

between the palladium atoms, are considered to be chiefly of metallic character. This is apparent from the palladium-palladium distances, which are only slightly larger than the distance 2.7505 Å in metallic palladium according to the data by Swanson & Tatge (1953). The varying bond distances between the palladium atoms are probably a compensation for the lack of coordination symmetry.

The authors express their appreciation to Prof. Haakon Haraldsen for his interest in this study and for making laboratory facilities available.

#### References

- GRØNVOLD, F. & RØST, E. (1956). *Acta Chem. Scand.* **10**, 1620.  
 SWANSON, H. E. & TATGE, E. (1953). *U. S. Nat. Bur. Stand.*, Circular 539, Vol. 1, p. 21.

*Acta Cryst.* (1962). **15**, 13

## Phasenbestimmung durch Quadrierung der Elektronendichte im Bereich von 2 Å- bis 1,5 Å-Auflösung

VON WALTER HOPPE

*Abteilung für Röntgenstrukturforschung am Max-Planck-Institut für Eiweiss- und Lederforschung, München, und Abteilung für Strukturforschung am Physikalisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München, Deutschland*

(Eingegangen am 26. Januar 1961)

An approximate method for the phase determination of additional structure factors, necessary for increasing the resolving power of the electron-density projection from 2 to 1.5 Å, is described. This method, which is of special interest for phase determination of protein crystals, is based on the similarity between the squared 2 Å projection and the 1.5 Å electron-density map of structures containing light elements only. The method is applied to some examples.

### Einleitung

Die für die Strukturuntersuchung von Protein-Einkristallen bisher ausschliesslich verwendete Methode des multiplen isomorphen Ersatzes erfordert die Paralleluntersuchung einer grösseren Anzahl von isomorphen Schweratomderivaten des Proteins. So mussten z. B. im Falle der Strukturuntersuchung von Myoglobin insgesamt 6 verschiedene Kristallsorten gleichzeitig untersucht werden (Bodo *et al.*, 1959). Die damit verbundene Vervielfachung der experimentellen Arbeitszeit ist bei den grossperiodigen Proteingittern derart beträchtlich, dass bisher die Strukturanalyse nur bis zu einer willkürlichen Auflösungsgrenze von 2 Å (im Falle von Myoglobin) (Kendrew *et al.*, 1960) vorangetrieben werden konnte. Die Anwendung der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes wird ferner durch eventuelle kleine Abweichungen der Isomorphie der einzelnen Derivate beeinträchtigt; solche Phasenfehler wirken sich wiederum bei hohen Auflösungen besonders aus.

Eine Auflösung von 2 Å gestattet bereits ein weitgehendes Erkennen der atomaren Struktur, wenn die entsprechenden Fouriersynthesen mit Kenntnis der bekannten Atomabstände, Bindungswinkel und anderer stereochemischer Daten interpretiert werden. Es erscheint daher möglich, ein Modell auf Grund der Ergebnisse der 2 Å-Auflösung zu konstruieren und die auf diesem Modell berechneten Phasen von Struktur-faktoren zur Phasierung der experimentell gemessenen

Struktur-faktoren einer Auflösung von 1,5 Å zu verwenden.\*

In der vorliegenden Arbeit wird nun ein neues Verfahren für eine Näherungsbestimmung dieser Restphasen vorgeschlagen. Es beruht auf gewissen allgemeinen strukturellen Zügen der Elektronendichtefunktion in bestimmten Auflösungen und liefert eine Elektronendichte-Projektion mit einer Auflösung von 1,5 Å ohne modellmässige Vorstellungen. Diese Elektronendichte-Projektion kann zur Aufstellung eines Modelles benutzt werden, das dann selbstverständlich über wechselseitige Berechnungen von Elektronendichte-Projektionen und Modellstruktur-faktoren weiter verfeinert werden kann. Da dieses Modell auf einer — wenn auch noch mit Phasenfehlern versehenen — Elektronendichte-Projektion höherer Auflösung (1,5 Å) beruht, (die naturgemäss zusätzliche experimentelle Informationen enthält) so sollte das Aufstellen des ersten Modells mit grösserer Sicherheit als aus der 2 Å-Elektronendichte-Projektion möglich sein. Voraussetzung ist natürlich, dass der Phasenbestimmungsprozess nicht derartige Fehler einführt, dass die zusätzlichen Fourierkoeffizienten das ursprüngliche 2 Å-Bild verschlechtern. Zur Beurteilung der Güte der Phasenbestimmung wurden daher im Laufe dieser Arbeit Testbeispiele durchgerechnet.

