

# experimentelle Methoden der Bioinformatik

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Allgemein / Hintergrund</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ChIP-Chip und ChIP-Seq</b>	<b>1</b>
2.1	Ablauf . . . . .	1
2.1.1	Crosslinking . . . . .	1
2.1.2	Sonication . . . . .	1
2.1.3	Immunoprecipitation (Selektion mittels Antikörper) . . . .	1
2.1.4	Reverse Immunoprecipitation . . . . .	2
2.1.5	Reverse Cross Linking . . . . .	2
2.1.6	Auswertung . . . . .	2
2.2	Probleme/Fehler . . . . .	2
2.3	Antikörper . . . . .	3
<b>3</b>	<b>Peak Calling</b>	<b>4</b>
3.1	MACS . . . . .	5
<b>4</b>	<b>CLIP</b>	<b>6</b>
4.1	CLIP-Seq . . . . .	6
4.2	ICLIP . . . . .	7
4.3	PAR-CLIP . . . . .	8
<b>5</b>	<b>Protein-Protein-Interaktion</b>	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Tandem Affinity Purification (TAP)</b>	<b>11</b>
6.1	Local clique merging algorithm (LCMA) . . . . .	13
6.2	Clique Finding Algorithm (CFA) . . . . .	14
<b>7</b>	<b>RNA structure probing</b>	<b>16</b>
7.1	objective function approach . . . . .	16
7.2	Inline-Probing . . . . .	16
7.3	Chemisches Probing . . . . .	17
7.3.1	MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq) . . . . .	17
7.3.2	CLIP: Cross-linking and immunoprecipitation protocol . .	17
7.3.3	SHAPE-Seq . . . . .	17
7.3.4	Hydroxyl-Radikal Probing . . . . .	19
7.3.5	DMS . . . . .	19
7.3.6	CMCT . . . . .	19
7.3.7	Kethoxal . . . . .	19
7.4	Nucleotide analoge interference mapping (NAIM) . . . . .	20
<b>8</b>	<b>Proteinstrukturen</b>	<b>21</b>
8.1	X-ray crystallography . . . . .	21
8.2	NMR spectroscopy . . . . .	22

# 1 Allgemein / Hintergrund

Messung von Strukturen vs. Messung von Interaktionen

Motifsuche:

- Proteine (Transkriptionsfaktoren) haben Domäne die Nukleotidsequenzen erkennen
- Position weight matrix (PWM), position specific scoring matrix (PSSM)
- MEME zum erkennen von Sequenzen / Motifen

## 2 ChIP-Chip und ChIP-Seq

ChIP: **Ch**romatin-**Im**muno**P**recipitation

Kein Single Cell Protocol -> es werden Zellpopulationen benötigt

Ziel: Man will feststellen an welcher Stelle Proteine binden

Quellen für Fehler / Ungenauigkeiten: Messung des Populationsmittelwerts

ChIP-Chip: Chromatin-Immunoprecipitation Chip

ChIP-Seq: Chromatin-Immunoprecipitation DNA-Sequencing

### 2.1 Ablauf

#### 2.1.1 Crosslinking

Stabilisierung der Bindungen zwischen DNA und Protein

Geschieht reversibel zwischen DNA (**Chromatin**) und rekombinanten Proteinen

- Formaldehyd (CH<sub>2</sub>O) vernetzt Base (B) mit Proteinen (P-NH<sub>2</sub>) quer
- $\text{P-NH}_2 + \text{CH}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PN}=\text{CH}_2 + \text{NH}_2\text{-B} \rightleftharpoons \text{PNH-CH}_2\text{-NH-B}$
- Rekombinant: Biotechnologisch hergestellte Proteine aus genetisch veränderten Organismen

#### 2.1.2 Sonication

Zerstören und Zerkleinern (fragmentieren) der Zellen, Zellbestandteile und DNA durch Ultraschall

(Vorher: Waschen der Zellen mit Protease Inhibitor, Lyse + homogenisieren)

- zeitkritisch → Länge bestimmt Grad der Zerkleinerung
- 200-1000 BP Fragmente im Idealfall

Ergebnis sind DNA Fragmente mit gebundenen Proteinen

#### 2.1.3 Immunoprecipitation (Selektion mittels Antikörper)

- Antikörper (binden an Beads oder Membranen, Chip/in Gel) binden an rekombinante Proteine

oder Protein-TAG (kurze Aminosäuresequenz, markieren Protein)

- Aufreinigung:

- Zentrifugation des Präzipitats: Beads+(Protein-DNA) am Boden, Zellfragmente/Rest in Lösung
- Abkippen der Lösung
- Aufnehmen des Beadspellets in Puffer, erneut zentrifugieren (x-Mal)
- Manchmal noch
- DNase Verdau der DNA in Lösung
- Aufheben der DNA in Lösung, als total-Chromatin-Probe

#### 2.1.4 Reverse Immunoprecipitation

Durch Aufreinigungsschritte sind Beads/Gel/Chip idealerweise frei von Zellfragmenten/ungebundener DNA.

Umkehren der IP mit Elutionspuffer → Antikörper von DNA+Proteine trennen  
→ Salzgehalt und pH-Wert an Rückreaktion angepasst

#### 2.1.5 Reverse Cross Linking

- Thermische Zerstörung der Bindung zw. Protein und DNA
- Salzgehalt des Buffer angepasst auf Rückreaktion      - Proteinase K und RNase bauen Proteine und RNA ab (zur Aufreinigung)
- Extraktion der übrig gebliebenen DNA durch Zentrifuge

#### 2.1.6 Auswertung

##### Chiphybridisierung

- Hybridisierung der DNA an Microarray
- Färbung der DNA
- Messung der Farbintensität

→ *mit dem ChIP Background kann ich nichts anfangen...* ←

##### Sequencing

Hochdurchsatzsequenzierung der aufgereinigten DNA.

