



## Übung 5: *Coot*<sup>1</sup>

Die letzte Übung (Electron Density Maps) sollte Sie mit dem Umgang mit Elektronendichtekarten vertraut machen. Ihre Aufgabe, eine gegebene Proteinstruktur mit einer Elektronendichtekarte passgenau zu überlagern, war aber genau genommen nicht sehr realistisch, denn der Zweck der Kristallographie ist die Strukturaufklärung und wenn der Kristallograph die Elektronendichtekarte erhält, ist die 3D-Struktur üblicher Weise noch nicht bekannt. In der heutigen Übung werden wir uns daher einem etwas realistischeren Beispiel zuwenden: Gegeben ist eine Proteinstruktur und eine mit dieser überlagerte Elektronendichtekarte. Verglichen mit der gegebenen Proteinstruktur enthält das Protein, von dem die Elektronendichtekarte stammt, allerdings einige Mutationen und Sie sollen herausfinden, welche das sind.

Zu Hilfe nehmen wir die unter Kristallographen sehr beliebte Software *Coot*. Ähnlich wie *Chimera* ist *Coot* (Crysallographic Object-Oriented Toolkit) ein Programm zur interaktiven Darstellung und Manipulation von Makromolekülen (Proteine, Nukleinsäuren, ...). Der Fokus liegt hier allerdings auf der Erstellung und der Überprüfung von 3D-Strukturen anhand kristallographisch ermittelter Elektronendichtekarten.

---

<sup>1</sup> Vielen Dank an Markus Perbandt für seine Hilfestellungen bei der Konzeption dieser Übung.

# 1 Einführung für *Coot*-Neulinge

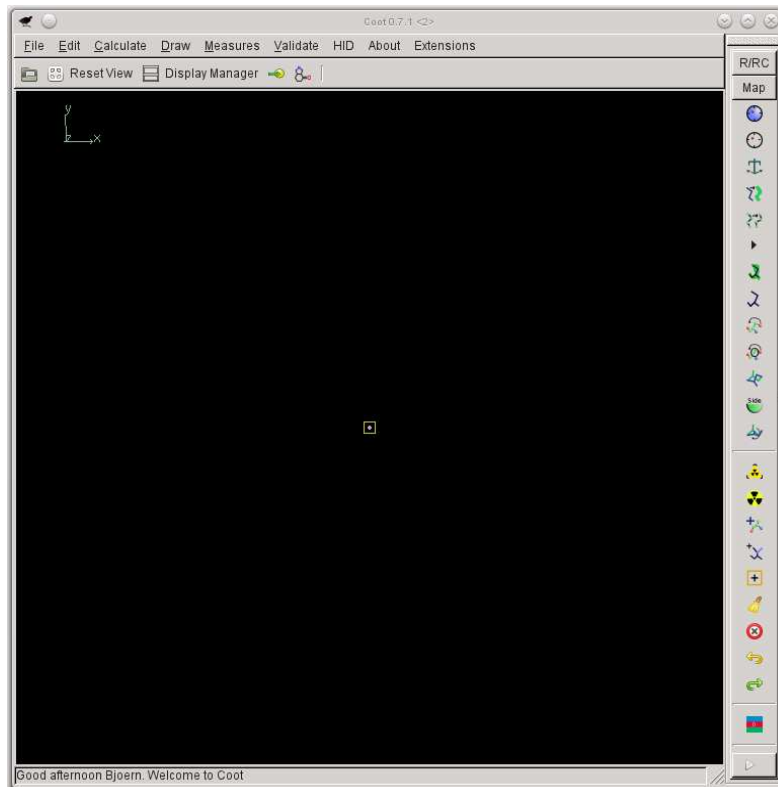
Zu Beginn dieser Übung möchten wir Sie mit *Coot* vertraut machen. Die Aufgabenzusammenstellung im ersten Teil dieser Übung ist eng an das *Coot*-Tutorial von der offiziellen *Coot*-Website<sup>2</sup> angelehnt.