\* Dies ist die experimentell ungefähr erreichbare Grenzauflösung bei Proteinkristallen.

### Grundgedanken des Verfahrens

Berechnet man eine Fouriersynthese einer aus gleichen Atomen bestehenden beliebigen Kristallstruktur mit einer Auflösung, in der alle Atome getrennt sind, und quadriert man diese Elektronendichte-Projektion, so erhält man bekanntlich ein Abbild der gleichen Struktur, in welchem die Atommaxima verschärft sind (Sayre, 1952). Hat man die ursprüngliche Fouriersynthese bei einer bestimmten Auflösung abgebrochen, so erhält man durch ihre Fouriertransformation die gleiche Anzahl der Fourierkoeffizienten zurück, wie sie in die Rechnung eingegeben wurde. Führt man hingegen eine Fouriertransformation der quadrierten Elektronensynthese durch, so erhält man — wie aus Faltungssätzen unmittelbar abgeleitet werden kann — zu den ursprünglichen Fourierkoeffizienten neue Fourierkoeffizienten höherer Auflösung. Diese Beziehung lässt sich verallgemeinern: durch Berechnung einer genügend hohen Potenz der Elektronendichte einer ausreichend aufgelösten Synthese lassen sich beliebig viele Strukturfaktoren der dieser Elektronendichte-Projektion zugrunde liegenden Punktstruktur durch Fouriertransformierung und ohne Rückgriff auf ein Modell berechnen.

Dieser Weg zur Gewinnung der Strukturfaktoren höherer Auflösung scheint zunächst im oben diskutierten Falle der Eiweisstruktur nicht anwendbar, da bei einer Auflösung von 2 Å die hauptvalenzmäßig gebundenen Atome nicht mehr voneinander getrennt sind. Tatsächlich ist aber — in Verallgemeinerung des Sayre'schen Postulates — nicht die Auflösung der Atome wesentlich, sondern die qualitativ ähnliche Struktur von zwei Fouriersynthesen verschiedener Auflösung. Nun lassen sich die atomaren Bindungsabstände einer organischen Struktur in zwei Gruppen einteilen: In die erste Gruppe fallen die Hauptvalenzbindungen, welche zwischen ca. 1,2 und ca. 1,5 Å betragen. Den kürzesten Nebenvalenzabstand mit ca. 2,7 Å hat die Wasserstoffbindung; die Abstände von durch Dispersionskräfte aneinander gebundenen aromatischen Gruppen liegen zwischen ca. 3,4 bis ca. 4,5 Å. Nun sind sowohl bei einer Auflösung von 2 Å wie bei einer Auflösung von 1,5 Å die Hauptvalenzbindungen noch nicht getrennt; hingegen reicht sowohl die Auflösung von 2 Å wie natürlich auch die Auflösung von 1,5 Å zu einer Trennung der durch eine Wasserstoffbindung verbundenen Atome aus. Man muss daher erwarten, dass die Elektronendichte-Projektionen bei 2 Å und bei 1,5 Å einander qualitativ 'ähnlich' sind, d. h., dass sie im wesentlichen aus kontinuierlichen Ansammlungen von Elektronendichte längs der Hauptvalenzbindungen bestehen. Der Querschnitt dieser Elektronendichteschlangen ist natürlich von der Auflösung abhängig. Man kann daher erwarten, dass eine Zuspitzung durch Potenzierung der Elektronendichte ein Bild liefert, welches dem wahren Bild genügend ähnlich ist, um durch Fouriertransformation Näherungswerte für die Phasen der zusätzlichen Strukturfaktoren liefern zu können.