- DNA extrahieren → DNA fragmentieren → Primer an Fragmente → Sequenzierung
- Herausrechnen der Primer (idealerweise kennt man sie) →
- Quality control → Phred-score Berechnung (Güte der erkannten Nukleobase) → Cutoff bei zu niedrigem Phred-score → Mapping des sequenzierten Teilstücks auf Genom

## 2.2 Probleme/Fehler

### Cross-Linking

**FN:** Protein an DNA gebunden, aber kein Cross-Linking

**FP:** Proteine, die sehr nahe an der DNA sind, aber ungebunden, werden

auch cross linked

### Sonication

- Größe der Fragmente abhängig von Ultraschalleinsatz – zeitkritisch!
- Kürzere und längere Fragmente können Informationen enthalten

### Immunoprecipitation

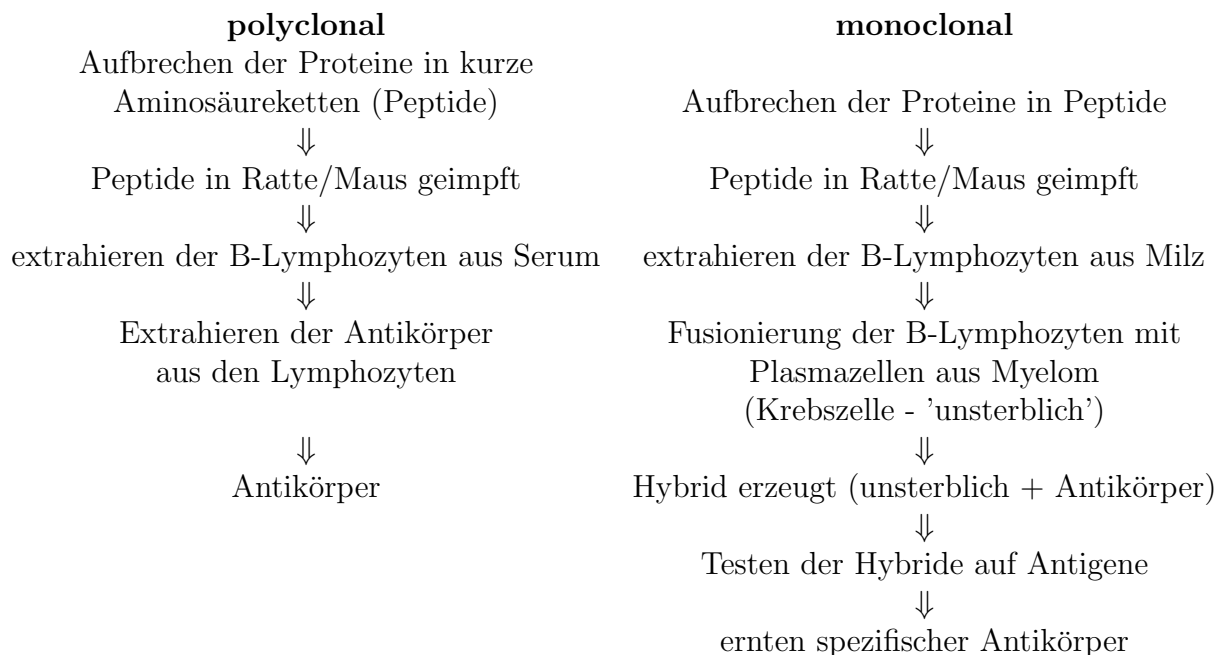
**FP:** Mangelnde Reinheit der rekombinanten Proteine; Spezifität der heterophilen Antikörper zu gering  
Aufreinigung führt zu **FP** und **FN**

### Chip

**FN:** Hybridisierung nicht effektiv genug

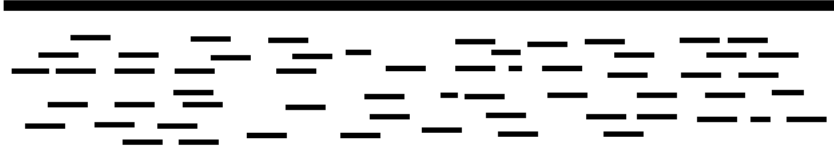
## 2.3 Antikörper

- Antikörper bindet spezifisch und sensitiv
- Antikörper sind fixiert an:
  - Beads
  - Chip (kein Microarray)
  - Gel
- Antikörper werden im Experiment erzeugt



### 3 Peak Calling

Sequenziertes Genom/RNA/DNA aus dem Experiment = viele, kurze Reads  
→ naiv: Jedes Nukleotid, dass von Reads bedeckt ist = Gebunden



→ Problem: Viele FP, da kurze Reads mehrere Treffer haben können

→ Lösung: Cutoff für Anzahl der Reads auf Nukleotid

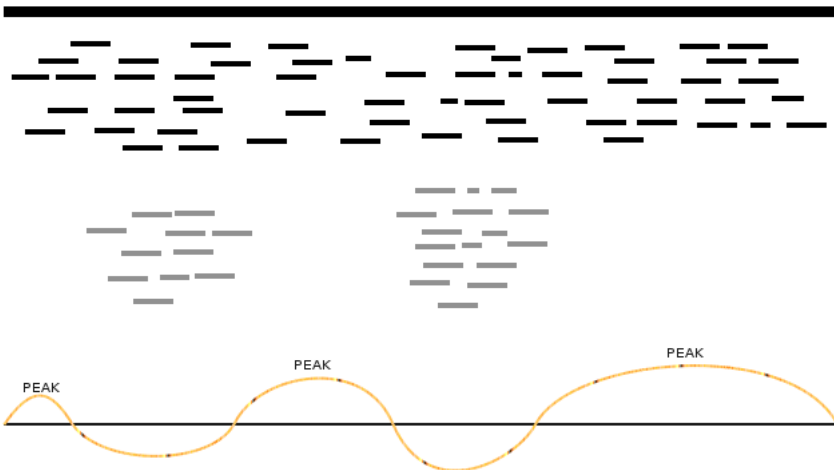
→ Problem: Manche Basen einfach zu binden = viele FP

So geht das nicht!

Lösung:

Enrichment:  $\log \frac{Expression}{Background}$

naiv: Wenn Enrichment > Cutoff → Peak!



### 3.1 MACS

Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS)

1. Einteilen des Genoms in Bins (Eimer)

Window: 200 BP und Offset von 1/4 der window size

In Bins werden Reads eingeordnet

2. Zählen der Fragmente pro Bin, +/- Strang

→ Poisson verteilt!

$$P(x > k, \lambda) = \sum_{i=k}^{\infty} P\lambda(i) = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} P\lambda(i) = 1 - \sum_{n=0}^{k-1} \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}$$

$\lambda$ =Mittelwert der read counts aus Background,  $k$ =read counts aus Experiment  
read count signifikant größer Mittelwert → Peak!

