



Bioinformatikwerkzeuge in der Forschung und Medizin – eine Übung.

In dieser Übung werden Sie mit echten biologischen Daten arbeiten, die im Internet frei zugänglich sind. Wir zeigen Ihnen wo und wie man DNA-Sequenzen, Proteinsequenzen und Proteinstrukturen sowie Programme zu deren Manipulation und Darstellung findet. Sie werden dabei einen Arbeitsvorgang kennenlernen und benutzen, den alle Forscher der Lebenswissenschaften mehr oder weniger täglich durchführen.

Lernziele:

- Kennenlernen der öffentlich im Internet zugänglichen DNA und Proteindatenbanken;
- Umgang mit einfachen, frei zugänglichen Programmen zur Manipulation der DNA und Proteinsequenzen;
- Vergleich der Proteinsequenzen mittels Alignment;
- Kennenlernen der Datenbanken und der Programme zur Darstellung der Proteinstrukturen.

Die Übung basiert auf der vor kurzem publizierte Arbeit* von Dr. Maximilian Posch und seinen Kooperationspartnern, unter anderem aus Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin. Durch genetisches Screening von Patienten mit Vorhofseptumdefekt, fanden die Autoren heraus, dass der Defekt auf bestimmten Mutationen in dem Protein Alpha Myosin Heavy Chain 6 (MYH6) zurückzuführen ist.

*Posch MG , Waldmüller S , Müller M , Scheffold T , Fournier D , et al. 2011 Cardiac Alpha-Myosin (*MYH6*) Is the Predominant Sarcomeric Disease Gene for Familial Atrial Septal Defects. PLoS ONE 6(12): e28872. doi:10.1371/journal.pone.0028872
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0028872>



HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG

Drei Erwachsene klagten beim Arztbesuch über Leistungsschwäche mit Atemnot bei körperlicher Belastung. Diese Symptome traten erst im Erwachsenenalter auf. Alle drei Personen hatten nahe Angehörige bei denen der Vorhofseptumdefekt aufgrund der Mutationen in MYH6 diagnostiziert wurde. Der Arzt schlug genetische Diagnostik vor. Nach ausgiebiger Beratung, haben die Personen entschieden, sich und ihre Kinder auf Mutationen in MYH6 testen zu lassen.

Welche der Personen A-F haben krankheitsrelevante Mutationen im MYH6?

Personen	Alter	Symptome
A	44 Jahre	Ja
B	42 Jahre	Ja
C	46 Jahre	Ja
D	12 Jahre	Nein
E	2 Jahre	Nein
F	3 Jahre	Nein

DURCHFÜHRUNG

Aufgabe 1:

In einer Diskussion, schlagen Sie eine geeignete Herangehensweise zur Beantwortung der Frage vor. Folgendes soll dabei bedacht werden:

1. Was ist Ihre Hypothese?
2. Welche Methodik wäre angebracht um die gestellte Frage zu beantworten?
3. Welche Informationen benötigt man um die gestellte Frage zu beantworten?
4. Welche Art von Ergebnissen erwarten Sie und wie werden Sie diese interpretieren?

Aufgabe 2

Werkzeuge:

Unten aufgeführt sind Links zu Sequenzmanipulationsprogrammen und Datenbanken, wo Informationen über MYH6 zu finden sind. Alle diese Seiten sind mit einander verlinkt, so dass man sich im Prinzip von einer Seite aus zu allen zugänglichen Informationen durchklicken kann. Über die Suchfelder können Informationen zu jedem beliebigen Gen/Protein aufgerufen werden.

