

Chemische und strukturelle Biologie während eines Praktikums in den USA

Ehemaliger Teilnehmer der Chemie-Olympiade forscht jetzt an der „Vanderbilt University“

Jens Meiler erreichte in den Jahren 1992 und 1993 die vierte Runde der Chemie-Olympiade. Als Teilnehmer, der es nicht ganz ins Team schaffte, konnte er im Sommer 1994 am Argonne National Laboratory bei Chicago (USA) ein zweiwöchiges Praktikum absolvieren. Anschließend studierte er in Leipzig Chemie und promovierte von 1998 bis 2001 in Frankfurt über „Mathematische Verfahren zur Aufklärung der Struktur, Dynamik und biologischen Aktivität von Molekülen unter Verwendung von NMR Spektroskopischen und Empirischen Parametern“. Während dieser Zeit spielte die Chemie-Olympiade immer eine große Rolle: Jens' Doktorvater, Prof. Christian Griesinger, ist ein ehemaliger Teilnehmer der Internationalen Chemie-Olympiade. In Leipzig und Frankfurt unterrichtete Jens Gymnasiasten in wöchentlichen Seminaren, gestaltete den „Vierländerwettbewerb“ und „Chemie – mach mit“ für den FChO und betreute Schüler in Forschungsprojekten – unter anderem bei der Entwicklung eines neuronalen Netzwerkes zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen, ein Projekt, das beim 35. Bundeswettbewerb Jugend Forscht im Jahr 2000 den Sieg errang.

Nach seiner Promotion arbeitete Jens in einem vierjährigen Forschungsaufenthalt bei David Baker in Seattle an der Entwicklung von Computeralgorithmen zur Proteinfaltung. Im Jahr 2005 folgte er einem Ruf an die Vanderbilt University, in Nashville, Tennessee, wo er mit dem Aufbau seiner eigenen Forschungsgruppe begann. Die Arbeitsgruppe ist inzwischen auf 25 Studenten, Postdoktoranden, und wissenschaftliche Mitarbeiter angewachsen und beschäftigt sich mit der Integration chemischer und struktureller Biologie in biomedizinischer Forschung. Dabei kombiniert Jens experimentelle und theoretische Methodenentwicklung (www.meilerlab.org).

Integration chemischer und struktureller Biologie als Ansatz in biomedizinischer Forschung

Über die Forschung in seinem Labor sagt Jens: „Wir vereinen computerbasierte und experimentelle Arbeit, um Proteine, die fundamentalen Moleküle der Biologie, und deren Wechselwirkung mit Substraten oder Therapeutika zu untersuchen. Bei

der Entwicklung von Computeralgorithmen haben wir dabei drei Ziele vor Augen: 1) Strukturaufklärung von Membranproteinen und von großen molekularen Komplexen wie Viren; 2) Entwicklung von Proteinen mit neuer Struktur und/oder Funktion, um unser Verständnis vom Prozess der Proteinfaltung zu vertiefen und neue Protein-Therapeutika zu entdecken; und 3) Erstellung von quantitativen Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität zur Entwicklung von spezifischeren Medikamenten. Grundlegend für unseren Erfolg ist die experimentelle Bestätigung der entwickelten Computeralgorithmen, eine Aufgabe die wir selbst in unserem Labor oder in Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern verfolgen.“

Aktuelle Forschungsansätze konzentrieren sich auf die Entwicklung von Medikamenten für neurodegenerative Funktionsstörungen und Krankheiten wie Schizophrenie, Alzheimer und Parkinson; auf das Verständnis der strukturellen Einflüsse auf die Bindung von Antidepressiva an Neurotransmitter-Transporter; auf Herzrhythmusstörungen, verursacht durch Mutationen in Kaliumkanälen oder deren ungewollter Wechselwirkung mit Medikamenten; auf Resistenzen in Krebs- und Bakterienzellen, die in Beziehung zu Transportproteinen stehen, die mehrere Arzneimittel in die Zelle transportieren; und auf die strukturellen Grundlagen von Virusinfektionen und Antikörperaktivität.