Mittelwert kann abhängig von Menge der reads in Window sein:

$$\lambda = \max(\lambda_{\text{global}}, \lambda_{1000}, \lambda_{5000}, \lambda_{10000})$$

→ Window jeweils zentriert an Bin

3. p-Value Correction

Holm-Bonferroni

q-Value

4. Peakmerging

Wenn Abstand zwischen Peaks < Cutoff → Merge Peaks

(bei MACS 2xWindowSize)

#### Wo sind die Bindungsstellen?

Protein → RNA - **ChIP**: Regionen, mit denen das Protein assoziiert ist

DNA → RNA - **ChIRP**: Match von RNA auf sequenzierter DNA

Verfahren ähnlich zu CLIP

→ RNA cross-linking (UV o. formalin) → aufreinigen →

reverse cross-linking → Read → Match mit DNA

(Chromatin isolation by RNA purification)

Protein → RNA - **RIP**: RNA zu cDNA, hybridisieren mit Chip

→ RNA cross-linking (UV o. formalin) → aufreinigen →

reverse cross-linking → RNA in cDNA →

Hybridisierung auf Chip

(RNA immunoprecipitation protocol)

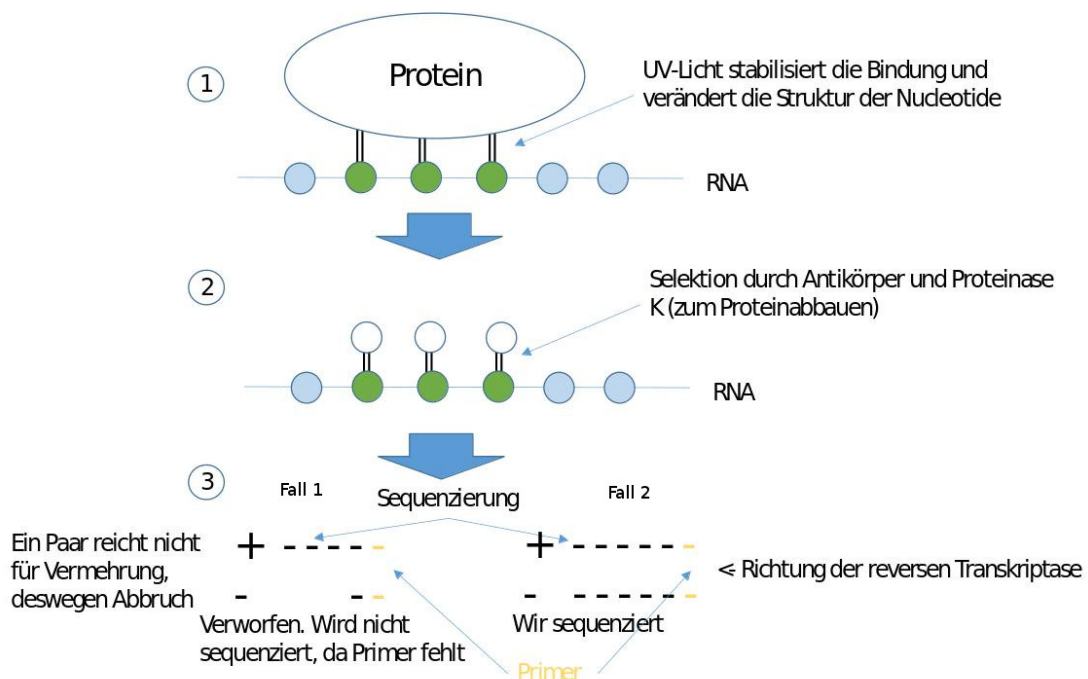
## 4 CLIP

1

### 4.1 CLIP-Seq

cross-linking & immunoprecipitation protocol (cross-linking immunoprecipitation-high-throughput sequencing)<sup>2</sup>

- Ultravioletes Licht für Cross-Linking
- UV-Licht cross linked NUR RNA mit Proteinen
- Induziert UV Mutation der RNA
- CIMS: Cross-linking induced mutation site



Template ist per Definition Plus-Strang und dass durch die PCR erzeugte der Minus-Strang (auch wenn es in der Zelle anders ist).

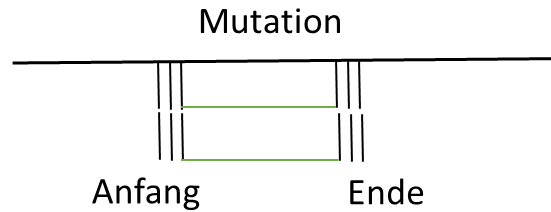
- Fall Links und Rechts treten gleichzeitig auf
- wird in vitro gemacht

<sup>1</sup><https://en.wikipedia.org/wiki/CLIP>

<sup>2</sup><https://de.wikipedia.org/wiki/CLIP-Seq>



Mutation ist Bindungsstelle:



- nach Häufungen schauen
- hohe Sequenziertiefe benötigt

## 4.2 ICLIP

individual nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation protocol<sup>3</sup>

- Schritt 1 und 2 wie bei CLIP-Seq
- Im Schritt 3 werden jetzt aber zirkuläre RNA erzeugt

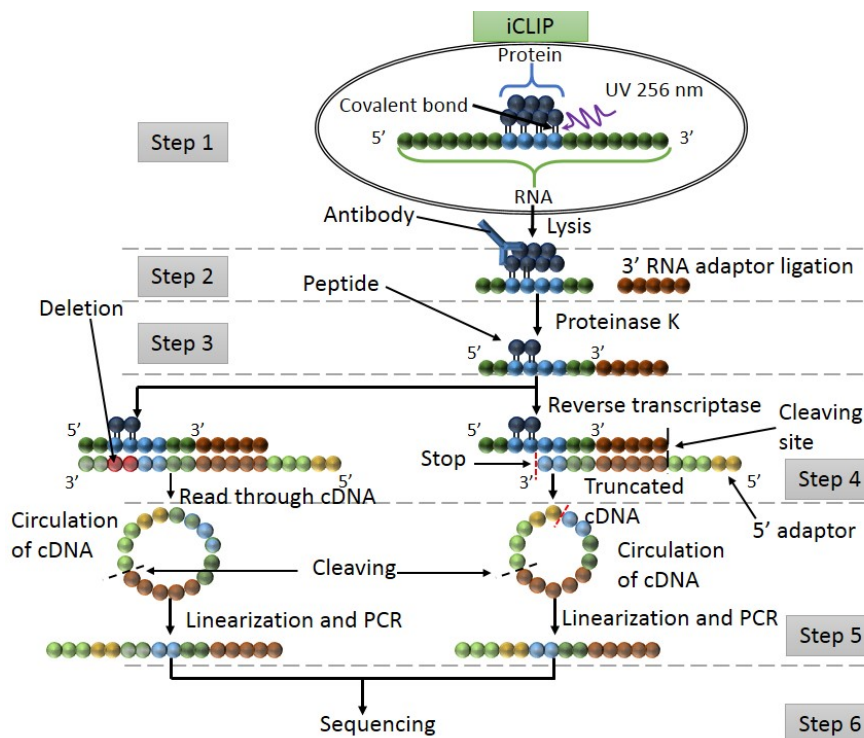


Figure 3: iCLIP

### Step 1

Irradiation of the cells with UV light catalyses covalent bond formation between proteins and RNA in direct contact. The cell is lysed, and the protein of interest is isolated using immunoprecipitation.

