



Übung 5: Conservation

BLAST und MSA

Laden Sie die Struktur einer Apo-Superoxiddismutase *1oxt*. Löschen Sie alle Moleküle aus der Einheitszelle bis auf den Dimer, dessen Struktur vollständig aufgeklärt wurde. Führen Sie eine BLAST suche der PDB durch. Starten Sie dazu:

Tools -> Sequence -> Blast Protein

Wählen Sie eine der Ketten aus. Behalten Sie sonst die Standardeinstellungen (aus Zeitgründen ist es wichtig, dass die *pdb* und nicht die viel größere *nr* Datenbank verwendet wird) und klicken Sie auf **OK**. Gefundene Strukturen werden nun mit ID, E-value, Alignment Score und Beschreibung angezeigt. Klicken Sie auf **Show in MAV** um sich das multiple Sequenalignment der Ergebnisse (nach Alignment Score sortiert) anzuschauen. Schauen Sie sich die verschiedenen Sequenzen an. Was beobachten Sie bei geringerem Alignment Score? In den ersten beiden Zeilen sehen Sie die Konsensussequenz und Sequenzkonservierung. Überlegen Sie, wie diese zustande kommen, und was sie implizieren.

Vorhersage

Starten Sie im *MultiAlignViewer*:

Structure -> Render by Conservation

Es erscheint das *Render/Select by Attribute* Menu, indem die Sequenzkonservierung als Attribut zur Verfügung steht (*mavConservation*). Färben Sie die behandelte Kette entsprechend. Schauen Sie sich die Sequenzkonservierung in der Struktur an. Welche Bereiche sind mehr und welche weniger konserviert? Spekulieren Sie über mögliche Gründe. Wo würden Sie das aktive Zentrum erwarten?

Laden Sie die Struktur der Holo-Superoxiddismutase **2c9v**, färben Sie auch diese nach der Sequenzkonservierung ein und überlagern Sie die Strukturen. Wo finden Sie die Kupfer- und Zinkatome? Mit welchen Residues interagieren sie? Um welche Aminosäuren handelt es sich dabei? Wie steht es um deren Konservierung?

Konservierung

Im Folgenden betrachten wir einige möglicherweise signifikante Fälle der Sequenzkonservierung anhand des Holo-Proteins (schalten Sie die Sichtbarkeit der Struktur **1oxt** aus).

- Wählen Sie die Residues mit der vergleichsweise geringsten Konservierung aus (< 60%). Gibt es eine grobe Tendenz für die Orte, an denen sie sich im Protein befinden? Wenn ja, woran könnte dies liegen?
- Neben dem aktiven Zentrum gibt es einen weiteren Bereich mit relativ hoher Konservierung (um Residue 148 herum). Welche Bedeutung könnte dieser haben? Können die Hydrophobizität (**Render/Select by Attribute**) und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen (**Tools -> Structure Analysis -> FindHBond** mit ausgewählten Einstellungen **Find these bonds: intra-model** und **Relax H-bond constraints**) ihre Vermutungen bestätigen?
- Lassen Sie sich auch die Seitenketten des konservierten Bereichs anzeigen (**display selection**). Was beobachten Sie zwischen den Cysteinen 146 und 57? Ist dies strukturell relevant?
- Wählen Sie die Residues mit dem höchsten Konservierungswert aus. Um welche Aminosäuren handelt es sich dabei? Wählen Sie alle Aminosäuren dieses Typs aus. Gibt es eine Tendenz hinsichtlich der Konservierung? Spekulieren Sie, ob dies auf andere Proteine übertragbar ist und woran dies liegen könnte. Hier ist der Ramachandran Plot der Struktur möglicherweise interessant.

Mutationen

Schalten Sie die Sichtbarkeit des Apoproteins wieder ein und führen Sie ein Sequenzalignment beider Strukturen durch. Finden Sie die Mutation und lassen Sie die Seitenketten anzeigen. Welche Auswirkung vermuten Sie bzgl. der Funktion? Erstellen Sie die Beschreibung der beobachteten Mutation (nach Format **A123B**) und recherchieren Sie diese kurz im Kontext der Superoxiddismutase (**SOD1**). Können Sie die Auswirkungen nachvollziehen, wenn Sie die Strukturen betrachten?

Laden Sie die Struktur der Superoxiddismutase mit der **A4V** Mutation **1n19**. Recherchieren Sie auch hier die Auswirkungen der Mutation kurz. Die Autoren der Struktur behaupten, die Mutation beeinflusst die Interaktion mit den Residues Leu106 und Ile113, welche wiederum das Beta Fass und das Dimer Interface stabilisieren, was zur einer geringeren Stabilität des gesamten Moleküls führen könnte¹. Überlagern Sie die Strukturen und schauen Sie sich die Umgebung der Mutation an. Versuchen Sie die Vermutungen nachzuvollziehen.

Andere Autoren behaupten, dass der lokale Einfluss der Mutation auf das Dimer Interface zu einer signifikanten Reorientierung der Monomere zu einander führt². Können Sie diese Beobachten, wenn Sie die Strukturen anhand von einer Kette überlagern und die Unterschiede in der anderen Kette betrachten? Hierbei die Rückgratdarstellung die Unterschiede verdeutlichen. Halten Sie die Unterschiede für signifikant?

Aufgaben

Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen möglichst kurz und schicken Sie ihre Antworten an olzhabaev@zbh.uni-hamburg.de als Anhang im plain text oder pdf Format bis zum 11.12.2017, 08:00 Uhr. Fügen Sie dabei bitte das Stichwort [AST] dem Betreff zu.

- a) Nennen Sie einige allgemeine Gründe dafür, dass bestimmte Sequenzbereiche eines Proteins vergleichsweise stärker konserviert werden als andere.
- b) Welche Vorhersagen lassen sich mit Hilfe konservierter Sequenzen treffen?
- c) Welche Interaktionen sind für die Stabilität einer aus mehreren Monomeren bestehenden Struktur relevant?

¹ [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01090-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01090-2)

² <https://doi.org/10.1073/pnas.0305143101>