Vanderbilt ist weltweit unter den Top 20 Universitäten und liegt in Nashville, Music City USA

Vanderbilt ist eine unabhängige, privat gestützte und international anerkannte Forschungsuniversität, die neben vielen Studienfächern auch eine große Vielfalt an Programmen für Doktoranden und Postdoktoranden anbietet. Die Kombination von modernster Forschung, Lehre und einer hervorragenden Universitätsklinik bietet eine anregende Atmosphäre sowohl für Studenten als auch für Mitarbeiter und Professoren. Hierdurch wird die Zusammenarbeit gefördert, um komplexe Probleme zu lösen, die Gesundheit, Kultur und Gesellschaft betreffen. In der Zeit von 2001 bis 2006 erhielt Vanderbilt jährlich durchschnittlich 16,4% mehr an Geldern des Gesundheitsministeriums für

Forschung an der Vanderbilt University

Forschung und besitzt demnach das am schnellsten wachsende akademisch-medizinische Förderprogramm in den USA. Vanderbilt ist momentan auf Rang zwölf der US-Universitäten platziert. Der Campus hat eine parkähnliche Atmosphäre mit mehr als 300 Baum- und Straucharten. Er wurde im Jahre 1988 zum nationalen Arboretum ernannt.

Die Heimatstadt der Universität, Nashville, ist eine pulsierende und ansprechende Stadt, die sich stolz "Music City USA" nennt. Die Stadt wurde 1779 gegründet und 1843 zur Hauptstadt von Tennessee ernannt und erhielt dreimal in Folge den Titel „freundlichste Stadt Amerikas“. Sie erstreckt sich auf eine Fläche von 1380 km² und hat ca. 570.000 Einwohner. Es herrscht ein mildes und angenehmes Klima mit nur wenigen sehr heißen oder sehr kalten Tagen im Jahr. Vanderbilt befindet sich etwa zwei Kilometer von der Innenstadt entfernt.

Sechswöchiges Praktikum von Chemie-Olympioniken im Sommer 2008

Im Sommer 2008 waren Alexej Grjasnow und Sascha Jähnigen für sechs Wochen in Nashville, um dort im Labor von Jens Meiler zu arbeiten. Sascha hatte an der vierten Runde der Chemie-Olympiade 2007 teilgenommen, Alexej am Bundeswettbewerb Jugend forscht. Projektschwerpunkt in Jens' Labor war für beide die Erforschung des menschlichen Serotonin-Transporters (hSERT). Ihr Praktikum ist Teil einer Initiative des FChO, die internationalen Forschungsaufenthalte für Teilnehmer der vierten Runde wieder aufleben zu lassen.

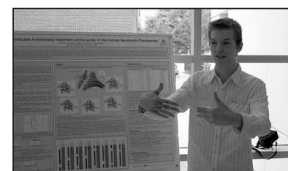
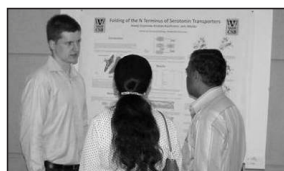
Es ist verständlich, dass man neben der Forschung auch viel von der amerikanischen Lebensart erfährt. Um die Arbeit des „meilerlab“ etwas vorzustellen und um andere zu motivieren, dergleichen zu tun, möchten Alexej und Sascha einen kleinen Bericht über diese sechs Wochen geben:

„In den USA waren wir in den Studentenwohnheimen auf dem Campus der Vanderbilt University untergebracht, wo wir zusammen mit zwei anderen amerikanischen Studenten in einer Art WG mit eigener Küchenzeile lebten (Und wer kocht?). Neben lebenserhaltenden Maßnahmen haben wir auch Einkauf, Wäsche waschen und andere Sachen selbst organisiert. Wir verbrachten also mehrere Wochen mit gleichaltrigen Amerikanern und lernten deren Lebensstil kennen, was sehr eindrucksvoll und lehrreich war: Auf beiden Seiten gibt es einige wirklich interessante Stereotypen (z.B. alle Deutschen lieben David Hasselhoff und feiern Oktoberfest...), die ausgeräumt werden mussten. Es gab Republikaner und Demokraten, mit völlig verschiedenen Wertvorstellungen. An der lokal bedeutsamen Country und Blue Grass Musik schieden sich die Geister gleichermaßen. Insgesamt

bekamen wir den Eindruck, dass die Amerikaner häufig offener als die Deutschen sind: Es gab überall Leute, mit denen man sich einfach so gut unterhalten konnte und die uns halfen, wenn wir z.B. einen Fahrer brauchten. Die gesamte Kultur ist doch ziemlich anders, mehr als man vielleicht zunächst vermutet. Schon allein die Sprache ermöglicht eine ganz andere Ausdrucksweise. Aber Gewöhnung stellt sich schnell ein und außerdem gab es ja noch die ebenso interessante Wissenschaft:

Bioinformatik ist alles andere als langweilig, auch wenn man viel vorm PC und fast gar nicht im klassischen Labor verweilt, denn sie bietet sehr interessante und vielversprechende Forschungsschwerpunkte. Das meilerlab brachte uns dabei eine sehr angenehme Art des Forschens nahe: Die Projekte sind keine Einzelaufgaben, sondern Teamwork: Jeder hilft mit seinen Kompetenzen. Vor allem in Treffen der einzelnen Forschungsteams kommen dadurch viele neue Ideen und Impulse auf, die wesentlich zum Fortschritt der Arbeit beitragen. Aber es wurde nicht nur gearbeitet, sondern auch viele Laborveranstaltungen wie eine Wanderung am Fuß der Appalachen, gemeinsames Grillen und andere Dinge unternommen. Auf diese Weise lernten wir uns alle noch besser kennen.

Den Rahmen unseres Praktikum bildete das „Research Internship Program“ (RIP) organisiert durch das „Vanderbilt Center for Science Outreach“, was dem Ganzen noch einen formalen Anstrich verlieh. Hier präsentierten wir zum Abschluss zusammen mit 40 weiteren Schülern unser Projekt auf einem Poster und Sascha hat sogar einen 3. Preis gewonnen.“



Alexej (links) und Sascha (rechts) bei der Posterpräsentation am 11. Juli 2008.

Der Mechanismus des Serotonin-Transporters

Bei dem Serotonin-Transporter handelt es sich um ein Membranprotein, das die Wiederaufnahme (engl. reuptake) des Neurotransmitters Serotonin (5-HT) in die Präsynapse kontrolliert (Abb. 2).

Krankheiten wie Parkinson oder Autismus sind in einigen Fällen direkt mit einer Fehlfunktion des Serotonin-Transporters verknüpft. Auch von Drogen, wie Ecstasy oder Kokain, ist bekannt, dass sie in den Transportmechanismus eingreifen und so den Serotoninspiegel in synap-