## Starten von *Coot*:

Geben Sie

***/home/hansen/programs/cool-Linux-x86\_64-red-hat-gtk2-python/bin/cool &***  
in die Kommandozeile Ihrer Shell ein, um *Coot* zu starten.

Anschließend wird sich das Hauptfenster von *Coot* öffnen:



## Öffnen von Strukturen und Elektronendichtekarten:

Wählen Sie

***File -> Open Coordinates...***

in der *Coot*-Menüleiste aus und klicken Sie im sich öffnenden Fenster auf „File System“.

Wechseln Sie dann in das Verzeichnis `/hansen/teaching/crystallography` und

---

<sup>2</sup> <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/Personal/pemsley/cool/>

wählen Sie hier die Datei `tutorial-modern.pdb` aus.  
Bestätigen Sie Ihre Auswahl mit „OK“.

### Anzeige der Elektronendichtekarten

Wählen Sie

***File -> Auto Open MTZ...***

in der Coot-Menüleiste und anschließend `rnasa-1.8-all_refmac1.mtz` aus.

Eine mtz-Datei enthält unter anderem die Amplituden der Strukturfaktoren und die Phaseninformationen. Mit Hilfe der in der Vorlesung vorgestellten Fourier-Transformation kann aus diesen Informationen die in blau dargestellte „normale“ Elektronendichtekarte berechnet werden. Zusätzlich sehen Sie noch rote und grüne Bereiche. Diese stammen von einer so genannten Differenzelektronendichtekarte, die uns dabei hilft, Fehler im Modell zu erkennen. Grün sind die Bereiche positiver Differenzdichte. Sie zeigen uns, dass hier das Strukturmodell noch unvollständig ist. Die roten Bereiche dagegen weisen eine negative Differenzelektronendichte auf. An diesen Stellen verfügt das Modell über fehlerhaft platzierte Atome.

### Bedienung:

Mit Maus und Tastatur ist es möglich, eine geöffnete Struktur in *Coot* zu bewegen und einzelne Elemente innerhalb dieser Struktur auswählen. Die Bedienung ist hierbei relativ ähnlich, wenn auch nicht gleich, zu dem, was Sie aus *Chimera* gewohnt sind.

Wenden Sie die folgenden Aktionen nacheinander an, um sich mit der Bedienung von *Coot* vertraut zu machen:

- Bewegen Sie die Maus mit gedrückter linker Maustaste, um die geöffnete Struktur zu rotieren.
- Bewegen Sie die Maus mit gedrückter linker Maustaste UND gleichzeitig die Ctrl-Taste, um die geöffnete Struktur zu verschieben.
- Wählen Sie, während Sie die Shift-Taste gedrückt halten, Atome mit der linken Maustaste aus, um sie zu beschriften.
- Bewegen Sie die Maus mit gedrückter rechter Maustaste, um in die Darstellungsebene hinein bzw. aus ihr heraus zu zoomen.
- Klicken Sie ein Atom mit der mittleren Maustaste (das Mausrad) an, um dieses Atom ins Zentrum der Darstellungsebene zu rücken.

- Drehen Sie am Mausrad (vorwärts oder rückwärts), um das Konturlevel<sup>3</sup> der Elektronendichtekarte zu modifizieren (vergrößern oder verkleinern).  
Alternative: Nutzen Sie die Tasten „+“ und „-“.

Im Display-Manager

**Draw -> Display Manager**

können Sie über die Scroll-Radiobuttons festlegen, für welche der geöffneten Elektronendichtekarten Sie beim Drehen des Mausrades den Konturlevel verändern möchten.