### Testbeispiele

Die praktische Erprobung dieses Gedankens wurde an zwei einfachen Modellstrukturen durchgeführt, welche verzerrten, völlig gestreckten Peptidketten entsprechen. Die (willkürliche) Verzerrung dieses (ebenen) Peptidkettenmodells sollte eine allzu hohe Symmetrie des Modells beseitigen. Günstiger wären nichtebene Modelle (etwa ein Teil einer  $\alpha$ -Helix), doch wurde von deren Durchrechnung wegen des hohen Rechenaufwandes abgesehen. Eines der Modelle ist zentrosymmetrisch, das andere azentrisch. Es wurden dreidimensionale Schnitte in die Ebene der Peptidkette gelegt, wobei vorausgesetzt wurde, dass die (dreidimensional angenommene) Messung der Strukturfaktoren bei je 3 Auflösungen\* (2,5, 2, 1,5 Å) abgebrochen wurde. Es wurde kein Temperaturfaktor berücksichtigt. Da die Atomformfaktoren von C, N, O bei 1,5 Å, besonders aber bei 2 und 2,5 Å Auflösung noch hohe Werte besitzen, bedingt diese Vernachlässigung Abbruchfehler bei der Modellrechnung, die jedoch — wie unsere Ergebnisse zeigten — genügend klein waren. Bei Proteinstrukturen sind diese Abbrucheffekte wegen des hohen natürlichen Temperaturfaktors sehr viel schwächer.

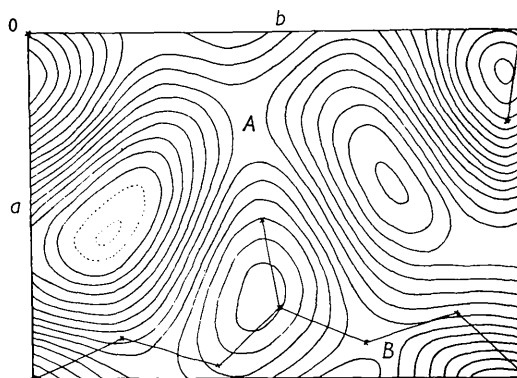


Fig. 1. Asymmetrisches Modell, Auflösung 2,5 Å. Elementarzelle:  $a = 4,73$ ,  $b = 6,68$  Å.

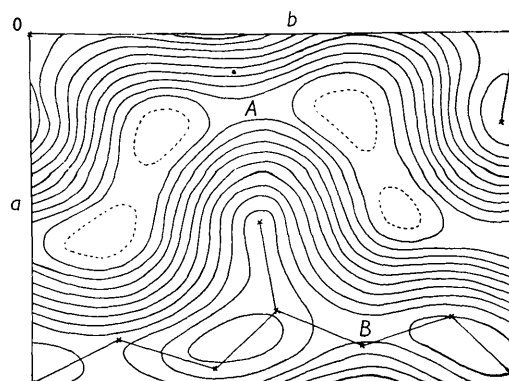


Fig. 2. Asymmetrisches Modell, Auflösung 2 Å.

\* Definition der Auflösung: Kleinster Netzebenenabstand der in die Fouriersynthese eingegebenen Strukturfaktoren.

Wir betrachten zunächst die Abbildungen des azentrischen Modelles in den verschiedenen Auflösungen in den Figuren 1 bis 3. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Auflösung von 2,5 Å nur ein sehr unscharfes Bild der Peptidkette resultiert. Es erscheinen zwar schon die Peptidketten getrennt, aber die Dichtesattel an den Stellen kürzester 'Nebervalenzbindungen' (vgl. *A* in Fig. 1) sind nur um wenig niedriger als die Stellen geringster Elektronendichte in der Peptidkette (vgl. *B* in Fig. 1). Von einer auch nur andeutungsmässigen Zuordnung von Atomen zum Dichtebild kann wohl noch kaum die Rede sein.

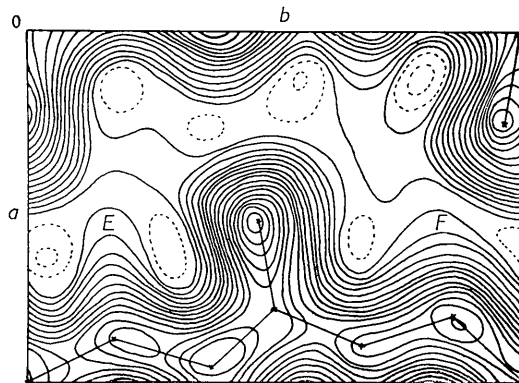


Fig. 3. Asymmetrisches Modell, Auflösung 1,5 Å.

