

AST Übung 2 - Genauigkeit

Einführung

Ziel dieses Übungsblatts ist die Analyse von Unordnung und Ungenauigkeiten in Makromolekülstrukturen. Im Folgenden liegt eine Proteinstruktur vor, welche sowohl durch Kristallstrukturanalyse als auch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) ermittelt wurde. Anhand dieser wird betrachtet, wie sich Unsicherheiten in den Koordinaten der jeweiligen Modelle widerspiegeln und wie sie quantifiziert und visualisiert werden können.

Struktur-Ensembles

Laden Sie das mit NMR-Spektroskopie ermittelte Modell einer mutierten monomeren Superoxiddismutase 1ba9 in *Chimera*. Hierbei handelt es sich um ein Struktur-Ensemble von 36 unterschiedlichen aus den NMR Daten berechneten Strukturen, welche das Spektrum möglicher Konformationen beschreiben.

Clustering von Strukturen

Zur besseren Übersicht über die Strukturvariationen soll die Visualisierung auf eine Untermenge von Strukturen beschränkt werden, in welcher die Elemente sich stärker von einander unterscheiden. Ein Ansatz hierzu ist das Clustering der Strukturen basierend auf durchschnittlichen Distanzen der Atomkoordinaten. Aus jedem der resultierenden Cluster wird dann die Struktur ausgewählt, welche allen anderen innerhalb des Clusters am ähnlichsten ist (Cluster Repräsentant). Starten Sie dazu Ensemble Cluster:

Tools -> MD/Ensemble Analysis -> Ensemble Cluster

Beschränken Sie unter `Parts to Match` die berücksichtigten Atome auf das Rückgrat mit einem entsprechenden Spezifikationsausdruck und klicken Sie auf OK.

Im Ergebnisfenster sehen Sie nun eine Liste von Modell-Clustern mit jeweiliger Anzahl der Mitglieder und dem Repräsentant-Modell. Aktivieren Sie die Checkbox `Choose ...` in `Model Panel` im Feld `Treatment of Chosen Clusters` mit der Option `representatives`. Wählen Sie nun alle Cluster aus. Im `Model Panel` sind nun die Cluster-Repräsentanten ausgewählt. Lassen Sie nur diese sichtbar (`show only`), **alle Strukturen sollen jedoch aktiviert bleiben**. Das `Ensemble Cluster` Fenster wird nicht mehr benötigt.

Visualisierung lokaler Unordnung

Untersuchen Sie die fünf Cluster Repräsentanten. Was beobachten Sie hinsichtlich der Überlagerung? Existieren starke lokale Unterschiede (Unordnung)? Können Sie für die Unterschiede Tendenzen zu bestimmten strukturellen Elementen beobachten? Was lässt sich über das Molekül an diesen Stellen aussagen?

Soweit haben Sie lokale Unordnung in der Struktur visuell evaluiert. Mit Hilfe der überlagerten Strukturen lässt sich diese auch quantifizieren. Hierfür kann für jedes Atom des Proteinrückgrates der "root-mean-square deviation" (RMSD) Wert zwischen allen Strukturen als Maß für die durchschnittliche Abweichung der Positionen folgendermaßen berechnet werden:

- Öffnen Sie das Sequenzfenster (Tools -> Sequence -> Sequence). Wählen sie das erste Modell aus (die Sequenzen aller Modelle sind zwangsläufig identisch).
- Starten Sie im Sequenzfenster über das Menü Structure -> Associations und klicken Sie im erschienenen Fenster auf Propagate und anschließend auf OK. Dieser Schritt ist notwendig, damit alle 36 Strukturen mit der aktuell angezeigten Sequenz assoziiert werden.
- Es ist wichtig, dass die Strukturen am Rückgrat überlagert sind, da die aktuellen Koordinaten aller Modelle verwendet werden. Sofern Sie bisher alle Strukturen gleichzeitig bewegt haben und keine deaktiviert war, sollte das zutreffen.
- Berechnen Sie die Rückgrat RMSD Werte im Sequenzfenster über Headers -> RMSD: backbone. Diese sind nun intern gespeichert und werden im Sequenzfenster als Balkendiagramm über den Residues angezeigt.

Für weitere numerische Analysen können die berechneten Daten über andere *Chimera* Fenster als Datei exportiert werden. Es ist jedoch auch möglich die Daten direkt in Chimera zur Visualisierung zu nutzen. Beschränken Sie dazu zunächst die Sichtbarkeit auf eines der angezeigten Modelle. Starten Sie dann über das Menü des Hauptfensters:

Tools -> Depiction -> Render by Attribute

In diesem Menü ist es möglich die Visualisierung (unter dem Reiter Render) oder Auswahl (Select) von Strukturen von gewissen Attributen abhängig zu machen. Wählen Sie unter Models das Modell aus, auf welches die Visualisierung angewendet werden soll. Unter Attributes of wird bestimmt, aus welcher Ebene der Strukturhierarchie die Attribute verwendet werden und die Visualisierung angewendet wird. Wählen Sie hier residues.

Unter Attribute wird das verendete Attribut ausgewählt. Die Rückgrat RMSD Werte heißen hierbei mavRMSDbackbone. Nach entsprechender Auswahl erscheint darunter nun ein Histogramm, welches aus den Attributwerten erstellt wurde, und in welchem sich mehrere Farbbalken befinden. Diese definieren einen stetigen Farbverlauf, bei dem die Farbe einem entsprechenden Wert im Histogramm zugeordnet ist. Sie können die Position und Farbe der Balken (und somit den definierten Farbverlauf) steuern. Darunter unten befinden sich weitere diverse Einstellungen zur Visualisierung. Behalten Sie dort die

vorgegebenen Einstellungen, schauen Sie sich den kleinsten und größten RMSD Wert im Histogramm an und klicken sie auf Apply.