**Entlangwandern der Proteinkette**

Im Fenster „Go To Atom“

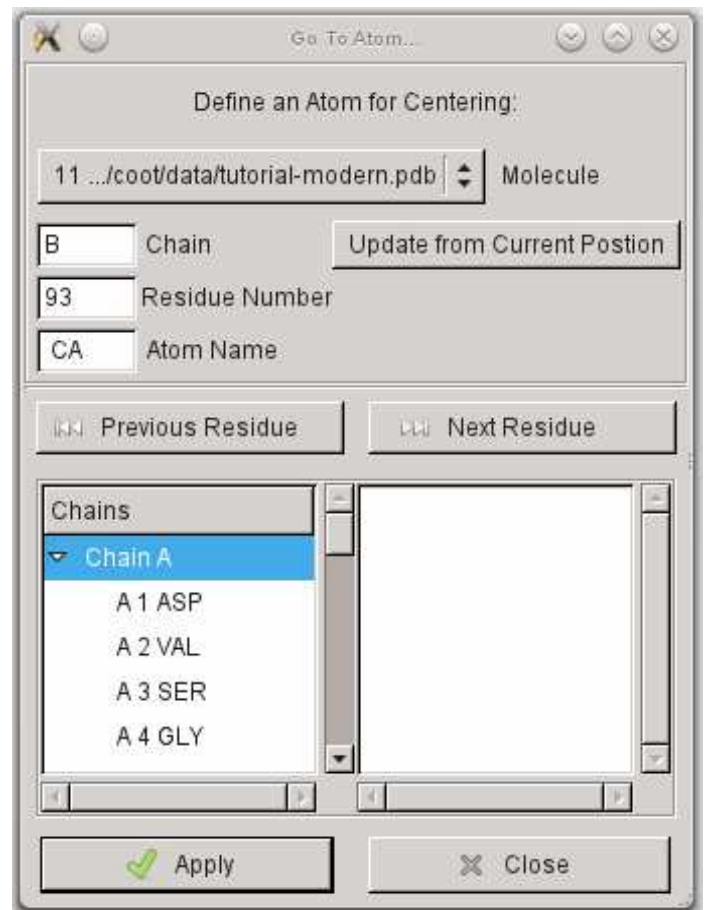
**Draw -> Go To Atom...**

können Sie unten links in der Liste auf den Pfeil vor „Chain A“ klicken, um die einzelnen Restgruppen der Kette A anzuzeigen (siehe Abbildung rechts).

Wählen Sie „1 ASP“ aus und bestätigen Sie Ihre Auswahl mit „Apply“.

Über die Buttons „Next Residue“ und „Previous Residue“ können Sie von

Restgruppe zu Restgruppe die Proteinkette entlang wandern. Wenn das Fenster „Go To Atom...“ geschlossen ist, können Sie hierfür alternativ auch Leertaste (vorwärts) und Shift+Leertaste (rückwärts) verwenden.



<sup>3</sup> In unserer Elektronendichtekarte gibt es nicht Orte mit und ohne Elektronendichte, es gibt nur Orte unterschiedlich hoher Elektronendichte. Wir können einen Schwellwert (das Konturlevel) auswählen, anhand dessen der Raum in Orte hoher und niedriger Elektronendichte eingeteilt wird. Zur grafischen Veranschaulichung wird die Oberfläche eingezeichnet, die diese beiden Bereiche des Raumes voneinander trennt. Auf dieser Oberfläche entspricht die Elektronendichte genau dem gewählten Schwellwert.

## Farbe der Elektronendichtekarte ändern

Wählen Sie im *Coot*-Hauptmenü

***Edit -> Map Colour... -> Elektronendichtekarte Ihrer Wahl***

Wählen Sie eine neue Farbe aus und bestätigen Sie Ihre Auswahl mit „OK“.

## Modelbau

Sie werden sich vielleicht fragen, was mit der geöffneten Struktur nicht stimmt.