Die Abbildung mit nächsthöherer Auflösung (2 Å, Fig. 2) erniedrigt nun beträchtlich den Sattel bei *A* und lässt auch das Niveau der Dichte innerhalb der Ketten weitgehend gleichmässig erscheinen (vgl. *B*). Vergleicht man dieses Bild (Fig. 2) mit der höchsten Auflösung (1,5 Å, Fig. 3), so ist die Auflösung zwischen den Peptidketten kaum viel besser als in Fig. 2. Die Trennung der hauptvalenzmässig gebundenen Atome ist ebensowenig möglich wie in Fig. 2, doch kann man — im Gegensatz zur Fig. 2 — die zickzackförmige Struktur der Kette an Ausbuchtungen der Dichte bei *E* und insbesondere bei *F* erkennen. Es ist damit klar, dass Fig. 3 eine bessere Lokalisierung der Atome der Peptidkette gestattet.

Fig. 4 zeigt nun die quadrierte Elektronendichte

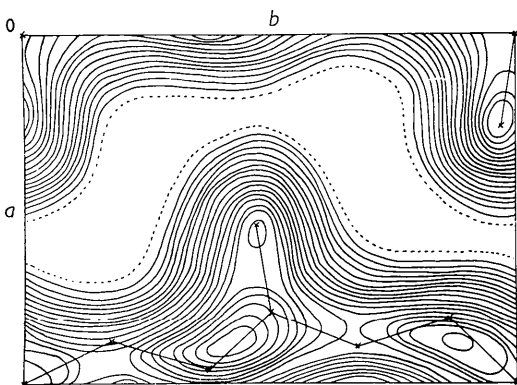


Fig. 4. Asymmetrisches Modell, Auflösung 2 Å quadriert.

von Fig. 2. Die qualitative Ähnlichkeit zwischen Fig. 3 und Fig. 4 ist bemerkenswert, wenn natürlich auch die Dichteausbuchtungen *E* und *F* (Fig. 3) in Fig. 4 ebenso wenig sichtbar sind wie in der nichtquadrirten Synthese von Fig. 2. Wendet man nun den vorgeschlagenen Phasenbestimmungsprozess an, d. h., bestimmt man anlehnend an das Sayre'sche Verfahren durch Faltung im reziproken Raum oder durch Rücktransformation der quadrierten Dichtefunktion\* Näherungsphasen für die neu hinzutretenden Fourierkoeffizienten (deren Absolutwerte als 'gemessen' vorliegen), so ergibt die Fourieranalyse das Bild von Fig. 5. Man erkennt



Fig. 5. Asymmetrisches Modell, Fourieranalyse, Auflösung 1,5 Å; Phasen der Fourierglieder 2 bis 1,5 Å aus der quadrierten Fourieranalyse der 2 Å-Auflösung bestimmt.

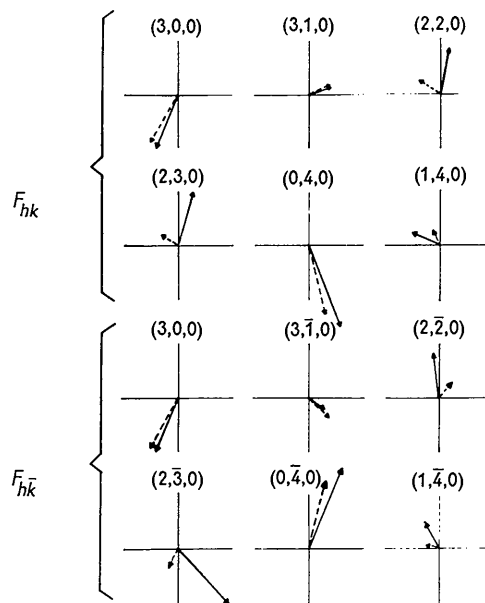


Fig. 6. Vergleich der zusätzlichen Strukturformfaktoren (2 bis 1,5 Å Auflösung). Ausgezogen: aus dem Modell berechnet, strichliert: aus quadrierter Elektronendichtesynthese (in 2 Å-Auflösung) berechnet.