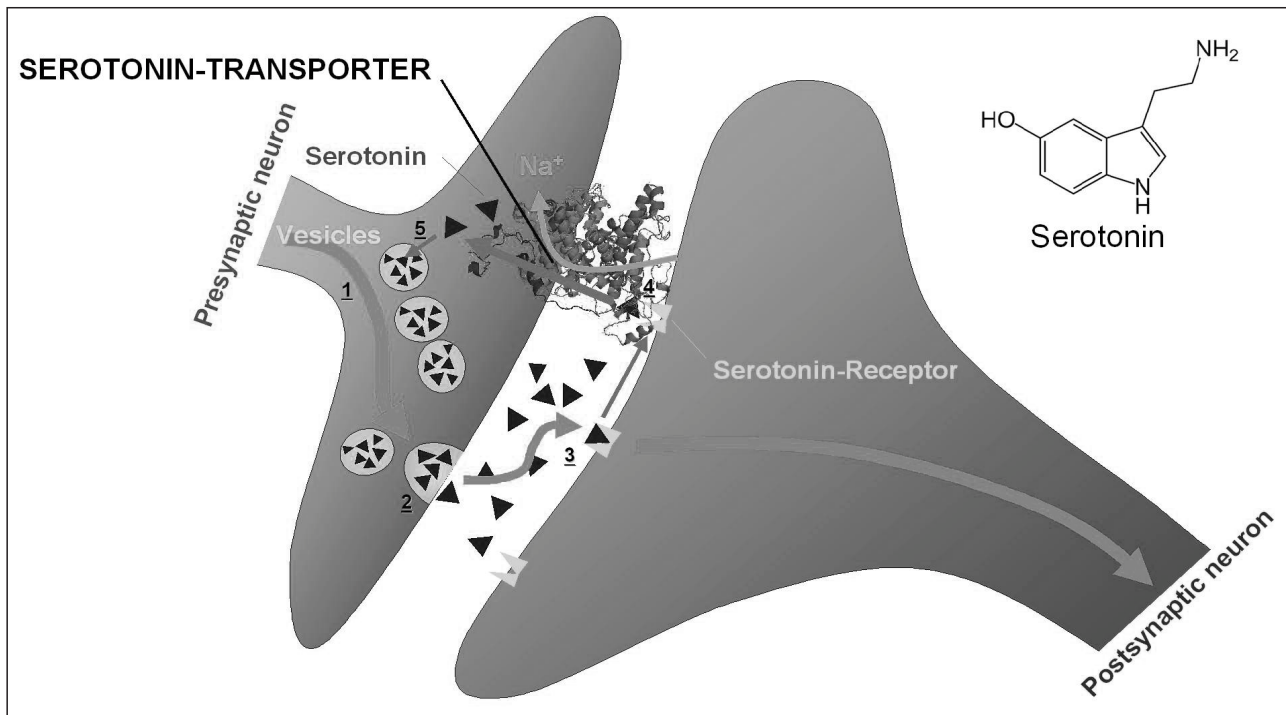


Abb. 2: Das Schema zeigt den vereinfachten Mechanismus des Serotonintransports: Erreicht ein Reiz die Synapse der präsynaptischen Nervenzelle (1), werden die Vesikel, die Serotonin (schwarze Dreiecke) enthalten, veranlasst in Richtung des synaptischen Spalts zu wandern. Dort geben sie den Neurotransmitter frei (2). Dieser bindet dann an den Rezeptor des postsynaptischen Neurons (3), was dort einen neuen elektrischen Reiz auslöst. Das „gebrauchte“ Serotonin wird nun zurück in die erste Synapse transportiert (reuptake, 4). Als treibende Kraft dient der Konzentrationsgradient von Natrium-Ionen, deren Unterschuss im Zellinnern durch den Serotonin-Transporter unter Mitnahme eines Neurotransmitter-Moleküls (Co-Transport) ausgeglichen werden kann. Auf diese Weise können die Vesikel neu „befüllt“ werden (5).

tischen Spalt erhöhen, was zu den entsprechenden Rauschzuständen führt. (Selektive) Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI = Selective Serotonin Reuptake Inhibitor) sind Antidepressiva, die am Serotonin-Transporter ihre Wirkung entfalten und dabei die Serotonin-Konzentration in der Gewebeflüssigkeit des Gehirns erhöhen. Ein besseres Verständnis dieses Transporters und verwandter Proteine ist demnach grundlegend für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapiemethoden.

Strukturvorhersage des N-Terminus von Serotonin-Transportern

Im Rahmen seines Praktikums beschäftigte sich Alexej mit der Strukturvorhersage des N-Terminus von Serotonin-Transportern. Gerade der N-Terminus dieses Proteins (die ersten 80 Aminosäuren von insgesamt 630) interagiert mit anderen Proteinen und spielt bei der Regulation der Transporter eine wichtige Rolle [1,2]. Um diese Interaktion zu verstehen, ist die Kenntnis der räumlichen Struktur des N-Terminus essentiell. Aus diesem Grund wandte Alexej

computergestützte Methoden an, um die räumliche Anordnung der N-Termini der Serotonin-Transporter vorherzusagen.