Gen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4624>

Genstruktur (hier muss MYH6 in das Suchfenster eingegeben werden. Klick ‚Submit‘ um die Suche zu starten) <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=225450073&clade=mammal&org=Human&db=0>

mRNA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_002471.3

Protein http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002462.2 ;
<http://www.uniprot.org/uniprot/P13533>

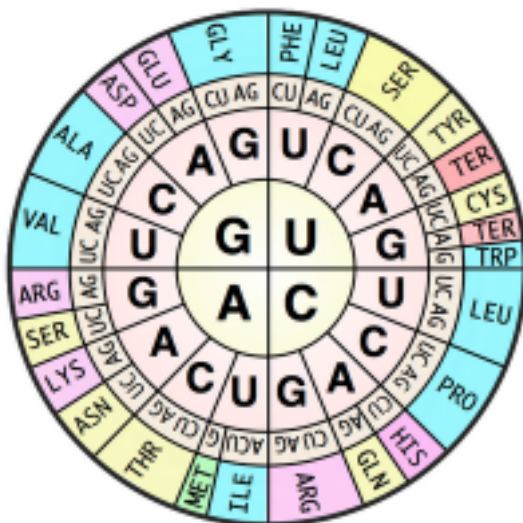
Übersetzung DNA => Protein <http://web.expasy.org/translate/>

Alignment DNA

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

Alignment Protein

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&QUERY=&SUBJECTS=



“Codon-wheel“

Protokoll:

1. Vergleichen Sie die DNA-Sequenzen der 6 Personen mit Kontroll-DNA mittels Alignment. Sehen Sie Unterschiede? Was bedeuten diese? Notieren sie die Position und Art des Unterschieds.

a. Öffnen Sie das Internetprogramm BLAST (*Alignment DNA*)

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

b. Aktivieren Sie das Kästchen „Align two or more sequences“

c. Kopieren Sie die Kontrollsequenz aus der Datei ‚DNA-Sequenzen‘ in das obere Fenster des Programms (‚Query‘). Alle anderen Sequenzen (alle zusammen, inklusive Namen: >Person A, etc) fügen Sie bitte in das untere Fenster ein (‚Subject‘). Klicken Sie ‚BLAST‘.

Personen	Alter	Symptome	Unterschiede in der DNA-Sequenz relativ zu Kontrolle
A	44 Jahre	Ja	
B	42 Jahre	Ja	
C	46 Jahre	Ja	
D	12 Jahre	Nein	
E	2 Jahre	Nein	
F	3 Jahre	Nein	

2. Übersetzen Sie die DNA-Sequenzen in Proteinsequenzen.

- a. Kopieren Sie die Sequenzen (einzeln) aus der Datei ‚DNA-Sequenzen‘ in das Fenster des Programms TRANSLATE. Klicken Sie ‚translate sequence‘.

<http://web.expasy.org/translate/>

- b. Wählen Sie den richtigen Leserahmen. Wie weiß man welcher Leserahmen der richtige ist?
- c. Klicken Sie auf die Aminosäure, die als erste Aminosäure des Proteins in Frage kommt. Welche Aminosäure ist immer die erste?
- d. Exportieren sie in FASTA Format und speichern die Sequenz in einem Word-Dokument. Vergeben Sie der Sequenz einen eindeutigen Namen.

- e. Wiederholen Sie den Vorgang bis Sie alle Sequenzen im einem Dokument haben.



3. Vergleichen Sie die Proteinsequenzen der 6 Personen mit der Kontrolle mittels Alignment (*Alignment Protein*). Benutzen Sie den gleichen Vorgang wie für DNA. Sehen Sie Unterschiede? Was bedeuten diese? Notieren sie die Position und Art des Unterschieds.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&QUERY=&SUBJECTS=

Personen	Alter	Symptome	Unterschiede in der DNA-Sequenz relativ zu Kontrolle	Unterschiede in der Proteinsequenz relativ zu Kontrolle
A	44 Jahre	Ja		
B	42 Jahre	Ja		
C	46 Jahre	Ja		
D	12 Jahre	Nein		
E	2 Jahre	Nein		
F	3 Jahre	Nein		

4. Vergleichen Sie jetzt die Unterschiede die Sie gefunden haben: Korrelieren die DNA-Mutationen mit Veränderungen in der Aminosäuresequenz?

Können Sie Ihre Hypothese bestätigen?

ÜBUNG II

Frage: Wie können einzelne Aminosäureaustausche zu Krankheit führen?