\* In unseren Rechnungen wurden die Fourierkoeffizienten durch Rücktransformation gewonnen.

sofort, dass nun auch — im Gegensatz zu Fig. 4 — Dichteausbuchtungen bei  $E$  und  $F$  auftreten, welche wie in Fig. 3 die Zickzackstruktur der Peptidkette andeuten. Das Bild in Fig. 5 ist damit eindeutig reicher an chemischer Information als die Bilder von Fig. 4 bzw. Fig. 2, wenn auch die nur näherungsweise bestimmten Phasen der zusätzlichen Fourierkoeffizienten nicht die volle Bildqualität von Fig. 3 zulassen. In Fig. 6 sind zur weiteren Beurteilung der Güte der Phasenbestimmung die neu hinzutretenden Strukturfaktoren der quadrierten Elektronendichte-Projektion (Fig. 4) mit den berechneten Struktur-faktoren des Modells (Fig. 3) verglichen; der gemittelte Phasenfehler ist ungefähr  $39^\circ$ .

In den Figuren 7, 8, 9, 10, 11 ist das Ergebnis der gleichartigen Rechnung für ein zentrosymmetrisches Modell enthalten. Entsprechend der Zentrosymmetrie ist das Ergebnis hier sogar noch günstiger. Tabelle 1 vergleicht die Strukturfaktoren der quadrierten Synthese (Fig. 10) und der 1,5 Å-Synthese von Fig. 9.

Die neu hinzutretenden Strukturfaktoren liegen ausserhalb der gestrichelten Umrandungslinie. Von 22 Strukturfaktoren haben nur 2 Strukturfaktoren falsches Vorzeichen, während drei weitere Struktur-faktoren im Vorzeichen unbestimmt bleiben, da ihre Absolutwerte in der quadrierten Struktur gleich Null sind.

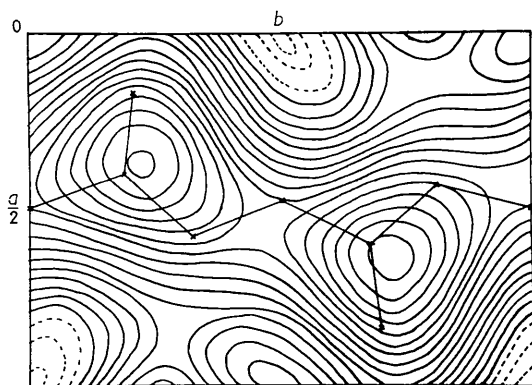


Fig. 7. Zentrosymmetrisches Modell, Auflösung 2,5 Å.  
Elementarzelle:  $a = 9,46$ ,  $b = 6,68$  Å.

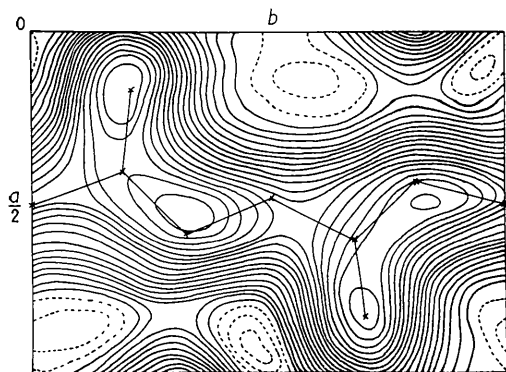


Fig. 8. Zentrosymmetrisches Modell, Auflösung 2 Å.

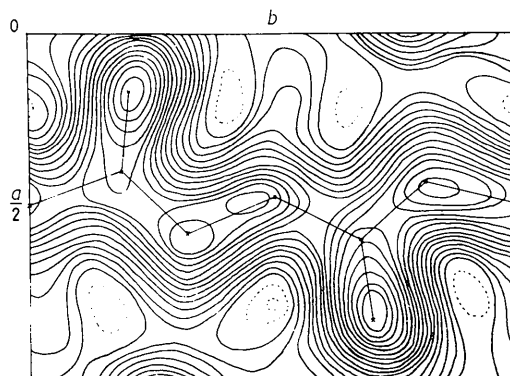


Fig. 9. Zentrosymmetrisches Modell, Auflösung 1,5 Å.