Zunächst nutzte er Webserver und Programme um Vorhersagen in Bezug darauf zu treffen, ob der N-Terminus eine geordnete Struktur annimmt und wo mögliche Sekundärstrukturelemente sein können. Diese Programme basieren darauf, dass sie die Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins mit Aminosäuresequenzen von Proteinen vergleichen, deren Tertiärstruktur bereits bekannt ist.

Hier werden mögliche Helixstrukturen für die Aminosäuren 68 bis 74 mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit vorhergesagt (Abb. 3) [3]. Ferner erscheint eine Helixstruktur innerhalb der ersten 20 Aminosäuren als möglich. Im Anschluss wird das Protein in einer Computersimulation gefaltet.

Im Rahmen dieses Projektes nutzte Alexej das Programm Rosetta [4] zum Vorhersagen der räumlichen Struktur. Rosetta benötigt die Aminosäuresequenz und Vorhersagen für die Sekundärstruktur als Eingabe. Das Programm zer-

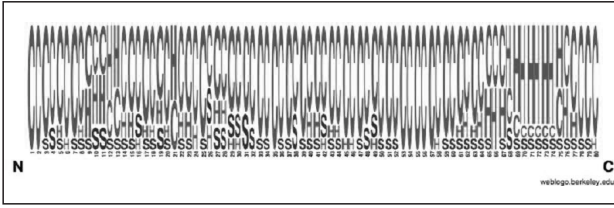


Abb. 3: Dies ist eine mit JuFo[3] erstellte Vorhersage für die Sekundärstruktur des N-Terminus. H steht für α -Helix, S für β -Strang und C für andere Konformationen. Die Größe der Buchstaben entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit welcher die einzelnen Konformationen vorhergesagt werden.

teilt die Aminosäuresequenz in Fragmente. Basierend auf den bekannten Strukturen von solchen kurzen Peptidfragmenten werden in einem „Monte Carlo“ Verfahren Proteinmodelle erstellt. Diese werden hinsichtlich ihrer Energie miteinander verglichen. Ist das neue, leicht variierte Modell energetisch günstiger, wird es weiterverwendet, ansonsten verworfen. So entstehen verschiedene Modelle, welche als energetisch günstig angesehen werden und daher gute Vorhersagen für die natürliche Struktur sind.

Durch die Anwendung dieses Programms war es Alexej möglich, Vorhersagen hinsichtlich der Struktur der Proteine zu machen und so Hypothesen bezüglich der Interaktionen zu formulieren. Der N-Terminus der Serotonin-Transporter bildet vermutlich keine stabile Tertiärstruktur (Abb. 4a), da kein ausreichend großer hydrophober Kern bei der Faltung entsteht. Allerdings erkennt man verschiedene, meist helikale Sekundärstrukturelemente. Trotzdem sind die für die Regulation bedeutsamen Aminosäuren [1,2] an der Oberfläche des N-Terminus (Abb. 4b) zu finden. Diese Resultate führten im Zusammenhang mit publizierten Daten zu der Annahme, dass der N-Terminus bei der Interaktion mit regulierenden Proteinen eine lange, α -helikale Struktur annehmen könnte. Diese Vermutung wird im meilerlab jetzt weiter untersucht.

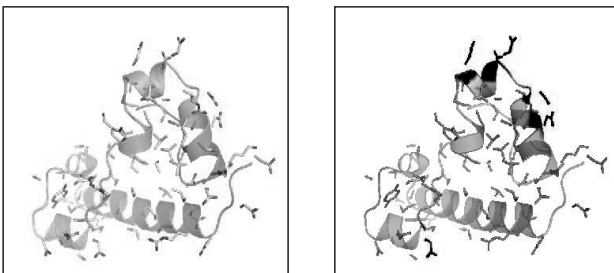


Abb. 4a +Abb. 4b: Eine Vorhersage für die Struktur des N-Terminus des Serotonin-Transporters der Ratte.