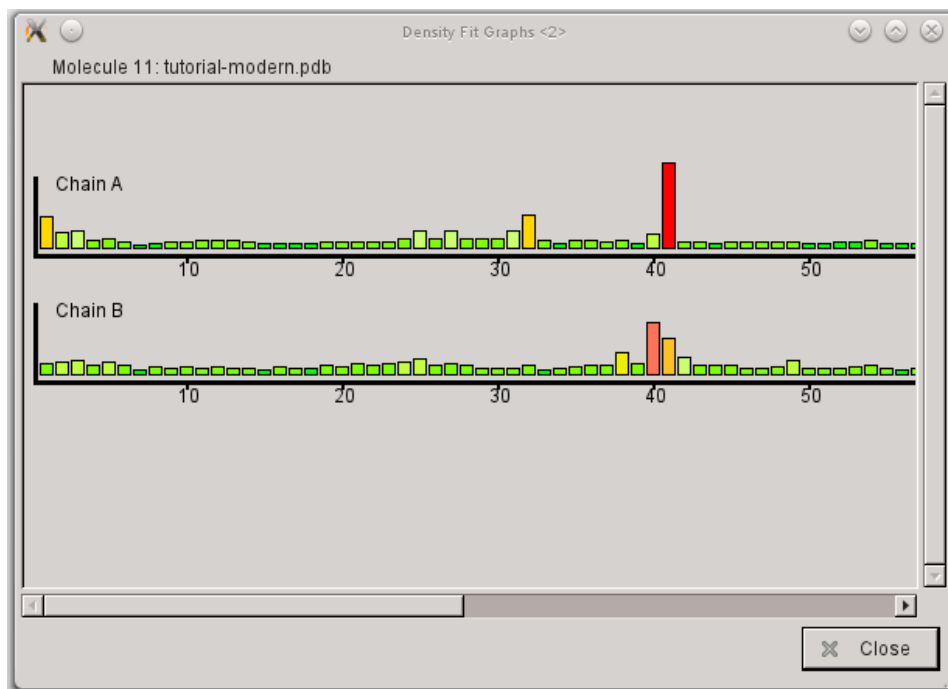
Es gibt viele verschiedene Analysemöglichkeiten dafür, Fehler und Ungenauigkeiten in einer gegebenen Struktur (Protein, DNA, RNA, ...) ausfindig zu machen und einige von diesen sind in *Coot* verfügbar.

Wählen Sie

***Validate -> Density Fit Analysis -> tutorial-modern.pdb***

über die *Coot*-Menüleiste.

Anschließend wird *Coot* Ihnen ein Histogramm anzeigen:



Schauen Sie sich das Histogramm an: Je größer und roter ein Balken ist, desto schlechter ist die Geometrie des Proteins in diesem Bereich. Besonders negativ fallen die Bereiche in der A-Kette an den Aminosäure-Positionen 41 und 89 auf.

Lassen Sie uns zunächst einen Blick auf den Rest 89 (A-Kette) werfen. Klicken Sie hierzu im Histogramm auf den entsprechenden Balken. *Coot* wird jetzt das  $C_{\alpha}$ -Atom des Restes 89A ins Zentrum der Ansicht setzen.

Wie Sie sehen, zeigt die Restgruppe dieses Phenylalanin-Restes in die falsche Richtung. Diesen Fehler wollen wir jetzt beheben. Lassen Sie sich hierfür zunächst das „Model/Fit/Refine“-Fenster anzeigen

**Calculate -> Model/Fit/Refine**

und wählen Sie hier „Rotamers...“ aus.

Im Coot-Hauptfenster können Sie jetzt mit der linken Maustaste eines der Atome des Restes 89A (z.B. das C<sub>γ</sub>-Atom) auswählen. Es erscheint dann das „Select Rotamer“-Fenster. Wählen Sie hier dasjenige Rotamer aus, bei welchem die Atome am besten zur Elektronendichte der Seitenkette passen. Bestätigen Sie Ihre Auswahl mit „OK“.

Die Koordinaten der Restgruppe passen allerdings noch immer nicht perfekt zur Elektronendichte. Wählen Sie jetzt im noch geöffneten „Model/Fit/Refine“-Fenster die Option „Real Space Refine Zone“ aus und klicken Sie anschließend zweimal auf ein Atom des Restes 89A. Wählen Sie in dem sich öffnenden „Accept Refinement?“-Fenster „Accept“. Nun passen Elektronendichte und Koordinaten der Restgruppe an dieser Position perfekt zusammen.



**Ob es auch möglich ist, nur „Real Space Refine Zone“ zu verwenden?**

Wählen Sie im „Model/Fit/Refine“-Fenster zweimal „Undo“, um die ursprünglichen Koordinaten der Restgruppe wiederherzustellen. Wählen Sie im selben Fenster erneut „Real Space Refine Zone“ aus und klicken Sie ein Atom der Restgruppe zweimal an.

