung 4.10 sind Auftragungen der *Completeness* (oben), des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) und des R_{merge} Wertes (unten) als Funktion der Auflösung für die beiden Gruppen gezeigt. In Tabelle 4.12 sind zudem die Qualitätsparameter der jeweils 3 besten Datensätze der beiden Gruppen (geordnet nach ihrer *Completeness*) sowie die Mittelwerte aller $0\,T$- bzw. $5\,T$-Datensätze angegeben. Sowohl aus den Abbildungen 4.10 als auch aus Tabelle 4.12 geht hervor, dass die 3 besten Datensätze mit der größten *Completeness* bzw. dem höchsten Auflösungsvermögen von Kristallen aus dem Magnetfeld stammen. Im Mittel unterscheiden sich die Qualitätsparameter jedoch nur geringfügig und *Wilcoxon*-Rangsummentests zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Verteilungen.

Tabelle 4.12: Qualitätsparameter der jeweils 3 besten Datensätze von *bovine* Trypsinkristallen aus einem $5\,T$-Magnetfeld bzw. der $0\,T$-Kontrollgruppe. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der $5\,T$- und $0\,T$-Gruppe (jeweils 12 Kristalle) angegeben.

Kristall	*Completeness*[a]	$< I/\sigma(I) >$ [b]	d_{min} [c]
bov_tryps_5t_17	59.4	14.83	1.25
bov_tryps_5t_20	58.2	16.16	1.27
bov_tryps_5t_10	58.2	15.51	1.26
bov_tryps_0t_05	57.9	15.56	1.28
bov_tryps_0t_02	57.3	11.73	1.30
bov_tryps_0t_13	56.9	16.22	1.29
Mittelwert $5\,T$	55.2(2.1)	13.6(2)	1.33(3)
Mittelwert $0\,T$	54.2(3.6)	12.7(2.5)	1.34(7)

[a] im Auflösungsbereich von 40Å – 1.10Å und für $I/\sigma(I) \geq 2$.

[b] im Auflösungsbereich von 40Å – 1.10Å und für $I/\sigma(I) \geq 0$.

[c] Kriterium: 50% *Completeness* bei $I/\sigma(I) \geq 2$.

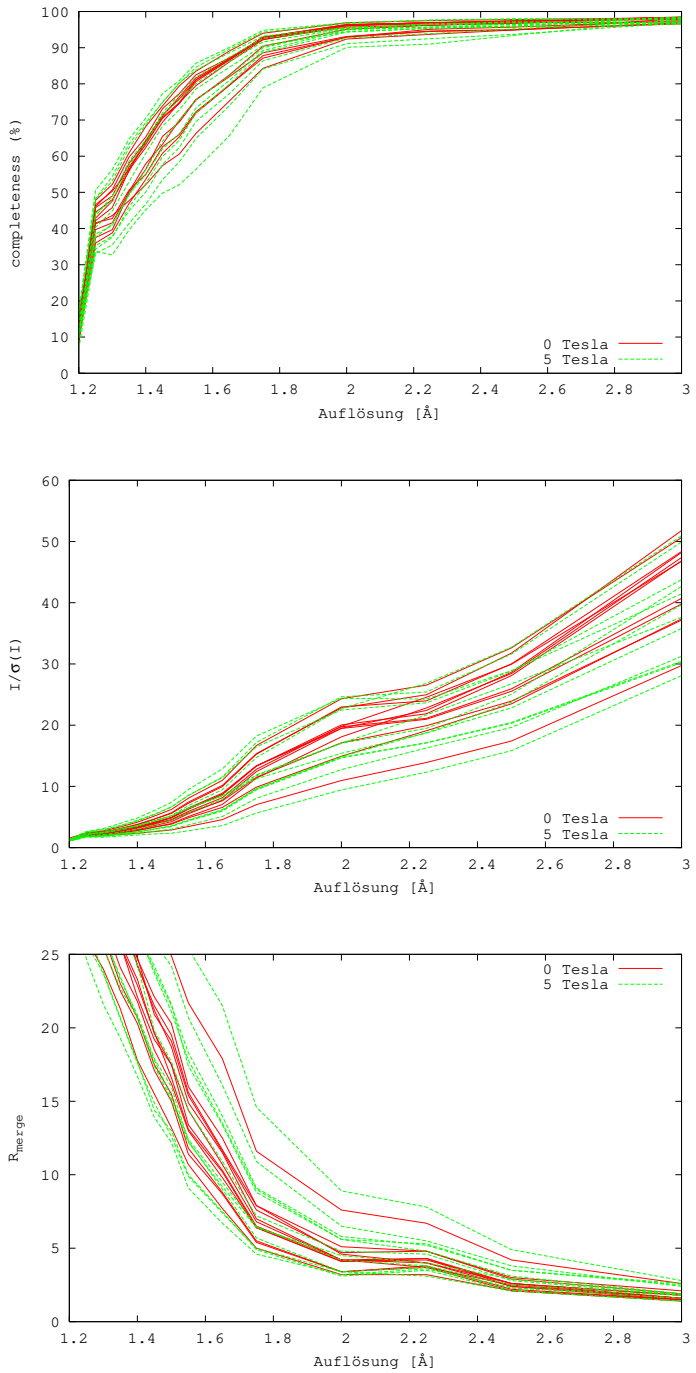

Abbildung 4.10: Auftragung der *Completeness* (oben), des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) und des R_{merge} Wertes (unten) als Funktion der Auflösung von *bovine* Trypsinkristallen gezüchtet in einem $5\,T$ Magnetfeld (grün) und ohne Magnetfeld (rot), (Kriterien: *Completeness* und R_{merge}: $I/\sigma(I) \geq 2$; $I/\sigma(I)$: $I/\sigma(I) \geq 0$).

Zusammenfassung

Die Kristallisation in einem 8.8 T-Magnetfeld wirkt sich uneinheitlich auf die Mosaizität von *bovine* Trypsinkristallen aus. Zwar weisen die Kristalle aus dem Magnetfeld geringere Halbwertsbreiten, zugleich aber auch größere OPP-Parameter auf. Dies dürfte auf stärker gegeneinander verkippten Mosaikblöcke bei den Kristallen aus dem Magnetfeld zurückzuführen sein (s. dazu Abb. 3.26). Eine Beurteilung diese Sachverhaltes bezüglich der Kristallqualität erscheint an dieser Stelle schwierig. Zum einen lassen kleinere FWHM-Werte auf eine geringere Mikromosaizität und damit auf eine stärkere Nahordnung schließen. Andererseits weisen Kristalle, die aus mehreren Mosaikblöcken bestehen, schlechtere geometrische Beugungseigenschaften auf. Da alle untersuchten Trypsinkristalle im Unterschied zu z.B. den untersuchten Lysozymkristalle jedoch ohnehin aus mehreren Mosaikblöcken bestehen ist diese stärkere Verkippung eher als wachstumsbedingt einzustufen und damit, wenn überhaupt, als negativer Effekt des Magnetfeldes auf die Kristallqualität anzusehen.

Bei den Intensitätsdaten zeigt sich ein leicht positiver Effekt durch die Kristallisation in einem 5 T Magnetfeld auf die *Completeness* und das mittlere $I/\sigma(I)$-Verhältnis sowie fast kein Unterschied auf das erreichbare Auflösungsvermögen. *Wilcoxon*-Rangsummentests ergeben für keinen der Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Verteilungen.

Insgesamt ergibt sich ein differenziertes Bild. Der Einfluss des Magnetfeldes auf die Mosaizität der Trypsinkristalle ist eher als negativ anzusehen, der Einfluss auf die Qualität der Intensitätsdaten ist dagegen, wenn auch nicht signifikant, eher leicht positiv.

4.2.3 Lysozym

Tetragonale Lysozymkristalle aus Hühnereiweiß wurden in einem Magnetfeld von $8.8\,T$ und einer entsprechenden $0\,T$-Kontrollgruppe gezüchtet. Die Kristallzüchtung erfolgte durch *hanging drop vapour diffusion* nach dem in Abschnitt B.1 angegebenen Rezept. Ein möglicher Einfluss des Magnetfeldes auf die Kristallqualität wurde durch den Vergleich von Intensitätsdatensätzen untersucht.

Ausrichtung der Kristalle

An einigen der im Magnetfeld gewachsenen Kristalle konnte eine Ausrichtung der Kristalle mit ihrer tetragonalen Achse entlang der Magnetfeldrichtung beobachtet werden. Ataka *et al.* beobachteten dagegen in ihren Experimenten bereits bei Feldstärken von $1.6\,T$ eine nahezu vollständige Ausrichtung der gewachsenen Kristalle [118]. Die in diesem Experiment beobachtete nur teilweise Ausrichtung der Kristalle dürfte wohl auf die Sedimentation der Kristalle zurückzuführen sein, im Zuge deren die Kristalle z.T. ihre Orientierung zum Magnetfeld verloren haben.

Intensitätsdaten

Die Aufzeichnung der Intensitätsdatensätze erfolgte an der X11-Strahlführung am DORIS-Speicherring in Hamburg. Die Datensammlungsparameter sind in Tabelle F.3 im Anhang angegeben. Es wurden jeweils 4 Kristalle aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld und 4 Kristalle der $0\,T$ Kontrollgruppe untersucht. Die Datensammlung erfolgte an schockgefrorenen Kristallen bei einer Temperatur von $100\,K$.

In Abbildung 4.11 sind die ermittelten Qualitätsparameter der Datensätze als Funktion der Auflösung gezeigt. Im Unterschied zu den entsprechenden Abbildungen in den anderen Abschnitten ist die Vollständigkeit für $I/\sigma(I) \geq 6$ gezeigt, da für die Messungen ein zu großer Detektorabstand gewählt wurde. Dadurch wurden die Reflexe des sonst verwendeten Auflösungskriteriums (50% Vollständigkeit bei $I/\sigma(I) \geq 2$) nicht erfasst. Das sonst verwendete Kriterium wäre in diesem Fall wenig aussagekräftig, da die Vollständigkeit für $I/\sigma(I) \geq 2$ bei allen Kristallen über 80% Prozent liegt und die Unterschiede sehr klein sind. In allen drei gezeigten Auftragungen stammt der beste Datensatz von einem Kristall der $0\,T$-Kontrollgruppe. Dieser weist, wie in Tabelle 4.13 angegeben, die höchste Vollständigkeit, die niedrigste Auflösungsgrenze und zudem den kleinsten B-Faktor auf. Allerdings sind die weiteren Datensätze, unter ihnen auch Kristalle aus dem Magnetfeld, von nur geringfügig schlechterer Qualität. Im Mittel sind die Datensätze von den Kristallen der $0\,T$-Kontrollgruppe leicht besser. *Wilcoxon*-Rangsummentests ergeben jedoch für keinen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Kristallen aus dem Magnetfeld und der Kontrollgruppe.

Tabelle 4.13: Qualitätsparameter der Datensätze von $8.8\,T$ und $0\,T$ Lysozymkristallen, geordnet nach abnehmender Vollständigkeit der Datensätze. Am Ende der Tabelle sind zudem die mittleren Parameter der beiden Gesamtgruppen für $8.8\,T$ und $0\,T$ (basierend auf jeweils 4 Kristallen) angegeben.

Kristall	*Compl.* [%][a]	$< I/\sigma(I) >$ [b]	d_{min} [c]	B-Faktor[d]	B-Faktor (rel.)[e]
lyso_9t_03	94.1	22.99	1.35	13.43	1.69
lyso_9t_02	93.7	25.59	1.24	11.87	0.07
lyso_9t_04	92.7	16.75	1.34	12.43	1.35
lyso_9t_01	92.6	20.76	1.27	12.17	0.62
lyso_0t_04	94.9	27.02	1.22	11.48	0.00
lyso_0t_02	94.1	20.28	1.24	12.41	0.49
lyso_0t_03	92.1	17.42	1.27	12.08	0.36
lyso_0t_01	89.4	17.35	1.33	12.34	0.30
Mittelwert $8.8\,T$	93.3(7)	21.5(3.7)	1.3(5)	12.5(7)	0.93(73)
Mittelwert $0\,T$	92.6(2.5)	20.5(4.5)	1.27(5)	12.1(4)	0.29(21)

[a] im Auflösungsbereich von 10Å $-$ 1.21Å und für $I/\sigma(I) \geq 2$.
[b] im Auflösungsbereich von 10Å $-$ 1.21Å und für $I/\sigma(I) \geq 0$.
[c] Kriterium: 50% *Completeness* bei $I/\sigma(I) \geq 6$.
[d] aus Wilson-Plot (Programm Wilson, CCP4) für den Auflösungsbereich bis 1.275Å.
[e] aus relativem Wilson-Plot (Programm XSCALE) für den Auflösungsbereich bis 1.21Å.

Zusammenfassung

Die Datensätze der untersuchten Kristalle beider Gruppen sind von guter Qualität. Der beste Datensatz stammt von einem Kristall der $0\,T$-Kontrollgruppe und auch im Mittel ergaben die Kristalle der Kontrollgruppe leicht bessere Datensätze. Allerdings sind die Unterschiede sehr klein und nicht signifikant. Das homogene $8.8\,T$ Magnetfeld hat daher keinen, bzw. wenn überhaupt, einen minimal negativen Einfluss auf die Datensatzqualität von tetragonalen Lysozymkristallen. In dieser Untersuchung wurde der Effekt des Magnetfeldes auf die Nahordnung untersucht, die im Unterschied zur Kristallmosaizität durch das Schockgefrieren der Kristalle nicht oder nur sehr wenig beeinflusst wird. Um den Einfluss von Strahlenschäden möglichst klein zu halten, erfolgte die Messung bei einer Temperatur von $100\,K$.

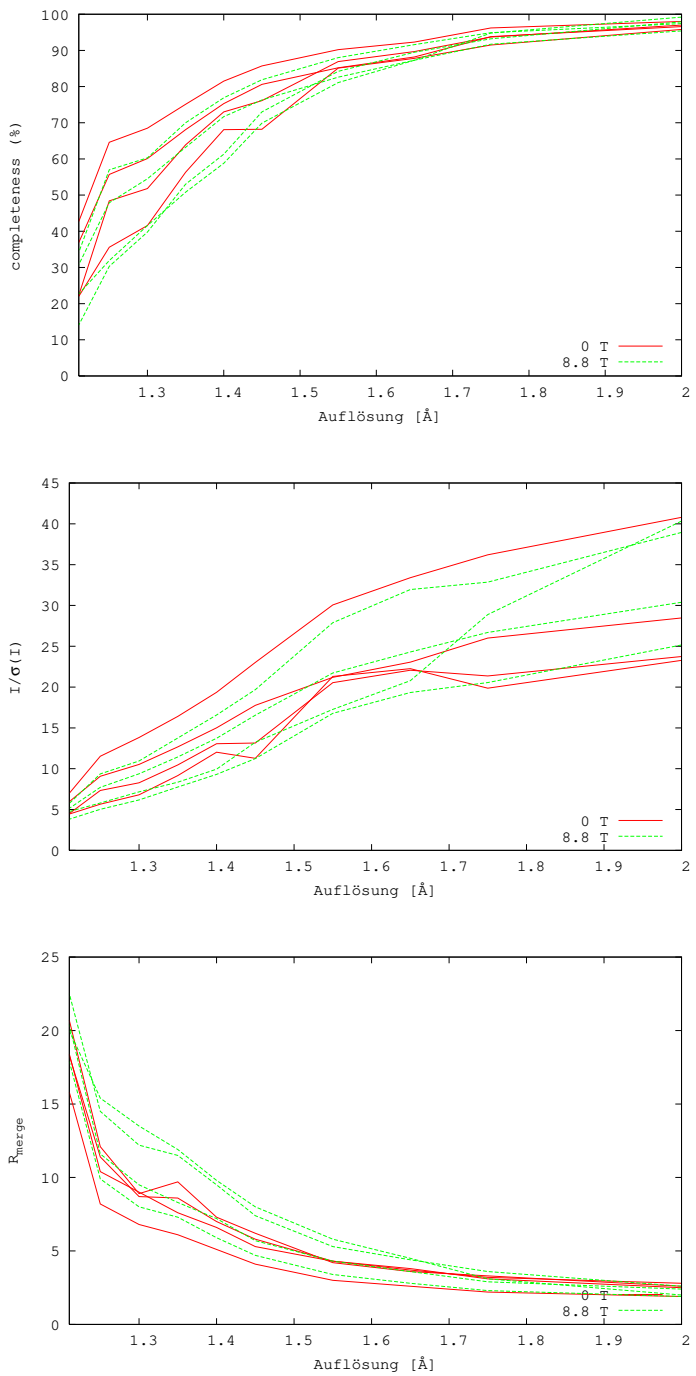

Abbildung 4.11: Auftragung der Vollständigkeit (oben) für $I/\sigma(I) \geq 6$, des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) für $I/\sigma(I) \geq 0$ und des R_{merge} Wertes für $I/\sigma(I) \geq 2$ (unten) als Funktion der Auflösung von Intensitätsdatensätzen von $8.8\,T$ (grün) und $0\,T$ Lysozymkristallen (rot).

4.2.4 Myoglobin

Im Unterschied zu Lysozym, Thaumatin und Trypsin, die allesamt diamagnetisch sind, handelt es sich bei Pottwal-Myoglobin um ein paramagnetisches Protein. Das paramagnetische Verhalten des Aquoferrimyoglobins rührt von dem *high-spin* Eisen(III)-Atom der Häm-Gruppe des Myoglobins her. Da Myoglobin ein Protein mit einer ausgesprochen großen magnetischen Anisotropie ist [77], wurde diese Substanz als weiteres Modellprotein ausgewählt. Mögliche Effekte durch ein Magnetfeld auf die Kristallqualität sollten hier deutlicher zu erkennen sein als bei den bisher untersuchten diamagnetischen Proteinen mit deutlich kleineren Anisotropien.

In Festkörper-NMR-Untersuchungen beobachteten Rothgeb und Oldfield erstmals die Ausrichtung von paramagnetischen Myoglobinkristallen in Magnetfeldern von $0.3\,T$ [123]. Die nach (0 0 1)-plattigen Kristalle richteten sich dabei mit ihrer a-Achse (64.6 Å [173]) senkrecht zur Richtung des Magnetfeldes aus. Kristalle von diamagnetischem *low-spin* Carbonyl-Myoglobin ließen sich dagegen auch in einem Magnetfeld von $8.5\,T$ nicht ausrichten. Versuche zur Kristallisation von Met-Myoglobinkristallen in homogenen Magnetfeldern wurden von Sakurazawa et al. unternommen [124].

Myoglobinkristalle wurden durch *batch*-Kristallisation in Magnetfeldern von $8.8\,T$ und $15.8\,T$ und in den jeweils entsprechenden $0\,T$-Kontrollgruppen nach dem in Abschnitt B.3 angegebenen Rezept gezüchtet. Dabei wurden insgesamt 3 voneinander unabhängige Kristallisationsversuche mit Ammoniumsulfatkonzentrationen (AS) von 73%, 75% und 77% durchgeführt.

Die erhaltenen Kristalle wurden anschließend hinsichtlich ihrer Mosaizität charakterisiert. Von einigen Kristallen wurden zudem Intensitätsdatensätze aufgezeichnet. Alle Mosaizitätsmessungen erfolgten an der Petra-1 Strahlführung. Die Intensitätsdatensammlungen wurden an der X11 Strahlführung am DORIS-Speicherring durchgeführt. Wie auch schon bei der Untersuchung der anderen Proteinkristalle, wurden aus allen Versuchsgruppen die am besten ausgebildeten Kristalle ohne sichtbare makroskopische Störungen ausgewählt.

Ausrichtung der Kristalle

Bei der Kristallisation in $8.8\,T$- und $15.8\,T$-Magnetfeldern wiesen sämtliche dort gewachsene Kristalle in allen durchgeführten Versuchen eine Orientierung zur Richtung des Magnetfeldes auf. Die nach (0 0 1) plattigen Kristalle richteten sich, wie bereits Rothgeb und Oldfield beschrieben [123] und in Abbildung 4.12 gezeigt, mit ihrer (0 0 1)-Fläche senkrecht zur Richtung des Magnetfeldes aus. Bei den $0\,T$-Kontrollgruppen konnte dagegen keine Vorzugsorientierung der Kristalle beobachtet werden.

Die im Magnetfeld gewachsenen Kristalle hafteten zudem in allen Versuchen an den Seiten der Probenröhrchens und waren nicht sedimentiert. Bei der Kristallisation der Kontrollgruppe dagegen befanden sich die Kristalle meist im unteren Teil des

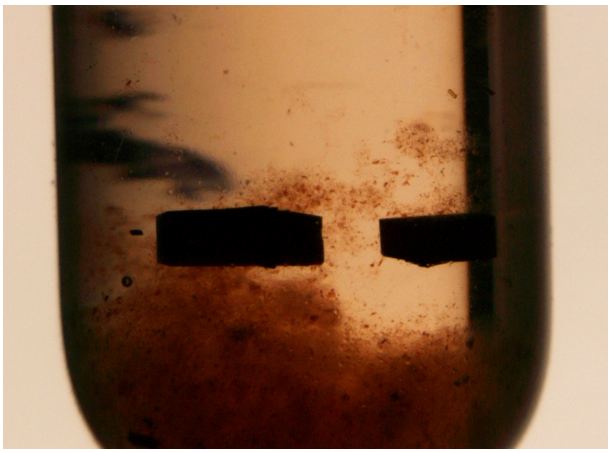

Abbildung 4.12: Ausrichtung von Pottwal-Myoglobinkristallen gezüchtet in einem 8.8 T Magnetfeld mit vertikaler Feldrichtung und einer Ammoniumsulfatkonzentration von 73%.

Probenröhrchens inmitten des (auch unten in Abbildung 4.12 zu sehenden) amorphen Präzipitates.

Mosaizität

Sämtliche Mosaizitätsmessungen an den Myoglobinkristallen erfolgten an der Petra-1 Strahlführung in Hamburg bei einer Energie von 18 keV. Aufgrund der relativ großen Mosaizität der Myoglobinkristalle wurde auf die Verwendung des *Bartels*-Monochromators verzichtet. Die Gitterparameter sowie die zu den Mosaizitätsmessungen ausgewählten Reflexe sind in den Tabellen D.4 bzw. E.4 im Anhang angegeben. In Tabelle 4.14 ist die Zahl der pro Gruppe untersuchten Kristalle sowie die Zahl der pro Gruppe gemessenen Reflexe angegeben.

In Tabelle 4.15 sind die Mosaizitätsparameter sowie die Kristallgröße der jeweils 3 Kristalle mit den kleinsten OPP-Parametern der 8.8 T-Gruppe und 0 T-Kontrollgruppe sowie die mittleren Mosaizitätsparameter der beiden Gesamtgruppen aus 73% AS angegeben. Der *beste* Kristall mit dem kleinsten OPP-Parameter entstammt der 0 T-Kontrollgruppe, allerdings stammt der Kristalle mit dem nächstkleineren OPP-Parameter aus dem 8.8 T-Magnetfeld. Dieser Kristall weist jedoch deutlich kleinere FWHM- und FW10%M-Werte auf, als der 0 T-Kristall mit dem kleinsten OPP-Parameter. Die *Mittelwerte* FWHM- und FW10%M-Parameter der beiden Gesamtgruppen unterscheiden sich nur geringfügig. Der mittlere OPP-Parameter ist für die 8.8 T-Kristalle deutlich größer als für die der Kontrollgruppe. Allerdings sind die Kristalle der 8.8 T-Gruppe mit einem mittleren Kristallvolumen von 2.28 mm^3 auch im Durchschnitt 14 mal grösser als die Kristalle der Kontrollgruppe. Daher dürften, wie bereits bei der Untersuchung der aufgereinigten Lysozymkristalle beobachtet, Kristall-

Tabelle 4.14: Anzahl der pro Gruppe gemessenen Reflexe und Myoglobinkristalle (AS = Ammoniumsulfat).

AS-Konzentration	Feldstärke [T]	Kristalle	Reflexe
73%	0	10	120
73%	8.8	7	79
75%	0	12	144
75%	8.8	10	120
77%	0	10	120
77%	8.8	10	120
77%	15.8	9	108

brüche mit großen Verkippungswinkeln für die Unterschiede der OPP-Parameter verantwortlich sein. *Wilcoxon*-Rangsummentests ergeben für die entsprechenden Verteilungen der OPP-Parameter signifikante (s. Tab. 4.18) und für die der Kristallgröße hoch signifikante Unterschiede (s. Tab. 4.19). In Abbildung 4.13 (links) sind die aus den Messdaten hervorgegangen Histogramme der FWHM-, FW10%M und OPP-Werte gezeigt.