Im Hauptfenster ist die Struktur nun nach berechnetem Rückgrat RMSD Wert eingefärbt. Experimentieren Sie im noch offenen Render/Select by Attribute Fenster mit unterschiedlichen Darstellungsformen (z.B. bewegen Sie die Farbbalken, ändern Sie die Farben...) und klicken Sie jeweils auf Apply um die Visualisierung zu aktualisieren.

Notieren Sie sich den längsten Abschnitt mit der größten lokalen Unordnung der Proteinkette mit Hilfe der vorgestellten Visualisierungen. Deaktivieren Sie abschließend die Sichtbarkeit aller NMR Modelle (schließen Sie die Modelle aber nicht).

Elektronendichte

Dichtekarten

Laden Sie nun die mit Röntgenstrukturanalyse ermittelte Struktur des gleichen Moleküls 1mfm und **bewegen Sie es nicht**. Laden Sie nun die dazugehörige Elektronendichtekarte mit dem Befehl: open edsID:1mfm. Die Karte und die Struktur sind nun korrekt überlagert und können zusammen bewegt werden. Wählen für das Molekül eine Darstellungsart, unter der sich die Elektronendichte um Atome herum gut untersuchen lässt.

Beim Laden der Karte erscheint Ihnen das Volume Viewer Fenster. In diesem steuern Sie die Darstellung der Elektronendichte. Das Histogramm zeigt die Verteilung verschiedener Dichtewerte an und mit dem Marker steuern Sie den Wert, für den die Isolinien angezeigt werden. Es wird bedingt durch übriges Lösungsmittel und Rauschen viel störende Elektronendichte innerhalb der Einheitszelle vorliegen. Um nur die Dichte anzuzeigen, welche die Atome des Moleküls direkt umgibt, kann im Menü des Volume Viewer das Zone Feld aufgerufen werden:

Features -> Zone

Wenn Sie nun das gesamte Molekül auswählen und den erschienenen Zone Button klicken, wird die Darstellung der Dichte auf einen angegebenen Radius (in Ångström) um die Auswahl beschränkt.

Überlegen Sie, was die Änderung der Isolinien beim Verschieben des Markers über die Elektronendichte aussagt. Untersuchen Sie die Verteilung der Elektronendichte um die Struktur, und experimentieren Sie mit den Darstellungsoptionen im Volume Viewer Fenster. Schauen Sie sich insbesondere die Elektronendichte in dem Bereich an, den Sie zuvor notiert haben (lokale Unordnung) und vergleichen Sie diese mit der Dichte im Rest des Moleküls. Sie können die Dichtekarte im Volume Viewer durch Klicken auf das Augensymbol verstecken / hervorbringen.

B-Faktoren & Vergleich

Aus der Elektronendichte können B-Faktoren, ein explizites Maß für lokale Unordnung und Mobilität berechnet werden. Im vorliegenden Modell wie in vielen anderen sind die berechneten B-Faktoren bereits in der Strukturdatei hinterlegt und können direkt zur Visualisierung im Render/Select by Attribute Menü als Attribut verwendet werden. Achten Sie darauf, dass das entsprechende Modell (1mfm) ausgewählt ist. Das B-Faktor Attribut lässt sich für Atome (bfactor) oder gemittelt für die Residues (average -> bfactor) darstellen.

Experimentieren Sie mit der Visualisierung der B-Faktor Werte. Vergleichen Sie Strukturabschnitte mit hohen B-Faktor Werten mit den entsprechenden Abschnitten in den NMR Modell und achten Sie dabei auf die berechneten RMSD Werte. Um zu sehen, wie B-Faktoren, Elektronendichte und NMR-Ensemble Abweichungen mit einander korrelieren, kann man das NMR Ensemble über die Röntgen-ermittelte Struktur überlagern. Aktivieren Sie wieder die Sichtbarkeit eines NMR Modells, färben Sie es nach RMSD Wert ein und rufen Sie das MatchMaker Tool auf:

Tools -> Structure Comparison -> MatchMaker

Wählen Sie hier 1mfm als Referenzstruktur und alle 1ba9 Modelle zum Matchen aus. Alle vorgegebenen Einstellungen können behalten werden (da die Strukturen sehr ähnlich sind und nichts besonders optimiert werden muss). Klicken Sie auf OK. Das MatchMaker Tool führt im Hintergrund ein Sequenzalignment und Distanzminimierungen durch. Alle Strukturen sollten dann überlagert sein.

Fragen

1. Das Modell 1mfm wurde mit einer Auflösung von 1.02Å erzeugt. Was sagt dies über die Qualität der ermittelten Struktur aus?
2. Welche ist (generell) die genauere Methode zur Strukturermittlung und warum? Warum bedarf es einer Alternative?
3. Im NMR Modell haben Sie mindestens eine Loop-Region mit hoher lokaler Variation in den Atomkoordinaten beobachtet. Schätzen Sie mit Hilfe der anderen gewonnenen Erkenntnisse ein, ob die Unsicherheit durch einen Mangel von NMR Daten an den Regionen oder durch lokale Flexibilität und Bewegung zustande kommt.
4. Im NMR Modell wurden die Rückgrat RMSD Werte zwischen den einzelnen Strukturen als Maß für Unordnung verwendet. Spekulieren Sie über andere mögliche Anwendungen für Atomare RMSD Werte im Kontext von Molekülstrukturen.