Es wird nun ein neues „Accept Refinement?“-Fenster angezeigt und ein Vorschlag für eine neue Positionierung der Restgruppe. Mit diesem sind wir allerdings noch nicht zufrieden. Klicken Sie jetzt erneut eines der Atome von Rest 89A mit der linken Maustaste an, ziehen Sie das Atom mit gedrückter linker Maustaste in den Bereich der hohen Elektronendichte für diesen Phenylalanin-Rest (drag) und lassen Sie die linke Maustaste anschließend los (drop). Es ist auch möglich, ein einzelnes Atom zu bewegen. Drücken Sie hierfür gleichzeitig noch die Ctrl-Taste. Wählen Sie „Accept“ im „Accept Refinement?“-Fenster, sobald Sie mit der Strukturverbesserung zufrieden sind.

### **Weitere Strukturverbesserungen**

Wir wollen uns nun die andere Region ansehen, in der es besonders auffällige Unterschiede zwischen Proteinstruktur und Elektronendichtekarte gibt. Klicken Sie im Fenster „Density Fit Graph“ im Histogramm auf den roten Balken für Rest 41A.

Was fällt Ihnen auf? Versuchen Sie wie im vorherigen Beispiel mit der Option „Real Space Refine Zone“ das Problem zu lösen.

### **„Kleckse“ in der Elektronendichtekarte**

In der Elektronendichtekarte gibt es einige Bereiche mit deutlich sichtbarer Elektronendichte (grün), denen aber kein Teilbereich der Struktur zugeordnet wurde.

Wählen Sie

#### ***Validate -> Unmodelled Blobs***

im Coot-Hauptmenü, um diese Kleckse (Blobs) in der Elektronendichtekarte zu finden. Wählen Sie zunächst Blob 2 in der erscheinenden Liste.

### **Blob 2**

Schauen Sie sich die Situation genau an. Was fällt Ihnen auf?

Offensichtlich brauchen wir hier ein tetraedisches Molekül. Klicken Sie im „Model/Fit/Refine“-Fenster auf den Button „Place Atom At Pointer“ und wählen Sie SO<sub>4</sub> aus.

Wie Sie sehen, wurde ein Sulfat-Anion in „Blob 2“ platziert, allerdings noch nicht optimal. Verwenden Sie erneut die Option „Real Space Refine Zone“, um die Position des SO<sub>4</sub>-Moleküls genau an die Elektronendichtekarte anzupassen.