Tabelle 4.15: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte und Kristallgröße der jeweils 3 besten Kristalle aus einem Magnetfeld von $8.8\,T$ bzw. der $0\,T$ Kontrollgruppe und aus 73% AS in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden $0\,T$- (10 Kristalle) und $8.8\,T$-Gesamtgruppen (7 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$	Vol $[mm^3]$
myo_0t_73_06	0.019(5)	0.050(19)	1.49(0.68)	0.34
myo_0t_73_02	0.023(6)	0.058(17)	1.78(1.03)	0.31
myo_0t_73_07	0.018(9)	0.061(41)	1.83(1.31)	0.09
myo_9t_73_06	0.013(8)	0.041(21)	1.74(1.01)	1.89
myo_9t_73_04	0.024(7)	0.081(68)	2.07(1.40)	2.22
myo_9t_73_01	0.016(8)	0.051(27)	2.50(1.33)	4.55
Mittelwert $0\,T$	0.024(11)	0.076(50)	2.12(1.30)	0.16(10)
Mittelwert $8.8\,T$	0.023(16)	0.075(53)	2.92(1.81)	2.28(1.11)

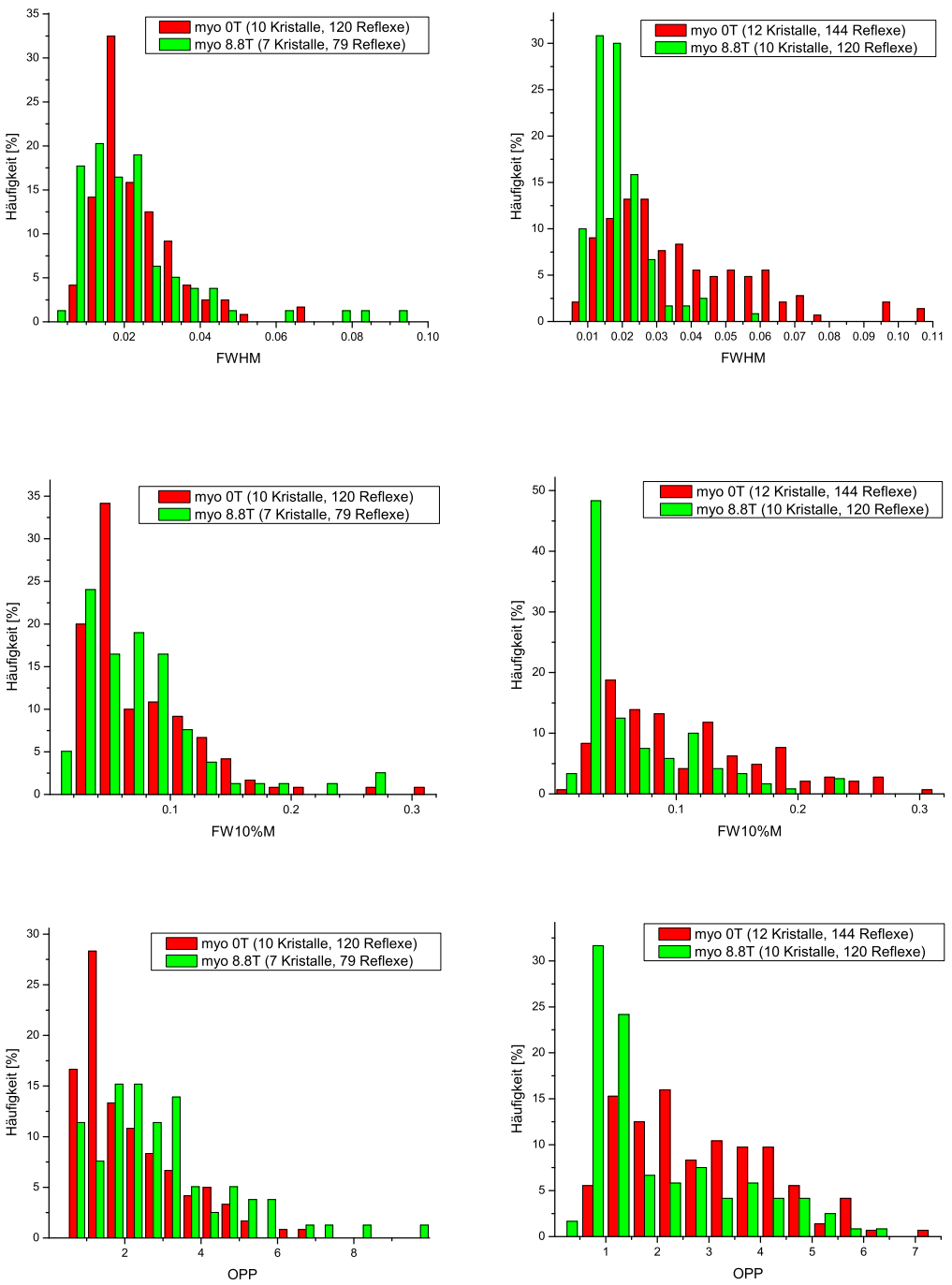

Abbildung 4.13: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Myoglobinkristallen aus 73% AS (links) und 75% AS (rechts), gezüchtet in einem 8.8 Tesla Magnetfeld mit vertikaler Feldrichtung (grün) und unter 0 Tesla (rot).

Die Mosaizitätsparameter der Myoglobinkristalle aus 75% AS mit den kleinsten OPP-Parametern sowie die Mittelwerte der $8.8\,T$- und $0\,T$-Gruppe sind in Tabelle 4.16 angegeben. Hier weisen die drei in der Tabelle angegebenen Kristalle aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld deutlich kleinere OPP-Parameter als die Kristalle der $0\,T$ Kontrollgruppe auf. Auch die FWHM- und FW10%M-Werte dieser Kristalle liegen deutlich unter denen der Kontrollgruppe. Wie mit den *besten* Kristallen der beiden Gruppen verhält es sich auch mit den *Mittelwerten* der Gesamtgruppen. Hier weisen die Kristalle aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld bei allen 3 Parametern deutlich kleinere Werte als die Kristalle der $0\,T$ Kontrollgruppe auf. *Wilcoxon*-Rangsummentests (s. Tab. 4.18) ergeben für die Verteilungen aller drei Parameter hoch signifikante Unterschiede. Zudem sind die Kristalle aus dem Magnetfeld ca. 6 mal größer als die Kristalle der Kontrollgruppe. Auch dieser Größenunterschied ist hoch signifikant (s. Tab. 4.19). In Abbildung 4.13 (rechts) sind zudem die Histogramme der FWHM-, FW10%M- und OPP-Parameter für die Kristallisation aus 75% AS gezeigt.

Tabelle 4.16: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte und Kristallgröße der jeweils 3 besten Kristalle aus einem Magnetfeld von $8.8\,T$ bzw. der $0\,T$ Kontrollgruppe und aus 75% AS in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten sind zudem die Mittelwerte der beiden $0\,T$- (12 Kristalle) und $8.8\,T$-Gesamtgruppen (10 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$	Vol $[mm^3]$
myo_0t_75_23	0.033(20)	0.081(52)	2.01(1.05)	0.04
myo_0t_75_22	0.030(15)	0.095(70)	2.15(1.28)	0.03
myo_0t_75_21	0.029(13)	0.083(42)	2.17(1.15)	0.08
myo_9t_75_21	0.021(13)	0.062(53)	1.56(1.13)	0.40
myo_9t_75_22	0.018(8)	0.048(32)	1.64(1.22)	0.34
myo_9t_75_16	0.017(5)	0.058(35)	1.73(1.11)	0.20
Mittelwert $0\,T$	0.037(21)	0.112(67)	2.81(1.40)	0.05(3)
Mittelwert $8.8\,T$	0.019(8)	0.064(48)	1.96(1.42)	0.29(7)

Die Kristallisation aus 77% AS erfolgte in Magnetfeldern von $8.8\,T$ und $15.8\,T$ sowie der entsprechenden $0\,T$ Kontrollgruppe. Die Mosaizitätsparameter der Kristalle mit den kleinsten OPP-Parametern der jeweiligen Gruppen sowie die mittleren Mosaizitätsparameter der Gesamtgruppen sind in Tabelle 4.17 angegeben. Die beiden Kristalle mit der *kleinsten* Mosaizität stammen aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld. Diese beiden Kristalle weisen auch die kleinsten FWHM- und FW10%M-Werte unter den in der Tabelle angegebenen Kristallen auf. Die Kristalle mit den nächstkleineren OPP-Parametern stammen aus der $0\,T$-Kontrollgruppe. Unter den in der Tabelle angegebenen Kristallen weisen

die Kristalle aus dem 15.8 T Magnetfeld die größten OPP-Parameter auf. Bei den *Mittelwerten* der Gesamtgruppen weisen die Kristalle der 0 T Kontrollgruppe bei allen 3 Qualitätsparametern die höchsten Werte bzw. die höchste Mosaizität auf. Insbesondere bei den FWHM-Werten weisen die Kristalle aus dem 8.8 T und 15.8 T Magnetfeld die deutlich kleineren Werte auf. *Wilcoxon*-Rangsummentests zeigen für die FWHM-Werte signifikante Unterschiede zwischen den Verteilungen der 8.8 T bzw. 15.8 T Kristalle und denen der 0 T Kontrollgruppe auf (s. Tab 4.18). Die Unterschiede zwischen den Verteilungen der FW10%M- und OPP-Parameter sind nicht so deutlich und daher auch nicht signifikant. Ein starker Einfluss des Magnetfeldes auf die Kristallgröße wie er bei der Kristallisation aus 75% und vor allem aus 73% AS beobachtet wurde, wurde bei der Kristallisation aus 77% AS nicht beobachtet. Die mittlere Kristallgröße ist für die Kristallisation bei 8.8 T am größten und bei 15.8 T am kleinsten, die Unterschiede sind jedoch relativ gering. In Abbildung 4.14 sind die Histogramme der FWHM-, FW10%M und OPP-Parameter für Kristalle aus 77% AS und 0 T, 8.8 T und 15.8 T gezeigt.

Tabelle 4.17: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der jeweils 3 besten Kristalle aus Magnetfeldern von 8.8 T und 15.8 T bzw. der 0 T Kontrollgruppe aus 77% AS in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der drei 0 T- (10 Kristalle), 8.8 T- (10 Kristalle) und 15.8 T-Gesamtgruppen (9 Kristalle) angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$	Vol $[mm^3]$
*myo*_0*t*_77_03	0.022(7)	0.048(13)	1.38(64)	0.10
*myo*_0*t*_77_05	0.017(6)	0.053(18)	1.39(54)	0.25
*myo*_0*t*_77_06	0.029(11)	0.054(20)	1.4(83)	0.16
*myo*_9*t*_77_08	0.018(15)	0.040(28)	1.07(62)	0.20
*myo*_9*t*_77_09	0.013(5)	0.034(14)	1.15(54)	0.12
*myo*_9*t*_77_07	0.018(10)	0.055(32)	1.59(1.00)	0.19
*myo*_16*t*_77_09	0.017(7)	0.058(41)	1.51(96)	0.06
*myo*_16*t*_77_05	0.017(10)	0.072(45)	1.55(83)	0.06
*myo*_16*t*_77_01	0.020(6)	0.054(20)	1.69(68)	0.05
Mittelwert 0 T	0.028(16)	0.076(46)	1.87(1.03)	0.11(9)
Mittelwert 8.8 T	0.022(13)	0.066(42)	1.81(1.09)	0.14(7)
Mittelwert 15.8 T	0.022(14)	0.072(48)	1.79(1.05)	0.09(7)

In den Tabellen 4.20 und 4.21 sind die mittleren FWHM- und OPP-Werte aller untersuchten Gruppen noch einmal zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass die Kristalle aus dem Magnetfeld bei allen AS-Konzentrationen geringere Mittelwerte ihrer

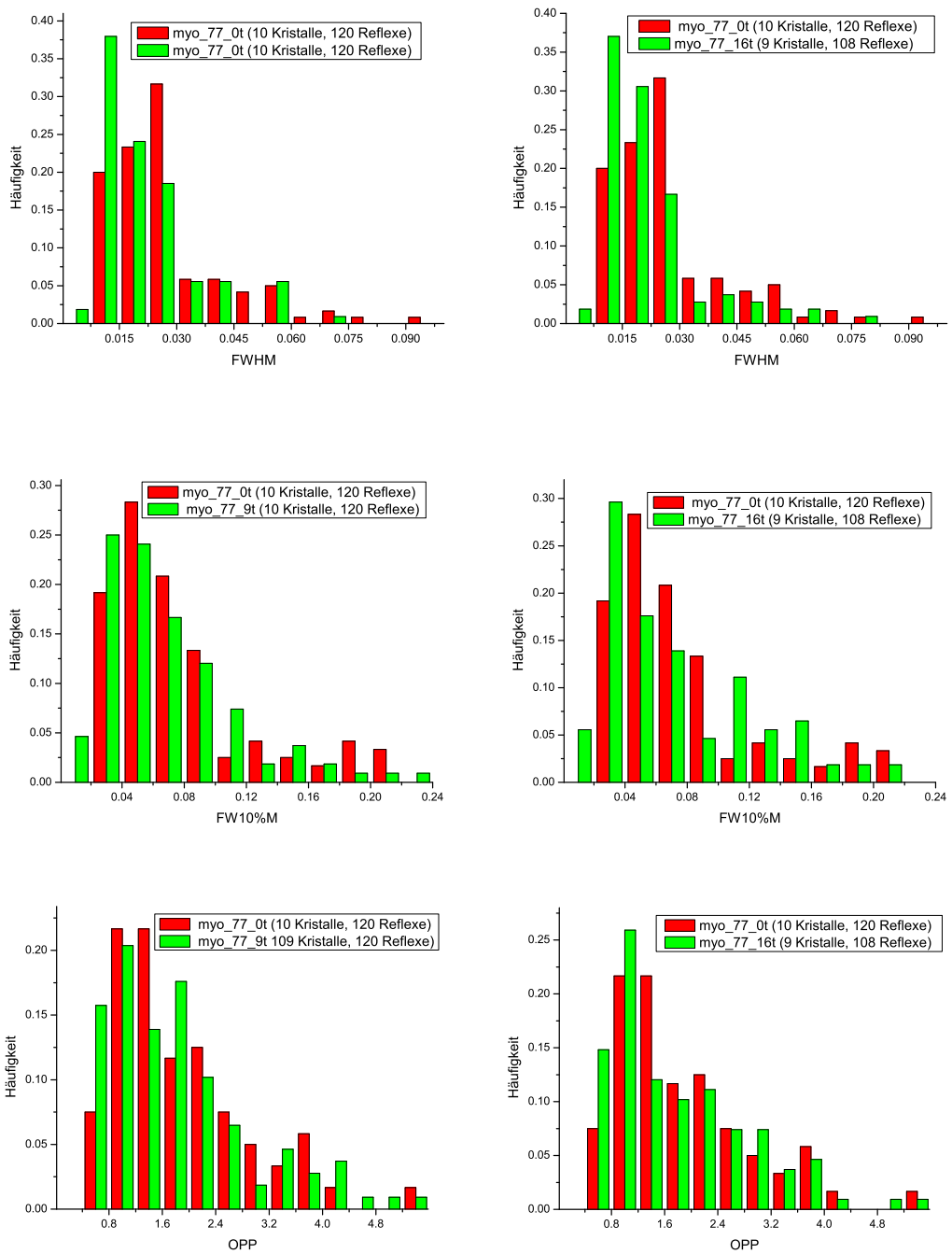

Abbildung 4.14: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Myoglobinkristallen aus 77% AS und 8.8 T und 0 T (links) und 15.8 T und 0 T (rechts). Die Mosaizitätsdaten der Kristalle aus dem Magnetfeld sind gün und die der Kontrollgruppe rot dargestellt.

Tabelle 4.18: Ergebnisse der *Wilcoxon*-Rangsummentests zum Einfluss homogener Magnetfelder von $8.8\,T$ und $15.8\,T$ auf die Qualität von Myoglobinkristallen. Es wurden jeweils die Verteilungen der Mosaizitätsparameter aus dem Magnetfeld mit denen der entsprechenden $0\,T$ Kontrollgruppen verglichen. Die Kristallisation erfolgte bei AS-Konzentrationen von 73%, 75% und 77%. Die Anzahl der jeweils pro Gruppe zugrundeliegenden Kristalle ist in Tabelle 4.14 angegeben.

Parameter	AS-Konz.	B $[T]$	W_a	$P(H_0)$ Tab.
$FWHM$	73%	8.8	65	> 0.20
$FW10\%M$	73%	8.8	65	> 0.20
OPP	73%	8.8	82	0.025 - 0.05
$FWHM$	75%	8.8	55	< 0.005
$FW10\%M$	75%	8.8	55	< 0.005
OPP	75%	8.8	66	< 0.005
$FWHM$	77%	8.8	85	0.05 - 0.10
$FW10\%M$	77%	8.8	94.5	> 0.20
OPP	77%	8.8	98	> 0.20
$FWHM$	77%	15.8	70	0.10
$FW10\%M$	77%	15.8	85	> 0.20
OPP	77%	15.8	86	> 0.20

Tabelle 4.19: Ergebnisse der *Wilcoxon*-Rangsummentests zum Einfluss homogener Magnetfelder und unterschiedlichen AS-Konzentrationen auf die Größe von Myoglobinkristallen. Die Anzahl der jeweils pro Gruppe zugrundeliegenden Kristalle ist in Tabelle 4.14 angegeben.

AS-Konz.	B $[T]$	W_a	$P(H_0)$ Tab.
73%	8.8	28	< 0.005
75%	8.8	55	< 0.005
77%	8.8	89	0.10 - 0.20
77%	15.8	93	> 0.20

Halbwertsbreiten aufweisen. *Wilcoxon*-Rangsummentests ergeben für die Kristallisation aus 75% hoch und für die Kristallisation aus und 77% AS leicht signifikante Unter-

schiede der entsprechenden Verteilungen (s. Tab. 4.18). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass der Mittelwert der $0\,T$-Gruppe bei der Kristallisation aus 75% AS im Vergleich zu den anderen Werten ungewöhnlich hoch ist. Ursache hierfür dürften ungünstige Kristallisationsverhältnisse dieser Gruppe sein. Ein *Wilcoxon*-Rangsummentest ergibt jedoch auch beim Vergleich der besten $8.8\,T$ Gruppe (75% AS) mit der besten $0\,T$ Gruppe (73% AS) hochsignifikante Unterschiede ($W_a = 55$, $P(H_0 < 0.01)$ der FWHM-Werte.

Tabelle 4.20: Mittlere Halbwertsbreiten (FWHM) von Myoglobinkristallen gezüchtet in $0\,T$, $8.8\,T$ und $15.8\,T$ Magnetfeldern bei AS-Konzentrationen von 73%, 75% und 77%.

AS-Konzentration	$0\,T$	$8.8\,T$	$16\,T$
73%	0.024(11)	0.023(16)	-
75%	0.037(21)	0.019(8)	-
77%	0.028(16)	0.22(13)	0.22(14)

Bei den OPP-Werten ergibt sich ein differenzierteres Bild. Während bei der Kristallisation aus 73% AS die Kristalle aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld signifikant höhere OPP-Werte als die der Kontrollgruppe aufweisen, weisen bei der Kristallisation aus 75% und 77% AS die Kristalle aus dem $8.8\,T$ bzw. $15.8\,T$ Magnetfeld die kleineren mittleren OPP-Parameter auf. Dieser Unterschied ist bei den Kristallen aus 75% AS besonders stark und hoch signifikant. Allerdings muß hier die bereits erwähnte besonders schlechte Qualität der Kristalle der $0\,T$-Gruppe aus 75% AS berücksichtigt werden. Die Unterschiede der OPP-Parameter bei der Kristallisation aus 77% AS durch das Magnetfeld sind allerdings gering und damit nicht signifikant.

Tabelle 4.21: Mittlere OPP-Parameter von Myoglobinkristallen gezüchtet in $0\,T$, $8.8\,T$ und $15.8\,T$ Magnetfeldern bei AS-Konzentrationen von 73%, 75% und 77%.

AS-Konzentration	$0\,T$	$8.8\,T$	$16\,T$
73%	2.12(1.30)	2.92(1.81)	-
75%	2.81(1.40)	1.96(1.42)	-
77%	1.87(1.03)	1.81(1.09)	1.79(1.05)

Kristallgröße

Hohe AS-Konzentrationen führen zu einer starken Übersättigung der Lösung. Daher sollten bei der Kristallisation aus 77% AS eine größere Anzahl kleinerer Kristalle entstehen als bei der Kristallisation aus 73% AS. In Tabelle 4.22 sind die mittleren Kristallgrößen der untersuchten Gruppen noch einmal zusammengefasst. Wird der bereits erwähnte Ausreißer bei der Kristallisation aus 75% AS und $0\,T$ einmal außer Acht gelassen, ist ein deutlicher Trend zu erkennen. Insbesondere bei der Kristallisation unter $8.8\,T$ nimmt die mittlere Kristallgröße mit abnehmender AS-Konzentration zu. Im Vergleich zu den Kristallen der $0\,T$ Kontrollgruppe führt das Magnetfeld zum Wachstum von größeren Myoglobinkristallen. Der Größeneffekt ist dabei umso stärker, je kleiner die AS-Konzentration ist. Während bei der Kristallisation aus 77% AS kein deutlicher Effekt auf die Kristallgröße zu erkennen ist, sind die Kristalle aus dem Magnetfeld bei der Kristallisation aus 73% im Mittel etwa 14 mal größer als die Kristalle der $0\,T$ Kontrollgruppe.

Tabelle 4.22: Mittlere Größen der untersuchten Myoglobinkristallen in Abhängigkeit von der AS-Konzentration und der Magnetfeldstärke.

AS-Konzentration	$0\,T$	$8.8\,T$	$16\,T$
73%	0.16(10)	2.28(1.11)	-
75%	0.05(3)	0.29(7)	-
77%	0.11(9)	0.14(7)	0.09(7)

Intensitätsdaten

Von einigen Kristallen (75% und 77% Ammoniumsulfat, $0\,T$ und $8.8\,T$ Magnetfeld) wurden im Anschluß an die Mosaizitätsmessungen an der X11 Strahlführung am DORIS-Speicherring Intensitätsdaten gesammelt. Die Datensammlungsparameter sind in den Tabellen F.4 und F.5 angegeben. Es konnten von 11 Kristallen aus dem $8.8\,T$-Magnetfeld und 12 Kristallen der $0\,T$-Kontrollgruppe aus 75% AS sowie von 4 Kristallen aus dem $8.8\,T$-Magnetfeld und 6 Kristallen der entsprechenden $0\,T$-Kontrollgruppe aus 77% AS auswertbare Datensätze erhalten werden.

In den Abbildungen 4.15 und 4.16 sind die Auftragungen der aus den Datensätzen erhaltenen Qualitätsparameter als Funktion der Auflösung gezeigt. Für die Kristallisation aus 75% AS ist ein beeindruckender Effekt durch die Kristallisation im Magnetfeld zu beobachten. Die Datenqualität sämtlicher Kristalle aus dem Magnetfeld ist besser als die des besten der $0\,T$-Kontrollgruppe. Bei der Kristallisation aus 77% AS stammen zwar die besten Kristalle ebenfalls aus dem Magnetfeld, allerdings weisen nur 2

der untersuchten 8.8 T-Kristalle (insges. 4 Kristalle) ein günstigeres $I/\sigma(I)$-Verhältnis und eine größere Vollständigkeit als die Kristalle der Kontrollgruppe (insges. 6 Kristalle) auf. Bei den R_{merge}-Werten weisen allerdings die Kristalle der Kontrollgruppe die kleinsten Werte auf.

In Tabelle 4.23 sind die mittleren Qualitätsparameter der jeweils 3 besten Datensätze der 0 T- und 8.8 T-Gruppen bei AS-Konzentrationen von 75% bzw. 77% sowie die Mittelwerte der 4 unterschiedlichen Gruppen angegeben.

Die mit Abstand *besten* Kristalle wurden aus 75% AS in einem Magnetfeld von 8.8 T gezüchtet. Die drei besten Kristalle dieser Gruppe weisen alle eine Auflösungsgrenze $d_{min} = 0.96$ Å auf und alle untersuchten Kristalle dieser Gruppe im Mittel eine Auflösungsgrenze von 0.97(2) Å. Der Kristall mit der kleinsten Auflösungsgrenze aus der 0 T Kontrollgruppe bei der Kristallisation aus 75% AS dagegen weist eine Auflösungsgrenze von 1.04 Å auf, der Mittelwert der Kontrollgruppe liegt bei 1.07(1) Å. Auch bei der Vollständigkeit, dem $I/\sigma(I)$-Verhältnis, und den B-Faktoren finden sich signifikante Unterschiede.