### Step 2

Washing is performed to remove free RNA, and RNA adaptors are ligated at the 3' ends.

### Step 3

Proteinase K digestion is performed. This leaves a peptide at the cross-link site that modifies the chemical structure of the nucleotide.

### Step 4

Reverse transcription PCR is performed. This results in both truncated cDNAs and cDNAs that are read through the cross-link sites.

### Step 5

Adapters are added to the 5' cDNA ends via circularization. Restriction enzyme cleavage is performed to linearize the cDNAs, allowing both the truncated and read through cDNAs to be sequenced. The position of cDNA truncation allows RNA-Protein interaction sites to be determined at high resolution.

### Step 6

Sequencing.

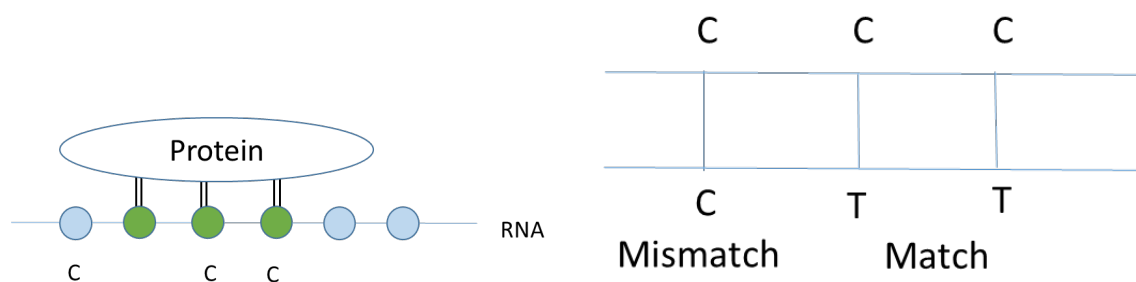
- **Vorteil:** Beide Ergebnisse aus Schritt 5 können in Schritt 6 genutzt werden

<sup>3</sup><https://de.wikipedia.org/wiki/ICLIP>

### 4.3 PAR-CLIP

Photoactivable Ribonucleoside-enhanced CLIP<sup>4</sup>

- Photoaktive (reagieren auf UV-Licht) Ribonucleoside -> Diese lassen wir in DNA einbauen
- UV-Licht für Cross Linking
- Cytosin ist photoaktiv, wird durch UV-Licht zu Uracil (welches in DNA zu Thymin wird)
- Antikörper um RNA Fragmente auszuwählen



**Seeding:** Transkription C→T, Reads C→T

**Alignment:** angepasste Kostenfunktion (C→T wird nicht bestraft). Dadurch nicht symmetrische Kostenfunktion

<sup>4</sup><https://de.wikipedia.org/wiki/PAR-CLIP>

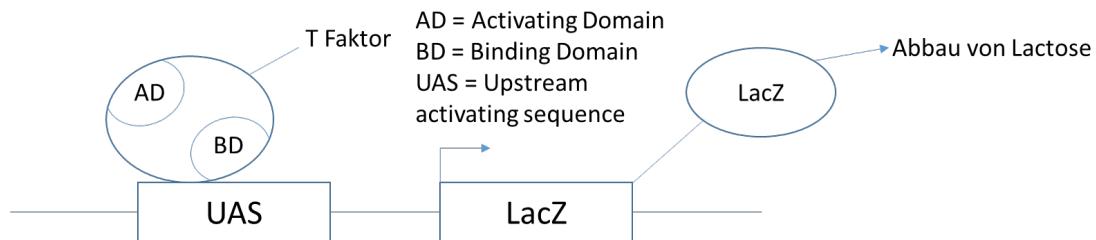
## 5 Protein-Protein-Interaktion

Yeast Two-Hybrid System:

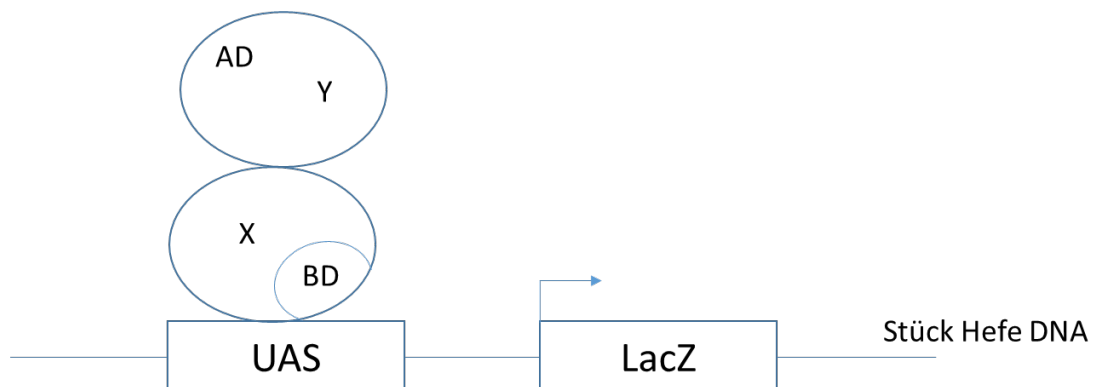
- benötigt: Wirtsorganismus: Hefe
- erzeugt: Zwei Hybridproteine

**Fragestellung:** Interagiert Protein X (Coding DNA X) mit Protein Y (Coding DNA Y)?

Normalfall:



- Coding DNA X und Binding Domain von GAL4 werden in Vektor (=Stück zirkuläre DNA in die ich Proteine binden kann) kloniert
- Vektor mit coding DNA Y & Activating Domain
- Beide Vektoren (haben auch Promotor) werden in Hefezelle eingeschleust