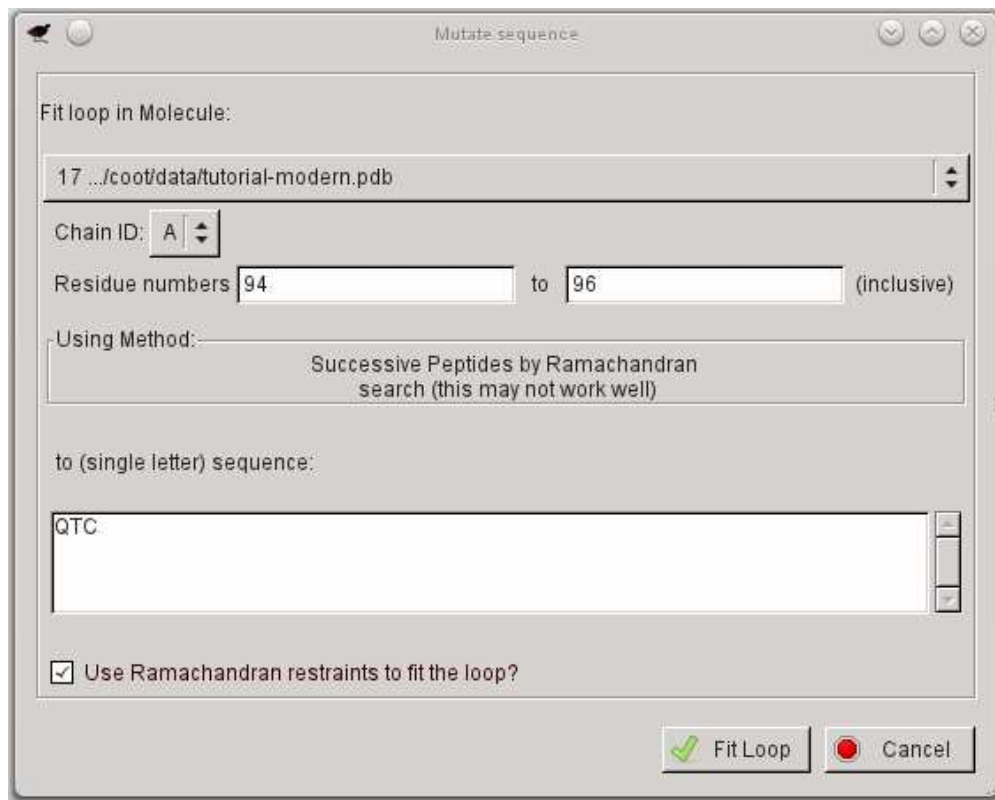
### **Blob 1**

Schauen Sie sich die Elektronendichte in diesem Bereich genau an. Was fehlt Ihrer Meinung nach?

Wenn Sie vermuten, dass hier ein paar Aminosäurereste am C-terminalen Ende der Kette A fehlen, liegen Sie goldrichtig. Die fehlenden Reste sind Glutamin, Threonin und Cystein. Wir wollen diese nun ergänzen:

#### ***Calculate -> Fit Loop...***

In dem sich öffnenden Fenster „Mutate Sequence“ tragen Sie „Residue numbers 94 to 96“ für Kette A ein und „QTC“ als „single letter sequence“ (siehe nächste Seite).



Stellen Sie sicher, dass Sie den unmodellierten Teil der Elektronendichtekarte gut sehen können und bestätigen Sie anschließend Ihre Eingaben durch Klicken auf „Fit Loop“.

An der Carboxylgruppe am C-terminalen Ende (Cystein; A96) fehlt noch ein Sauerstoffatom, welches wir ergänzen wollen:

***Calculate → Other Modelling Tools...***

Wählen Sie im sich öffnenden Fenster „Add OXT to Residue...“ aus.

Nutzen Sie wieder die Option „Real Space Refine Zone“, um die Positionierung der hinzugefügten Restgruppen zu optimieren, falls dies erforderlich ist.

Zu welchem Cysteinrest wird das Cystein 96 vermutlich eine Disulfidbrücke ausbilden? Notieren Sie Ihre Antwort auf der letzten Seite dieser Übung.

### **Hinzufügen endständiger Restgruppen**

Verwenden Sie das Fenster „Go To Atom...“ um zum Rest 72 der Kette A zu gelangen und schauen Sie sich diesen Bereich genau an. Ihnen wird auffallen, dass hier einige Atome fehlen. Eigentlich sollte an dieser Stelle ein Cystein-Rest sein. Lassen Sie uns diese Restgruppe zunächst entfernen. Klicken Sie hierzu im Fenster „Model/Fit/Refine“ auf „Delete“. Im sich öffnenden Fenster „Delete item“ wählen



Sie dann „Residue/Monomer“ aus und klicken danach ein Atom des Restes 72A an. Diese Aminosäure wird daraufhin verschwinden.

Als nächstes wollen wir an dieser Stelle ein Alanin einfügen. Wählen Sie im „Model/Fit/Refine“-Fenster die Option „Add Terminal Residue“ aus und klicken Sie dann ein Atom des benachbarten Reste (71A) an. *Coot* wird jetzt einen Alanin-Rest im gewünschten Bereich der Elektronendichtekarte platzieren. Klicken Sie auf „Accept“, um diese Änderung anzunehmen.