- Der Farbverlauf von blau zu rot entspricht der Reihenfolge der Aminosäuren beginnend mit den N-terminalen.
- Schwarz hervorgehoben sind die für die Interaktionen bedeutenden Aminosäuren.

„Evolutionary Traces“ im Serotonin-Transporter

Saschas Projekt war die Untersuchung des Serotonin-Transporters mittels einer „Evolutionary Trace“ (ET) Methode, die von Olivier Lichtarge [5] entwickelt wurde.

Evolutionary trace bedeutet so viel, wie ein evolutionärer Pfad, den eine Protein- (oder auch DNA-) Sequenz gegangen ist. Sie betrachtet das Verhalten, d.h. Mutationen, die während der Evolution stattfanden. Dabei wird angenommen, dass Mutationen von Aminosäuren, die wichtig für die Proteinfunktion sind, durch Selektion aussortiert werden, wenn die Funktion des Proteins gestört oder ausgelöscht wird. Diese funktionellen Aminosäuren weisen demnach eine scheinbar geringere Mutationsrate auf als andere weniger wichtige Teile des Proteins. Die Methode setzt sich zum Ziel, anhand von Regionen mit niedriger Mutationsrate funktionell bedeutsame Segmente zu finden und zu klassifizieren.

Da man auch heute noch verschiedene Entwicklungsstufen aller Lebewesen vorfindet (Insekt, Fisch, Säuger...), ist es relativ einfach einen Stammbaum (phylogenetischen Baum, Abb. 5) zu erzeugen, der dann Rückschlüsse auf den evolutionären Weg des betrachteten Proteins zulässt.

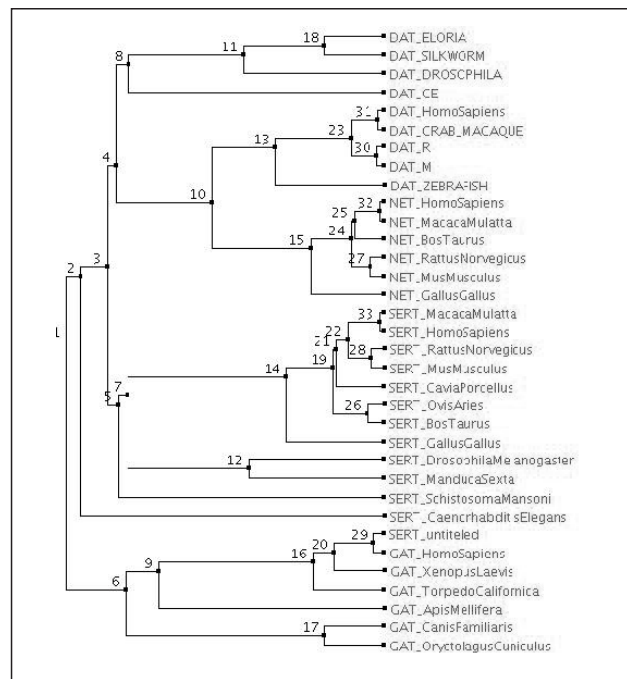


Abb. 5: Der dargestellte Stammbaum oder „phylogenetic tree“ zeigt alle Sequenzen der NSS-Transporterfamilie.

Die Nummerierung der Knotenpunkte ist schrittweise von links (wenig Ähnlichkeit) nach rechts (hohe Ähnlichkeit) und dient als Grundlage für die Bestimmung des Rangs der einzelnen Positionen des Proteins.

Die eigentliche ET-Methode ist die computergestützte Analyse von „multiple sequence alignment“ (Anordnung aller homologen Sequenzen untereinander) und dem phylogenetischen Baum. Die Auswahl der bedeutenden, konservierten Positionen erfolgt durch ein Rang-System, welches je nach Grad der Variabilität jeder Spalte im Alignment eine Punktzahl zuweist. Sie ist umso kleiner, je früher in der Evolution (weiter links im Stammbaum) eine Position nicht mehr mutiert wurde und je weniger verschiedene Aminosäuren an ihr auftreten. Daraus erhält man eine Top-Rank-Skala aller Aminosäuren, die eine Selektion ermöglicht [6].

