

# **Protokoll Versuch B1**

Modellbau, Elektronendichtekarten und  
Symmetrie

**Gruppe 8**

Susanne Duncker und Friedrich Hahn

## Versuch B1: Modellbau, Elektronendichtekarten und Symmetrie

### Teilversuch 1: Computereinführung

Alle hier beschriebenen Arbeiten werden nach einer kleinen Einführung auf einem UNIX-System durchgeführt.

Mit Hilfe des Computers und geeigneter Software können dreidimensionale Strukturen von Proteinen dargestellt und betrachtet werden. Wir verwenden hier das Programm Coot, welches unter anderem das Betrachten von Proteinstrukturen und viele weitere Operationen ermöglicht. Zur Einführung wird ein pdb-File vom Thioredoxin eingelesen und das Modell betrachtet. Die Lage der Atome werden im pdb-File folgendermaßen angegeben:

1	N	MET	1	39.203	15.671	25.103	1.00	47.70	N
2	CA	MET	1	38.380	16.351	24.054	1.00	46.07	C
3	C	MET	1	39.072	16.288	22.669	1.00	41.82	C
4	O	MET	1	40.252	15.935	22.568	1.00	42.13	O

Die Angaben entsprechen folgenden Daten:

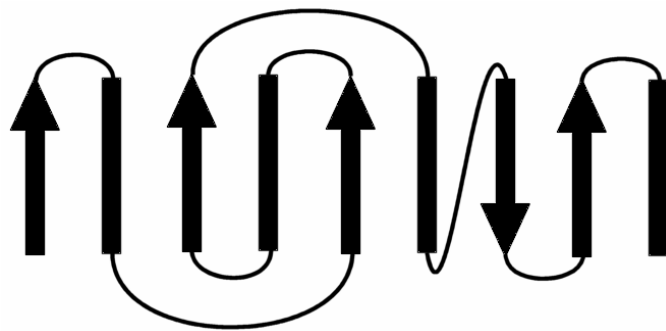
- Laufende Atomnummer
- Art des Atoms bezüglich der Aminosäure in der es vorkommt
- Name der Aminosäure
- Laufende Nummer der Aminosäure
- Koordinaten des Atoms (x, y, z)
- Belegungsfaktor
- Temperaturfaktor
- Art des Atoms

Des weiteren sind in pdb-Files noch weitere Informationen wie Auflösung, Symmetriegruppe und Kommentare hinterlegt.

In Coot werden die Daten als dreidimensionales Modell gezeigt, es kann um alle Achsen rotiert, entlang der Achsen verschoben und gezoomt werden. Mit Hilfe des Clippings können Atome in Abhängigkeit ihrer z-Koordinate ein- bzw. ausgeblendet werden um bessere Sichtbarkeit bestimmter Strukturen von Interesse zu bekommen, ohne dass diese von optisch drüberliegenden Atomen verdeckt werden. Außerdem kann man das Molekül so verschieben, dass man den gewünschten Teil auf dem Bildschirm hat. Zum Einstieg wird hier ein Datensatz des Thioredoxin verwendet. In dem Molekül kommen drei Schwefelatome vor (grün), zwei in Cysteinen (32 und 35) und eines im Methionin (37). Die Aminosäurekette besitzt am C-Terminus Alanin und am N-Terminus Serin. Des weiteren kann man die Ansicht so umstellen, dass man nur die C- $\alpha$ -Atome sieht wodurch man gut Sekundärstrukturelemente erkennen kann:

1 – 10:  $\beta$ -Faltblatt  
 1 – 19:  $\alpha$ -Helix  
 23 – 29:  $\beta$ -Faltblatt  
 33 – 49:  $\alpha$ -Helix  
 53 – 60:  $\beta$ -Faltblatt  
 64 – 70:  $\alpha$ -Helix  
 71 – 82:  $\beta$ -Faltblatt  
 86 – 95:  $\beta$ -Faltblatt

Im Topologieplot schaut das dann so aus (N-Terminus links, C-Terminus rechts):



Im folgenden wurde mit Hühnereiweiß-Lysozym gearbeitet. Dieses besteht aus 129 Aminosäuren. Am N-Terminus befindet sich Lysin und am C-Terminus ist Leucin. Die C- $\alpha$ -Atome der ersten und letzten Aminosäure sind 20.04 Å entfernt. Das Molekül besteht nicht nur aus Helices, es hat ungefähr zwischen den Aminosäuren 42 bis 57 antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Die roten Kreuze in der Darstellung sind hier Sauerstoffatome von Wassermolekülen. Außerdem befinden sich noch Nitratmoleküle im Modell.