Aufgabe 1

1. Finden Sie die Positionen von den identifizierten Mutationen relativ zu der Domänstruktur des MYH6. Benutzen Sie dafür den folgenden Link:

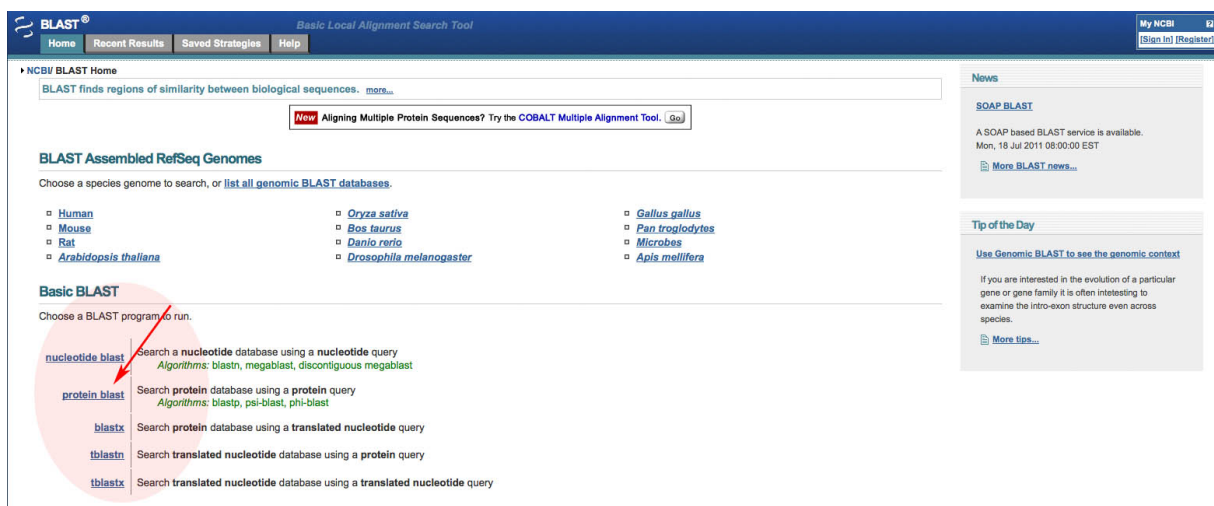
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_002462.2

Kann man jetzt schon ahnen, warum die Mutationen zu Funktionsstörungen des Proteins führen?

2. MYH6 ist ein sehr großes Protein. Die Struktur für das menschliche MYH6 ist, wegen diversen experimentellen Schwierigkeiten, noch nicht gelöst worden. Da Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Proteins für viele Anwendungen (z. B. Arzneimittelentwicklung) sehr wichtig ist, haben Forscher alternative Strategien entwickelt. Es ist z. B. häufig möglich so genannte Deletionsmutanten (Teile des Proteins) oder Orthologen des Proteins zu kristallisieren.

Finden Sie heraus, ob die Proteinstruktur des MYH6 aus anderen Spezies gelöst worden ist.

- Benutzen Sie folgenden Link: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Klicken Sie auf 'protein blast'.



- Im oberen Fenster fügen Sie bitte die Proteinsequenz von MYH6 ein.
- Bei ‚Choose Search Set‘, unter ‚Database‘ wählen Sie ‚Protein Data Bank proteins (pdb)‘.
- Klicken Sie BLAST.

Das Programm sucht jetzt in der Proteinstrukturdatenbank nach Strukturen von Proteinen die sehr ähnliche Aminosäuresequenz haben. Sie bekommen hunderte von Datenbankeinträgen zurück.