Weniger ausgeprägt sind die Unterschiede bei der Kristallisation aus 77% AS. Zwar stammt auch hier der Kristall mit der höchsten Auflösungsgrenze aus dem Magnetfeld, allerdings weist der beste Kristall der Kontrollgruppe eine nur um 0.01 Å kleinere Auflösungsgrenze auf. Im *Mittel* weisen die Kristalle aus dem 8.8 T Magnetfeld bei allen in der Tabelle angegebenen Parametern (abgesehen vom B-Faktor) leicht bessere Werte auf als die Kristalle der Kontrollgruppe. Signifikant sind diese Unterschiede jedoch nicht.

Tabelle 4.23: Qualitätsparameter der jeweils 3 besten Datensätze von Myoglobinkristallen aus einem 8.8 T Magnetfeld und der entprechenden 0 T-Kontrollgruppe und Ammoniumsulfatkonzentrationen von 75% und 77%. Die Datensätze innerhalb der einzelnen Gruppe sind nach abnehmender Vollständigkeit der Datensätze geordnet. Zudem sind am Ende der Tabelle die Mittelwerte der vier Gruppen angegeben. Die Mittelwerte basieren auf 11 bzw. 4 Kristallen aus dem 8.8 T-Magnetfeld aus 75% bzw. 77% AS und 11 bzw. 4 Kristallen der 0 T-Kontrollgruppe aus 75% bzw. 77% AS.

Kristall	*Completeness*[a]	$< I/\sigma(I) >$	d_{min}[b]	B-Faktor[c]	$< OPP >$[d]
myo_0t_75_21	71.7	11.99	1.06	9.82	2.17(1.15)
myo_0t_75_26	71.6	12.53	1.04	9.42	3.11(1.74)
myo_0t_75_19	71.6	12.82	1.06	9.47	3.03(1.52)
myo_9t_75_22	81.2	15.17	0.96	8.48	1.64(1.22)
myo_9t_75_17	81	12.7	0.96	8.3	2.49(1.62)
myo_9t_75_18	79.9	14.53	0.96	8.39	1.77(1.42)
Mittelw. 0 T	69.75(2.35)	11.85(49)	1.07(1)	9.83(21)	2.81(66)[e]
Mittelw. 8.8 T	78.4(1.87)	14.00(81)	0.97(2)	8.37(9)	1.96(63)[e]
myo_0t_77_06	76.8	13.2	1.05	8.48	1.4(87)
myo_0t_77_03	74.3	13.59	1.07	8.58	1.38(67)
myo_0t_77_05	71.9	11.79	1.08	9.23	1.39(57)
myo_9t_77_01	78.7	13.06	1.04	8.88	2.87(1.44)
myo_9t_77_09	74.1	11.34	1.09	8.91	1.15(54)
myo_9t_77_03	73.9	13.82	1.05	8.59	1.69(79)
Mittelw. 0 T	70.25(5.55)	11.81(1.45)	1.10(5)	8.83(53)	1.72(48)[e]
Mittelw. 8.8 T	74.3(3.37)	12.76(1.04)	1.07(4)	8.91(28)	1.7(83)[e]

[a] im Auflösungsbereich von 20 Å $-$ 1.04 Å und für $I/\sigma(I) \geq 2$.

[b] Kriterium: 50% Vollständigkeit bei $I/\sigma(I) \geq 2$.

[c] aus Wilson-Plot (Programm Wilson, CCP4) für den Auflösungsbereich bis 1.08 Å.

[d] Daten der Mosaizitätsmessungen an der Petra-1 Strahlführung.

[e] Es wurden nur die OPP-Werte der Kristalle berücksichtigt, an denen eine Intensitätsdatensammlung erfolgte.

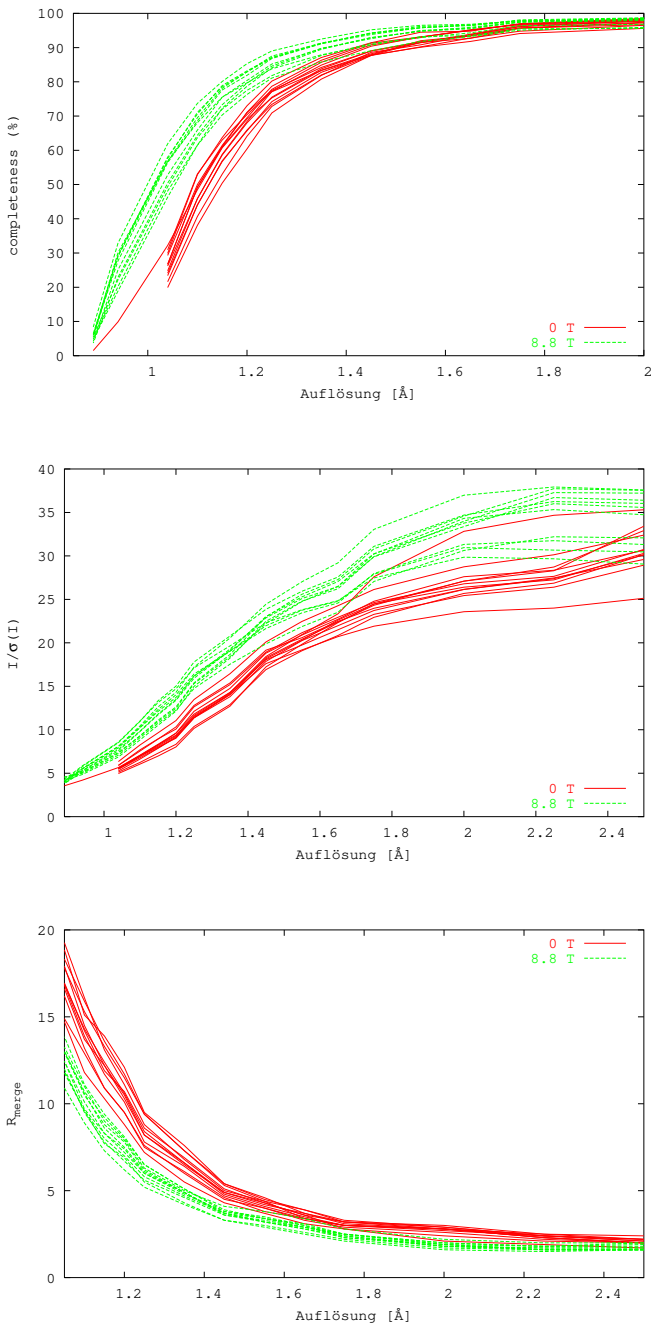

Abbildung 4.15: Auftragung der Vollständigkeit (oben), des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) und des R_{merge} Wertes (unten) als Funktion der Auflösung von Pottwal-Myoglobinkristallen gezüchtet unter 8.8 Tesla (grün) und 0 Tesla (rot) und einer Ammoniumsulfatkonzentration von 75% (Kriterium: $I/\sigma(I) \geq 3$).

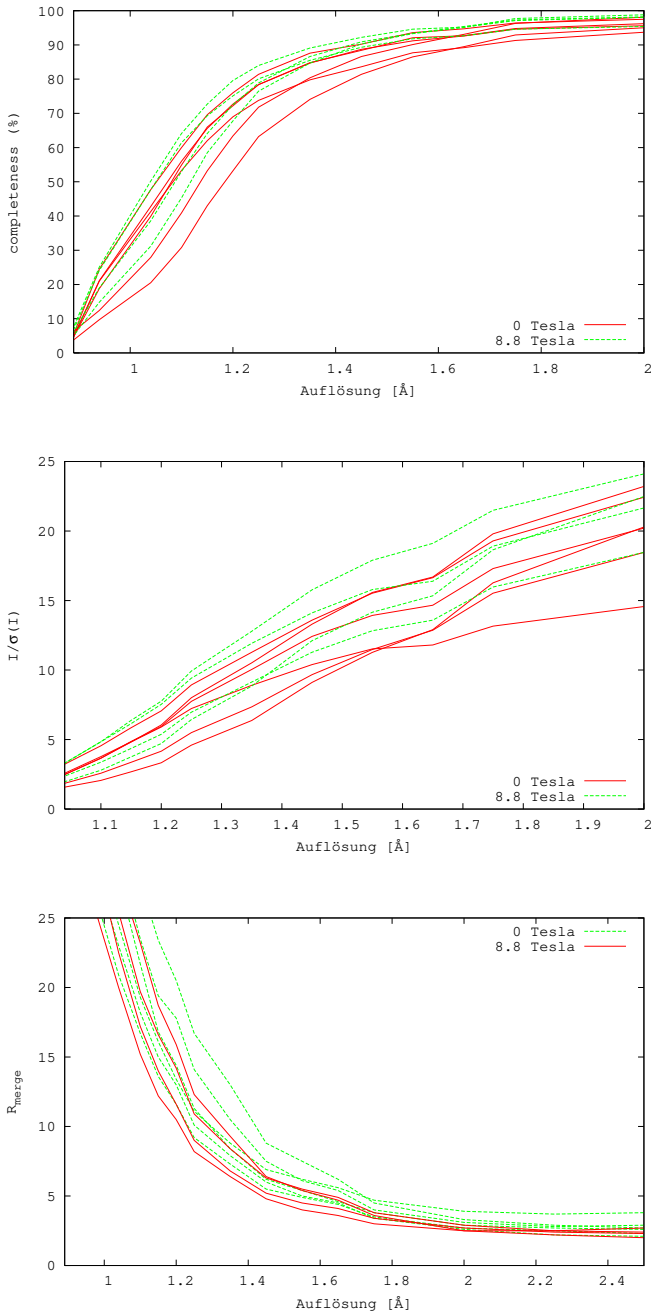

Abbildung 4.16: Auftragung der *Completeness* (oben), des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) und des R_{merge} Wertes (unten) als Funktion der Auflösung von Pottwal-Myoglobinkristallen gezüchtet unter 8.8 Tesla (grün) und 0 Tesla (rot) und einer Ammoniumsulfatkonzentration von 77% (Kriterium: $I/\sigma(I) \geq 3$).

Zusammenhang zwischen Mosaizität und B-Faktoren

Ebenso wie bei der Untersuchung des Effektes der Aufreinigung des Proteinmaterials auf die Kristallqualität von Lysozymkristallen (s. 4.1) wurden einige Myoglobinkristalle sowohl hinsichtlich ihr Mosaizität als auch anschließend hinsichtlich ihres integralen Streuvermögens charakterisiert. Daher ist es hier ebenfalls möglich, den Zusammenhang zwischen diesen Größen zu untersuchen. Abbildung 4.17 (oben) zeigt den Zusammenhang zwischen dem mittleren OPP-Parameter und dem durch *Wilson*-Plot ermitteltem B-Faktor der untersuchten Kristalle. Unten in der Abbildung ist der Zusammenhang zwischen den mittleren FWHM-Werten und dem B-Faktor der gleichen Kristalle gezeigt.

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass die Kristalle der einzelnen Gruppen ($0\,T$ und $75\%AS$, $8.8\,T$ und $75\%AS$ usw.) ähnliche Mosaizitätswerte und B-Faktoren aufweisen. Dabei ist zu beachten, dass die Kristalle aus 77% AS mit der doppelten Dosis pro Aufnahme belichtet wurden. Ein Zusammenhang zwischem der Mosaizität und dem B-Faktor ist hier zwar zu erkennen, allerdings weniger deutlich als bei den Lysozymkristallen aus aufgerinigtem bzw. nicht-aufgerinigtem Proteinmaterial (s. Abb. 4.5).

Zusammenfassung

Alle in Magnetfeldern von $8.8\,T$ bzw. $15.8\,T$ gewachsenen Myoglobinkristalle zeigen eine perfekte Ausrichtung zur Magnetfeldrichtung. Zudem führt die Kristallisation von Myoglobin aus 75% bzw. 73% AS in einem homogenen Magnetfeld von $8.8\,T$ zur Ausbildung signifikant größerer Kristalle. Bei der Kristallisation aus 77% AS haben Magnetfelder von $8.8\,T$ und $15.8\,T$ dagegen keinen großen Einfluss auf die Kristallgröße. Gleichzeitig weisen die Kristalle aus dem Magnetfeld in allen untersuchten Parametern, bis auf den mittleren OPP-Parameter bei der Kristallisation aus 73% AS, z.T. deutlich und stark signifikant kleinere Mosaizitätswerte als die entsprechenden Kristalle der Kontrollgruppe auf. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei der Kristallisation aus 75%. Zwar sind die Kristalle der $0\,T$-Kontrollgruppe aus 75% AS von besonders schlechter Qualität, aber auch im Vergleich zu den übrigen Kontrollgruppen sind die Kristalle aus 75% AS und $8.8\,T$ von signifikant besserer Qualität. Neben einer verringerten Mosaizität weisen die Kristalle aus 75% AS und dem $8.8\,T$ Magnetfeld auch signifikant bessere Beugungseigenschaften als die Kristalle der entsprechenden Kontrollgruppe auf. So beugen diese im Schnitt bis zu einer Auflösung von 0.97Å , während die Kristalle der Kontrollgruppe nur bis zu einer maximalen Auflösung von 1.07 Å beugen. Weniger deutlich ausgeprägt ist dieser Qualitätsunterschied bei der Kristallisation aus 77% AS. Hier weisen die Kristalle aus dem $8.8\,T$ Magnetfeld zwar im *Mittel* bei fast allen Qualitätsparametern bessere Werte auf, jedoch sind die Unterschiede hier nicht signifikant. Allerdings wurden aus diesen Gruppen auch deutlich weniger Kristalle untersucht.

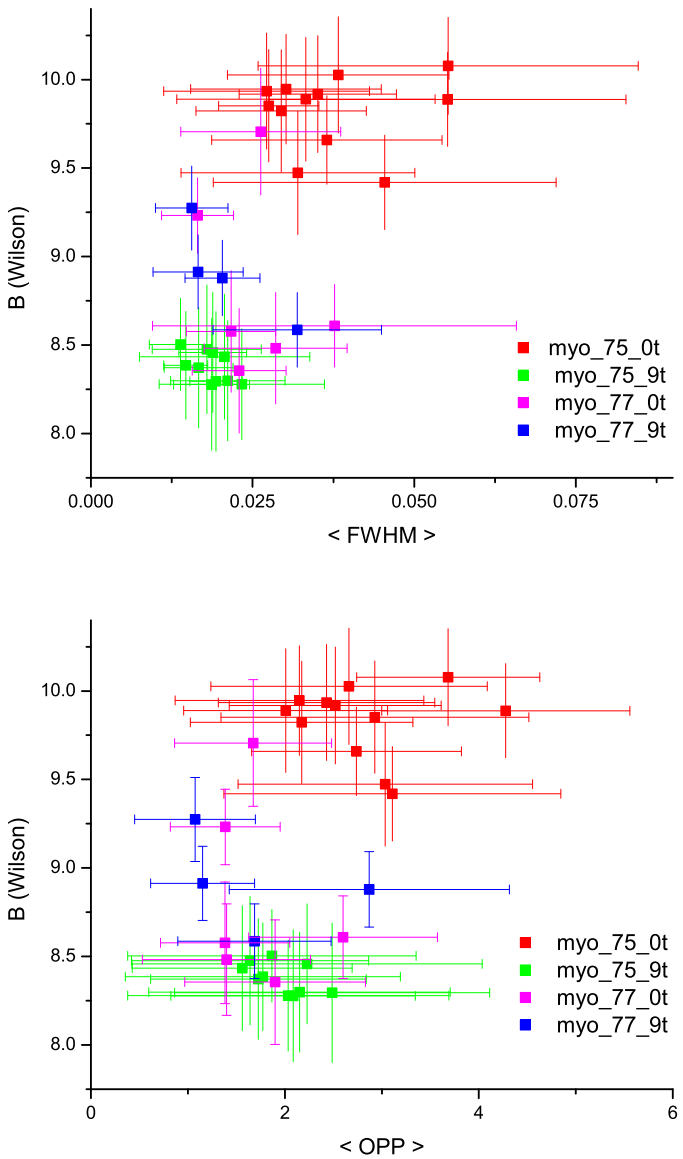

Abbildung 4.17: Zusammenhang zwischen den mittleren OPP-Parameter (oben) bzw. dem mittleren FWHM-Wert (unten) und dem durch *Wilson*-Plot ermittelten B-Faktor aller untersuchten Myoglobinkristalle.

4.3 Mikrogravitation

4.3.1 Qualitätsuntersuchungen an TIM-Kristallen

Die Kristallisation von Proteinen unter Mikrogravitation kann in einigen Fällen zu Kristallen von kleinerer Mosaizität und mit besseren integralen Beugungseigenschaften führen. Während der Effekt auf die integralen Beugungseigenschaften an verschiedenen Systemen und durch Messung einer größeren Anzahl von Kristallen relativ gut untersucht ist, wurden die Auswirkungen auf die Mosaizität bis auf einen Fall immer nur an $1 - 2$ Kristallen pro Gruppe untersucht.

Der Effekt der Kristallisation unter Mikrogravitation auf die Kristallmosaizität wurde an dem Protein 'Triose Phosphat Isomerase' ('TIM') mit einem Molekulargewicht von $\approx 24\,kD$ untersucht [174]. Zusätzlich wurden an einigen Kristallen im Anschluß an die Mosaizitätsmessungen Intensitätsdatensätze aufgezeichnet. Unter Mikrogravitation gezüchtete TIM-Kristalle ($0\,g$) und in einer Kontrollgruppe auf der Erde gezüchtete Kristalle ($1\,g$) wurden für diese Untersuchungen freundlicherweise von Ingrid Zeegers von der Universität Brüssel zur Verfügung gestellt.

Mosaizitätsuntersuchungen

Die Mosaizitätsmessungen an den unter Mikrogravitation ($0\,g$) und auf der Erde in Agarose-Gel gezüchteten ($1\,g$) TIM-Kristallen erfolgten an der Petra-1 Strahlführung bei einer Energie von $18\,keV$. An 11 unter Mikrograviation gezüchteten Kristallen ($0\,g$) konnten insgesamt 130 Reflexe und an 8 auf der Erde gezüchteten Kristallen ($1\,g$) konnten insgesamt 75 Reflexprofile aufgezeichnet werden. Pro Kristall konnten aufgrund des im Vergleich zu übrigen untersuchten Proteinkristallen relativ schlechten Streuvermögens nicht immer die angestrebten 12 Reflexe gemessen werden. Das schlechte Streuvermögen dürfte dabei zum einen auf die schlechte Qualität der Kristalle selbst und zum anderen auf die im Vergleich zu den übrigen Substanzen größere Elementarzelle und damit kleinerem Streuvermögen zurückzuführen sein.

In Tabelle 4.24 sind die mittleren Mosaizitätswerte und die Kristallgrößen der jeweils 3 besten unter $0\,g$ bzw. $1\,g$ gewachsenen TIM-Kristalle sowie die Mittelwerte der beiden Gesamtgruppen angegeben. Die Kristalldaten sind dabei in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte sortiert. Bei der Betrachtung fällt auf, daß die beiden mit Abstand besten Kristalle unter Mikrogravitation gezüchtet wurden. Sie weisen deutlich kleinere mittlere FWHM-, FW10%M und OPP-Werte auf, als der beste $1\,g$-Kristall. Bei den FWHM- und FW10%M-Werten ist dieser Effekt besonders deutlich. Im *Mittel* unterscheiden sich die Kristalle der beiden Gruppen jedoch nur geringfügig. Die $0\,g$ Kristalle weisen fast die gleiche mittlere Halbwertsbreite wie die $1\,g$-Kristalle auf. Nur die mittleren FW10%M und OPP-Werte sind geringfügig kleiner. *Wilcoxon*-Rangsummentests (s. Tab. 4.25) zeigen allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verteilungen.

In Abbildung 4.3.1 sind die Histogramme der FWHM, FW10%M und OPP-Werte gezeigt. In allen drei Histogrammen weisen die unter Mikrogravitation gezüchteten Kristalle bei den kleinsten Mosaizitätswerten die grösseren Häufigkeiten auf, gleichzeitig aber auch bei den größeren Mosaizitätswerten, so daß sich im Mittel nur geringe Unterschiede ergeben.

Tabelle 4.24: Mittlere FWHM-, FW10%M-, OPP-Werte und Kristallgrößen der jeweils 3 besten TIM-Kristalle gezüchtet unter Mikrogravitaion ($0\,g$) und auf der Erde ($1\,g$) in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden Gesamtgruppen angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$	Kristallgröße
*tim*_0*g*_04	0.013(2)	0.024(11)	0.94(15)	0.036
*tim*_0*g*_01	0.012(3)	0.022(6)	0.95(13)	0.024
*tim*_0*g*_02	0.022(8)	0.036(6)	1.20(15	0.014
*tim*_1*g*_14	0.019(2)	0.030(6)	1.03(14)	0.039
*tim*_1*g*_13	0.022(6)	0.039(12)	1.26(20)	0.046
*tim*_1*g*_05	0.020(6)	0.038(28)	1.33(32)	0.015
Mittelwert 0g	0.0236(92)	0.059(16)	1.30(25)	0.038(33)
Mittelwert 1g	0.0235(65)	0.066(18)	1.37(30)	0.041(13)

Tabelle 4.25: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zur Bestimmung des Signifikanzniveaus des Effektes der TIM-Kristallisation unter Mikrogravitation auf die Kristallmosaizität (Mikrogravitation ($0\,g$): 11 Kristalle (Gruppe A), Erde ($1\,g$): 8 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_a	$P(H_0)$ Tab.
$FWHM$	77	> 0.20
$FW10\%M$	74	> 0.20
OPP	89	> 0.20

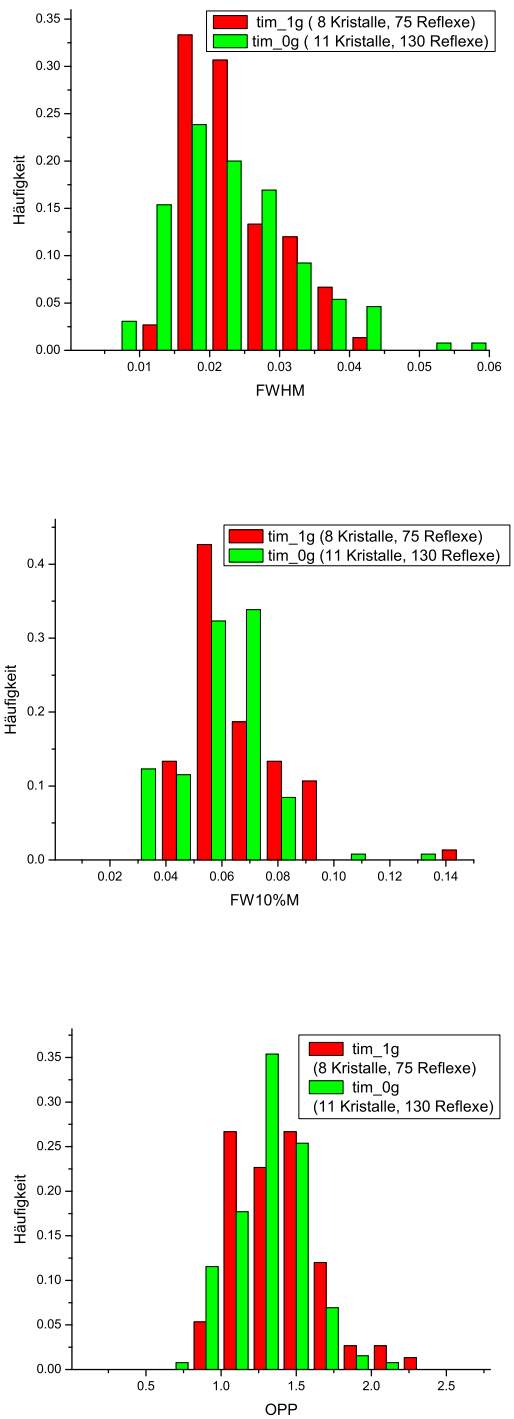

Abbildung 4.18: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von unter Mikrogravitation (grün) und in einem Gel auf der Erde gezüchteten TIM-Kristallen (rot).

