

## AST Übung 2 - Genauigkeit (Zusatzaufgaben)

### Alternative Konformationen

Starten Sie *Chimera* und laden Sie die Modelle 1ba9 und 1mfm einschließlich der Dichtekarte des letzteren (edsID:1mfm). Zur Erinnerung: Hierbei handelt es sich um das NMR- und Röntgen-Modell der gleichen monomeren Superoxiddismutase. Im Folgenden liegt der Fokus auf einem bestimmten Teil des Moleküls, so dass es hilfreich ist, eine lokale Strukturüberlagerung durchzuführen. Wählen Sie dazu zunächst die **Rückgratome** der Residues 145 bis 147 aller Modelle aus. Starten Sie dann das MatchMaker Tool (unter Tools -> Structure Comparison) und wählen Sie dort 1mfm als Referenzmodell und alle 1ba9 Modelle zum Matchen aus. Aktivieren Sie unbedingt beide Further restrict matching to current selection Checkboxen, bevor sie auf OK klicken.

Die Strukturen sind im ausgewählten Bereich nun gut überlagert (jedoch nicht im Rest des Moleküls). Um diesen besser im Detail zu betrachten, wechseln Sie zunächst in die Atomare Darstellung, wählen Sie **alle** Atome der Residues 145 bis 147 aus und lassen Sie nur diese anzeigen (show selection). Verstecken Sie Modell 1mfm und die Dichtekarte und betrachten Sie zunächst nur das NMR Ensemble. Zur Übersicht ist es auch hilfreich die Wasserstoffatome zu verstecken (~show H). Betrachten Sie die Seitenkette des Cysteins 146. Was fällt Ihnen auf? Gibt es gewisse Tendenzen zu bestimmten Konformationen? Betrachten Sie nun die selbe Seitenkette in Modell 1mfm. Sehen Sie etwas ungewöhnliches?

Im Röntgen Modell sehen Sie *alternative Konformationen* der selben Seitenkette. Liegt die Seitenkette in unterschiedlichen Konformationen in den kristallisierten Proteinenmolekülen vor, so wird die Elektronendichte entsprechend verteilt im Experiment gemessen. Sind die unterschiedlichen Varianten ausgeprägt genug, so wird die Software, welche die Atome an die Dichte anpasst, unterschiedliche Konformationen erstellen und sie dem Modell hinzufügen. I.d.R. werden diese direkt in die Modelldateien geschrieben und bei der Visualisierung in *Chimera* entsprechend angezeigt.

Verifizieren Sie anhand der Dichtekarte, dass die Elektronendichte für die Konformationen plausibel erscheint (vorher ist es zur Übersicht sinnvoll die Darstellung der Dichte mit dem Zone Feature auf das Cystein 146 zu beschränken). Prüfen Sie ebenfalls, ob die unterschiedlichen Konformationen sich im NMR Ensemble widerspiegeln. Schätzen Sie mit Hilfe der Dichtekarte und dem NMR Ensemble ein, welche der Konformationen wahrscheinlicher ist.

## Disulfidbrücken

Lassen Sie nun nur Modell 1mfm ohne Elektronendichte sichtbar und wählen Sie die Residues 56 bis 58 aus. Mit `display selection` werden die ausgewählten Atome zusätzlich zu den bisher angezeigten sichtbar gemacht. Sie sehen nun, dass die entfernten Teile der Sequenz lokal bei einander liegen und laut Visualisierung über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 57 und 146 verbunden sind, wobei für jede der Konformationen des Cysteins 146 eine Bindung angezeigt wird.

Betrachten Sie die Bindungen. Was fällt Ihnen bzgl. ihrer Längen auf? Sie können die Distanz zwischen je zwei ausgewählten Atomen mit dem Befehl `distance selection` als Label anzeigen lassen. Finden Sie damit die Längen der Bindungsvarianten heraus. Die Disulfidbrücke ist eine kovalente Bindung von etwa 2.05 Å Länge. Welche der vorgeschlagenen Bindungen ist realistischer, bzw. überhaupt möglich?

Offensichtlich liegt hier ein Problem vor, da für eine der Bindungsvarianten der Abstand zwischen den Schwefelatomen viel zu groß ist. Sie haben zuvor jedoch anhand der Elektronendichte und dem NMR Ensemble verifiziert, dass diese Konformation der Cystein 146 Seitenkette relativ wahrscheinlich ist. Spekulieren Sie mit Hilfe der Analysemethoden und Erkenntnisse aus dem ersten Teil dieser Übung über mögliche Erklärungen für Ihre Beobachtungen.

## Fragen

1. Ist es möglich aus einem NMR Ensemble allein alternative Konformationen innerhalb von Proteinstrukturen zu bestimmen? Begründen Sie.
2. Um aus einem NMR Ensemble eine repräsentative Struktur zu ermitteln, wird vorgeschlagen alle Atomkoordinaten zu mitteln. Ist dies ein guter Ansatz? Warum bzw. warum nicht?
3. Überlegen Sie, wie die Qualität einer mit Röntgenstrukturanalyse ermittelten Struktur unabhängig von der Auflösung eingeschätzt werden kann.