

Einführung

Dieses Übungsblatt behandelt einfache Qualitätsmerkmale von Proteinstrukturen. Anhand zweier mit Kristallstrukturanalyse ermittelten Strukturen des gleichen Proteins werden einfache geometrische Qualitätskriterien über das PDB-Webinterface und *Chimera* untersucht. Mit einer einfachen Energieminimierung wird abschließend versucht eine Struktur zu verbessern.

Protein Data Bank

Die *Protein Data Bank* (US Website: www.rcsb.org; Europäische Website: www.pdbe.org) ist eine große, offene Datenbank für Makromolekülstrukturen (Proteine, RNA). Jeder Eintrag wird über einen vier Zeichen langen alphanumerischen Code identifiziert und enthält neben den Atomkoordinaten unterschiedliche Metainformationen zum gegebenen Molekül und der aufgeklärten Struktur.

Rufen Sie die europäische Website in einem Webbrowser auf und suchen Sie über das Search Textfeld (oben rechts) nach folgenden Stichworten: „*Crystal Structure of Human DJ-1*“. In der Leiste links können Sie die Ergebnisse nach verschiedenen Kriterien filtern. Passen Sie hier die Kriterien `Experimental methods`, `Organism name` und `Molecule name` Ihrer Suchanfrage entsprechend an. Lassen Sie die Ergebnisse durch das `Sort by` Menu (oben rechts) aufsteigend nach Qualität sortieren.

Unter den angezeigten Einträgen sollte Modell 1j42 erscheinen. Klicken Sie auf den Identifier um den Eintrag zu öffnen, lassen Sie jedoch den Tab mit den Suchergebnissen offen. Verschaffen Sie sich einen Überblick über das Molekül und die angezeigten Metainformationen. Erkunden Sie die Art der von der PDB erfassten Informationen und wie diese präsentiert werden.

Wechseln Sie nun zurück zu dem Tab mit dem Suchergebnissen und sortieren Sie diese absteigend nach Qualität. Öffnen Sie den Eintrag 4rkw und vergleichen Sie die Daten mit 1j42. Schauen Sie sich insbesondere den Bereich `Experiments and Validation` an, welcher Ihnen einen Überblick über die Strukturqualität anhand unterschiedlicher Metriken gibt. Vergleichen Sie auch die Auflösungen, mit denen die Strukturen ermittelt wurden.

Vergleich von Auflösungen

Starten Sie nun *Chimera* und öffnen Sie die betrachteten Modelle mit Elektronendichtekarte **in folgender Reihenfolge**:

```
open 1j42
open edsID:1j42
open 4rkw
open edsID:4rkw
```

Stellen Sie die gleiche `step` Zahl (am besten 1) bei beiden Modellen ein. Nutzen Sie das `Zone Tool` im `Volume Viewer` um störende Elektronendichte zu entfernen. Zur Erinnerung: Aktivieren Sie das `Zone` Feld unter `Features` im `Volume Viewer` Fenster, wählen Sie die Atome der beiden Strukturen aus und klicken Sie mit einem geeigneten Radius auf den `Zone`

Button. Die Begrenzung der Darstellung wird zunächst nur auf eines der Modelle angewendet. Klicken Sie auf den Namen des anderen Modells über dem Histogramm um es stattdessen auszuwählen und klicken Sie erneut auf den Zone button.

Überlagern Sie nun Modell 4rkw auf 1j42 (letzteres ist die Referenzstruktur) mit dem MatchMaker Tool. Nun sind die Proteinstrukturen überlagert, jedoch nicht die Dichtekarten (da diese als unabhängige Modelle betrachtet werden). Geben Sie hierfür den Befehl `matrixcopy #2 #3` in die Kommandozeile ein, um die neue Position des Modells 2 (4rkw) auf das Modell 3 (4rkw Dichtekarte) zu übertragen. Nun sollten sowohl beide Strukturen als auch die Elektronendichten korrekt überlagert sein.

Vergleichen Sie die Elektronendichten beider Modelle mit einander und schauen Sie, ob der Unterschied in den Auflösungen sich bemerkbar macht. Hierzu ist die atomare Darstellung am sinnvollsten. Die Dichtekarten lassen sich mit einem Klick auf das \odot Symbol ein- bzw. ausschalten. Schauen Sie sich insbesondere das Verhalten der Dichtewerte um Ringstrukturen an (z.B. um Residues 126-127). Nutzen Sie auch hier zur Übersicht das Zone Tool.

Ramachandran Outlier

Starten Sie das Model Panel und öffnen Sie von dort aus den *Ramachandran* Plot für Modell 1j42. Die grünen Konturen beschreiben die Wahrscheinlichkeiten der ϕ, ψ Winkelkombinationen für bestimmte Residue-Gruppen. Betrachten Sie die Residues, welche außerhalb der abgegrenzten Gebiete im General case fallen. Sie können auf die Punkte klicken um die entsprechenden Residues im *Chimera* Hauptfenster auszuwählen. Um welche Aminosäuren handelt es sich dabei? Erklären Sie ihre Beobachtungen.