Kristallgröße

Im Mittel weisen die Kristalle der beiden Gruppen ähnliche Größen auf. So sind $0\,g$-Kristalle im Mittel $0.038(33)\,mm^3$ und die $1\,g$-Kristalle $0.041(13)\,mm^3$ groß. Zu beachten ist jedoch, daß der mit einem Volumen von $0.128\,mm^3$ mit Abstand größte Kristall unter Mikrogravitation entstanden ist. Abbildung 4.3.1 zeigt eine Auftragung der mittleren OPP-Werte gegen die Kristallgröße. Im Unterschied zu der entsprechenden Auftragung der untersuchten Lysozymkristalle (s. Abb. 4.3) ist hier kein deutlicher Zusammenhang zwischen den mittleren OPP-Werten und der Kristallgröße zu erkennen.

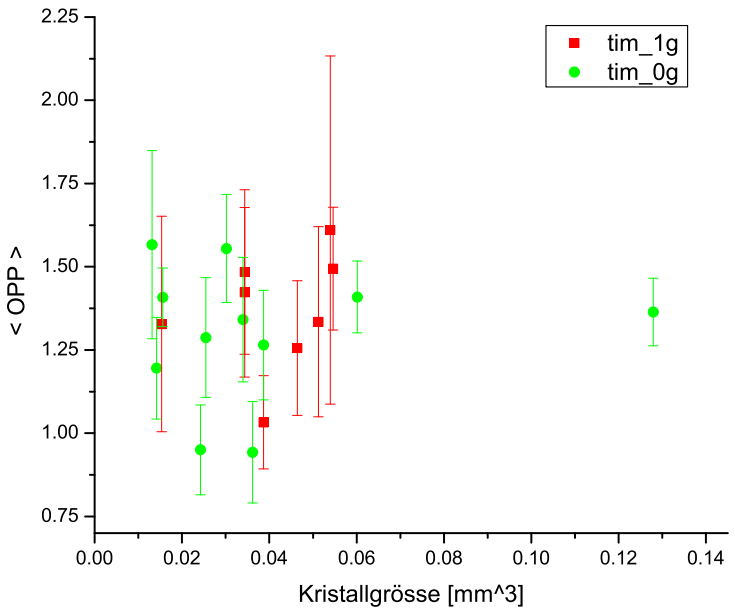

Abbildung 4.19: Auftragung der mittleren OPP-Werte gegen die Kristallgröße von unter Mikrogravitation (grün) und in Agarose-Gel auf der Erde gezüchteten TIM-Kristallen (rot).

Intensitätsdaten

Von einigen der zuvor hinsichtlich ihrer Mosaizität charakterisierten TIM-Kristallen wurden im Anschluß an der X11-Strahlführung am DORIS-Speicherring in Hamburg Intensitätsdatensätze aufgezeichnet. Die Datensammlungsparameter sind im Anhang in Tabelle F.6 angegeben. Die Auswahl der Kristalle erfolgte dabei zufällig und ohne Berücksichtigung der zuvor bestimmten Mosaizität. Es konnten dabei von 5 unter Mikrogravitation ($0\,g$) und 6 auf der Erde gewachsenen Kristallen ($1\,g$) auswertbare Datensätze erhalten werden. Abbildung 4.20 zeigt Auftragungen der Vollständigkeit, des $I/\sigma(I)$-Verhältnisses und des R_{merge} Wertes (unten) als Funktion der Auflösung von unter Mikrogravitation und auf der Erde in Agarose-Gel gezüchteten Kristallen.

Bei der Betrachtung fällt auf, daß die Datensätze der unter Mikrogravitation gezüchteten TIM-Kristalle gerade im Bereich höherer Auflösung von deutlich besserer Qualität sind. Sie zeigen ein Vollständigkeit bei einem günstigeren $I/\sigma(I)$-Verhältnis und einen geringeren R_{merge}-Wert. In Tabelle 4.26 sind die extrahierten Qualitätsparameter der jeweils drei besten Datensätze pro Gruppe sowie die Mittelwerte der beiden Gruppen angegeben. Die Datensätze sind dabei nach abnehmender Vollständigkeit sortiert. Hier zeigt sich ebenfalls, daß die drei Kristalle mit der größten Vollständigkeit und der höchsten Auflösungsgrenze unter Mikrogravitationsbedingungen gezüchtet wurden. Auch bei den *Mittelwerten* ergeben sich, bis auf den mittleren B-Faktor, durchgehend bessere Werte für die $0\,g$-Kristalle. *Wilcoxon*-Rangsummentests (s. Tab. 4.27) zeigen dementsprechend z.T. hochsignifikante Unterschiede der Verteilungen.

Tabelle 4.26: Qualitätsparameter der jeweils 3 besten Datensätze von unter Mikrogravitation und auf auf der Erde in Agarose-Gel gezüchtete TIM-Kristallen geordnet nach abnehmender Vollständigkeit der Datensätze. Am Ende der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden Gruppen ($0\,g$: 5 Kristalle, $1\,g$: 6 Kristalle) angegeben.

Kristall	Vollständigkeit[a]	$< I/\sigma(I) >$	d_{min}[b]	B-Faktor[c]	$< OPP >$[d]
tim_0g_14	63.4	10.29	1.87	37.63(20)	1.41(11)
tim_0g_15	62.6	10.63	1.9	36.94(19)	1.36(10)
tim_0g_06	60.1	10.4	1.91	38.31(18)	1.26(16)
tim_1g_18	58.3	9.28	1.97	38.27(19)	1.61(52)
tim_1g_12	55.8	9.13	2.04	38.19(19)	1.33(29)
tim_1g_20	55.2	10.15	2.03	36.92(21)	1.49(18)
Mittelwerte tim_0g	59.7(3.6)	9.5(1.3)	1.95(10)	36.9(1.4)	1.36(6) [e]
Mittelwerte tim_1g	54.9(2.1)	8.9(8)	2.07(7)	36.8(1.3)	1.38(13) [e]

[a] im Auflösungsbereich von $40\,\text{Å} - 1.64\,\text{Å}$ und für $I/\sigma(I) \geq 2$.

[b] Kriterium: 50% *Completeness* bei $I/\sigma(I) \geq 2$.

[c] aus Wilson-Plot (Programm Wilson, CCP4 [171]) für den Auflösungsbereich bis $2.20\,\text{Å}$.

[d] Daten der Mosaizitätsmessungen an der Petra-1 Strahlführung.

[e] Es wurden nur die OPP-Werte der in diese Daten eingegangenen Kristalle berücksichtigt.

Tabelle 4.27: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zur Bestimmung des Signifikanzniveaus des Effektes der TIM-Kristallisation unter Mikrogravitation auf die Qualität der Intensitätsdatensätze (Mikrogravitation ($0\,g$): 5 Kristalle (Gruppe A), Erde ($1\,g$): 6 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_a	$P(H_0)$ Tab.
Vollständigkeit	19	$0.025 - 0.005$
$< I/\sigma(I) >$	24	$0.10 - 0.20$
d_{min}	19	$0.025 - 0.005$
B-Faktor	29	> 0.20

4.3.2 Zusammenfassung

Die unter Mikrogravitation gezüchteten TIM-Kristalle weisen im Mittel ein leicht geringere Mosaizität als auf der Erde in Agarose-Gel gezüchtete Kristalle auf. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Die beiden Kristalle mit der mit Abstand kleinsten Mosaizität wurden allerdings unter Mikrogravitationsbedingungen erhalten.

Deutlicher ist ein positiver Effekt an den an einigen Kristallen gesammelten Intensitätsdatensätzen zu erkennen: Die $0\,g$-Kristalle beugen zu höherer Auflösung bei einem günstigerem Signal/Rausch-Verhältnis. Bis auf die Verteilungen der B-Faktoren sind diese Unterschiede signifikant bis hoch signifikant.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß beachtet werden, daß es sich bei den Kristallen der $1\,g$ Kontrollgruppe um in Agarose-Gel gezüchtete Kristalle handelt, während die Kristalle unter Mikrogravitation ohne den Zusatz von Agarose-Gel gezüchtet wurden. Der hier beobachtete positive Effekte durch die Kristallisation unter Mikrogravitation könnte jedoch ebenso auf einen negativen Einfluss des Geles auf die Kristallqulaität zurückzuführen sein. Umgekehrt könnte ein positiver Einfluss durch das Gel einen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Agarose-Gel bestehenden größeren Qualitätsunterschied verringern.

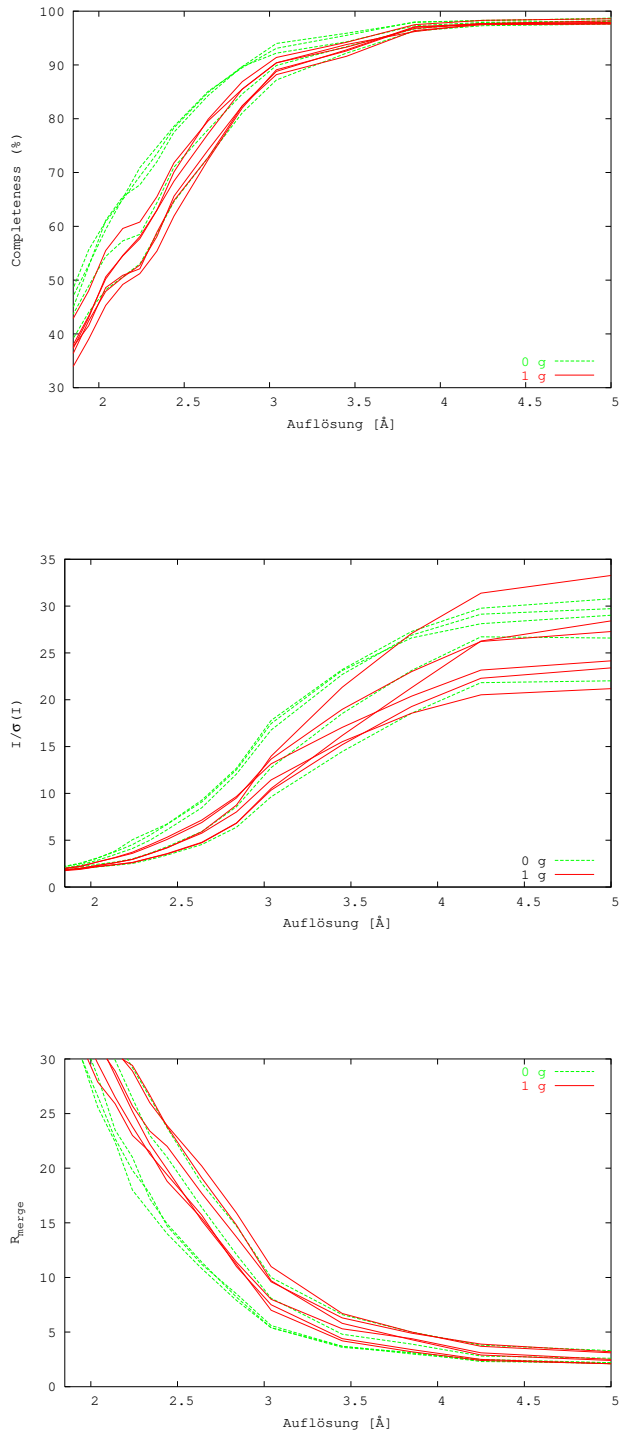

Abbildung 4.20: Auftragung der *Completeness* (oben), des durchschnittlichen $I/\sigma(I)$-Verhältnisses (Mitte) und des R_{merge}-Wertes (unten) als Funktion der Auflösung von unter Mikrogravitation (grün) und auf der Erde in einem Gel (rot) gezüchteten TIM-Kristallen (Kriterium: $I/\sigma(I) \geq 2$).

4.4 Inhomogene Magnetfelder

Zur Untersuchung des Effektes der Kristallisation in stark inhomogenen Magnetfeldern auf die Qualität von Proteinkristallen wurden die diamagnetischen Modellproteine Lysozym und Insulin sowie das paramagnetische Protein Myoglobin gewählt. Während für die beiden diamagnetischen Proteine die abstoßende Kraft durch die Feldinhomogenität zu einem der Mikrogravitation ähnlichen Zustand führt, erfahren paramagnetische Proteinmoleküle eine anziehende Kraft, die zu einem der Hypergravitation vergleichbaren Zustand führt.

Die Untersuchung des Effektes von inhomogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität an den drei Modellsubstanzen erfolgte durch Mosaizitätsmessungen.

4.4.1 Tetragonales Lysozym

Die Züchtung der tetragonalen Lysozymkristalle erfolgte durch *batch*-Kristallisation in Quarzglaskapillaren mit einem Durchmesser von $1\,mm$ nach dem in Abschnitt B.2 angegebenen Rezept. Die Quarzkapillare ist an beiden Seiten mit Wachs verschlossen. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.21 gezeigt. Die Stromstärke am PROLET (s. Abschn. 3.1) betrug während dem gesamten Kristallwachstum 150 A.

Ausrichtung und Sedimentation der Kristalle

Interessanterweise waren die im PROLET gewachsenen Lysozymkristalle nicht wie die Kristalle der Kontrollgruppe sedimentiert, sondern befanden sich, wie in Abbildung 4.21 veranschaulicht, im oberen Teil Quarzkapillare. Dies dürfte auf die abstoßende Kraft zurückzuführen sein, die die Kristalle im inhomogenen Magnetfeld erfahren. Im Unterschied zu den nach der *hanging-drop-vapour-diffusion* Methode in homogenen Magnetfeldern gezüchteteten Lysozymkristallen (s.a. Abschn. 4.2.3) zeigten zudem alle im inhomogenen Magnetfeld des PROLET gewachsenen Kristalle eine perfekte Ausrichtung mit ihrer tetragonalen c-Achse in Richtung des Magnetfeldes. Da das Magnetfeld hier mit ca. $4.5\,T$ deutlich schwächer als das bei der Kristallisation in den homogenen Magnetfeldern war, dürfte der weit geringere Ausrichtungsgrad dort, wie bereits vermutet, auf die Sedimentation der Kristalle zurückzuführen sein.

Mosaizität

Sämtliche Mosaizitätsmessungen wurden an der Petra-1 Strahlführung durchgeführt. Aufgrund der hohen Kristallperfektion der untersuchten Kristalle wurden alle Messungen mit dem in Abschnitt 3.3.1 näher beschriebenen Si-113 Bartels-Monochromator durchgeführt. Insgesamt wurden 143 Reflexprofile von 12 Kristallen aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET und 96 Reflexprofile von 8 Kristallen der entsprechenden Kontrollgruppe aufgezeichnet.

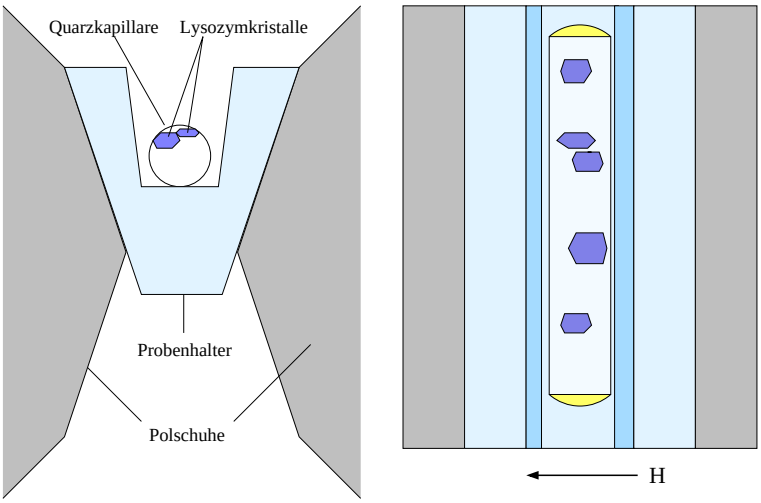

Abbildung 4.21: Seitenansicht der mit Kristallisationslösung gefüllten Quarzkapillare im inhomogenen Magnetfeld des PROLET. Die Lysozymkristalle sedimentieren nicht, sondern befinden sich aufgrund der repulsiven Kraft durch das inhomogene Magnetfeld im oberen Teil der Kapillare (links). Aufsicht auf den Versuchsaufbau. Alle Kristalle in der Kapillare sind in Richtung des Magnetfeldes ausgerichtet (rechts).

In Tabelle 4.28 sind die mittleren Mosaizitätsparameter der drei besten Kristalle der jeweiligen Gruppen sowie die mittleren Mosazitätsparameter der beiden Gesamtgruppen angegeben. Die Kristalle mit den kleinsten mittleren OPP-Parameter von 0.19(5) und 0.20(9) stammen dabei aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET, es folgen jedoch relativ dicht die Kristalle der Kontrollgruppe mit mittleren OPP-Parametern von 0.21(8) und 0.22(5).

Bei den drei *mittleren* Mosaizitätsparametern der beiden Gesamtgruppen weisen die Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld jedoch höhere Werte als die der Kontrollgruppe auf. Während die Unterschiede bei den FWHM-Werten sehr gering sind, sind diese bei den FW10%M- und OPP-Werten deutlich größer. Die ist vor allem darauf zurückzuführen, daß sich unter den Kristallen aus dem inhomogenen Magnetfeld einige Kristalle von deutlich schlechterer Qualität befinden.

Aus *Wilcoxon*-Rangsummentests ergeben sich, wie in Tabelle 4.29 angegeben, jedoch keine bzw. nur wenig signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Verteilungen. Lediglich die beiden Verteilungen der OPP-Werte unterscheiden sich unterhalb des 20%-Niveaus. Wenn überhaupt, ist also ein leicht negativer Einfluss des homogenen Magnetfeldes auf die Kristallmosaizität zu beobachten. Insgesamt weisen alle untersuchten Kristalle eine ausgesprochen geringe Mosaizität auf.

In Abbildung 4.22 sind die aus den Messdaten hervorgegangenen Histogramme der FWHM-, der FW10%M und OPP-Werte gezeigt. Während in dem Histogramm der FWHM-Werte kein deutlicher Effekt zu erkennen ist, weisen die Kristalle aus dem

inohomogenen Magnetfeld breitere FW10%M- und OPP-Werte als die entsprechenden Kristalle der Kontrollgruppe auf.

Tabelle 4.28: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der jeweils 3 besten Lysoym-Kristalle gezüchtet in einem stark imhomogenen Magnetfeld und in einer Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden Gesamtgruppen angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
*lyso_prol*_13	0.0037(12)	0.0091(25)	0.19(5)
*lyso_prol*_15	0.0050(25)	0.0084(36)	0.20(9)
*lyso_prol*_14	0.0039(20)	0.0097(38)	0.22(9)
*lyso_kontr*_12	0.0053(26)	0.0088(35)	0.21(8)
*lyso_kontr*_13	0.0045(21)	0.0084(26)	0.22(5)
*lyso_kontr*_10	0.0045(21)	0.0092(35)	0.23(8)
Mittelwert Prolet	0.0047(27)	0.0134(81)	0.38(24)
Mittelwert Kontrollgruppe	0.0045(21)	0.0095(35)	0.26(10)

Tabelle 4.29: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zur Bestimmung des Signifikanzniveaus des Effektes der Lysozymkristallisation im inhomogenen Magnetfeld des PROLET (Prolet: 12 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 8 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_a	$P(H_0)$
$FWHM$	127	> 0.20
$FW10\%M$	134	> 0.20
OPP	141	$0.10 - 0.20$

Zusammenfassung

Alle im PROLET gezüchteten Lysozymkristalle befanden sich im oberen Teil der Quarzkapillare, während sich die Kristalle der Kontrollgruppe im unteren Teil der Kapillare befanden, also sedimentiert waren. Zur Levitation von Lysozymkristallen ist nach in dem Abschnitt 2.5 in Tabelle 2.3 angegebenen Werten ein $\nabla B^2/2$-Wert von $1436\,T^2/m$ erforderlich. Diese ist ein weiterer Beleg dafür, daß die berechneten Feldverläufe des PROLET experimentell erreicht wurden. Mosaizitätsmessungen allerdings zeigen keinen positiven Effekt der Kristallisation von Lysozym im inhomogenen Magnetfeld des PRO-

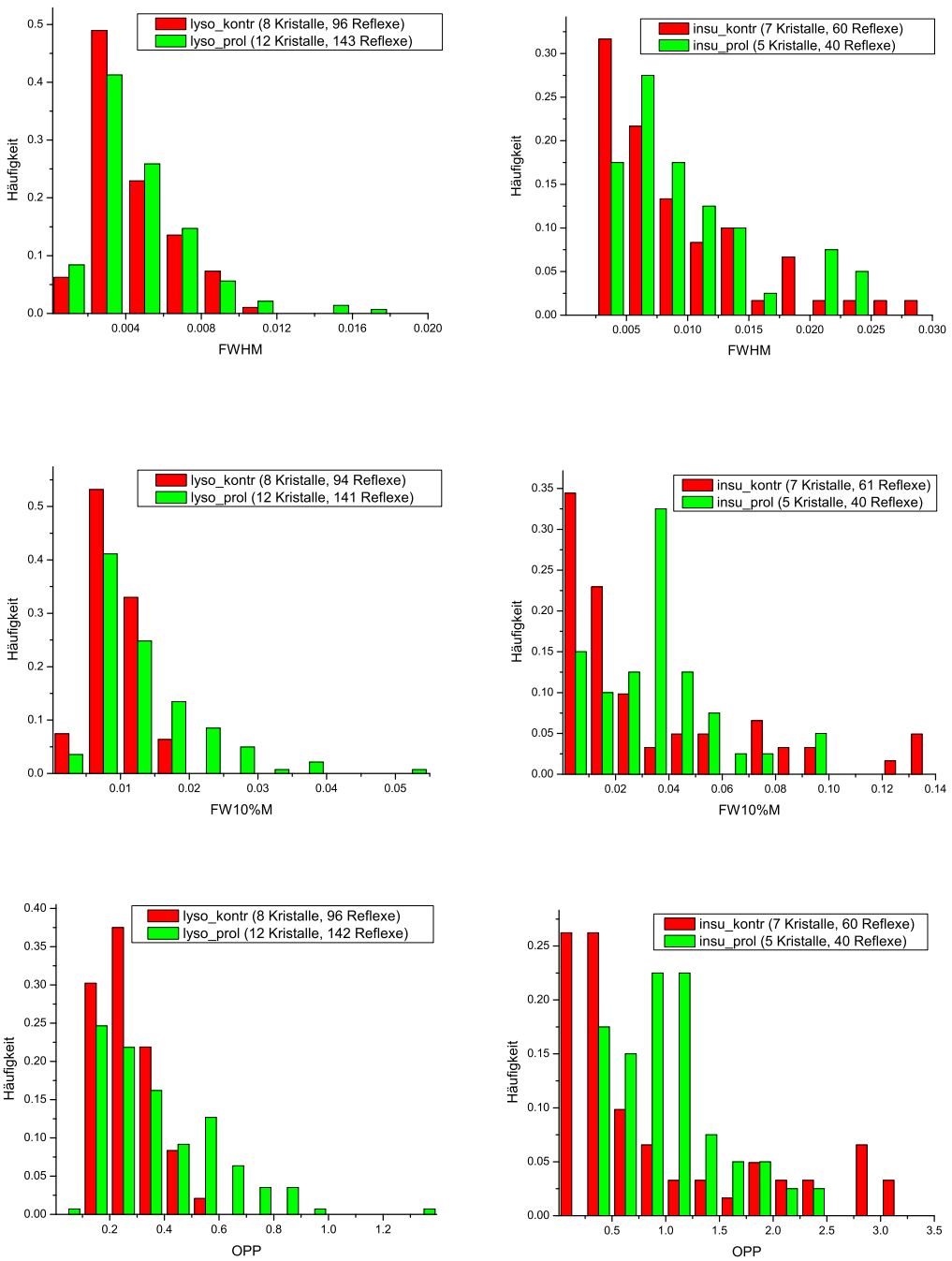

Abbildung 4.22: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Lysozym-Kristallen (links) und Insulin-Kristallen (rechts) gezüchtet im inhomogenen Magnetfeld des PROLET (grün) und der Kontrollgruppe (rot).

LET auf die Qualität der Kristalle. Bei den FW10%M- und den OPP-Werten ist sogar ein leicht negativer Einfluß zu erkennen.

4.4.2 Insulin

Porcine-Insulin Kristalle wurden nach der in Abschnitt B.4 angegebenen Vorschrift durch Senkung der Temperatur von 45° auf 20° ebenfalls in Quarzglaskapillaren gezüchtet.

Mosaizität

Die Mosaizitätsmessungen erfolgten an der SNBL-Strahlführung der ESRF in Grenoble. Bei der Untersuchung der Kristalle bereitete vor allem das Verrutschen der Kristalle in der Kapillare während der Messung Probleme. Aus diesem Grund konnten nur von einer relativ kleinen Zahl an Kristallen Reflexprofile aufgezeichnet werden. Zudem konnten pro Kristall aufgrund der bereits erwähnten experimentellen Beschränkungen im Schnitt nur etwa 8-9 anstelle der angestrebten 12 Reflexprofile pro Kristall gemessen werden. Insgesamt konnten 40 Reflexe von 5 Insulin-Kristallen aus dem inhomogenen Magnetfeld und 61 Reflexe von 7 Insulin-Kristallen der Kontrollgruppe aufgezeichnet werden.