**Welche Interaktionspartner hat Protein X?**

- Erstellen einer Library (Vektor mit X und Vektor mit einem anderen Protein)
- Da wo Hefe auf Lactose wächst reagieren die Proteine

**Problem:**

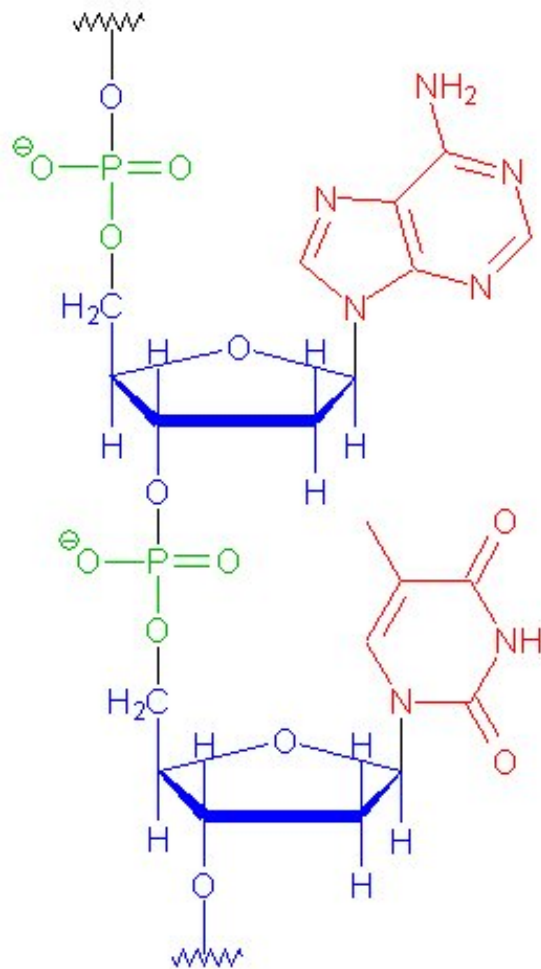
- X&Y falten nicht in natürlicher Struktur und dies führt dazu dass sie nicht mehr binden können (false negativ)
- Das BD oder AD nicht gefaltet werden wie für ihre Funktion notwendig (false negativ)

- Vektor Klonierung funktioniert nicht immer (false negativ)
- Zufällige Aktivierung von Lac Z (false positiv von 80%) → man bekommt nur die Info ob Hefe wächst, aber nicht wie stark

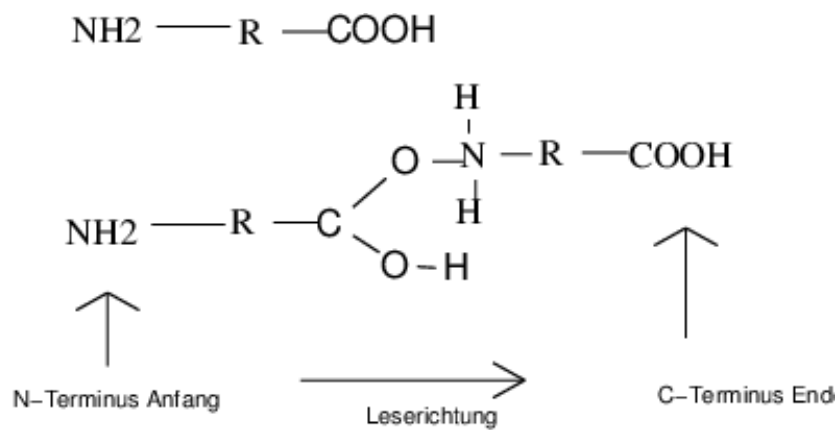
In Hefe kennt man ca-50% aller Interaktionen (Interaktom). Mensch: 30% des Interaktom bekannt.

## 6 Tandem Affinity Purification (TAP)

<sup>5</sup> DNA:



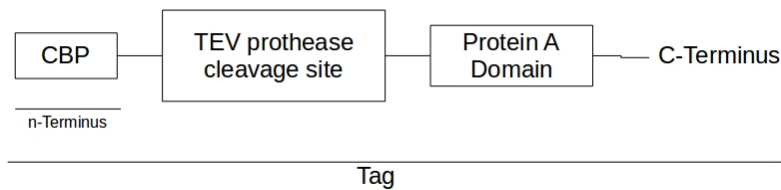
- ähnlich auch bei Proteinen



<sup>5</sup>[https://en.wikipedia.org/wiki/Tandem\\_affinity\\_purification](https://en.wikipedia.org/wiki/Tandem_affinity_purification)

## TAP-Tag

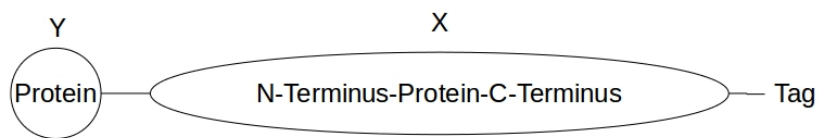
- C-terminal variante (es gibt auch n-terminal)



CBP - Calmodulin binding peptide<sup>6</sup>

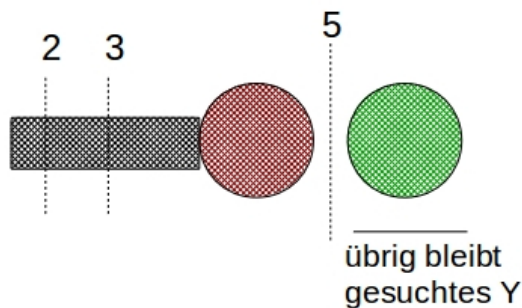
TEV - tobacco etch virus<sup>7</sup>

IgG - unspezifischer Antikörper<sup>8</sup>



**Protein Y wird gesucht!** (Tag wird in Plasmid eingeschleußt)

1. Plasmid mit getagtem Protein & Interaktionspartner werden in Hefezellen inkubiert
2. Affinity purification (Ähnlichkeit Aufreinigung): IgG Matrix bindet die Protein A Domain des Tags (am Ende bleibt Tag übrig)
3. mit Hilfe der TEV protease um an TEV protease cleavage site zu schneiden
4. Calmodium beads um Protein zu extrahieren
5. Auftrennen der Proteine, z.B. durch Ultraschall (nur Interaktionsbindung, keine Peptidbindung!)
6. Identifizieren von Y durch Massenspektrometer



<sup>6</sup><https://en.wikipedia.org/wiki/Calmodulin>

<sup>7</sup>[https://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco\\_etch\\_virus](https://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_etch_virus)