Lysozym besitzt vier Disulfidbrücken, zwischen den Cysteinen 64 – 80, 15 – 30, 6 – 127 und 76 – 94. Die Distanzen zwischen den Atomen 105 O und 108 N beträgt 2.90 Å und den Atomen 33 NZ und OD 1 beträgt 2.75 Å. Außerdem wurde der Ramachandranplot angeschaut, aber nicht ausgewertet, da er noch nicht besprochen worden ist. Mit dem Befehl "Simple Mutate..." im Menü "Model/Fit/Refine" lässt sich jede beliebige Aminosäure gegen eine andere austauschen.

## Teilversuch 2: Modellbau

Hier werden mit Hilfe eines Modellbausatzes und eines Programms, xrama, Modelle von Oligopeptiden basierend auf der Eingabe von Dihedralwinkeln erstellt.

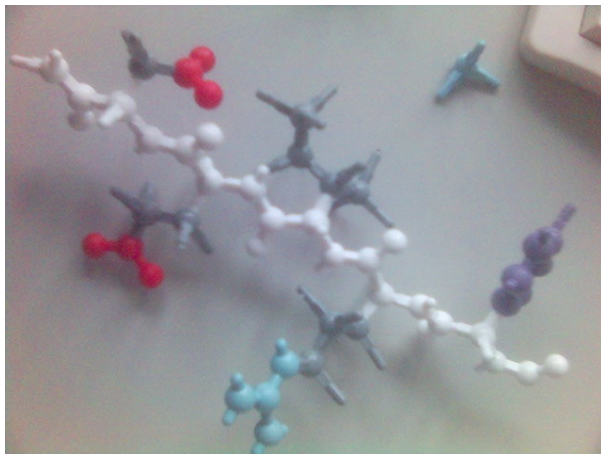
Der Modellbausatz besteht aus verschiedenfarbigen Teilen, die weißen stellen die Peptidbindung und das C- $\alpha$ -Atome dar. Grau sind die Kohlenstoffatome der Seitenkette, rot organische Säuregruppen und gelb Sulfidgruppen. Außerdem sind aromatische Ringe violett. Beim Modellbau werden zuerst die Aminosäuren in der richtigen Rotationskonformation (L-Isomere) zusammengesteckt und anschließend zur Kette verknüpft. Folgende Ketten wurden gebildet:

Kette 1:

S Serin  
A Alanin  
N Asparagin  
N Asparagin  
E Glutaminsäure

Kette 2:

F Phenylalanin  
R Arginin  
I Isoleucin  
E Glutaminsäure  
D Asparaginsäure



FRIED-Aminosäurekette, N-Terminus rechts

Die Kette wie sie auf der Abbildung zu sehen ist hat eine gestreckte Konformation, beide Dihedralwinkel  $\Psi$  und  $\Phi$  betragen  $0^\circ$ . Das sind auch praktisch die einzigsten beiden Parameter, welche die Konformation des Aminosäurerückrads bestimmen. Verdreht man diese Winkel so, dass die Seitengruppen die geringste sterische Behinderung haben, sprich abwechselnd nach oben und unten zeigen, erhält man die Konformation eines  $\beta$ -Faltblattstranges. Nun werden alle Seitengruppen durch Alanine ausgetauscht und es soll durch Modifikation der beiden Winkel die Kette das Sekundärstrukturmotiv der rechtsgängigen  $\alpha$ -Helix einnehmen. Dazu müssen die Winkel um etwa  $-50^\circ$  bzw.  $-60^\circ$  (also gegen den Uhrzeigesinn) gedreht werden. Die  $\alpha$ -Helix besitzt dadurch, dass die partial negativ geladenen Sauerstoffatome der Peptidbindung zum C-Terminus und die partial positiv

geladenen Wasserstoffatome der Peptidbindung zum N-Terminus zeigen, eine Polarität. Des weiteren ragen die Seitenketten nach außen.

Mit dem Programm xrama können regelmäßige Molekülmodelle erstellt werden. Hierfür werden die vorgegebenen Dihedralwinkel für  $\alpha$ -Helix,  $3_{10}$ Helix,  $\pi$ -Helix und Polyprolin II verwendet und die generierten Modelle anschließend in Coot angeschaut. Es werden Merkmale wie Händigkeit der Helices, Anzahl der Aminosäuren pro Windung, Beteiligung der Aminosäuren an Wasserstoffbrücken und Länge dieser Brücken bestimmt.