In Tabelle 4.30 sind die mittleren Mosaizitätsparameter der jeweils drei Kristalle mit den kleinsten OPP-Werten pro Gruppe sowie die mittleren Mosaizitätsparameter der beiden Gesamtgruppen angegeben. Dabei fällt auf, daß der *beste* Kristall der Kontrollgruppe mit 0.20(4) einen weniger als halb so großen mittleren OPP-Parameter wie der beste Kristall aus dem inhomogenen Magnetfeld aufweist (0.42(6)). Auch die beiden weiteren Kristalle der Kontrollgruppe weisen eine deutlich geringere Mosaizität als die besten Kristalle der Versuchsgruppe auf. Die Unterschiede der *Mittelwerte* zwischen den beiden Gruppen sind jedoch sehr klein. Die Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld sind dabei von leicht höherer Mosaizität. Dies ist in erster Linie auf einen besonders schlechten Kristall der Kontrollgruppe zuruckzuführen und drückt sich auch in der größeren Standardabweichung bei den Kristallen der Kontrollgruppe aus.

Wilcoxon-Rangsummentests zeigen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Verteilungen. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 4.30 angegeben.

In Abbildung 4.22 (rechts) sind zudem die aus den Meßwerten erhaltenen Histogramme der drei aus den Reflexprofile extrahierten Mosaizitätsparameter gezeigt. Aus den Histogrammen geht hervor, daß die Kristalle der Kontrollgruppe eine geringere Mosaizität aufweisen. Insbesondere bei FW10%M- und den OPP-Parametern weisen die Kristalle der Kontrollgruppe bei kleinen Mosaizitätswerten höhere Häufigkeiten auf. Allerdings stammen auch die größten Mosaizitätswerte von einem Kristall der Kontrollgruppe.

Tabelle 4.30: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der jeweils 3 besten Insulin-Kristalle gezüchtet in einem stark imhomogenen Magnetfeld und in einer Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten in der Tabelle sind zudem die Mittelwerte der beiden Gesamtgruppen angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
*insu_prol*_02	0.0046(6)	0.0063(14)	0.42(6)
*insu_prol*_01	0.0108(59)	0.0199(112)	0.89(30)
*insu_prol*_05	0.0147(53)	0.0237(63)	0.97(13)
*insu_kontr*_06	0.0038(4)	0.0051(6)	0.20(4)
*insu_kontr*_02	0.0042(8)	0.0055(10)	0.27(13)
*insu_kontr*_04	0.0054(8)	0.0072(13)	0.27(4)
Mittelwert Prolet	0.0099(55)	0.035(21)	1.01(49)
Mittelwert Kontrollgruppe	0.0099(86)	0.034(37)	0.97(1.05)

Tabelle 4.31: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zur Bestimmung des Signifikanzniveaus des Effektes der Insulinkristallisation im inhomogenen Magnetfeld des PROLET (Prolet: 5 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 7 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_a	$P(H_0)$
$FWHM$	36	> 0.20
$FW10\%M$	37	> 0.20
OPP	38	> 0.20

Zusammenfassung

Insgesamt decken die untersuchten Insulinkristalle einen relativ breiten Bereich an Mosaizitäten ab. So beträgt die kleinste Halbwertsbreite 0.0038° und die größte gemessene Halbwertsbreite liegt bei 0.0557°. Die mit Abstand besten Kristalle stammen zwar aus der Kontrollgruppe, allerdings wiesen beide Gruppe ähnliche mittlere Mosaizitätswerte auf und es liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verteilungen vor. Hierbei muß jedoch die relativ kleine Stichprobengröße mit nur 5 bzw. 6 Kristallen berücksichtigt werden.

4.4.3 Myoglobin

Wie bereits erwähnt, erfahren die paramagnetischen Myoglobin-Moleküle in Unterschied zu den diamagnetischen Molekülen in inhomogenen Magnetfeldern eine Kraft hin zu Orten größerer Feldstärke. Aufgrund der ca. 10-100 mal stärkeren Wechselwirkung von paramagnetischen Stoffen mit Magnetfeldern im Vergleich zu diamagnetischen Substanzen sollte daher ein der Hypergravitation ähnlicher Zustand vorliegen. Die paramagnetischen Moleküle sollten daher im unteren Teil der Probe eine erheblich höhere Konzentration als im oberen Teil aufweisen. Die Kristallisation von paramagnetischem Pottwal-Myoglobin erfolgte durch *batch*-Kristallisation in Glaskapillaren nach der in Abschnitt B.3 angegebenen Vorschrift aus 75% AS.

Sedimentation und Morphologie der Kristalle

Sowohl die Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET als auch die Kristalle der Kontrollgruppe befanden sich im unteren Teil der Quarzglaskapillare. Allerdings wiesen die Kristalle aus dem PROLET eine stark gestörte Morphologie auf. Die Kristalle zeigten dabei bereits mit bloßem Auge sichtbare Wachstumsstufen und Terrassen. Eine mögliche Ausrichtung der Kristalle war aufgrund dieser stark gestörten Morphologie nicht eindeutig zu beurteilen. Die Kristalle der Kontrollgruppe waren dagegen von normaler gut ausgebildeter Morphologie.

Mosaizität

Die Untersuchung der Kristalle erfolgte an der Petra-1 Strahlführung bei einer Energie von $18\,keV$. Da Myoglobin-Kristalle eine hohe Mosaizität aufweisen erfolgten die Messungen ohne *Bartels*-Monochromator. Insgesamt wurden 96 Reflexprofile von 8 Kristallen aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET und 60 Reflexprofile von 5 Kristallen der Kontrollgruppe aufgezeichnet. In Tabelle 4.32 sind die mittleren Mosaizitätsparameter der jeweils 3 besten Kristalle aus den beiden Gruppen sowie die mittleren Mosaizitätsparameter der beiden Gesamtgruppen angegeben. Es fällt auf, daß der beste Kristall aus dem inhomogenen Magnetfeld bei allen drei Qualitätsparametern eine höhere Mosaizität aufweist als alle drei in der Tabelle angegebenen Kristalle der Kontrollgruppe. Auch bei den Mittelwerten weisen die Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld bei allen drei Parametern deutlich höhere Werte auf. Dieser Effekt ist bei den FW10%M und OPP-Werten besonders ausgeprägt.

Die Ergebnisse der *Wilcoxon*-Rangsummen Tests sind in Tabelle 4.4.3 angegeben. Dabei unterscheiden sich die Verteilungen der FWHM-Parameter signifikant unterhalb des 10%-Niveau, die Verteilungen des FW10%M-Parameters unterhalb des 5%- und die des OPP-Parameters sogar unterhalb des 1%-Niveaus. Die Myoglobin-Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld weisen also eine im Vergleich zu den Kristallen der Kontrollgruppe hoch-signifikant höhere Mosaizität auf. In Abbildung 4.23 sind zudem die

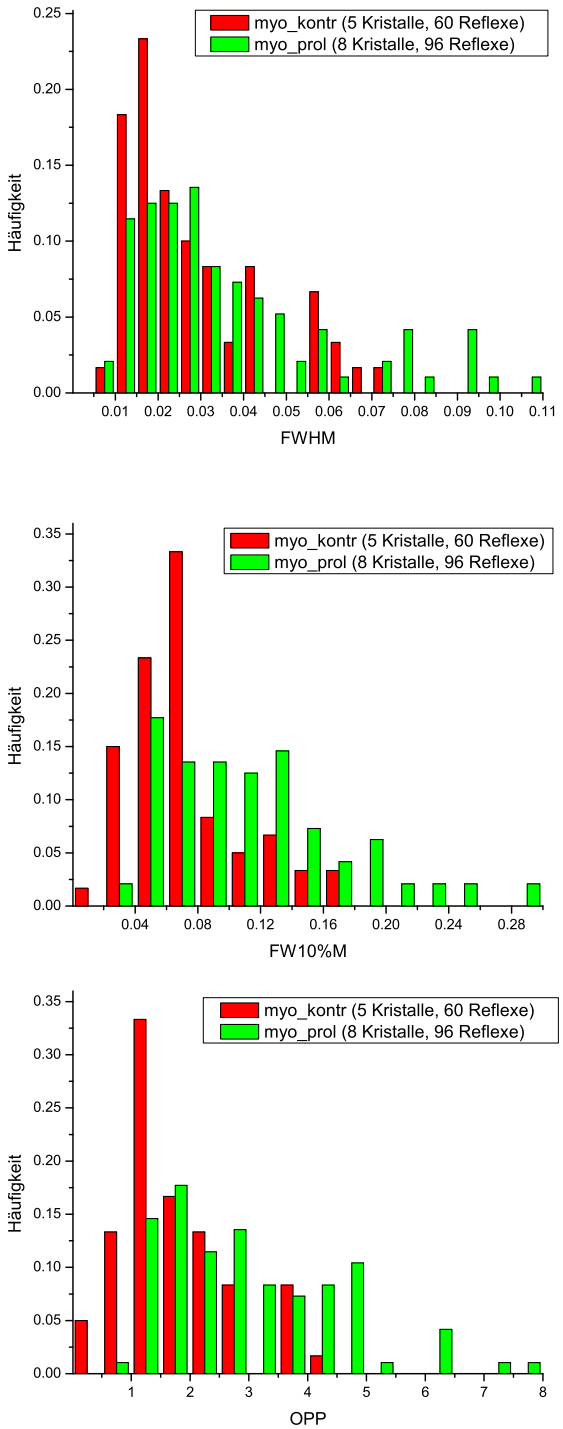

Abbildung 4.23: Histogramme der FWHM-Werte (oben), FW10%M-Werte (Mitte) und der OPP-Werte (unten) von Myoglobin-Kristallen aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET (grün) und der Kontrollgruppe (rot).

Histogramme der FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte gezeigt.

Tabelle 4.32: Mittlere FWHM-, FW10%M- und OPP-Werte der jeweils 3 besten Myoglobin-Kristalle gezüchtet in einem stark imhomogenen Magnetfeld und in einer Kontrollgruppe in Reihenfolge zunehmender OPP-Werte. Unten sind zudem die Mittelwerte der beiden Gesamtgruppen angegeben.

Kristall	$< FWHM >$	$< FW10\%M >$	$< OPP >$
*myo_prol*_05	0.0456(219)	0.079(30)	1.86(94)
*myo_prol*_01	0.0253(111)	0.083(37)	2.16(1.07)
*myo_prol*_04	0.0470(211)	0.104(27)	2.17(49)
$myo_kontr_0 1$	0.0182(73)	0.063(39)	1.37(88)
$myo_kontr_0 2$	0.0228(75)	0.062(33)	1.39(78)
$myo_kontr_0 3$	0.0412(178)	0.072(28)	1.61(62)
Mittelwert Prolet	0.0372(233)	0.114(58)	2.99(1.53)
Mittelwert Kontrollgruppe	0.0282(162)	0.072(36)	1.74(92)

Tabelle 4.33: Ergebnis des *Wilcoxon*-Rangsummentests zur Bestimmung des Signifikanzniveaus des Effektes der Myoglobin-Kristallisation im inhomogenen Magnetfeld des PROLET (Prolet: 8 Kristalle (Gruppe A), Kontrollgruppe: 5 Kristalle (Gruppe B)).

Parameter	W_a	$P(H_0)$
$FWHM$	66	$0.05 - 0.1$
$FW10\%M$	74	< 0.05
OPP	72	$0.005 - 0.01$

Zusammenfassung

Im Unterschied zu den diamagnetischen Lysozymkristallen wachsen die Myoglobinkristalle im unteren Teil der Quarzkapillare. Die stark gestörte Morphologie der Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET ist dabei ein Hinweis auf besonders ungünstige Wachstumsbedingungen, wie sie z.B. bei hohen Übersättigungen der Lösungen auftreten. Der durch das inhomogene Magnetfeld erzeugte Zustand der Hypergravitation dürfte daher zu einer starken Konzentration des Myoglobins und dadurch zu einer sehr hohen lokalen Übersättigung im unteren Teil der Kapillare führen.

Die Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld weisen neben dieser gestörten Morphologie auch eine deutlich größere Mosaizität auf. Die Unterschiede der Verteilungen aller drei Mosaizitätsparameter sind dabei hoch-signifikant.

Kapitel 5

Diskussion

Im diesem Kapitel werden die Auswirkungen der Proteinaufreinigung, der Kristallzüchtung unter Mikrogravitation und insbesondere die der Kristallzüchtung in homogenen und inhomogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität diskutiert. Abschließend wird eine kurze Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über Qualitätsuntersuchungen an Proteinkristallen gegeben.

5.1 Proteinaufreinigung

Die Auswirkungen der Aufreinigung des Proteinmaterials auf die Mosaizität und das integrale Streuvermögen wurden an dem Protein Lysozym untersucht. Die aus aufgereinigtem Protein gezüchteten Kristalle waren dabei deutlich größer und von kleinerer Mosaizität als die Kristalle aus nicht aufgereinigtem Lysozym. Diese Ergebnisse stimmen gut mit der Theorie überein. Durch den verringerten Anteil an Verunreinigungen kommt es nicht zu einer 'Vergiftung' der Wachstumsflächen und es können größere Kristalle wachsen. Die verringerte Einlagerung von Verunreinigungen führt dabei gleichzeitig zu einer kleineren Mosaizität. Die Auswirkung der Aufreinigung auf die Qualität der Intensitätsdatensätze ist in Übereinstimmung mit der Literatur gering und nicht signifikant [97, 29, 40]. Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung der Reinheit des Ausgangsmaterials, dass zur Kristallisation eingesetzt wird. Eine Verdoppelung der Kristallgröße von Proteinen, die nur ausgesprochen kleine Kristalle ergeben, kann dabei in vielen Fällen eine Strukturlösung ermöglichen.

5.2 Homogene Magnetfelder

Der Effekt der Proteinkristallisation in homogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität wurde an den diamagnetischen Proteinen Thaumatin, Trypsin und Lysozym untersucht. Zudem wurden ausführliche Untersuchungen an dem paramagnetischen Protein Myoglobin vorgenommen.

5.2.1 Diamagnetische Substanzen

Die Kristallisation der diamagnetischen Modellproteine fand in homogenen Magnetfeldern mit Stärken von $5\,T$ und $8.8\,T$ statt. Dabei sollte ein möglicher Effekt auf die Kristallqualität aufgrund der größeren Wechselwirkung bei der Kristallisation in stärkeren Magnetfeldern deutlicher werden.

Bei den in Magnetfeldern gezüchteten Trypsinkristallen konnte keine Vorzugsorientierung zum Magnetfeld beobachtet werden. Die Lysozymkristalle zeigten zumindest teilweise eine Orientierung zur Richtung des Magnetfeldes. Hier ist davon auszugehen, dass die Orientierung im Zuge der Sedimentation der Kristalle verloren ging. Am deutlichsten war die Ausrichtung der Kristalle entlang der Magnetfeldrichtung bei den Thaumatinkristallen zu beobachten. Hier waren bei der Kristallisation in horizontaler Feldrichtung nahezu alle Kristalle ausgerichtet, bei der Kristallisation mit vertikaler Feldrichtung zumindest noch ein Großteil. Es ist daher anzunehmen, dass die Anisotropie des Diamagnetismus bei den Trypsinkristallen am kleinsten und den Thaumatinkristallen am größten ist. Die Charakterisierung der Kristallqualität der in homogenen Magnetfeldern gezüchteten Proteinkristalle erfolgte durch Mosaizitätsmessungen und das Aufzeichnen von Intensitätsdatensätzen. Die Mosaizitätsmessungen zeigten dabei weder für die bei $8.8\,T$ gezüchteten Trypsin-Kristalle noch für die bei $5\,T$ und $8.8\,T$ gezüchteten Thaumatinkristalle einen positiven Effekt auf die Kristallmosaizität. In einem Experiment wiesen die in einem $8.8\,T$-Magnetfeld gezüchteten Thaumatinkristalle sogar leicht höhere Mosaizitäten auf. Von in einem Magnetfeld von $5\,T$ gezüchteten Trypsinkristallen und in einem $8.8\,T$-Magnetfeld gezüchteten Lysozymkristallen und den Kristallen der Kontrollgruppen wurden Intensitätsdatensätze aufgezeichnet. In beiden Fällen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Qualitätsparametern der Kristalle aus dem Magnetfeld und denen der Kontrollgruppe.

Es ist daher davon auszugehen, dass die Kristallisation diamagnetischer Proteine in homogenen Magnetfeldern weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf die Kristallqualität hat. Für das Protein Thaumatin, dass offensichtlich die stärkste Wechselwirkung mit dem Magnetfeld aufweist, hätten dabei am wahrscheinlichsten Effekte erkennbar sein sollen. Dies dürfte vor allem auf die auf molekularer Ebene ausgesprochen schwache Wechselwirkung der Moleküle mit dem Magnetfeld zurückzuführen sein. Erst ab Kristallgrößen von einigen hundert Nanometern ist Rechnungen zufolge ein deutlicher Anteil der Lysozymkristalle in einem $8.8\,T$-Magnetfeld ausgerichtet. Das Kristallwachstum selbst, also die Anlagerung von Molekülen an die Wachstumsfläche, spielt sich jedoch auf molekularer Ebene, also in einem Größenbereich von einigen Nanometern ab. Die an diamagnetischen Proteinlösungen in starken Magnetfeldern beobachteten Viskositätsänderungen dürften demnach ebenfalls keinen Einfluss auf die Kristallqualität haben [130, 131, 99, 132]. Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren dabei auf einer großen Anzahl, insgesamt 132, untersuchter Kristalle drei verschiedener

Modellproteine. Die in der Literatur gefundenen vermeintlich positiven Effekte auf die Kristallqualität [46, 80, 47, 99, 100] sind daher wohl eher auf die unzureichende Statistik dieser Untersuchungen als auf systematische Effekte zurückzuführen.

5.2.2 Paramagnetische Substanzen

Die Wechselwirkung von Magnetfeldern mit paramagnetischen Substanzen ist mindestens um 1-2 Größenordnungen stärker als die mit diamagnetischen Substanzen. Daher wurde der Effekt der Kristallisation in homogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität zudem an dem paramagnetischen Protein Myoglobin untersucht. Myoglobin ist aus NMR-Untersuchungen für seine starke magnetische Anisotropie bekannt [77].

Myoglobinkristalle wurden in Magnetfeldern von $8.8\,T$ und $15.8\,T$ und bei Ammoniumsulfatkonzentrationen (AS) von 73%, 75% und 77%, gezüchtet. In den Experimenten zeigten alle im Magnetfeld gewachsenen Kristalle eine Ausrichtung entlang der Magnetfeldrichtung. Zudem waren die im Magnetfeld gewachsenen Kristalle in den meisten Fällen deutlich größer als die Kristalle der entsprechenden Kontrollgruppen. Der Größenunterschied war dabei umso größer, desto kleiner die Ammoniumsulfatkonzentration war.

Die Kristalle wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Mosaizität als auch ihrer Beugungseigenschaften charakterisiert. Die Kristalle aus den Magnetfeldern weisen dabei bis auf die Kristallisation aus 73% AS die kleineren Mittelwerte ihrer Mosaizitätsparameter auf. Bei letzterer dürften die schlechteren Mosaizitätsparameter der Kristalle aus dem Magnetfeld auf die im Schnitt $14\times$ größere Kristallgröße zurückzuführen sein. Der deutlichste Effekt der Kristallisation im Magnetfeld auf die Kristallqualität wird bei der Kristallisation aus 75% AS beobachtet. Hier weisen die Kristalle aus Magnetfeld bei allen drei Parametern signifikant kleinere Mosaizitäten auf. Zwar sind in diesem Experiment die Kristalle der Kontrollgruppe von deutlich schlechterer Qualität als bei der Kristallisation bei $0\,T$ aus 73% und 77% AS, aber im Vergleich mit den FWHM-Werten dieser Gruppen sind die Kristalle von signifikant kleinerer Mosaizität. Bei der Kristallisation aus 77% sind die Kristalle aus dem Magnetfeld im Mittel zwar von kleinerer Mosaizität, allerdings sind die Unterschiede hier nicht signifikant. Bei der Analyse der Intensitätsdaten zeigt sich das gleiche Bild. Bei der Kristallisation aus 75% AS weisen die Kristalle aus dem Magnetfeld bei allen Qualitätsparametern signifikant bessere Eigenschaften auf und beugen zu deutlich höherer Auflösung als der beste in der Literatur angegebene Kristall. Bei der Kristallisation aus 77% AS sind diese Unterschiede nicht so deutlich ausgeprägt. Allerdings weisen die Kristalle aus dem Magnetfeld auch hier bei allen bis auf einen Parameter im Mittel die besseren Qualitätsmerkmale auf.

Im Unterschied zu den diamagnetischen Modellproteinen ist bei der Kristallisation von paramagnetischem Myoglobin in homogenen Magnetfeldern ein positiver Effekt sowohl auf die Kristallmosaizität als auch auf die Beugungseigenschaften zu beobachten.

Der Effekt ist dabei umso größer, desto kleiner die AS-Konzentration ist. Der Mechanismus, der zu dieser Verbesserung führt, ist dabei unklar. Allerdings ist aus NMR-Untersuchungen bekannt, dass aufgrund der extrem großen magnetischen Anisotropie des Myoglobinmoleküls in starken Magnetfeldern bereits ein merklicher Anteil der einzelnen Myoglobinmoleküle in der Lösung eine Orientierung zum Magnetfeld aufweisen [77].

Eine mögliche Erklärung für den positiven Effekt auf die Kristallqualität könnte daher ein aus der Ausrichtung der Moleküle resultierende Bildung eines dreidimensionalen Netzwerk der Myoglobinmoleküle sein, wie es in der Literatur für diamagnetische Substanzen vorgeschlagen wurde [99]. Ein derartiges Netzwerk würde zu einer erhöhten Viskosität der Lösung führen. Im Unterschied zu der an diamagnetischen Lysozym beobachteten Viskositätserhöhung sollte diese für paramagnetisches Myoglobin aufgrund der erheblich größeren Anisotropie deutlich größer ausfallen. Hierdurch käme es analog zu der Kristallisation in Gelen zu einem stärker diffusionskontrollierten Wachstum. Zudem müßten sich die Moleküle zuerst aus diesem Netzwerk lösen, bevor sie in den Kristall eingebaut werden können. Beide Effekte sollten zu einem deutlich verlangsamten Kristallwachstum und dadurch zu Kristallen besserer Qualität führen. Eine andere Erklärung könnte in der Ausrichtung der Moleküle selbst liegen. Unter der Annahme, dass die Moleküle im Kristall eine ähnliche Orientierung wie in der Lösung aufweisen, sollten sich diese erheblich leichter an die Wachstumsflächen anlagern können, da sie zumindest in einer Richtung bereits eine Vororientierung aufweisen. Dies könnte zu einer deutlichen Reduzierung der Orientierungsfehlordnung im Kristall führen. Auch die in der Literatur diskutierte 3D-Nukleation könnte einen möglichen Mechanismus für diesen Effekt darstellen [80]. Durch das Magnetfeld würden die sedimentierenden Kristallite zumindest in einer Richtung die gleiche Orientierung wie die Wirtskristalle aufweisen, was zu einer kleineren Störungszone führen soll. Allerdings ist der Mechanismus der 3D-Nukleation an Myoglobinkristallen bisher nicht in der Literatur beschrieben worden.

5.3 Mikrogravitation

Die Kristallisation unter Mikrogravitation ist die mit Abstand aufwändigste und wohl auch am besten untersuchte Methoden zur Kristallzüchtung makromolekularer Verbindungen (s. Abschn. 2.6.3). Dabei berichten einige Gruppen von positiven (z.B. [10, 156, 157, 158] andere von reproduzierbar negativen Ergebnissen auf die Kristallqualität (z.B. [155]).

An dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten unter Mikrogravitationsbedinungen gezüchteten TIM-Kristallen konnte im Vergleich zu in Agarose-Gelen gezüchteten Kristallen ein leicht positiver jedoch nicht signifikanter Effekt auf die Kristallmosaizität beobachtet werden. Signifikanter ist dieser Effekt bei der Qualität der Intensitätsda-

tensätze. Hier weisen die unter Mikrogravitation gezüchteten Kristalle vor allem eine höhere Vollständigkeit der Daten auf. Zwar mag die durchschnittliche Auflösungsverbesserung um 0.12 Å nicht sonderlich bedeutend erscheinen, allerdings erlaubt z.B. eine Auflösungsverbesserung von 3.15 Å auf 3.00 Å in vielen Fällen die sichere Unterscheidung zwischen großen und kleinen Aminosäuren und damit die Sicherstellung, dass die durch die Sequenz vorgegebene Aminosäure an der richtigen Stelle im Strukturmodell sitzt und nicht um eine Aminosäure verschoben ist. Bei der Kristallisation unter Mikrogravitation sollte allerdings der erhebliche Aufwand zur Durchführung dieser Experimente im Verhältins zu dessen Nutzen gesehen werden. Zwar ist an dem in dieser Arbeit untersuchten System ein positiver Effekt durch die Kristallisation unter Mikrogravitation zu erkennen, allerdings kann dieser auch auf einen negativen Effekt durch die Zugabe von Agarose zu der Kontrollgruppe zurückzuführen sein.

5.4 Inhomogene Magnetfelder

Eine deutlich preiswertere und leichter zugängliche Methode mit ähnlichen zu erwartenden Effekten wie die Kristallisation unter Mikrograviation stellt die Kristallisation von diamagnetischen Proteinen in stark inhomogenen Magnetfeldern dar. Der Effekt der Kristallisation in inhomogenen Magnetfeldern auf die Kristallqualität wurden an den beiden diamagnetischen Proteine Lysozym und Insulin und dem paramagnetischen Protein Myoglobin untersucht.

5.4.1 Prolet

Zur Kristallzüchtung in inhomogenen Magnetfeldern wurde ein eigener Magnetaufbau realisiert (s. Abschn. 3.1). Durch die Konstruktion spezieller Polschuhe konnten mit einem klassischen Elektromagneten erstmals $\nabla B^2/2$-Werte von etwa $1400\,T^2/m$ erreicht werden, wie sie zur Magnetolevitation von Wasser und diamagnetischen Proteinen erforderlich sind. Dies war bisher nur mit sog. *Bitter* und supraleitenden Magneten möglich. Neben den erheblich geringeren Betriebs- bzw. Anschaffungskosten weist dieser Magnetaufbau zudem den Vorteil einer guten Zugänglichkeit des Probenraumes und einer guten Temperierbarkeit auf.

5.4.2 Diamagnetische Substanzen

Unter Mikrogravitation gezüchtete Lysozym- und Insulinkristalle zeigen sowohl eine deutlich kleinere Mosaizität [33, 48] als auch bessere integrale Beugungseigenschaften [175, 17]. Zudem zeigten Lysozymkristalle, die in stark inhomogenen Magnetfeldern gezüchtet wurden, kleinere B-Faktoren [82]. Aus diesem Grund wurden diese beiden Modellproteine zur Untersuchung des Effektes der Kristallisation in inhomogenen Magnetfelder auf die Mosaizität ausgewählt. Mosaizitätsmessungen ergaben jedoch, dass

Kristallisation dieser beiden diamagnetischen Proteine in stark inhomogenen Magnetfeldern wenn überhaupt, einen eher negativen Effekt auf die Kristallmosaizität hat. Eine Ursache hierfür könnte in den unterschiedlichen magnetischen Suszeptibilitäten der zur Kristallisation eingesetzten Substanzen wie z.B. Protein, Wasser, $NaCl$ oder $ZnSO_4$ liegen. Durch die unterschiedlichen Kräfte die diese Stoffe in inhomogenen Magnetfeldern erfahren kann es zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten dieser Stoffe innerhalb der Lösung und damit zu ungünstigeren Kristallisationsbedingungen kommen. Dieser Effekt wurde bisher in der Literatur nicht diskutiert.

Es ist jedoch anzumerken, dass die Kristalle sowohl aus dem inhomogenen als auch aus der Kontrollgruppe zumindest von ähnlicher aber auch teilweise von besserer Qualität als die in der Literatur angegebenen Werte der unter Mikrogravitation gezüchteten Kristalle waren. Daher ist fraglich, ob die in der Literatur beschriebenen Effekte tatsächlich auf einen positiven Effekt der Mikrogravitation zurückzuführen sind und nicht z.B. auf eine ungenügende Zahl untersuchter Kristalle oder auf eine nicht sorgfältig kristallisierte Kontrollgruppe.

5.4.3 Paramagnetische Substanzen

Im Unterschied zu diamagnetischen Substanzen erfährt das paramagnetische Protein Myoglobin im inhomogenen Magnetfeld des PROLET einen der Hypergravitation ähnlichen Zustand. Daher bildeten sich die Myoglobinkristalle im Unterschied zu den diamagnetischen Kristallen auch an der Unterseite der Kapillare, also an Orten höherer Feldstärke. Die Myoglobinkristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld des PROLET zeigten bereits bei Betrachtung unter dem Polarisationsmikroskop deutliche makroskopische Störungen. Mosaizitätsmessungen ergaben, dass diese Kristalle im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe von signifikant schlechterer Qualität waren. Die Ursache hierfür dürfte eine hohe lokale Übersättigung des Myoglobins im unteren Teil der Kapillare sein. Durch diese hohe Übersättigung kommt es zu einem schnellen, unkontrollierteren Kristallwachstum, dass sich negativ auf die Kristallqualität auswirkt.

5.4.4 Qualitätsuntersuchungen an Proteinkristallen

In dieser Arbeit wurde eine systematische Untersuchung über den Einfluss eines bestimmten Wachstumsparameters auf die Qualität von Proteinkristallen durchgeführt. Dabei wurde erstmalig eine so große Zahl von Kristallen untersucht, dass mit dem *Wilcoxon*-Rangsummentests statistisch belegbare Aussagen erhalten werden konnten. Die Untersuchung der Kristallqualität im Rahmen dieser Arbeit erfolgte dabei durch Mosaizitätsmessungen und in einigen Fällen komplementär durch Analyse von Intensitätsdatensätzen.

Die bei den Mosaizitätsmessungen ermittelten Halbwertsbreiten der Reflexprofile bewegen sich dabei von einigen tausendstel bis zu einem zehntel Grad. Dabei

sind die Unterschiede der Halbwertsbreiten zwischen verschiedenen Proteinen deutlich größer als die zwischen den einzelnen Kristallen eines bestimmten Proteins. Lysozym-, Thaumatin- und Insulinkristalle weisen relativ schmale Reflexprofile mit Halbwertsbreiten von einigen tausendstel Grad auf und bestehen in der Regel aus ein oder zwei Mosaikblöcken. Die Reflexprofile der Trypsin- und Myoglobinkristalle sind dagegen meist einige hundertstel Grad breit und setzen sich aus vielen einzelnen Mosaikblöcken zusammen. Die bereits ohne Verwendung des *Bartels*-Monochromators erreichbare instrumentelle Auflsoung war für die untersuchten Proteine, einmal abgesehen von den Lysozymkristallen, deutlich kleiner als die Kristallmosaizität. Auf eine kompliziertere Entfaltung der instrumentellen Auflösungsfunktion von den experimentell bestimmten Reflexprofilen konnte daher verzichtet werden. Die Untersuchungen an den Lysozymkristallen erfolgten unter Verwendung des *Bartels*-Monochromators. Fast alle untersuchten Modellproteinen zeigten eine mehr oder weniger deutliche Anisotropie ihrer Mosaizität. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den Myoglobinkristallen. Durch Methoden wie dem Φ-*fine-slicing* oder der Extraktion eines Mosaizitätsparameters aus Intensitätsdaten hätte diese Anisotropie unter Umständen zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen können.

Intensitätsdatensammlungen unter Verwendung der exakt gleichen Datensammlungsparameter sind ebenfalls geeignet, Qualitätsunterschiede an Proteinkristallen aufzuzeigen. Im Unterschied zu Mosaizitätsmessungen, die in erster Linie sensitiv auf die Fernordnung im Kristall sein sollten, wird die Qualität der Intensitätsdatensätze mehr durch die Nahordnung bestimmt. Durch die gleichzeitige Bestimmung der Kristallmosaizität und der Intensitätsdatensammlung an Lysozymkristallen konnte ein interessanter Zusammenhang bestätigt werden. Die Kristalle mit der kleineren Mosaizität weisen auch die kleineren B-Faktoren, also eine bessere Nahordnung, auf (s.a. Abschn. 2.3.1). An Myoglobinkristallen konnte zwar ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Kristallmosaizität und den B-Faktoren beobachtet werden, allerdings ist dieser nicht so ausgeprägt wie bei den Lysozymkristallen. Eine Erklärung hierfür kann das Konzept der Mikro- und Makromosaizität liefern. Bei den Lysozymkristallen, die meist aus einem Mosaikblock bestehen, sind die Mosaizitätswerte mehr durch die Mikromosaizität, also die Nahordnung, bestimmt. Die Myoglobinkristalle dagegen bestehen in den meisten Fällen aus mehreren, oft nicht klar voneinander getrennten Mosaikblöcken. Hier sind die Mosaizitätsparameter mehr durch die Makromosaizität, also die Fernordnung dominiert. Dementsprechend ist hier auch ein nicht so deutlicher Zusammenhang zwischen der Mosaizität und dem B-Faktor zu beobachten.

Insgesamt sind die beobachteten Effekte durch die Veränderung eines Wachstumsparameters, bis auf eine Ausnahme, relativ klein. Um signifikante Aussagen über den Einfluss dieser die Kristallqualität nur wenig beeinflussenden Parameter machen zu können, wären erheblich größere Stichproben nötig. Dies wäre jedoch mit einem erheblich größeren Messzeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Eine Ursache für diese nur

kleinen Effekte könnte die Wahl der Modellproteine darstellen. Da die meisten Magneten nur für kurze Zeit zur Verfügung standen und zudem nur einer begrenzten Menge Proben Platz bieten, wurden fast ausschließlich gut kristallisierende Modellproteine gewählt, um in jedem Fall genügend Kristalle für vergleichende Untersuchungen zu erhalten. Allerdings ergeben diese Proteine aufgrund ihrer guten Kristallisationseigenschaften auch Kristalle von ausgesprochen guter Qualität. So beugen alle untersuchten Modellproteine, einmal abgesehen von den TIM-Kristallen, bis zu einer Auflösungsgrenze von unter 1.5 Å. Unter Umständen sollten für nicht so gut kristallisierende Proteine stärkere Effekte durch Veränderung der Wachstumsparameter zu erwarten sein. Bei der Kristallisation der Catalase im homogenen Magnetfeld wurde diese Problematik deutlich. In diesem Fall wurde ein nicht so gut kristallisierendes Protein gewählt, dass auch nicht zu ganz so hohen Auflösungen wie die anderen Proteine beugt. Allerdings wurden hier auch nur 2 bzw. 1 für Beugungsuntersuchungen geeignete Kristalle aus dem 8.8 T-Magnetfeld bzw. der Kontrollgruppe aus jeweils 24 Ansätzen erhalten.

Kapitel 6

Ausblick

Hochaufgelöste Mosaizitätsmessungen stellen ein gut geeignetes Mittel zur Charakterisierung der Kristallqualität dar und erlauben einen tieferen Einblick in den Kristallaufbau als dies z.B. mit der Sammlung von Intensitätsdatensätzen möglich ist. Ortsauflösenden Techniken, wie z.B. das sog. *rocking curve imaging*, stellen eine Erweiterung der herkömmlichen Mosaizitätsmessungen dar, und erlauben eine lokale Analyse der Mosaizität [36]. Durch das Aufzeichnen von *reciprocal space maps* ist zudem eine Unterscheidung zwischen d-Wert-Variationen und der Kristallmosaizität möglich. Beide Methoden sind zumindest bei der Untersuchung an Proteinkristallen noch mit einem extrem hohen experimentellen Aufwand verbunden und wurden bisher nur exemplarisch an 2 Modellsystemen untersucht. Eine Etablierung dieser Methoden zur Untersuchung von Proteinkristallen ist daher ein logischer Schritt. Die Kombination beider Techniken, also die ortaufgelöste Messung von Mosaizität und d-Wert-Variationen würde sicherlich die eleganteste Methode zur Evalutation der Kristallqualität darstellen.

An noch brillanteren Synchrotronstahlungsquellen sollten solche Experimente auch an kleineren Kristallen in kurzer Zeit und bei zugleich hoher Auflösung möglich sein. Gerade an besonders kleinen Kristallen könnten Mosaizitätsmessungen und *reciprocal space maps* helfen, die Ursache für die die Kristallgröße limitierenden Faktoren zu identifizieren und gegebenenfalls Abhilfe zu schaffen.

An relativ kleinen diamagnetischen Molekülen konnte zwar eine Orientierung der Kristalle in homogenen Magnetfeldern beobachtet werden, allerdings hatte dies keine Auswirkungen auf die Qualität der in homogenen Magnetfeldern gewachsenen Proteinkristalle. Bei ausreichend starker Wechselwirkung zwischen dem Magnetfeld und den entsprechenden Molekülen, wie z.B. bei paramagnetischen Myoglobinmolekülen, stellt die Kristallisation in homogenen Magnetfeldern jedoch eine vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung der Kristallqualität dar.

Neben anderen paramagnetischen Proteinen sollten auch große diamagnetische Proteine mit einer entsprechend größeren magnetischen Anisotropie geeignete Substanzen zur Verbesserung der Kristallqualität durch Kristallisation in homogenen Magnetfel-

dern darstellen. Vor allem Membranproteine sollten aufgrund der parallel angeordneten α-Helices eine großes magnetisches Dipolmoment aufweisen. Eine verbesserte Kristallqualität wäre gerade für diese Proteine von größer Bedeutung, da diese besonders oft nur schlecht kristallisieren. Aber auch für die Züchtung von Viren-Kristallen könnte die Anwendung homogener Magnetfelder interessant sein. Viren weisen meist ein Proteinkapsid mit hoher Eigensymmetrie auf. Allerdings folgt die in dem Kapsid eingeschlossene DNA oder RNA nicht dieser Symmetrie und weist im Kristall eine statistisch verteilte Orientierung auf. Durch Kristallisation in starken homogenen Magnetfeldern könnte über die Ausrichtung der DNA oder RNA eventuell auch eine dreidimensionale periodische Ordnung der DNA bzw. RNA im Kristall erzielt werden. Dadurch wären durch Beugungsexperimente auch Informationen über die Struktur der DNA und RNA innerhalb des Viruspartikels zugänglich.

Der Ausrichtungsgrad der Moleküle ist proportional zum Quadrat der Feldstärke. Durch den Einsatz neuer Hochfeldmagneten sollte sich daher der Ausrichtungsgrad der Moleküle in der Lösung stark erhöhen lassen. Ein positiver Effekt auf die Kristallqualität sollte damit ebenfalls erheblich wahrscheinlicher werden. Zudem ist die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus interessant. Durch kinetische Betrachtung des Kristallwachstums und die Bestimmung des Ausrichtungsgrades der Moleküle in der Lösung in Abhängigkeit von der Feldstärke über die magnetischen Doppelbrechung könnten hier hilfreiche Erkenntnisse gewonnen werden.

Weitere interessante Anwendungen von homogenen Magnetfeldern in der Strukturbiologie könnten die Ausrichtung von biologischen Makromolekülen zur Bildung von 2D-Kristallen, zur Kristallisation mit definierter Orientierung auf bestimmten Substraten sowie die Kleinwinkelstreuung darstellen. Insbesondere bei letzterer sollte durch die Einstellung einer eindimensionalen Ordnung der Moleküle durch das Magnetfeld ein erheblicher Informationsgewinn zu erzielen sein.

Die Anwendung inhomogener Magnetfelder, wie sie z.B. durch den PROLET erreicht werden können, zeigt bei den beiden untersuchten diamagnetischen Proteinen keinen deutlichen Effekt auf die Kristallqualität. Anders sieht es bei dem paramagnetischen Protein Myoglobin aus, bei dem die Kristalle aus dem inhomogenen Magnetfeld von deutlich schlechterer Qualität als die Kristalle der Kontrollgruppe waren. Dies ist auf die hohe lokale Übersättigung des Proteins im unteren Teil der Kapillare zurückzuführen. Diese Möglichkeit, über die Stromstärke und damit über die Feldimhomogenitäten gezielt lokale Übersättigungen einstellten zu können, eröffnet diverse Möglichkeiten für die Kristallisation paramagnetischer Proteine. So lassen sich z.B. die Nukleation und das Kristallwachstum gezielt und ohne mechanische Eingriffe steuern, wodurch in vielen Fällen die Züchtung größerer Kristalle möglich sein sollte. Auch schwerlösliche Proteine, die bei der Aufkonzentration meist als amorphes Präzipitat ausfallen, könnten unter Umständen durch eine langsame Einstellung der Übersättigung kristallisiert werden. Bei Proteinen die Eisen enthalten, stellen die Oxidation des Eisens und die damit ver-

bundenen strukturellen Änderungen bei der Kristallisation oft ein Problem dar. Da solche Oxidationen oft mit der Veränderung der magnetischen Eigenschaften einhergehen, stellt die Anwendung inhomogener Magnetfelder ebenfalls eine elegante Methode zur 'Aufreinigung' dar. Während das nicht-oxidierte paramagnetische Protein z.B. eine Kraft zu Bereichen höherer Feldstärken erfährt, werden oxidierte und damit strukturell veränderte diamagnetische Spezies aus diesen Bereichen herausgedrückt.

Magnetaufbauten wie der PROLET bieten durch die Möglichkeit, diamagnetische Substanzen levitieren zu können, weitere interessante Anwendungsmöglichkeiten. Neben probenhalterfreien Anwendungen in der Spektroskopie stellt insbesondere die linsenfreie Abbildung kleiner diamagnetischer Objekte wie z.B. von Zellen mit kohärenter Röntgenstrahlung eine interessante Anwendung dar. Für die Methode des sog. *oversampling* weist eine probenhalterfreie Platzierung des Objektes im Röntgenstrahl erhebliche Vorteile auf [176]. Durch die Ausrichtung des Objektes durch das Magnetfeld wird die Auswertung der Daten dabei weiter erleichtert. Durch die gleichzeitige Verwendung eines Lasers und dessen Wechselwirkung mit dem elektrischen Dipolmoment des Objektes könnte zudem die Einstellung bestimmter Orientierungen des Objektes erreicht werden [177].

Anhang A

Hall-Sonden Kalibration

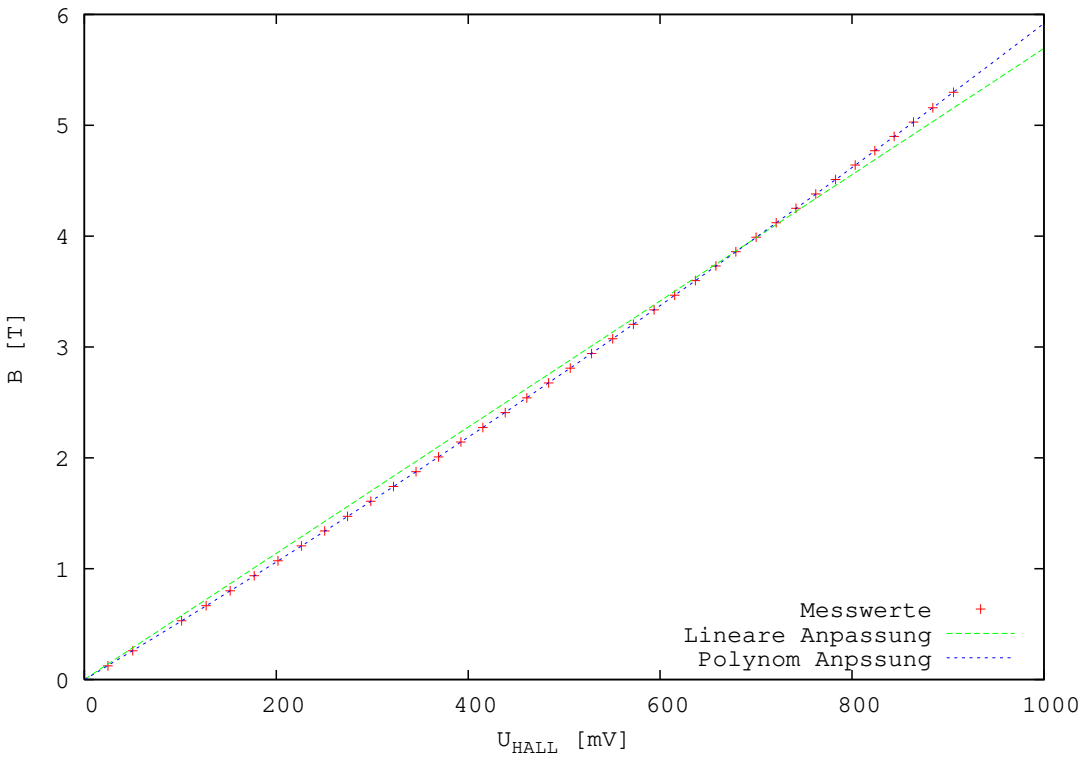

Abbildung A.1: Kalibrationskurve des Hall-Generators FH-301 der Fa. BELL: Auftragung der mit einem NMR Teslameter PT 2025 der Firma METROLAB ermittelten Feldstärke gegen die gemessene Hall-Spannung bei einer Temperatur von $293\,K$.

Anhang B

Kristallisationsvorschriften

B.1 tetragonales Lysozym, *hanging drop vapour diffusion*

Proteinlösung	Reservoirlösung
52 mg/ml Lysozym	6% NaCl
in 0,133 M Natriumacetat (pH=4.7)	in 0,133 M Natriumacetat (pH=4.7)

Zum Ansetzen der Kristallisation werden Proteinlösung und Reservoirlösung zu gleichen Teilen gemischt (jeweils 20 μl) und gegen die Reservoirlösung equilibriert (1000 μl). Die Kristallisation ist nach ca. 5-7 Tagen abgeschlossen.

B.2 tetragonales Lysozym, *Batch*-Kristallisation

Lösung 1	Lösung 2
100 mg/ml Lysozym	7.5% Natriumchlorid
in 0.05 M Natriumacetat (pH 4.5)	in 0.05 M Natriumacetat (pH 4.5)

Zur Kristallisation werden Lösung 1 und Lösung 2 zu gleichen Teilen gemischt.

B.3 Pottwal-Myoglobin, *Batch*-Kristallisation

Lösung 1	Lösung 2
60 mg/ml Pottwal-Myoglobin	ges. Ammoniumsulfat
in 0,1 M Natriumphosphat (pH 6,8)	in 0,1 M Natriumphosphat (pH 6,8)

Zur Kristallisation werden 75% Lösung 1 (77% bzw. 73%) mit 25% Lösung 2 (23% bzw. 27%) gemischt. I.d.R. treten bereits nach einem Tag erste Kristalle auf. Je geringer der Anteil von Lösung 2, desto langsamer wachsen die Kristalle und desto weniger Kristalle werden erhalten.

B.4 Schweine-Insulin, Temperaturzüchtung

Lösung
200 ml 0,02 M HCl
100 ml 0,2 M Natriumcitrat
60 ml Aceton
20 ml H_2O
20 ml 0,12 M $ZnSO_4$

Die Lösung wird zunächst auf 45° C erwärmt. In der warmen Lösung werden nun 0.5 mg/ml *porcine* Insulin gelöst. Zur Kristallisation wird die Lösung anschließend langsam auf 20° C abgekühlt lassen. Je langsamer dabei die Abkühlungsrate ist, desto weniger Kristalle dafür aber größere Kristalle werden erhalten.

B.5 Rinder-Trypsin, *hanging drop vapour diffusion*

Proteinlösung	Reservoirlösung
60 mg/ml Trypsin	0,2 M Ammoniumsulfat
0.01 M Calciumchlorid	0,1 M TRIS
10 mg/ml Benzamidin Hydrochlorid	pH = 8.5
in 0.025 M HEPES (pH 7.0)	

Die Kristallisation erfolgt analog zu B.1. Nach ca. 7 Tagen ist die Kristallisation abgeschlossen.

B.6 Thaumatin, *hanging drop vapour diffusion*

Proteinlösung	Reservoirlösung
15 mg/ml Thaumatin	1,0 M Weinsäure
in 0,1 M ADA (pH 6.5)	0.1 M ADA
	mit NaOH auf pH=6.5

Zur Kristallisation wird wie in B.1 beschrieben verfahren. Die Kristallisation ist nach ca. 4-5 Tagen abgeschlossen.