<sup>8</sup>[https://de.wikipedia.org/wiki/Immunglobulin\\_G](https://de.wikipedia.org/wiki/Immunglobulin_G)

weitere Informationsquellen (indirekt)

Ziel: Reduzierung des False-Negatives

- Interaktion über Protein-Protein-Bindungsdomain: Vorhersage über Markovmodelle möglich (Domain, Interaktionspartner)
- Homologie: Vorhersage über Interaktionen in nahen Verwandten
- Textmining auf Publikationen

Filterung

Ziel: Reduzierung der False-Positives

- Co-Expression: werden 2 Proteine gleichzeitig expremiert?
- Lokalisationsinformationen: wenn nicht im gleichen Kompartiment vorhanden, Interaktion nicht möglich

⇒ Ergebnisse durch vorherige Vorgänge: Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke in einer Spezies

⇒ **Analyse des Netzwerks**

Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk (PPIN) = Graph  $G = (V, E)$

$V$  = Knoten (Proteine)

$E$  = Kanten (Interaktionen)  $\subseteq V \times V \rightarrow$  erzeugt Paare von Knoten

$\rightarrow$  ungerichtete Graphen:  $(a, b) \in E \Leftrightarrow (b, a) \in E$

## 6.1 Local clique merging algorithm (LCMA)

clique - vollständige subgraphen  $C$

$C = (V', E')$  mit  $V' \subseteq V, E' \subseteq E$

$\forall x, y \in V' : (x, y) \in E'$

Annahme: dichte Subgraphen repräsentieren Proteinkomplexe

Dichte von  $G$ :  $\delta(G) = \frac{2 \cdot |E|}{|V| \cdot (|V| - 1)}$

Suche nach dichten Graphen

1. Suchen Knoten  $u$  in  $G$  mit dem kleinsten Grad (Grad eines Knoten = Anzahl der Kanten die von einem Knoten ausgehen)
2. entfernen Knoten (+ Kanten) mit dem geringsten Grad  $\Rightarrow$  erhöht die Dichte in Graphen:  $G' = G \setminus \{u\}$
3. wiederhole ab 1 solange gilt:  $\delta(G') > \delta(G)$

$\Rightarrow$  lokale Cliques  $C_1, \dots, C_n$

Merge:

Overlap von  $C_x = (V_x, E_x)$  &  $C_y = (V_y, E_y)$

$$Overlap = \frac{|V_x \cap V_y|^2}{|V_x| \cdot |V_y|} \quad (1)$$

wenn  $Overlap > \text{cut-off}$   $C_x \cup C_y = (V_x \cap V_y, E_x \cap E_y)$

Solange wie noch Cliques gemerged werden &  $\underbrace{\sum_n \frac{\delta(n)}{N}}_{\text{averagedensity}}$  nicht signifikant schlechter wird ( $AD' > 0,95 AD$ )

$\rightarrow$  Vergleich mit realen Proteinkomplexen hat gezeigt, dass Cliques keine gute Approximation ergeben

## 6.2 Clique Finding Algorithm (CFA)

Annahme: Proteinkomplexe k-connected

graphs  $\Rightarrow$  geringe Dichte möglich

k-connected:  $k \in \mathbb{N} \forall V' \subset V, |V'| < k, G$  zusammenhängend

$k \rightarrow$  Anzahl der Knoten, die entfernt werden können, ohne dass  $G$  auseinanderfällt

$\Rightarrow$  alle Knoten haben Grad  $> k$

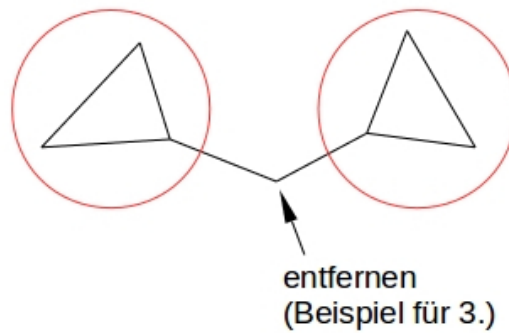
1. entferne alle Knoten mit Grad  $< k$
2. wenn der resultierende Graph weniger als  $k$  Knoten hat  $\rightarrow$  kein k-connected Subgraph
3. finden  $\{u_1, \dots, u_n\}, n < k$ , so dass  $G \setminus \{u_1, \dots, u_n\}$  nicht mehr zusammenhängen, es entstehen Zusammenhangskomponenten

$\Rightarrow$  für jede Zusammenhangskomponente beginnen bei 1.

wenn  $u_1, \dots, u_n$  nicht existiert  $\Rightarrow G$  ist k-connected



Beispiel:  $k=2$



$k \Rightarrow$  Suche Anzahl  $n < k$  = Anzahl der Knoten die entfernt werden können ohne dass der Graph auseinanderfällt

- 1-connected
- 2-connected
- ...
- n-connected

Filtern:  $\text{dia}(G)$  = Durchmesser von  $G$  (Länge des längsten Pfades)

$k=1 \Rightarrow \text{dia}(G) = 4$

$k=2 \Rightarrow \text{dia}(G) > 2 \cdot k$

rausgefiltert werden alle  $\text{dia}(G) < 2 \cdot k$ , da dort die Dichte hoch

## 7 RNA structure probing

Bestimmung von:

- Basenpaarung
- Sekundärstruktur und Tertiärstruktur

### 7.1 objective function approach

**Hard constraints:**

→ 3 Aussagen möglich: — = gepaart; . = ungepaart; X = unbekannt

**Soft constraints:**

→ Wahrscheinlichkeit ob Base an Position Y gepaart ist oder nicht

→ Minimiere den Fehler  $F(\vec{E})$

$$\vec{E} = \sum_{\mu} \frac{\varepsilon_{\mu}^2}{\tau^2} + \sum_{i=0}^n \frac{1}{\sigma^2} (p_i(\vec{\varepsilon}) - q_i)^2 \quad (2)$$

$\mu$  ... Strukturelemente  $\varepsilon_{\mu}$  ... Betrag der Stör-Energie eines Strukturelements

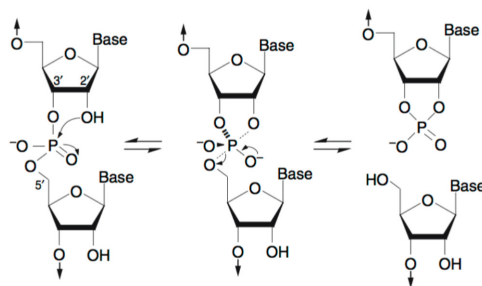
$\tau^2$  ... Varianz des Standardenergiemodells

$\sigma^2$  ... Varianz der Probingdaten

$p_i(\vec{\varepsilon})$  ... Wahrscheinlichkeit, dass i ungepaart ist unter Bedingung des Standardenergiemodells und der Störenergie

### 7.2 Inline-Probing

inline-nucleophilic-attack: Wie in der Abbildung zu sehen kommt es zu strukturellen Änderungen der chemischen Konformation des RNA-Strangs an der Phosphatgruppe. Grund hierfür ist die Instabilität der Einzelsträngigen RNA, die bei Bindung eines Liganden an das Molekül zum Bruch (Cleavage") führt oder eine rein zufällige Konformationsänderung des RNA-Moleküls.