Wählen Sie nun im *Ramachandran* Plot von 1j42 unter Show region for die Option Glycine (sym) aus. Ihnen werden nun die Bereiche der wahrscheinlichen Winkelkombinationen für Glycin angezeigt. Einer der Punkte liegt fast außerhalb der Konturen und stellt einen *Ramachandran-outlier* dar. Wählen Sie diesen aus und betrachten Sie die entsprechende Struktur. Vergleichen Sie die Konformationen dieses Residues in beiden Modellen. Was fällt Ihnen auf? Wie verhalten sich die Elektronendichten dort? Welche Konformation ist wahrscheinlicher und welche ein potentieller Fehler im Modell?

Atom Clashes

Laut Datenbank soll es in Modell 1j42 Clashes geben. Einige lassen sich mit Chimera finden. Starten Sie dazu:

```
Tools -> Structure Analysis -> Find Clashes/Contacts
```

Unter Atoms to Check können Sie ausgewählte Atome zum Prüfen auf Clashes designieren. Wählen Sie dazu im alle Atome von 1j42 mit der normalen Selektion aus und klicken Sie auf Designate. Wählen Sie bei Check designated atoms against: die Option themselves. Behalten Sie alle anderen Einstellungen und schauen Sie sich die Optionen unter Clash/Contact Parameters genau an. Versuchen Sie herzuleiten, wie *Chimera* einen Clash definiert.

Klicken Sie auf `Apply`. Unten im `Find Clashes/Contacts` Fenster wird Ihnen die Anzahl gefundener Clashes angezeigt. Im Chimera Hauptfenster werden die Clashes visualisiert. Notieren Sie sich die Anzahl der Clashes und die beteiligten Residues.

Suchen Sie nun nach Clashes im anderen Modell (mit gleichen Clash-Parametern). Hierzu müssen Sie vorher die Atome des Modells auswählen und erneut auf den `Designate` Button klicken. Was beobachten Sie?

Energieminimierung

Es ist möglich in Chimera eine Energieminimierung der Struktur mittels einer Kombination von Gradientenverfahren vorzunehmen. Starten Sie hierzu:

```
Tools -> Structure Editing -> Minimize Structure
```

Es erscheint ein Menu, in welchem das zu minimierende Modell ausgewählt wird und die Optimierungsparameter festgelegt werden. Überlegen Sie, was die Parameter bedeuten und wie sie sich auf das Ergebnis und die Laufzeit der Minimierung auswirken. Wählen Sie hier Modell `1j42` aus, wählen Sie die Option `Neither memorize nor use memorized options` und klicken Sie auf `Minimize`.

Nacheinander werden mehrere Menus erscheinen, in welchen Optionen für die „Vorbereitung“ der Molekülstruktur zur Minimierung gesetzt werden. Schauen Sie sich die Optionen und Parameter genau an (behalten Sie jedoch jeweils die Standardwerte) und überlegen Sie, wozu die Vorbereitungsschritte notwendig sind.

Die Energieminimierung kann einige Minuten dauern. Entfernen Sie anschließend die hinzugefügten Wasserstoffe (`delete H`) und suchen Sie erneut nach Clashes in `1j42`. Wie viele Clashes beobachten Sie jetzt und um welche handelt es sich?

Sie können das Modell `1j42` ein weiteres Mal öffnen, um zu vergleichen, wie die Energieminimierung die Struktur verändert hat. Wie groß sind die beobachteten Unterschiede? Schauen Sie sich den *Ramachandran Outlier* (Residue 65) noch einmal an. Hat die Minimierung die Rückgratkonformation an dieser Stelle signifikant verändert? Woran kann das liegen?

Fragen

1. Es wurden Ramachandran Outlier und Atom Clashes betrachtet. Nennen Sie ein weiteres geometrisches Qualitätsmaß und beschreiben sie es kurz.
2. Welche der geometrischen Qualitätsmaße eignen sich um 1. Rückgrat und 2. Seitenketten zu beschreiben und warum?
3. Beschreiben Sie einen einfachen Ansatz einen Clash zwischen zwei Atomen zu definieren (ohne Energien zu berechnen).
4. Bei der Energieminimierung wurden einige Schritte durchgeführt um das Molekül „vorzubereiten“. Um welche handelt es sich und wozu sind diese notwendig?
5. Nennen Sie einen möglichen Grund dafür, dass eine Energieminimierung einer Struktur mittels *gradient descent* Methoden nicht alle Clashes (oder andere Probleme) beseitigt oder sogar neue Clashes verursacht.