	$\alpha$ -Helix	$3_{10}$ Helix	$\pi$ -Helix	Polyprolin II
Händigkeit	Rechts	Rechts	Rechts	Links
Reste/Windung	3.6	3.0	4.4	~3
H-Brücken	i, i+4	i, i+3	i, i+5	-
Länge der H-Brücken	2.01	1.76	1.26	-
Abstand H-Donor-Akzeptor	2.96	?	2.15	-
Atome/Windung	13	10	16	-
Vorkommen	Sehr häufig	Selten, kurz	Kaum	Häufig

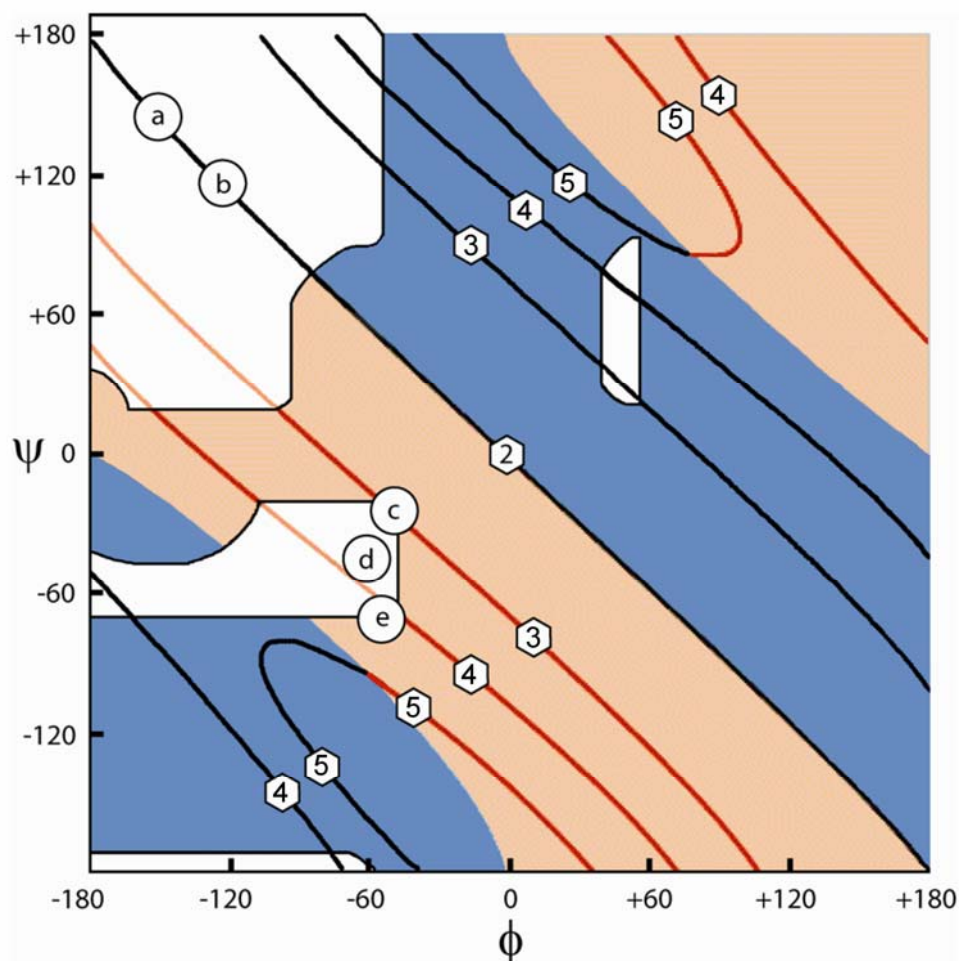
Die  $3_{10}$ Helix hat ihren Namen daher, dass es drei Aminosäuren pro Umlauf und 10 Atome zwischen den an der H-Brücke beteiligten Atome sind. Die  $\pi$ -Helix besitzt einen ziemlich großen Innenraum in der Helix, was diese wohl instabiler macht. Die Polyprolin II-Helix bildet keine intramolekularen Wasserstoffbrücken aus, da die Abstände zwischen den Carbonylsauerstoffen und den NH-Gruppen zu groß sind. Die biologische Entsprechung dazu ist die Kollagentripelhelix, welche in vielen Bindegeweben vorkommt. Hier bilden die linksgängigen Ketten eine rechtshändige Tripelhelix aus. Diese hat immer als jede dritte Aminosäure Glycin ist, da dieser Rest in das innere der Helix zeigt und nur beim Glycin die Seitengruppe klein genug ist. Ein häufig wiederholtes Sequenzmotiv ist Prolin-Hydroxyprolin-Glycin. Die H-Brücken bilden sich zwischen den NH-Gruppen der Glycin und den benachbarten Carbonylsauerstoffen des Prolins aus.