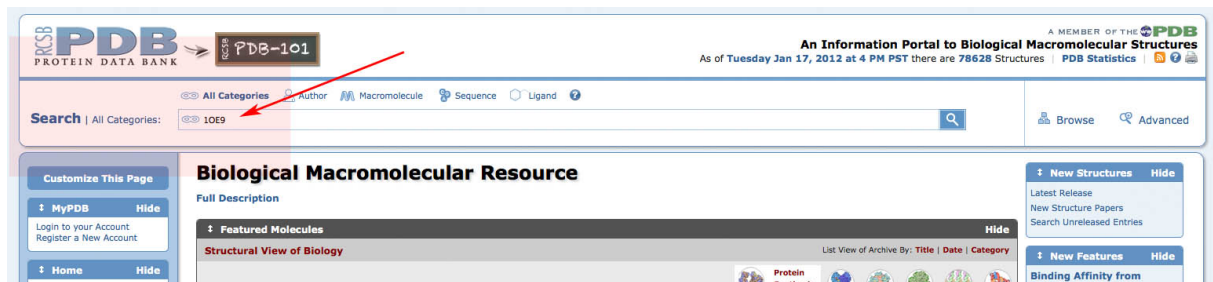
Sie haben jetzt eine sehr lange Liste von verfügbaren Proteinstrukturen.

- Wie entscheidet man welche Struktur die richtige ist?
- Betreffen die gefundenen Mutationen konservierte Aminosäuren?
 - In der Liste der Strukturen finden Sie die Struktur 4A7F („Chain C...“ mittig).
 - Klicken Sie auf den Namen.
 - Hier sehen Sie jetzt ein Alignment zwischen der menschlichen MYH6 Sequenz und der Sequenz aus einem Schleimpilz.

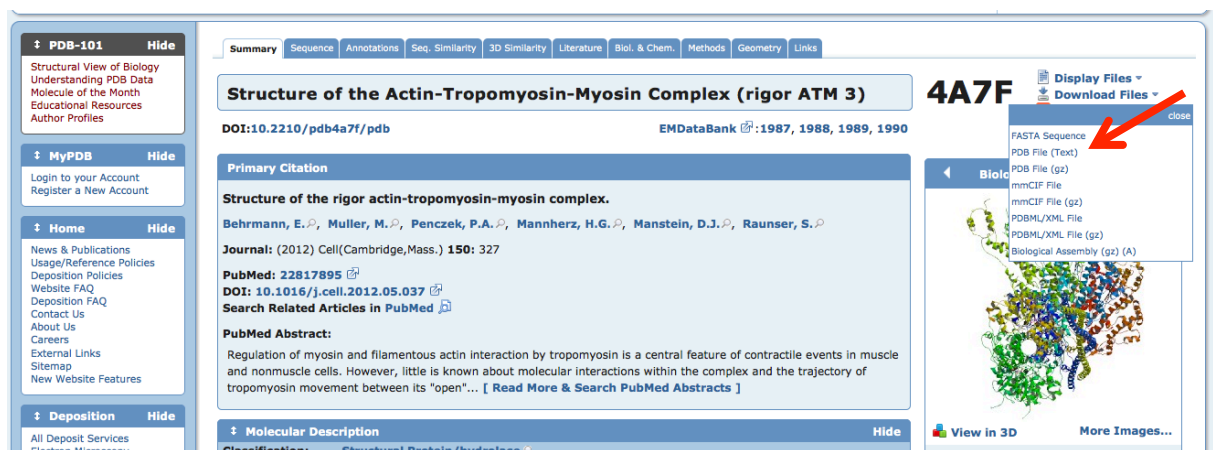
Aufgabe 2

Nächster Schritt ist es die Struktur im Detail anzuschauen.

- Gehen Sie zu <http://www.pdb.org/>
- Geben Sie 4A7F in das Suchfenster ein, klicken Sie auf die Lupe.



- Gehen Sie zu 'Download files' (rechts) und speichern Sie 'PDB File (Text)'