Der Alanin-Rest wurde nun ergänzt, aber eigentlich gehört ein Cystein an diese Stelle. Wählen Sie die Option „Mutate & Auto Fit...“ aus und klicken Sie dann auf ein Atom des neu hinzugefügten Alanin-Restes. In der daraufhin erscheinenden Auswahl wählen Sie „CYS (C)“ aus.

Betrachten Sie den Bereich, in welchem die Cystein-Restgruppe platziert wurde, etwas genauer. Ihnen wird auffallen, dass es hier zwei Bereiche mit erhöhter Elektronendichte gibt, in denen die Cystein-Restgruppe Platz finden würde. Zu erklären ist dies damit, dass es für diesen Cystein-Rest zwei alternative Konformationen gibt. Lassen Sie uns dies modellieren:

Klicken Sie auf „Add Alt Conf“ und danach auf ein Atom des Reste 72A. Wählen Sie anschließend in der sich öffnenden Auswahl das passende Rotamer aus und bestätigen Sie Ihre Auswahl mit „OK“. Ihnen werden jetzt zwei Cysteinreste angezeigt. Nutzen Sie wieder die Option „Real Space Refine Zone“, um die Positionierung zu optimieren.

Sie sind jetzt gut genug vorbereitet, um mit dem zweiten Teil dieser Übung zu beginnen. Schließen Sie jetzt Struktur und Elektronendichtekarte:

***File -> Close molecule/map...***

Anschließend wählen Sie alle geöffneten Strukturen und Maps aus und klicken auf „Delete Marked Molecules & Maps“.