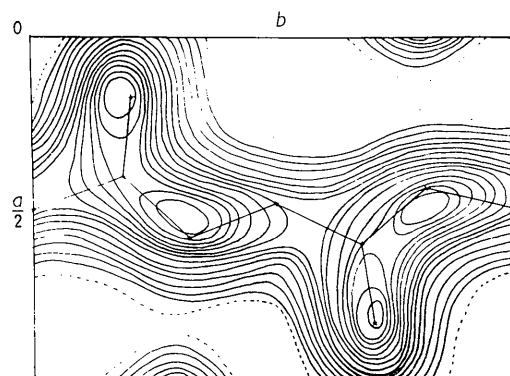


Fig. 10. Zentrosymmetrisches Modell, Auflösung 2 Å quadriert.

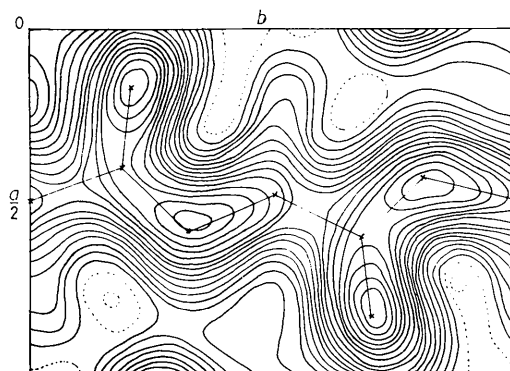


Fig. 11. Zentrosymmetrisches Modell, Fouriersynthese, Auflösung 1,5 Å; Vorzeichen der Fourierglieder 2 bis 1,5 Å aus der quadrierten Fouriersynthese der 2 Å-Auflösung bestimmt.

Es ist an sich nicht unbedingt erforderlich, durch Quadrierung zu verschärfen; jede Potenzierung mit einem Exponenten grösser als Eins führt, wie bereits eingangs erwähnt, zu neuen Fourierkoeffizienten höherer Ordnung. Wir haben aber auf eine einfache empirische Weise zeigen können, dass die Quadrierung für Bilder organischer Strukturen mit Auflösungen von 2 und 1,5 Å gut angepasst ist. Vergleicht man

Tabelle 1. Vergleich der Strukturfaktoren der quadrierten Elektronendichte (eingeklammerte Werte) mit den berechneten Strukturfaktoren des Modells

		Zentrosymmetrisches Modell													
$h \rightarrow$		0		1		2		3		4		5		6	
$k$	$\bar{4}$	(0,3)	3,2	(-0,9)	-0,4	(0,3)	-0,6								
$\downarrow$	$\bar{3}$	(0)	0,2	(-3,7)	-5,1	(-1,5)	-2,7	(0,8)	4,0	(-0,9)	-1,9				
	$\bar{2}$	(-10,4)	-9,6	(1,1)	1,2	(-0,5)	-2,2	(3,6)	3,8	(0)	2,0	(-0,7)	0,3		
	$\bar{1}$	(0,4)	-0,1	(3,9)	4,0	(8,1)	7,3	(-2,6)	-2,4	(2,9)	5,4	(1,0)	1,2	(0)	0
	0	(39,1)	37,1	(0,2)	0	(-13,6)	-13,6	(0,8)	0,6	(6,2)	6,9	(0,5)	0,5	(-1,9)	-2,7
	1	(0,4)	-0,1	(4,8)	4,1	(-8,0)	-7,0	(-2,7)	-2,3	(-2,2)	-4,3	(0,7)	1,4	(0)	-0,3
	2	(-10,4)	-9,6	(-0,5)	0	(-0,8)	-2,4	(-5,2)	-4,7	(0)	2,8	(0,5)	0,3		
	3	(-0,1)	0,2	(-4,5)	-6,0	(1,1)	3,4	(0,6)	4,4	(0,3)	1,2				
	4	(0,3)	3,2	(0,5)	0,8	(0,2)	-0,6								

nämlich den Abfall der Dichte zwischen zwei Atomen (Nebenvalenzabstand von 3–4 Å) in den quadrierten Synthesen (Fig. 4 und 10) und den Synthesen mit 1,5 Å Auflösung (Fig. 3 und 9), so findet man, dass dieser Abfall ungefähr gleich ist. In Fig. 12 ist dieser Vergleich durchgeführt.