Im Anschluss an diese Analyse werden räumliche Häufungen von Aminosäuren mit niedrigem Rang identifiziert, denn solchen zusammenhängenden Regionen in einem Protein wird eine höhere Relevanz beigemessen, als isolierten Positionen. Lichtarges Methode konzentriert sich hierbei lediglich auf räumliche Häufungen, d.h. auf Aminosäuren, die in der Tertiärstruktur des Proteins nahe beieinander liegen. Auch hier gibt es wieder eine Punktzahl („z-score“ der Standardnormalverteilung) [7]. Die Endergebnisse werden dann auf eine Struktur der Zielsequenz (vorzugsweise auf die des menschlichen Proteins) projiziert (Abb. 6).

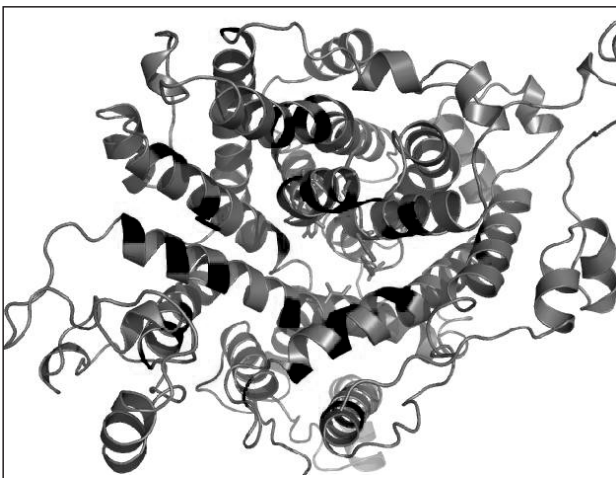


Abb.6: Das dargestellte Protein ist hSERT.

Rot hervorgehoben sind alle Aminosäuren, die aus dem besten Clustering der NSS-Transporterfamilie hervorgehen.

Es ist deutlich, dass diese eher im Zentrum des Proteins lokalisiert sind und deshalb von funktioneller Bedeutung sein können. Eine Serie solcher Datensätze und deren Kombination erlaubt, die wesentlichen Aminosäuren herauszustellen.

Hinsichtlich des hSERT ist es mit Hilfe der ET-Methode gelungen, weitere potentiell bedeutsame Aminosäuren vorherzusagen, neben den bereits experimentell identifizierten. Viele von diesen befinden sich nahe der Bindungsstelle für Serotonin im Zentrum des Transporters (Abb. 6).

In der Zukunft werden diese Vorhersagen experimentell geprüft und können so zur Identifikation wichtiger Aminosäuren im Transport der Neurotransmitter beitragen.

Sascha Jähnigen
Alexej Grjasnow
Jens Meiler

[1] M. W. Quick, *Neuron* (2003), 40, 537-549.

[2] H. K. Müller, O. Wiborg, J. Haase, *J. Biol. Chem.* (2006), 281, 39, 28901-28909.

[3] J. Meiler, M. Müller, A. Zeidler, F. Schmäsche, *J. Mol. Model.* (2001), 7, 360-369.

[4] C. A. Rohl et al. (oder C.E.M. Strauss, D. Chivian, D. Baker) *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* (2004), 55, 656-677.

[5] O. Lichtarge et al. (oder H. R. Bourne, F. E. Cohen), *J. Mol. Biol.* (1996), 257, 342-358.

[6] I. Mihalek et al. (I. Reš, O. Lichtarge), *J. Mol. Biol.* (2004), 336, 1265-1282.

[7] I. Mihalek et al. (I. Reš, H. Yao, O. Lichtarge), *J. Mol. Biol.* (2003), 331, 263-279.