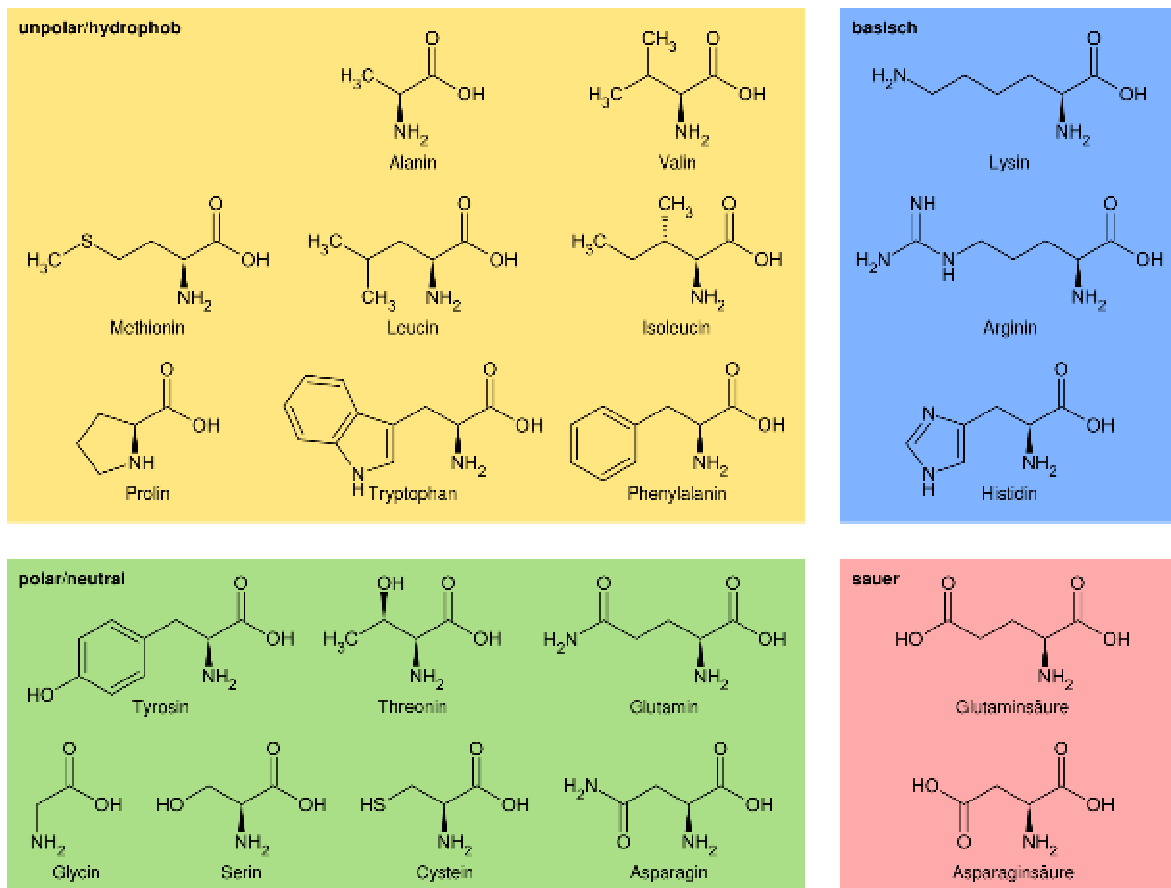
## 2 Modellkorrektur

Wie bereits zu Beginn beschrieben, wird Ihre Aufgabe nun darin bestehen, ein gegebenes Proteinstrukturmodell anhand einer Elektronendichtekarte zu korrigieren. Öffnen Sie bitte zunächst das Modell `exercise_model_refmac1.pdb` und die zugehörige Elektronendichtekarte `exercise_data_refmac1.mtz`. Sie finden diese Dateien im Verzeichnis `/home/hansen/teaching/Crystallography`.

Starten Sie Ihre Arbeit beim ersten Rest des gegebenen Proteins:

**Draw -> Go To Atom...**

Wie Sie deutlich beim Vergleich zwischen Modell und Elektronendichtekarte sehen können, ist das Modell an dieser Stelle unvollständig. Die Elektronendichtekarte im Bereich der ersten Restgruppe enthält einen größeren Abschnitt, der nicht durch die Restgruppe der Aminosäure Alanin, eine Methylgruppe, ausgefüllt wird. Wir wollen deshalb Alanin gegen eine andere Aminosäure austauschen.



Quelle: [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org)

Welche Aminosäure würden Sie vorschlagen? Welche können Sie in jedem Fall ausschließen? Falls Sie keinen biologischen/biochemischen Hintergrund haben und daher mit den verschiedenen Restgruppen der Aminosäuren noch nicht sehr vertraut sind, dürfen Sie gerne die Übersicht auf der vorherigen Seite zur Hilfe nehmen.

Rufen Sie sich erneut das Fenster „Model/Fit/Refine“ auf

***Calculate -> Model/Fit/Refine...***,

klicken Sie anschließend auf „Mutate & Auto Fit“ und danach auf ein Atom des Alanin-Restes an Position 1. Wählen Sie aus der erscheinenden Liste „LYS (K)“ aus, um den Alanin-Rest gegen Lysin auszutauschen.

Wie Sie sehen, passt die Restgruppe des Lysin-Restes perfekt zur Elektronendichte an dieser Position.

Durch Drücken der Leertaste gelangen Sie zur nächsten Aminosäure, ein Valin. Hier scheint alles in Ordnung zu sein. Drücken Sie die Leertaste ein weiteres Mal.

An Position 3 des Modells befindet sich ein Alanin. Anhand der Elektronendichte in diesem Bereich können Sie aber eindeutig sehen, dass Alanin an dieser Position nicht die richtige Aminosäure ist. Welche Aminosäure würden Sie vorschlagen?

Gehen Sie jetzt Schritt für Schritt die gesamte Proteinsequenz entlang. Finden Sie alle Mutationen und korrigieren Sie das Modell entsprechend. Notieren Sie Ihre Mutationsvorschläge in der Tabelle auf der folgenden Seite.

### 3 Aufgaben

- a) Zu welchem Cysteinrest wird das Cystein 96 (Abschnitt: 1 Einführung für Coot-Neulinge) vermutlich eine Disulfidbrücke ausbilden?
- b) Füllen Sie bitte die folgende Tabelle aus.

Position	Aminosäure im Modell	mutiert zu
1	Alanin	Lysin
3	Alanin	

Bitte bringen Sie Ihre Antworten zur Übung am **7. Dezember 2015** mit. Der Zufall bestimmt, welche Studenten Ihre Lösungen präsentieren werden.