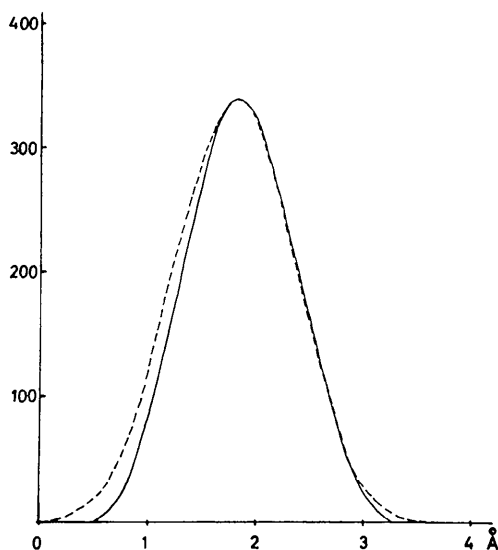


Fig. 12. Querschnitt eines von seinen Nachbarn ca. 3–4 Å entfernten Atoms; (a) in der quadrierten 2 Å-Synthese (strichliert), (b) in der 1,5-Å-Synthese (ausgezogen).

Enthält eine Struktur wenige schwere Atome (z. B. Fe in Myoglobin), werden die Strukturfaktoren der quadrierten Elektronendichte durch das zu hohe Gewicht der Schweratome verfälscht; es ist dann erforderlich, dieses Gewicht durch Subtraktion der Strukturfaktoren einer, nur Schweratome enthaltenden Teilstruktur entsprechend zu reduzieren.

Die Testbeispiele zeigen, dass das vorgeschlagene Verfahren zu sinnvollen Ergebnissen führt: Das Hin- und Zurücknehmen der gemessenen Absolutwerte der höheren

Fourierkoeffizienten in Verbindung mit einem von Modellhypothese freien und zwangsläufigen Prozess zur Bestimmung ihrer Näherungsphasen führt nach Fig. 5 zu einer gegenüber Fig. 2 wesentlich verbesserten Grundlage für die Konstruktion des Punktmodells. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich allerdings nicht entnehmen, wie Messfehler in den Absolutwerten und in den Phasen der als bekannt vorausgesetzten Strukturfaktoren das Ergebnis beeinflussen werden. Man muss hierbei bedenken, dass unser Verfahren an sich schon eine Näherung ist — im Gegensatz zu den ursprünglichen Sayreschen Beziehungen, die ja exakt gelten. Sind die Messfehler klein oder vergleichbar gegenüber den in der Näherung verankerten 'theoretischen' Fehlern, so ist zu vermuten, dass das Verfahren anwendbar ist. Man könnte versuchen, diese Frage durch eine Fehlertheorie des Einflusses der Messfehler zu klären. Da aber eine solche Theorie die Kenntnis der Fehlerverteilung etc. voraussetzt, erscheint es zweckmäßiger, das Verfahren z. B. an dem unmittelbar interessierenden Fall einer Eiweißstrukturanalyse zu erproben. Dieses Vorgehen ist umso mehr zu empfehlen, als das Verfahren leicht zu programmieren ist und dann an geeigneten Rechenmaschinen vollautomatisch abläuft. Ein Vergleich von Ausschnitten aus den Fouriersynthesen bei 2 Å bzw. bei 1,5 Å Auflösung würde dann sofort zeigen, ob eine Verbesserung erreicht wurde.

Die vorliegende Arbeit wurde unterstützt durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch Spenden des Fonds der Chemie, wofür wir unseren besten Dank aussprechen.

#### Literatur

- BODO, G., DINTZIS, H. M., KENDREW, J. C. & WYCKOFF, H. W. (1959). *Proc. Roy. Soc., A* **253**, 70.  
 KENDREW, J. C., DICKERSON, R. E., STRANDBERG, B. E., HART, R. G., DAVIES, D. R., PHILIPS, D. C. & SHORE, V. C. (1960). *Nature, Lond.* **185**, 422.  
 SAYRE, D. (1952). *Acta Cryst.* **5**, 60.