Anhang C

Säulenchromatographische Proteinaufreinigung

Hierzu wird das aufzureinigende Protein im entsprechenden Puffer gelöst und zur Entfernung von eventuell ungelösten Proteinresten bei 18000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend zur restlosen Beseitigung von etwaigen der Säule abträglichen Partikeln bei 18000 rpm durch ein Millipore-Filterröhrchen (0,22 μm Porenweite) filtriert. Die Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60TM Superdex 75 prep grade der Fa. PHAMARCIA) wird vor der Aufgabe der Proteinlösung mit 2 Säulenvolumina (240 ml) des entsprechenden zur Aufreinigung verwendeten Proteinpuffers equilibriert. Zur chromatographischen Aufreinigung werden nun bis zu maximal 3 ml der Proteinlösung auf die Säule aufgebracht. Der Lauf erfolgt idealerweise bei einer Flussrate von 1.0 ml/min und einer Fraktionsgröße von 1.5 ml. Während des gesamten Laufes wird mit einem Photometer die Extinktion der aus der Säule austretenden Lösung bei 280 nm bestimmt. Fraktionen mit erhöhter Absorption im gemessenen Wellenlängenbereich werden nach Abschluss des Laufes auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen und durch SDS-Elektrophorese auf Größe und Menge der enthaltenen Proteine untersucht. Fraktionen mit dem von Verunreinigungen befreiten Zielprotein werden gegebenfalls zusammengefasst und entsprechend der jeweiligen Kristallisationsbedingungen aufkonzentriert. Als Laufpuffer wird vorteilhafter der Puffer gewählt, der auch für die Kristallisation verwendet werden soll. Für Lysozym wird daher sinnvollerweise ein 0.05 M Natriumacetat Puffer (pH 4.5) und für Thaumatin ein $0,1\,M$ ADA Puffer (pH 6.5) verwendet.

Anhang D

Gitterparameter der Modellproteine

Tabelle D.1: Raumtemperatur-Gitterparameter von tetragonalem Lysozym. Die Gitterparameter stammen aus der Intensitätsdatenmessung des Kristalls *lyso_a_07*.

Parameter	Wert
Raumgruppe	$P\,4_3\,2_1\,2$
a[Å]	79.16
b[Å]	79.16
c[Å]	38.02
T	293 K
PDB-Code	1IEE ($T = 100K$) [175]

Tabelle D.2: Raumtemperatur-Gitterparameter von tetragonalem Thaumatin. Die Gitterparameter stammen aus [178].

Parameter	Wert
Raumgruppe	$P\,4_1\,2_1\,2$
a[Å]	58.53
b[Å]	58.53
c[Å]	151.35
T	293 K
PDB-Code	1KWN [178]

Tabelle D.3: Raumtemperatur-Gitterparameter von orthorhombischem Rinder-Trypsin. Die Gitterparameter stammen aus der Intensitätsdatenmessung des Kristalls *bov_tryps_5t_17*.

Parameter	Wert
Kristallsystem	orthorhombisch
a[Å]	63.31
b[Å]	63.71
c[Å]	69.15
T	$293K$
PDB-Code	-

Tabelle D.4: Raumtemperatur-Gitterparameter von monoklinem Pottwal-Myoglobin. Die Gitterparameter stammen aus [179]. Aus Gründen der Transferierbarkeit sind a- und c-Achse vertauscht.

Parameter	Wert
Raumgruppe	$P\,2_1$
a[Å]	64.59
b[Å]	31.04
c[Å]	35.15
β [°]	105.58
T	$293K$
PDB-Code	1A6N ($T = 100K$) [180]

Tabelle D.5: Raumtemperatur-Gitterparameter von rhomboedrischem Schweine-Insulin. Die Gitterparameter stammen aus [181].

Parameter	Wert
Raumgruppe	$R\,3$
a[Å]	82.5
b[Å]	82.5
c[Å]	34.0
T	$293K$
PDB-Code	4INS [181]

Tabelle D.6: Raumtemperatur-Gitterparameter von trigonalem TIM. Die Gitterparameter stammen aus [174].

Parameter	Wert
Raumgruppe	$P\,3_2\,2\,1$ oder $P\,3_1\,2\,1$
a[Å]	125.95
b[Å]	125.95
c[Å]	103.72
T	$293K$
PDB-Code	1B9b [174]

Anhang E

Reflexe der Mosazititätsmessungen

Tabelle E.1: Ausgewählte Reflexe der Mosaizitätsmessungen für tetragonales Lysozym.

Reflex	d_{hkl} [Å]
16 16 0	3.50
16 $\overline{1}$6 0	3.50
0 0 8	4.75
7 7 6	4.97

Tabelle E.2: Ausgewählte Reflexe der Mosaizitätsmessungen für tetragonales Thaumatin.

Reflex	d_{hkl} [Å]
0 0 40	3.78
20 0 0	2.93
0 20 0	2.93
10 10 24	3.46

Tabelle E.3: Ausgewählte Reflexe der Mosaizitätsmessungen für orthorhombisches Rinder-Trypsin.

Reflex	d_{hkl} [Å]
0 0 12	5.76
0 10 0	6.37
12 0 0	5.28
8 8 8	4.71

Tabelle E.4: Ausgewählte Reflexe der Mosaizitätsmessungen für monoklines Pottwal-Myoglobin.

Reflex	d_{hkl} [Å]
0 0 6	5.64
0 $\overline{12}$ 0	2.59
14 0 0	4.44
1 $\overline{5}$ 5	4.50

Tabelle E.5: Ausgewählte Reflexe der Mosaizitätsmessungen für rhomboedrisches Schweine-Insulin.

Reflex	d_{hkl} [Å]
0 0 9	3.78
12 0 0	5.95
0 12 0	5.95
12 $\overline{12}$ 0	5.95

Anhang F

Parameter der Intensitätsdatensammlungen an der X11-Strahlführung

Im folgenden werden kurz die zur Datensammlung verwendeten Parameter der einzelnen Messreihen in Tabellenform angegeben. Zur Bedeutung der einzelnen Parameter siehe Abschnitt 2.2.6.

Tabelle F.1: Datensammlungsparameter von tetragonalen Lysozymkristallen aus aufgereinigtem und nicht-aufgereinigtem Lysozym

Parameter	Wert
Energie	$15.3\,keV$
Blendengröße	$0.3 \times 0.3\,mm$
Rotationswinkel $\Delta\Phi$	0.5°
Belichtungsdosis	$50\,kHz$
Anzahl der Bilder	360
Abstand Kristall - Detektor	$80\,mm$
Datensammlungstemperatur	$293\,K$

Tabelle F.2: Datensammlungsparameter von $5\,T$ und $0\,T$ Rinder-Trypsinkristallen

Parameter	Wert
Energie	$15.3\,keV$
Blendengröße	$0.2\ \times\ 0.2\,mm$
Rotationswinkel $\Delta\Phi$	0.5°
Belichtungsdosis	$50\,kHz$
Anzahl der Bilder	360
Abstand Kristall - Detektor	$85\,mm$
Datensammlungstemperatur	$293\,K$

Tabelle F.3: Datensammlungsparameter von $8.8\,T$ und $0\,T$ Lysozymkristallen

Parameter	Wert
Energie	$15.3\,keV$
Blendengröße	$0.2\ \times\ 0.2\,mm$
Rotationswinkel $\Delta\Phi$	0.5°
Belichtungsdosis	$50\,kHz$
Anzahl der Bilder	360
Abstand Kristall - Detektor	$100\,mm$
Datensammlungstemperatur	$100\,K$

Tabelle F.4: Datensammlungsparameter von $8.8\,T$ und $0\,T$ Myoglobinkristallen aus 75% AS.

Parameter	Wert
Energie	$15.3\,keV$
Blendengröße	$0.3\ \times\ 0.3\,mm$
Rotationswinkel $\Delta\Phi$	0.5°
Belichtungsdosis	$50\,kHz$
Anzahl der Bilder	360
Abstand Kristall - Detektor	$80\,mm$
Datensammlungstemperatur	$293\,K$

Tabelle F.5: Datensammlungsparameter von $8.8\,T$ und $0\,T$ Myoglobinkristallen aus 77% AS.

Parameter	Wert
Energie	$15.3\,keV$
Blendengröße	$0.3 \times 0.3\,mm$
Rotationswinkel $\Delta\Phi$	$0.5°$
Belichtungsdosis	$100\,kHz$
Anzahl der Bilder	360
Abstand Kristall - Detektor	$60\,mm$
Datensammlungstemperatur	$293\,K$

Tabelle F.6: Datensammlungsparameter von unter Mikrogravitation und auf der Erde in Agarose-Gel gezüchteten TIM-Kristallen.

Parameter	Wert
Energie	$15.3\,keV$
Blendengröße	$0.3 \times 0.3\,mm$
Rotationswinkel $\Delta\Phi$	$0.5°$
Belichtungsdosis	$200\,kHz$
Anzahl der Bilder	240
Abstand Kristall - Detektor	$150\,mm$
Datensammlungstemperatur	$293\,K$

Literaturverzeichnis

[1] A. Ducruix und R Giege. *Crystallization Of Nucleic Acids And Proteins; A Practical Approach.* Oxford University Press, 1999.

[2] A. McPherson. *Crystallization of Biological Macromolecules.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

[3] K.T. Wilke und J. Bohm. *Kristallzüchtung.* Harri Deutsch Verlag, 1988.

[4] R. Boistelle und J.P. Astier. Crystallization mechanism in solution. *J. Cryst. Growth*, 90:14–30, 1988.

[5] A.J. Malkin, Yu.G. Kuznetsov und A. McPherson. In situ atomic force microscopy studies of surface morphology, growth kinetics, defect structure and dissolution in macromolecular crystallization. *J. Cryst. Growth*, 196:471–488, 1999.

[6] H. Lin, F. Rosenberger, J.D. Alexander und A. Nadarajah. Convective-diffuse transport in protein crystal growth. *J. Cryst. Growth*, 151:153–162, 1995.

[7] R. Savino und R. Monti. Buoyancy and surface-tension-driven convection in hanging-drop protein crystallizer. *J. Cryst. Growth*, 165:308–318, 1996.

[8] W. Littke und C. John. Protein single crystal growth under microgravity. *Science*, 225:203–204, 1984.

[9] W. Littke und C. John. Protein single crystal growth under microgravity. *J. Cryst. Growth*, 76:663–672, 1986.

[10] L.J. DeLucas, F.L. Suddath, R. Naumann, M.B. Broom, M. Pusey, V. Yost, B. Herren, D. Carter, B. Nelson, E.J. Meehan, A. McPherson und C.E. Bugg. Preliminary investigations of protein crystals using the space shuttle. *J. Cryst. Growth*, 76:681–693, 1986.

[11] L.D. DeLucas, C.D. Smith, H.W. Smith, S. Vijay-Kumar, S.E. Senadhi, S.E. Ealick, D.C. Carter, R.S. Snyder, P.C. Weber, F.R. Salemme, D.H. Ohlendorf, H.M. Einspahr, L.L. Clancy, M.A. Navia, B.M. McKeever, T.L. Nagabushan, G. Nelson, A. McPherson, S. Koszelak, G. Taylor, D. Stammers, K. Powell, G. Darby und C.E. Bugg. Protein crystal growth in microgravity. *Science*, 246:651–654, 1989.

[12] T.Y. Miller, X. He und D.C. Carter. A comparison between protein crystals grown with vapor diffusion methods in microgravity and protein crystals using gel liquid-liquid diffusion ground-based method. *J. Cryst. Growth*, 122:306–309, 1992.

[13] R. Giege, J. Drenth, A. Ducruix, A. McPherson und W. Saenger. Crystallogenesis of biological macromolecules. Biological, microgravity and other physicochemical Aspects. *Prog. Cryst. Growth Ch.*, 30:237–281, 1995.

[14] B. Lorber, A. Theobald-Dietrich, C. Charron, C. Sauter, J.D. Ng, D.-W. Zhu und R. Giege. From conventional crystallization to better crystals from space: a review on pilot crystallogenesis studies with aspartyl-tRNA synthetases. *Acta Cryst.*, D58:1674–1680, 2002.

[15] M.C. Robert und F. Lefaucheux. Crystal growth in gels: principle and applications. *J. Cryst. Growth*, 90(358-367), 1988.

[16] T. Molenkamp. *Marangoni Convection, Mass Transfer and Microgravity.* PhD thesis, University of Groningen, Netherlands, 1968.

[17] L.J. DeLucas. Protein crystallization - is it rocket science? *Drug Discov. Today*, 6(14):734–744, 2001.

[18] S.B. Howard, P.J. Twigg, J.K. Baird und E.J. Meehan. The solubility of hen-egg-white lysozyme. *J. Cryst. Growth*, 90:94–104, 1988.

[19] G.K. Christopher, A.G. Phipps und R.J. Gray. Temperature-dependent solubility of selected proteins. *J. Cryst. Growth*, 191:820–826, 1998.

[20] I. Dobrianov, K.D. Finkelstein, S.G. Lemay und R.E. Thorne. X-ray topography studies of protein crystal perfection and growth. *Acta Cryst.*, D54:922–937, 1998.

[21] J.R. Luft, D.T. Albright, J.K. Baird und G.T. DeTitta. The Rate of Water Equilibration in Vapor-Diffusion Crystallizations: Dependence on the Distance from Droplet to Reservoir. *Acta Cryst.*, D56:1098–1106, 1996.

[22] E.L. Forsythe, D.L. Maxwell und M. Pusey. Vapor diffusion, nucleation rates and the reservoir to crystallization volume ratio. *Acta Cryst.*, D58:1601–1605, 2002.

[23] C. Giacovazzo, editor. *Fundamentals of Crystallography.* IUCr Texts on Crystallography. International Union of Crystallography, 1992.

[24] M.M. Woolfson. *An introduction to X-ray crystallography.* Cambridge University Press, 1997.

[25] A. Authier. *Dynamical Theory of X-Ray Diffraction.* International Union of Crystallography; Oxford Science Publications, 2001.

[26] E. Prince, editor. *International Tables for Crystallography Volume C: Mathematical, physical and chemical tables.* International Union of Crystallography - Springer, 2004.

[27] F. Rosenberger. Inorganic and protein crystal growth - similarities and differences. *J. Cryst. Growth*, 76:618–636, 1986.

[28] A. Shaikevitch und Z. Kam. Investigation of long-range Order in Protein Crystals by X-ray Diffraction. *Acta Cryst.*, A37:871–875, 1981.

[29] C.L. Caylor, I. Dobrianov, S.G. Lemay, C. Kimmer, S. Krimiski, K.D. Finkelstein, W. Zipfel, W.W. Webb, B.R. Thomas, A.A. Chernov und R.E. Thoren. Macromolecular impurities and disorder in protein crystals. *Proteins*, 36:270–281, 1999.

[30] A.J. Malkin und R.E. Thorne. Growth and disorder of macromolecular crystals: insights from atomic force microscopy and x-ray diffraction studies. *Methods*, 34:273–299, 2004.

[31] E. Weckert und K. Hümmer. On the quantitative determination of triplet phases by X-ray three-beam diffraction. *Acta Cryst.*, A46:387–393, 1990.

[32] R.W. Alkire, W.B. Yelon und J.R. Schneider. Determination of the absolute structure factor for forbidden (222) reflection in silicon using 0.12 Åγ-rays. *Phys. Rev.*, 26(6):3097–3104, 1982.

[33] E.H. Snell, S. Weisgerber, J.R. Helliwell, E. Weckert, K. Hölzer und K. Schroer. Improvements in lysozyme crystal perfection through microgravity growth. *Acta Cryst.*, D51:1099–1102, 1995.

[34] E.H. Snell, A. Cassetta, J.R. Helliwell, T.J. Boggon, N.E. Chayen, E. Weckert, K. Hölzer, K. Schroer, E.J. Gordon und P.F. Zagalsky. Partial improvement of crystal quality for microgravity-grown Apocrustacyanin C_1. *Acta Cryst.*, 53:231–239, 1997.

[35] Joseph D. Ng, Bernard Lorber, Richard Giegé, Stanley Koszelak, Aaron Greenwood und Alexander McPherson. Comparative Analysis of Thaumatin Crystals Grown on Earth and in Microgravity. *Acta Cryst.*, D53:724–733, 1997.

[36] D. Lübbert, A. Meents und E. Weckert. Accurate rocking-curve measurements on protein crystals grown in a homogeneous magnetic field of 2.4 T. *Acta Cryst.*, D60:987–998, 2004.

[37] E. Snell, H.D. Bellamy und G.E.O. Borgstahl. Macromolecular crystal quality. *Method. Enzymol.*, 368:268–288, 2003.

[38] R.J. Matyi und H.M. Volz. Triple-axis x-ray diffraction analyses of hen-egg white lysozyme crystals. *J. Phys. D Appl. Phys.*, 34:A64–69, 2001.

[39] H.D. Bellamy, E.H. Snell, J. Lovelace, M. Pokross und G.E.O. Borgstahl. The high mosaicity illusion: revealing the true characteristics of macromolecular crystals. *Acta Cryst.*, D56:986–995, 2000.

[40] M.C. Robert, B. Capelle, B. Lorber und R. Giege. Influence of impurities on protein crystal perfection. *J. Cryst. Growth*, 232:489–497, 2001.

[41] J.W. Pflugrath. The finer things in x-ray diffraction data collection. *Acta Cryst.*, D55:1718–1725, 1999.

[42] N. Wermes. Trends in pixel detectors: Tracking and imaging. *IEEE T. Nucl. Sci.*, 51:1006–1015, 2004.

[43] R. Helliwell. Protein crystal perfection and the nature of radiation damage. *J. Cryst. Growth*, 90:259–272, 1988.

[44] M. Colapietro, G. Cappuccio, C. Marciante, A. Pifferi, R. Spagna und J.R. Helliwell. The x-ray diffraction station at the adone wiggler facility: Preliminary results (including crystal perfection). *J. Appl. Cryst.*, 25:192–195, 1992.

[45] R. Fourme, A. Ducruix, M. Ries-Kautt und B. Capelle. The perfection of protein crystals probed by direct recording of Bragg reflection profiles with a quasi-planar X-ray wave. *J. Synchr. Rad.*, 2:136–142, 1995.

[46] T. Sato, Y. Yamada, S. Saijo, T. Hori, R. Hirose, N. Tanaka, G. Sazaki, K. Nakajima, N. Igarashi, M. Tanaka und Y. Matsuura. Enhancement in the perfection of orthorhombic lysozyme crystals grown in a high magnetic field (10 T). *Acta Cryst.*, D56:1079–1083, 2000.

[47] T. Sato, Y. Yamada, S. Saijo, T. Hori, R. Hirose, N. Tanaka, G. Sazaki, K. Nakajima, N. Igarashi, M. Tanaka und Y. Matsuura. Improvement in diffraction maxima in orthorhombic HEWL crystal grown under high magnetic field. *J. Cryst. Growth*, 232:229–236, 2001.

[48] G.E.O. Borgstahl, A. Vahedi-Faridi, J. Lovelace, H.D. Bellamy und E.H. Snell. A test of macromolecular crystallization in microgravity: large well ordered insulin crystals. *Acta Cryst.*, D57:1204–1207, 2001.

[49] H. Hope. Cryocrystallography of biological macromolecules. *Acta Cryst.*, B44:22–26, 1988.

[50] E.F. Garman und T.R. Schneider. Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, 30:211–237, 1997.

[51] E.P. Mitchell und E.F. Garman. Flash freezing of protein crystals: investigation of mosaic spread and diffraction limit with variation of cryoprotectant concentration. *J. Appl. Cryst.*, 27:1070–1074, 1994.

[52] E. Garman und P. Mitchell. Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions. *J. Appl. Cryst.*, 29:584–587, 1996.

[53] K.A. Robinson, J.E. Ladner, M. Tordova und G.R. Gilliand. Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography. *Acta Cryst.*, D56:996–1001, 2000.

[54] T.-Y. Teng und K. Moffat. Cooling rates during flash cooling. *J. Appl. Cryst.*, 31:252–257, 1998.

[55] S. Kriminsky, C. Caylor, M.C. Nonato, K.D. Finkelstein und R.E. Thorne. Flash cooling and annealing of protein crystals. *Acta Cryst.*, D58:459–471, 2002.

[56] A. Vahedi-Faridi, J. Lovelace, H.D. Bellamy, E.H. Snell und G.E.O. Borgstahl. Physical and structural studies on the cryocooling of insulin crystals. *Acta Cryst.*, D59:2169–2182, 2003.

[57] J.M. Harp, D.E. Timm und G.J. Bunick. Macromolecular crystal annealing: Overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography. *Acta Cryst.*, D54:622–628, 1998.

[58] R.L. Owen und E. Garman. A new method for predeterming the diffraction quality of protein crystals: using soap as a selection tool. *Acta Cryst.*, D61:130–140, 2005.

[59] K.S. Hölzer. *Strukturlösung mit experimentell bestimmten Triplettphasen am Besipiel des tetragonalen Lysozyms.* PhD thesis, Fakultät für Physik der Universität Karlsruhe, 1998.

[60] J. Lovelace, E.H. Snell, M. Pokross, A.S. Arvai, C. Nielsen, N.-H. Xuong, H.D. Bellamy und G.E.O. Borgstahl. BEAM-ish: a graphical user interface for the physical characterization of macromolecular crystals. *J. Appl. Cryst.*, 33:1187–1188, 2000.

[61] J. Lovelace und G.E.O. Borgstahl. BEAM-ish 2.0: a graphical user interface for the physical characterization of macromolecular crystals. *J. Appl. Cryst.*, 36:1101–1002, 2003.

[62] J.L. Ferrer und M. Roth. An algorithm for automatic mosaic spread analysis of a protein crystal. *J. Appl. Cryst.*, 31:523–532, 1998.

[63] W. Kabsch. Crystallography of biological macromolecules. In M.G. Rossmann und E. Arnold, editors, *International Tables for Crystallography*, volume F, chapter 25.2.9. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2001.

[64] Z. Otinowksi und W. Minor. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Method. Enzymol.*, 276:307–326, 1997.

[65] T.J. Boggon, J.R. Helliwell, R.A. Judge, A. Olczak, D.P. Siddons, E.H. Snell und V. Stojanoff. Synchrotron x-ray reciprocal-space mapping, topography and diffraction resolution studies of macromolecular crystal quality. *Acta Cryst.*, D56:868–880, 2000.

[66] R.J. Matyi und H.M. Volz. Triple-axis x-ray diffraction analyses of hen egg-white lysozyme crystals. *Journal of Physics D*, 34:A64–A69, 2001.

[67] E. Weckert, D. Lübbert, A. Meents und H. Franz. Comparison of CCD and Image Plate detector performance for photon energies above 25keV. *Annual Report HASYLAB*, Seiten 987–988, 2002.

[68] G.M. Sheldrick, Z. Dauter, K.S. Wolson, H. Hope und L.C. Sieker. The application of direct methods and patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Cryst.*, D49:18–23, 1993.

[69] K Diederichs und P.A. Karplus. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat. Struct. Biol.*, 4(4):269–275, 1997.

[70] R.B.G. Ravelli, P. Theveneau, S. McSweeney und M. Caffrey. Unit-cell volume changes as a metric of radiation damage in crystals of macromolecules. *J. Synchr. Rad.*, 9:355–360, 2002.

[71] K. Diederichs, S. McSweeney und R.B.G. Ravelli. Zero dose extrapolation as part of macromolecular synchrotron data reduction. *Acta Cryst.*, D 59:903–909, 2003.

[72] A. Gonzalez und C. Nave. Radiation damage in protein crystals at low temperature. *Acta Cryst.*, D50:874–877, 1994.

[73] R. Müller, E. Weckert, J. Zellner und M. Drakopoulos. Investigation of radiation-dose-induced changes in organic light-atom crystals by accurate d-spacing measurements. *J. Synchr. Rad.*, 9:368–374, 2002.

[74] H. Lueken. *Magnetochemie*. Teubner, 1999.

[75] J.F. Nye. *Physical Properties of Crystals; Their Representation by Tensors and Matrices*. Oxford Univerity Press, 1985.

[76] M.D. Simon und A.K. Geim. Diamagnetic levitation: Flying frogs and floating magnets. *J. Appl. Phys.*, 87(9):6200–6204, 2000.

[77] J.R. Tolman, J.M. Flanagan, M.A. Kennedy und J.H. Prestegard. Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: Information for structure determination in solution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92:9279–9283, 1995.

[78] J.S. Brooks, J.A. Reavis, R.A. Medwood, T.F. Stalcup, M.W. Meisel, E. Steinberg, L. Arnowitz, C.C. Stover und J.A.A.J. Perenboom. New opportunities in science, materials, and biological systems in the low gravity (magnetic levitation) environment. *J. Appl. Phys.*, 87(9):6194–6199, 2000.