**Vorgehen:**

- Erstellen von zwei Proben des zu untersuchenden RNA-Moleküls

- In einer Probe gewählten Ligand hinzugeben
- beide Proben werden lange inkubiert → nucleophilic attack
- Gelbild mittels Gelelektrophorese herstellen und Längen der RNA-Fragmente beider Proben vergleichend betrachten
- gleiche Strukturen werden als Hintergrundrauschen (ligandenunabhängige) Cleavages betrachtet

## 7.3 Chemisches Probing

RNA-modifizierende Chemikalien sind **struktursensitiv** [1] und **sequenzunabhängig**

- 1 Es werden Chemikalien genutzt die entweder gepaarte oder ungepaarte Basen modifizieren
- 2 Mechanismus zur Detektion der Modifikation

### 7.3.1 MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq)

- Einteilen des Genoms in Bins
    - a Windowsize: typisch 200 bp + offset (ungefähr 0,25 windowsize = 50 bp)
    - b MACS empfiehlt Bin doppelt so groß wie Fragmente
  - Zähle die Anzahl an hypothetischen Fragmenten pro Bin (=window)
- Fragmente können in mehr als ein Bin fallen

### 7.3.2 CLIP: Cross-linking and immunoprecipitation protocol

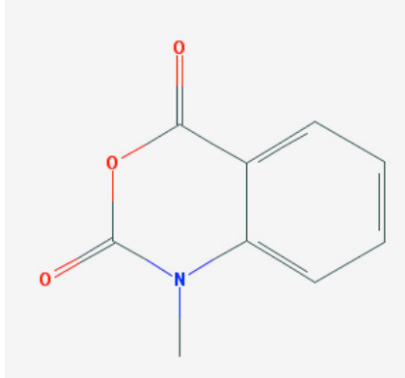
- Ultraviolettes Licht für cross linking
- UV cross linked nur RNA mit Proteinen
- induziert UV Mutation der RNA
- CIMS: cross-linking induced mutation sites

### 7.3.3 SHAPE-Seq

(Selective 2'-hydroxylacetylation analyzed by **p**rimers **e**xtension **s**equencing)

- 2'-OH ist reaktiver wenn die zugehörige Base ungebunden ist
- genutzte Chemikalie: N-methylisatoic anhydride

- unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) bindet ein Sauerstoffmolekül des NMIA an 2'-OH der RNA



(Quelle: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Methylisatoic\\_anhydride](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Methylisatoic_anhydride))

- reverse Transkription: Die RNA wird mit DNA-Molekülen transkribiert. Im Anschluss werden die gewonnenen DNA-Fragmente sequenziert und als Library gespeichert
- Da es auch zu zufälligen Abbruch bei der reversen Transkription kommen kann, wird ebenfalls eine negativ-Library erzeugt
- Alignment der Reads an Transkriptom der RNA ( $X_{ij}$ , wobei  $i$  = Basenposition,  $j$  = Library)
- Maximum-Likelihood-Model:
  - $r_i = \frac{r_{i+}}{r_{i-}} \rightarrow$  Datengrundlage
  - negativ-Library  $\rightarrow$  Abbruchrate
  - simulierte Daten  $m_i \rightarrow$  Berechnung der positionsweisen Shape-Reaktivität

$\rightarrow$  Ermittlung der pseudo-Free-Energy

$$\Delta G_{Shape_i} = m * \ln(\gamma_i * 1, 0) + b \quad (3)$$

$m$  ... Anstieg des Bestrafungswertes

$1,0$  ... Pseudocount  $b$  ... negativer Bonus der freien Energie für gepaarte Basen

$$M_{ij} = \min \begin{cases} M(i+1, j) \\ \min(M(i+1, k-1) * M(k+1, j) * e^{-\frac{E'_{ij}}{kT}}) \end{cases} \quad (4)$$

wobei:

$$E'_{ij} = E_{ij} + \Delta G_{Shape_i} + \Delta G_{Shape_j} \quad (5)$$

$E_{ij}$  ... Standard Energiemodell

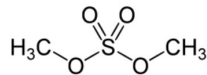
### 7.3.4 Hydroxyl-Radikal Probing

Hydroxyl-Radikale führen zum Bruch der RNA-Sequenz, wenn keine 3-D Interaktion stattfindet und keine Bindung an ein Protein vorliegt.

Nachteil: Sie sind nur kurzlebig in Lösung und müssen hergestellt werden

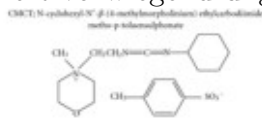
### 7.3.5 DMS

Di-Methylsulfat bindet an  $CH_3$  von ungebundenen A bzw. C oder an eines der beiden, wenn sie das letzte Basenpaar einer Helix bilden oder wenn sie direkt neben einem GU-Basenpaar liegen.



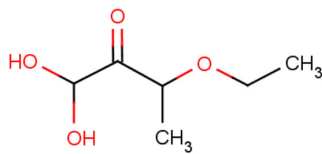
### 7.3.6 CMCT

(1-Cyclohexyl-(2-Morpholinoethyl)Carbodiimid Metho-p-Toluensulfonat) modifiziert vorwiegend ungepaartes Uridin und teilweise ungepaartes Guanin.