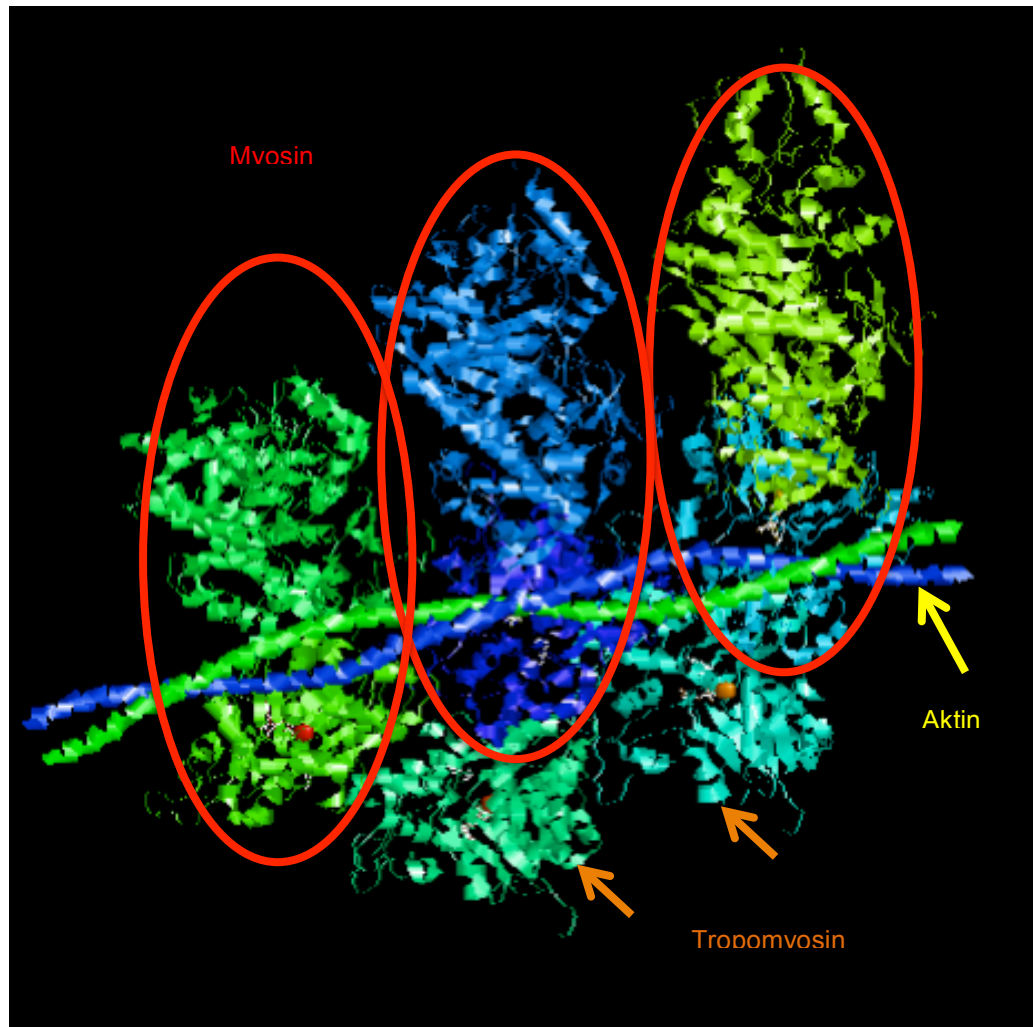
Zum Anschauen der Proteinstruktur werden wir ein Programm benutzen, das im Internet frei verfügbar ist – Rasmol (<http://rasmol.org/>).

Instruktionen für Benutzung des Programms finden Sie hier:

<http://www1.tu-darmstadt.de/fb/ch/Fachgebiete/OC/AKSchmidt/Avimec/UE/RASMOL/Rasmol.html>

- Öffnen Sie die gespeicherte pdb-Datei.
- Wählen Sie im Registermenu: Display => Ribbons, Colours => Chain

Sie sehen 3 Moleküle von Myosin-Motordomäne, zwei Aktin Monomere und zwei Moleküle Tropomyosin.



- Rotieren Sie die Struktur (linke Maustaste), bewegen (rechte Maustaste) und/oder zoomen Sie ein und aus (Shift + linke Maustaste).

1. Welche Sekundärstrukturelemente sehen Sie?

Diese sieht man noch eindeutiger wenn man in Colours-Menü „Structure“ wählt.

2. Finden Sie die Aminosäuren 463, 467 und 633 in der Struktur. Vergleichen Sie deren Seitenketten der mit den Seitenketten von den „Mutanten“. Kann man jetzt den pathologischen Effekt der Mutationen erklären?