[79] I. Wakayama, N., M. Ataka und H. Abe. Effect of a magnetic field gradient on the crystallization of hen lysozyme. *J. Cryst. Growth*, 178:653–656, 1997.

[80] S.-X. Lin, M. Zhou, A. Azzi, G.-J. Xu, N.I. Wakayama und M. Ataka. Magnet used for protein crystallization: Novel attempts to improve the crystal quality. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 275:274–278, 2000.

[81] J. Qi, N.I. Wakyama und M. Ataka. Magnetic suppression of convection in protein crystal growth processes. *J. Cryst. Growth*, 232:132–137, 2001.

[82] D.C. Yin, N.I. Wakayama, K. Harata, M. Fujiwara, T. Kiyoshi, H. Wada, N. Niimura, S. Arai, W.D. Huang und Y. Tanimoto. Formation of protein crystals (orthorhombic lysozyme) in quasi-microgravity environment obtained by superconducting magnet. *J. Cryst. Growth*, 270:184–191, 2004.

[83] W. Thomson. On the forces experienced by mmall spheres under magnetic influence; and some of the phenomena presented by diamagnetic substances. In *Reprint of Papers on Electrostatics and Magnetism*, volume XXXIII, pages 493–499. MacMillan, London, 1872.

[84] R.C. Weast, editor. *Handbook of Chemistry and Physics*, volume 68. CRC Press, Inc., 1987-1988.

[85] G. Careri, L.De Angelis, E. Gratton und C. Messana. Magnetic susceptibility of lysozyme. *Phys. Lett.*, 60A(5):490–491, 1977.

[86] Y. Ikezoe, N. Hirota, J. Nakagawa und K. Kitazawa. Making water levitate. *Nature*, 393:749–750, 1998.

[87] W. Braunbek. Freies Schweben diamagnetischer Körper im Magnetfeld. *Z. Phys.*, 112:764–769, 1939.

[88] A. Beaugnon und R. Tournier. Levitation of organic materials. *Nature*, 349:470, 1991.

[89] M.V. Berry und A.K. Geim. Of flying frogs and levitrons. *Eur. Phys. J.*, 18:307–313, 1997.

[90] M. Tagami, M. Hamai, I. Mogi, K. Watanabe und M. Motokawa. Solidification of levitating water in a gradient strong magnetic field. *J. Cryst. Growth*, 203:594–598, 1999.

[91] T.K. Kiyoshi, O. Ozaki, H. Morita, H. Nakayama, H.-B. Jin, H. Wada, N.I. Wakayama und M. Ataka. Superconducting magnets for generating uniform magnetic force field. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, 9(2):362–365, 1999.

[92] Y.G. Kuznetsov, A.J. Malkin und A. McPherson. In situ atomic force microscopy studies of surface morphology, growth kinetics, defect structure and dislocations in macromolecular crystallization. *J. Cryst. Growth*, 196:471–488, 1999.

[93] M. Plomb, A. McPherson und A.J. Malkin. Repair of impurity-poisoned protein crystal surfaces. *Proteins*, 50:486–495, 2003.

[94] M. Skouri, B. Lorber, J.-P. Munch und J.S. Candau. Effect of macromolecular impurities on lysozyme solubility and crystallizability: dynamic light scattering, phase diagram, and crystal growth studies. *J. Cryst. Growth*, 152:209–220, 1995.

[95] P.G. Vekilov, L.A. Monaco, B.R. Thomas, V. Stojanoff und F. Rosenberger. Repartitioning of NaCl and protein impurities in lysozyme crystallization. *Acta Cryst.*, D52:785–798, 1996.

[96] P.G. Vekilov, L.A. Monaco und F. Rosenberger. Facet morphology response to nonuniformities in nutrient and impurity supply - I. Experiments and interpretation. *J. Cryst. Growth*, 156:267–278, 1995.

[97] J. Hirschler, F. Halgland, E. Forest und J.C. Fontecilla-Camps. Contaminant conclusion into protein crystals analyzed by electrospray mass spectrometry and x-ray crystallography. *Protein Sci.*, 7:185–192, 1998.

[98] B.R. Thomas, P.G. Vekilov und F. Rosenberger. Heterogenity determination and purification of commercial hen egg-white lysozyme. *Acta Cryst.*, D52:776–784, 1996.

[99] M. Ataka und N.I. Wakayama. Effects of a magnetic field and magnetization force on protein crystal growth. Why does a magnet improve the quality of some crystals? *Acta Cryst.*, D58:1708–1710, 2002.

[100] S. Saijo, Y. Yamada, T. Sato, N. Tanaka, T. Matsui, G. Sazaki, K. Nakajima und Y. Matsuura. Structural consequences of hen egg-white lysozyme orthorhombic crystal growth in a high magnetic field: validation of X-ray diffraction intensity, conformational energy searching and quantitative analysis of B factors and mosaicity. *Acta Cryst.*, D61:207–217, 2005.

[101] K. Lonsdale und K.S. Krishnan. Diamagnetic anisotropy of crystals in relation to their molecular structure. *Proc. R. Soc. Lond.*, A156:597–613, 1936.

[102] Kathleen Lonsdale. Diamagnetic anisotropy of conjugated compounds. *J. Chem. soc.*, pages 364–368, 1938.

[103] D.L. Worcester. Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(11):5475–5477, November 1978.

[104] Elliot G. Finer und Arthur Darke. Orientation of poly-l-lysine hydrobromide by magnetic fields. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. Sect. I*, 71:984–987, 1975.

[105] W.D.Jr. Horrock und E.S. Greenberg. Evaluation of dipolar nuclear magnetic resonance shifts in low-spin hemin systems: Ferrocytochrome c and methmyoglobin cyanide. *Biochim. Biophys. Acta*, 322:38–44, 1973.

[106] Kathleen Lonsdale. Diamagnetic anisotropy of organic molecules. *Proc. R. Soc. London Ser. A*, 171:541–568, 1939.

[107] Marc Chabre. Diamagnetic anisotropy and orientation of α helix in frog rhodopsin and meta II intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(11):5471–5474, 1978.

[108] J. Torbet, J.-M. Freyssinet und G. Hudry-Clergon. Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields. *Nature*, 289(5793):91–93, 1981.

[109] J. Torbet und G. Maret. Fibres of highly oriented Pf1 Bacteriophage produced in a strong magnetic field. *J. Mol. Biol.*, 134:843–845, 1979.

[110] P.E. Fraser, D.R. McLachlan, W.K. Surewicz, C.A. Mizzen, A.D. Snow, J.T. Nguyen und D.A. Kirschner. Conformation and fibrillogenesis of Alzheimer Aβ Peptides with selected substitution of charged residues. *J. Mol. Biol.*, 244:64–73, 1994.

[111] P. Sikorski, E.D.T. Atkins und L.C. Serpell. Structure and texture of fibrous crystals formed by Alzheimer's Aβ(11-25) peptide fragment. *Structure*, 11:915–926, 2003.

[112] G. Maret, M.v. Schickfus, A. Mayer und K. Dransfeld. Orientation of nucleic acids in high magnetic fields. *Phys. Rev. Lett.*, 35(6):397–400, 1975.

[113] J.W. Beams. Electric and magnetic double refraction. *Rev. Mod. Phys.*, 4:133–172, 1932.

[114] E.W. Bastiaan, C. MacLean, P.C.M. van Zijl und A.A. Bothner-By. High-resolution NMR of liquids and gases: Effect of magnetic-field-induced molecular alignment. *Ann. R. NMR S.*, 19:35–77, 1987.

[115] N Tjandra and A. Bax. Direct measurements of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science*, 278:1111–1113, 1997.

[116] M.R. Hansen and A. Pardi. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat. Struct. Biol.*, 5(12):1065–1074, 198.

[117] E. Oldfield und T.M. Rothgeb. NMR of individual sites in protein crystals. Magnetic ordering effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 102:3635–3537, 1980.

[118] M. Ataka, E. Katoh und N.I. Wakayama. Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of crystallization of lysozyme. *J. Cryst. Growth*, 173:592–596, 1997.

[119] G. Sazaki, E. Yoshida, H. Komatsu, S. Nakada, T. Myashita und K. Watanabe. Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals. *J. Cryst. Growth*, 173:231–234, 1997.

[120] Y. Tanimoto, R. Yamaguchi, Y. Kanazawa und M. Fujiwara. Magnetic orientation of lysozyme crystals. *RIKEN review*, 44:162–163, 2002.

[121] S.I. Yanagiya, G. Sazaki, S.D. Durbin, S. Miyashita, T. Nakada, H. Komtsu, K. Watanabe und M. Motokawa. Effect of a magnetic field on the orientation of hen egg-white lysozyme crystals. *J. Cryst. Growth*, 196:319–324, 1999.

[122] J.P. Astier, S. Veesler und R. Boistelle. Protein crystals orientation in a magnetic field. *Acta Cryst.*, D54:703–706, 1998.

[123] T.Michael Rothgeb und Eric Oldfield. Nuclear magnetic resonance of heme protein crystals. *J. Biol. Chem.*, 256(3):1432–1446, 1981.

[124] S. Sakurazawa, T. Kubota und M. Ataka. Orientation of protein crystals grown in a magnetic field. *J. Cryst. Growth*, 196:325–331, 1999.

[125] D.C. Yin, Y. Oda, N.I. Wakayama und M. Ataka. New morphology, symmetry, orientation and perfection of lysozyme crystals grown in a magnetic field when

paramagnetic salts ($NiCl_2$, $CoCl_2$ and $MnCl_2$) are used as crystallizing agents. *J. Cryst. Growth*, 252:618–625, 2003.

[126] S. Yanagiya, G. Sazaki, S.D. Durbin, S. Miyashita, K. Nakajima, H. Komatsu, K. Watanabe und M. Motokawa. Effects of a magnetic field on the growth rate of tetragonal lysozyme crystals. *J. Cryst. Growth*, 208:645–650, 2000.

[127] D.C. Yin, Y. Inatomi und K. Kuribayashi. Study of lysozyme crystal growth under a strong magnetic field using a Mach-Zehnder interferometer. *J. Cryst. Growth*, 226:534–542, 2001.

[128] D.C. Yin, Y. Inatomi, N.I. Wakayama, W.D. Huang und K. Kuribayashi. An investigation of magnetic field effects on the dissolution of lysozyme crystal and related phenomena. *Acta Cryst.*, D58:2024–2030, 2002.

[129] A.F. Witt, G.J. Herman und H.C. Gatos. Czochalski-type crystal growth in transverse magnetic fields. *Journal of Material Science - Letters*, 5:822–824, 1970.

[130] C. Zhong und N.I. Wakayama. Effect of a high magnetic field on the viscosity of an aqueous solution of protein. *J. Cryst. Growth*, 226:327–332, 2001.

[131] C. Zhong, L. Wang und N.I. Wakayama. Effect of a high magnetic field on protein crystal growth - magnetic field induced order in aqueous protein solutions. *J. Cryst. Growth*, 233:561–566, 2001.

[132] L. Wang, C. Zhong und N.I. Wakayama. Damping of natural convection in the aqueous protein solution by the application of high magnetic fields. *J. Cryst. growth*, 237-239:312–316, 2002.

[133] G. Sazaki, D. Durbin, S., S. Miyashita, T. Ujihara, K. Nakajima und M. Motokawa. Magnetic damping of the temperature-driven convection in NaCl aqueous solution using a static and homogenous field of 10T. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 38:L842–L844, 1999.

[134] A.J. Malkin, Y.G. Kuznetsov, T.A. Land, J.J. DeYoro und A. McPherson. Mechanisms of growth of protein and virus crystals. *Nature Structural Biology*, 2(11):956–959, 1995.

[135] A.J. Malkin, Y.G. Kuznetsov und A. McPherson. Incorporation of microcrystals by growing protein and virus crystals. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 24:247–252, 1996.

[136] J.P. Astier, D. Bokern, L. Lapena und S. Veesler. α-amylase crystal growth investigated by in situ atomic force microscopy. *J. Cryst. Growth*, 226:294–302, 2001.

[137] L.J. DeLucas, M.M. Long, K.M. Moore, W.M. Rosenblum, T.L. Bray, C. Smtih, M. Carson, S.V.L. Narayana, M.D. Harrington, D. Carter, A.D. Clark, Jr., R.G. Nanni, J. Ding, A. Jacobo-Molina, S.H. Kamer, S.H. Hughes, E. Arnold, H.M.

Einspahr, L.l. Glancy, G.S.J. Rao, P.F. Cook, B.G. Harris, S.H. Munson, B.C. Finzel, A. McPherson, P.C. Weber, F.A. Weber, F.A. Lewandowski, T.L. Nagabhushan, P.P. Trotta, P. Reichert, M.A. Navia, K.P. Wilson, J.A. Thomson, R.N. Richards, K.D. Bowersox, C.J. Meade, E.S. Baker, B.J. Bishop, B.J. Dunbar, E. Trinh, J. Prahl, A. Sacco Jr. und C.E. Bugg. Recent results and new hardware developments for protein crystal growth in microgravity. *J. Cryst. Growth*, 135:183–195, 1994.

[138] M. Pusey, W. Witherow und R. Naumann. Preliminary investigations into solutal flow about growing tetragonal lysozyme crystals. *J. Cryst. Growth*, 90:105–111, 1988.

[139] C.C. Young, R.C. De Mattei, R.S. Feigelson und W.A. Tiller. Some implications of colloid stability theory for protein crystallization. *J. Cryst. Growth*, 90:79–85, 1988.

[140] S. Koszelak und A. McPherson. Time lapse microphotography of protein crystal growth using a color VCR. *J. Cryst. Growth*, 90:304–343, 1988.

[141] S. Koszelak, D. Martin, J. Ng und A. McPherson. Protein crystal growth rates determined by time laps microphotography. *J. Cryst. Growth*, 110:177–181, 1991.

[142] N.E. Chayen, E.H. Snell, J.R. Helliwell und P.F. Zagalsky. CCD video observation of microgravity crystallization of apocrustacyanin C_1. *J. Cryst. Growth*, 171:219–225, 1997.

[143] P.G. Vekilov. Protein crystal growth - microgravity aspects. *Adv. Space Res.*, 24(10):1231–1240, 1999.

[144] W. Littke. A new universally applicable procedure for wall-contact-free single crystal growth from a suspended droplet under conditions of microgravity (suspended drop method). *J. Cryst. Growth*, 90:344–348, 1988.

[145] J. Day und A. McPherson. Macromolecular crystal growth experiments on international microgravity laboratory-1. *Protein Sci.*, 1:1254–1268, 1992.

[146] K. Asano, S. Fujita, T. Senda und Y. Mitsui. Crystal growth of Ribonuclease S under microgravity. *J. Cryst. Growth*, 122:323–329, 1992.

[147] R.K. Srong, A. Stoddard, B.L.and Arott und G.K. Farber. Long duration growth of protein crystals in microgravity aboard the MIR space station. *J. Cryst. Growth*, 119:200–214, 1992.

[148] V.A. Erdmann, C. Lippmann, C. Betzel, Z. Dauter, K. Wilson, R. Hilgenfeld, J. Hoven, A. Liesum, W. Saenger, A. Müller-Fahrnow, W. Hinrichs, M. Düvel, G.E. Schulz, C.W. Müller, H.G. Wittmann, A. Yonath, G. Weber, K. Stegen und K.A. Plaas-Lin. Crystallization of proteins under microgravity. *FEBS Lett.*, 259(1):194–198, 1989.

[149] R.-C. Bi, L.-L. Gui, Q. Han, F.-L. Shen, K. Shi, P. Wang, Y, S.-Z. Chen, Y.-L. Hu, X.-T. Niu, J. Dong, Y.-C. Zhou und N.-Q. Lin. Protein crystallization in space. *Microgravity Sci. Tec.*, VII/2:203–206, 1994.

[150] L.J. De Lucas, C.D. Smith, D.C. Carter, R.S. Snyder, A. McPherson, S. Koszelak und C.E. Bugg. Microgravity protein crystal growth: results and hardware development. *J. Cryst. Growth*, 109:12–16, 1991.

[151] M.M. Long, L.J. DeLucas, C. Smith, M. Carson, K. Moore, M.D. Harrington, D.J. Pillion, S.P. Bishop, W.M. Rosenblum, R.J. Naumann, A. Chait, J. Prahl und C.E. Bugg. Protein crystal growth in microgravity - temperature induced large scale crystallization of insulin. *Microgravity Sci. Tec.*, VII/2:196–202, 1994.

[152] C. Betzel, N. Günther, S. Poll, K. Moore, L.J. DeLucas, C.E. Bugg und W. Weber. Crystallization of the EGF receptor ectodomain on US Space Mission STS-47. *Microgravity Sci. Tec.*, VII/3:242–245, 1994.

[153] L. Sjölin, A. Wlodawer, G. Bergqvist, P. Holm, K. Loth, H. Malmström, J. Zaar, L. Anders Svensson und G.L. Gilliland. Protein crystal growth of Ribonuclease A and pancreatic trypsin inhibitor aboard the MASER 3 rocket. *J. Cryst. Growth*, 110:322–332, 1991.

[154] S.D. Trakhanov, A.I. Grebenko, A.V. Shirokov, A.V. Gudkov, A.V. Egorov, I.N. Barmin, B.K. Vainstein und A.S. Spirin. Crystallization of protein and ribosomal particles in microgravity. *J. Cryst. Growth*, 110:317–321, 1991.

[155] R. Hilgenfeld, A. Liesum, R. Storm und A. Plaas-Link. Crystallization of two bacterial enzymes on an unmanned space mission. *J. Cryst. Growth*, 122:200–214, 1992.

[156] A. McPherson. Effects of a microgravity environment on the crystallization of biological macromolecules. *Microgravity Sci. Tec.*, VI/2:101–109, 1993.

[157] M.M. Long, J.B. Bishop, T.L. Nagabhushan, P. Richert, G.D. Smith und L.J. DeLucas. Protein crystal growth in microgravity of large scale temperature induction method: bovine insulin, human insulin and human alpha interferon. *J. Cryst. Growth*, 168:233–243, 1996.

[158] J.-S. Pan, X.-T. Niu, L.-L. Gui, Y.-C. Zhou und R.-C. Bi. Crystallization under microgravity of acidic phospholipase a_2 from venom of *Agkistrodon halys Pallas*. *J. Cryst. Growth*, 168:227–232, 1996.

[159] J. Qi, N.I. Wakayama und A. Yabe. Attenuation of natural convection by magnetic force in electro-nonconducting fluids. *J. Cryst. Growth*, 204:408–412, 1999.

[160] L.B. Wang und N.I. Wakayama. Control of natural convection in non- and low-conducting diamagnetic fluids in a cubical enclosure using inhomogeneous magnetic fields with different directions. *Chem. Eng. Sci.*, 57:1867–1876, 2002.

[161] L. Arnowitz, E. Steinberg, J.S. Brooks, K. Storr und L. Balicas. Protein crystal growth studies in the low-gravity environment of the 19.5 T NMR magnet. *NHFML annual research review, National high magnetic field laboratory, Tallahassee, Florida (USA)*, pages 13–14, 2001.

[162] S. Maki, Y. Oda und M. Ataka. High-quality crystallization of lysozyme by magneto-archimedes levitation in a superconducting magnet. *J. Cryst. Growth*, 261:557–565, 2004.

[163] Fa. Vakuumschmelze Hanau, Hr. Boergermann. Experimentelle Magnetisierungswerte von VACOFLUX 50. persönliche Mitteilung.

[164] O. Chubar, P. Elleaume und J. Chavanne. A 3D magnetostatics computer code for insertion devices. *J. Synchr. Rad.*, 5:481–484, 1998.

[165] S. Wolfram. *Mathematica*. Adisson-Wesley, 3. auflage edition, 1997.

[166] Bruker. *Technische Beschreibung B-E 45 Elektromagnet*.

[167] W. Kabsch. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.*, 26:795–800, 1993.

[168] W.A. Stahel. *Statistische Datenanalyse*. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, 1995.

[169] D. Zwillinger und S. Kokoska. *Standard probability and statistics tables and formula*, chapter 14.9, pages 373–377. Boca Raton: Chapman & Hall, 2000.

[170] M. Abramowitz und I.A. Stegun. *Handbook of mathematical functions*, chapter 26.2.17, page 932. Dover publications, Inc., 1970.

[171] NUMBER 4 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.*, D50:760–763, 1994.

[172] N.E. Chayen und E. Saridikakis. Is lysozyme the ideal model protein? *J. Cryst. Growth*, 232:262–264, 2001.

[173] J.C. Kendrew und R.G. Parrish. The crystal structure of myoglobin; III. Sperm whale myoglobin. *Proc. R. Soc. A.*, 238:305–324, 1956.

[174] D. Maes, J.P. Zeelen, N. Thanki, N. Beaucamp, M. Alvarez, M.H. Thi, J. Backmann, J.A. Martial, L. Wyns, R. Jaenicke und R.K. Wierenga. The crystal structure of Triosephosphate isomerase (Tim) from Thermotoga Maritima : A comparative thermostability structural analysis of ten Tim structures. *Proteins*, 37:411–453, 1999.

[175] C. Sauter, F. Otálora, J.A. Gavira, O. Vidal, R. Giegé und J.M. Garcia-Ruiz. Structure of tetragonal hen egg-white lysozyme at 0.94 Å from crystals grown by the counter-diffusion method. *Acta Cryst.*, D57:1119–1126, 2001.

[176] D. Sayre. X-ray crystallography: The past and present of the phase problem. *Struct. Chem.*, 13(1):81–96, 2002.

[177] J.C.H. Spence und R.B. Doak. Single molecule diffraction. *Phys. Rev. Lett.*, 92:198102, 2004.

[178] C. Sauter, B. Lorber und R. Giege. Towards atomic resolution with crystals grown in gel: The case of thaumatin seen at room temperature. *Proteins*, 48:146–150, 2002.

[179] G.S. Kachalova, A.N. Popov und H.D. Bartunik. A steric mechanism for inhibition of CO binding to heme proteins. *Science*, 284:473–476, 1999.

[180] J. Vojtechovsky, K. Chu, J. Berendzen, R.M. Sweet und I. Schlichting. Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophys. J.*, 77:2153–2174, 1999.

[181] E.N. Baker, T. L. Blundell, J.F. Cutfield, S.M. Cutfield, E.J. Dodson, G.G. Dodson, D.M. Hodgkin, R.E. Hubbard, N.W. Isaacs und C.D. Reynolds. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 319:369–456, 1988.

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei meinen Betreuer der Arbeit, Herrn PD Edgar Weckert, für die interessante Aufgabenstellung, die tollen Möglichkeiten am HASYLAB, die anregenden Diskussionen, die wertvollen Ratschläge und die Hilfestellung bei den Experimenten, auch abends und am Wochenende, ganz herzlich bedanken.

Danken mchte ich zudem Herrn Prof. Dr. Robert L. Johnson und Herrn Prof. Dr. Bernd Sonntag für die freundliche Übernahme der Gutachterrolle bei der Promotion bzw. Disputation.

Weiterhin möchte ich mich bei Daniel Lübbert, Bernd Reime, Heiko Schulz-Ritter, Rainer Harf und Helge Larsen für die sehr gute Zusammenarbeit und Hilfe, die ich von ihnen erfahren habe, ganz herzlich bedanken. Ohne sie wäre in dieser Arbeit vieles nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gebührt zudem dem Team der HASYLAB-Werkstatt von Jens Brehling insbesondere für die technische Umsetzung des PROLET, den Bau diverser Kristallisationseinsätze und Thermostaten für die unterschiedlichen Magneten und neuer Teile für den Petra-1 Messplatz.

Herrn Dr. Dieter Elefant und dem Team vom IFW-Dresden möchte ich für die Möglichkeit zur Nutzung der dortigen Magneten und die große Hilfsbereitschaft, die ich dort auch zu später Stunde erfahren habe, danken. Ebenso gebührt mein Dank Herrn Dr. Yorck Holler und Herrn Hermann Herzog und deren Mitarbeitern für die Möglichkeit zur Nutzung der bei DESY aufgestellten Magneten mit der zugehörigen Infrastruktur sowie deren großer Hilfsbereitschaft.

Wolfgang Morgenroth und Armin Wagner und den weiteren 'Korrekturlesern' der Arbeit sei an diese Stelle ebenfalls gedankt. Jürgen Harf danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung einiger Graphiken.

Auch all den anderen Leuten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und hier nicht namentlich erwähnt wurden, möchte ich ebenfalls für deren Unterstützung, große Hilfsbereitschaft und Geduld danken.

Bei meiner Freundin Elke Birkheuser möchte ich mich für das große Verständnis meiner Arbeit gegenüber, insbesondere im Frühjahr und Sommer 2004, ganz herzlich bedanken.