Ferner werden weitere Kombinationen von Dihedralwinkeln in xrama verwendet um ein besseres Verständnis für den Ramachandranplot zu bekommen (S. 61). Die generierten Helices werden auf Händigkeit, geringsten Abstand von Atomen mit je mindestens zwei Atomen dazwischen und geringsten Abstand von Atomen nach einem Helixumlauf untersucht und überprüft ob diese Abstände sterisch erlaubt sind oder nicht.

	Händigkeit	Atom 1	Atom 2	Abstand [ $\text{\AA}$ ]	Erlaubt?
a1	Links	7N	7O	2,69	Ja
a2	Links	5O	6C $\alpha$	2.84	Ja
a2	“	9O	5C $\beta$	1.95	Nein
a3	Rechts	5N	6N	2.58	Nein
a4	Rechts	6O	7C $\alpha$	2.84	Ja
a5	Rechts	8C	3O	0.36	Nein
a5	“	5N	4C $\beta$	2,72	Nein
a6	Links	5O	5N	2.69	Ja

a7	Links	6O	7O	2.17	Nein
a8	Gestreckt	6N	4O	1.30	Nein
a9	Links	4O	5O	2.69	Ja
a9	“	1O	2C	2.65	Nein
a10	Links	9O	9C $\beta$	2.75	Ja
a11	Rechts	7C $\beta$	6O	2.41	Nein
a12	Rechts	7C $\beta$	6O	2.82	Ja

Trägt man die Dihedralwinkel der gebildeten Strukturen in den Ramachandranplot und beachtet die Eigenschaften dieser Strukturen kann man erkennen, dass alle rechtsgängigen Helices im rötlichen Bereich und linksgängigen im blauen Bereich liegen. Die sechseckigen Markierungen repräsentieren die Anzahl der Aminosäuren pro Windung. Diese Anzahl geht von zwei Aminosäuren auf der Diagonale von links oben nach rechts unten, welche die maximal gestreckte Konformation ist, bis zu maximal fünf Aminosäuren pro Umlauf. Die weißen Bereiche sind die erlaubten Bereiche für mögliche Dihedralwinkel. In ihnen liegt das antiparallele  $\beta$ -Faltblatt (a), das parallele  $\beta$ -Faltblatt (b), die  $3_{10}$ Helix (c), die  $\alpha$ -Helix (d) und die  $\pi$ -Helix (e).



### **Teilversuch 3: Symmetrie und Elektronendichte**

Als Ausgangsmaterial dienen hier Plexiglasscheiben bedruckt mit den Schichten einer Elektronendichtekarte des Sexualhormonbindendes Globulins. Auf diesen sollen alle Symmetrieelemente (S. 65) bestimmt werden. Bei unserem Kristall handelt es sich um eine trigonale Packung, nämlich R32 nach den „International Tables for Crystallography“ (siehe Anhang 1). Die Elementarzelle hatte die Form einer Raute. In Ebene 0 waren folgende Symmetrieelemente zu erkennen (siehe Anhang 2):

- an den Ecken sechs zweizählige Drehachsen hexagonal angeordnet
- auf jeder Ecke eine dreizählige Drehachse
- in der Mitte jeder Seite zwei zweizählige Schraubenachsen
- auf jeder Seite zwei dreizählige Schraubenachsen
- in der Fläche auf der kurzen Diagonalen zwei dreizählige Schraubenachsen
- in der Fläche auf der langen Diagonalen zwei dreizählige Drehachsen

Außerdem kehren diese Symmetrieelemente, welche in der Ebene liegen auf den Ebenen  $1/6$ ,  $1/3$ ,  $3/6$ ,  $2/3$  und  $5/6$  verschoben wieder auf (siehe Anhang 3). Die Dichtekarte kann außerdem Hexagonal interpretiert werden (siehe Anhang 1). Die asymmetrische Einheit ist die kleinste Einheit mit der man durch Rotation und Translation das gesamte Gitter darstellen kann. Zusätzlich wird der Umriss des selben Proteins auf einer Folie für jede vierte Ebene eingezeichnet (siehe Anhang 4, rot: Ebene 0.0; grün: 0.13; schwarz: 0.27; blau: 0.40).