Geben Sie im Skript-Fenster (RasMol Command Line) ein:

```
select 463
color magenta
```

select 467

color orange

select 633

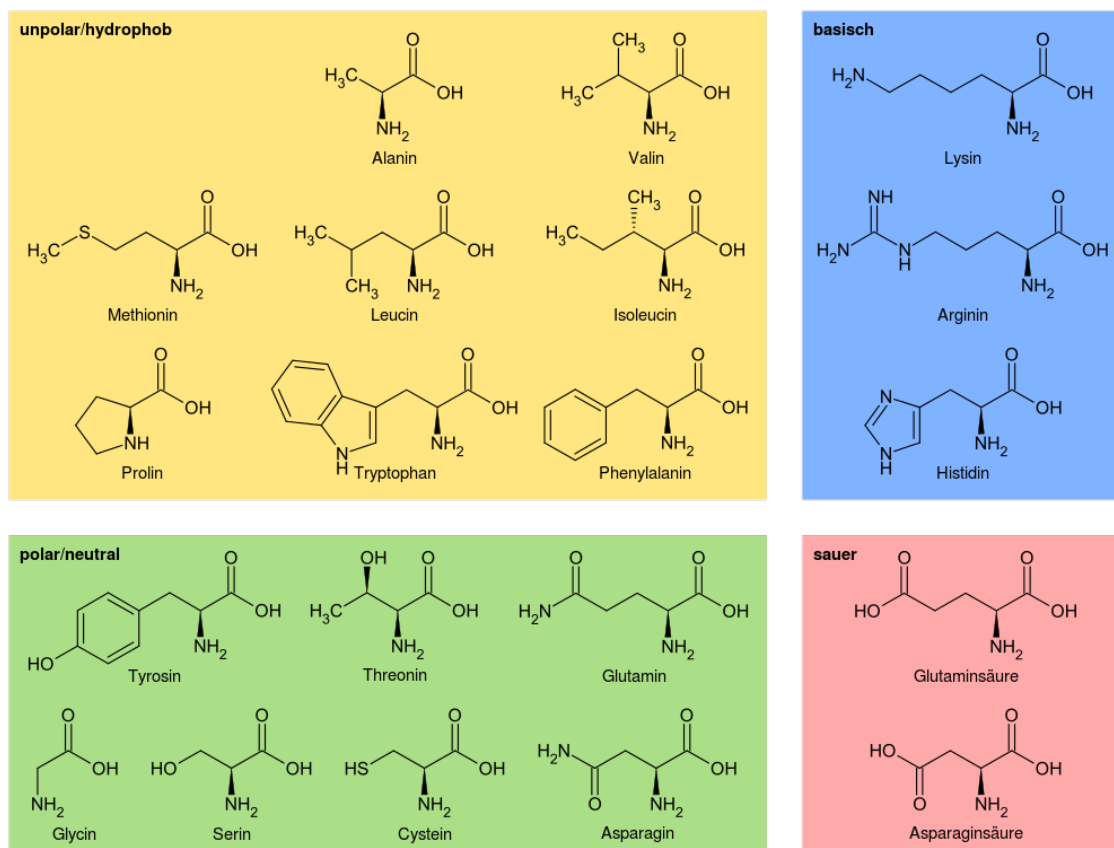
color red

- Geben Sie im Skript-Fenster (RasMol Command Line) ein:

Select 463, 467, 633

- Wählen Sie im Registermenu: Options => Labels
- Wählen Sie im Registermenu: Display => ball & stick

Strukturen der Aminosäuren:



3. Es ist inzwischen bekannt, dass die Region zwischen Aminosäuren 519 – 561 im menschlichen MYH6 (445-481 im Schleimpilz-Myosin), eine Helix-Schleife-Helix Struktur annimmt und die Interaktionsfläche zwischen Myosin und Aktin bildet.

Geben Sie im Skript-Fenster (RasMol Command Line):

Select 445-481

Color yellow

Könnte man jetzt den pathologischen Effekt der Mutationen erklären?