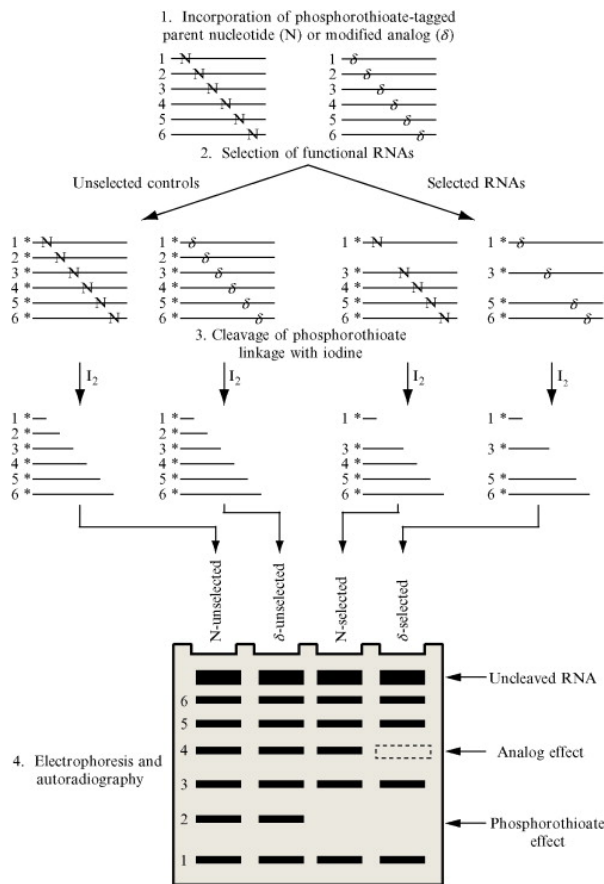


### 7.3.7 Kethoxal

Kethoxal modifiziert ungepaartes Guanin



## 7.4 Nucleotide analog interference mapping (NAIM)



(Quelle: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909680010>)

NAIM ist eine Erweiterung des Interferenz-Mappings mit Triphosphorsäure-Substitution. Untersucht, welche Basen funktional sind. Vorgehensweise:

- Nukleotide sind prinzipiell ohne funktionelle Gruppe
- Nukleotide werden in vitro zufällig durch getaggende Analogika und getaggende normale Nukleotide während Transkription markiert
- Annahme: Jedes Transkript hat nur ein getaggendes Nukleotid/Analogon
- Auswahl der aktiven funktionalen RNAs und Erzeugung einer inaktiven Kontrollgruppe
- Cleavage (Beschneiden) hinter der getaggenden Struktur durch Iod
- Gelelektrophoresebild → gibt Aussage darüber, welche durch Selektion sichtbar werden und welche durch Nukleotid-Einbau sichtbar sind

## 8 Proteinstrukturen

### Methoden

- NMR-Spektroskopie (Protein in Lösung)
- Röntgen-Kristallographie (Protein als Kristall)

→ Bestimmung der 3D-Atompositionen → Position-Database (PDP)

Nachteil: sehr ungenau und starkes Hintergrundrauschen

### 8.1 X-ray crystallography

Voraussetzung: regulären Kristall aus dem Protein



**Bragg's Law:**  $n\lambda = 2d\sin(\Theta)$

X-ray crystallography diffraction:

X-ray → Kristall → Ablenkung

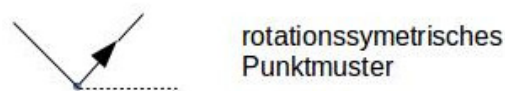
durch Atome → Ablenkung wird durch einen Detektor gemessen

festen Wellenlänge  $\lambda$ , Winkel  $\Theta$  variieren (Kristall rotieren) → charakteristisches Diffraction pattern → Amplitude ändert sich über den Winkel

$$d_{hkl} = \frac{a_0}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \text{ mit } hkl = \text{Laue-Index, } a_0 = \text{Gitterkonstante}$$

oder:

$\Theta$  fest und  $\lambda$  variieren → white x-ray

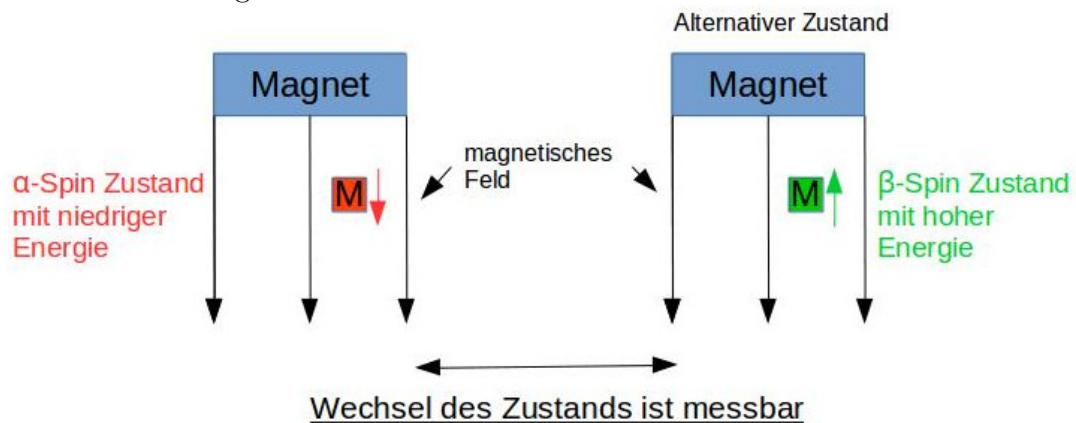


Kombinierte Information aus allen Messungen für verschiedene  $\lambda$  &  $\Theta$

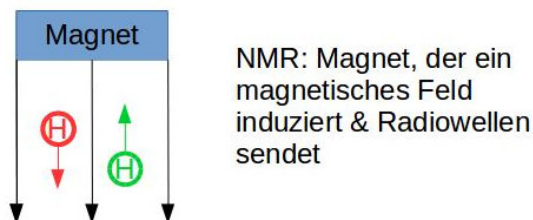
1. Backbone des Proteins ( $COOH - NH_2$ )
2. Bestimmung der Position der flexiblen Seitenketten der Aminosäuren
3. Verbesserung

## 8.2 NMR spectroscopy

NMR: nuclear magnetic resonance



Atome mit magnetischen Eigenschaften: H, Deuterium, N, C, Li, B, O



→ ohne weitere äußere Einflüsse Atom in  $\alpha$  - spin

→ über Flips im Magnetfeld Ermittlung der Protein-Struktur

Spektren von H,C,N + Strukturformel der bekannten Aminosäure + Aminosäureketten

→ Wechselwirkungen zwischen den Gruppen herleiten → 3D Koordinaten berechnen