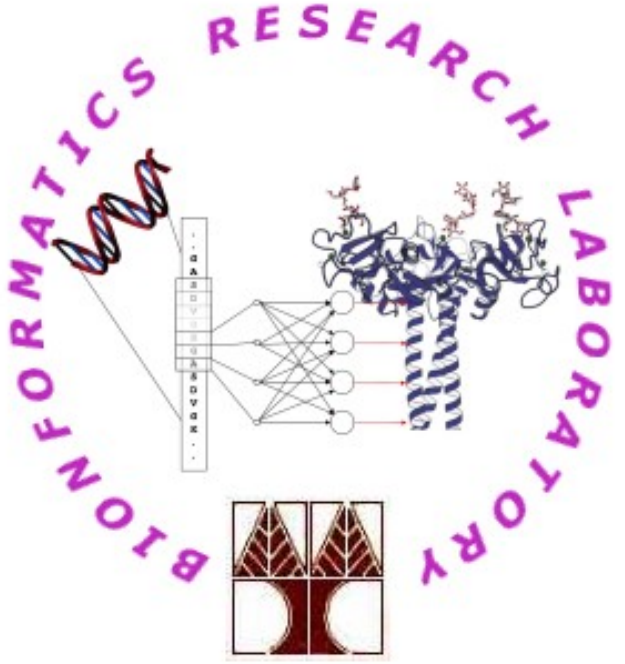
Προγνωστικές μέθοδοι με βάση αμινοξικές αλληλουχίες



Vasilis Promponas
Bioinformatics Research Laboratory
Department of Biological Sciences
University of Cyprus

ΣΥΝΟΨΗ

- Εισαγωγή
- Πρόγνωση της δομής πρωτεϊνών
- Πρόγνωση στοιχείων της πρωτεϊνικής δομής
- Συζήτηση ..

Πίσω στο “Κεντρικό Δόγμα”

Σχεδόν για όλες τις πρωτεΐνες

Το πρόβλημα ...

Ακολουθία

…
LHYFRAQTVGKIMVVGRRT…

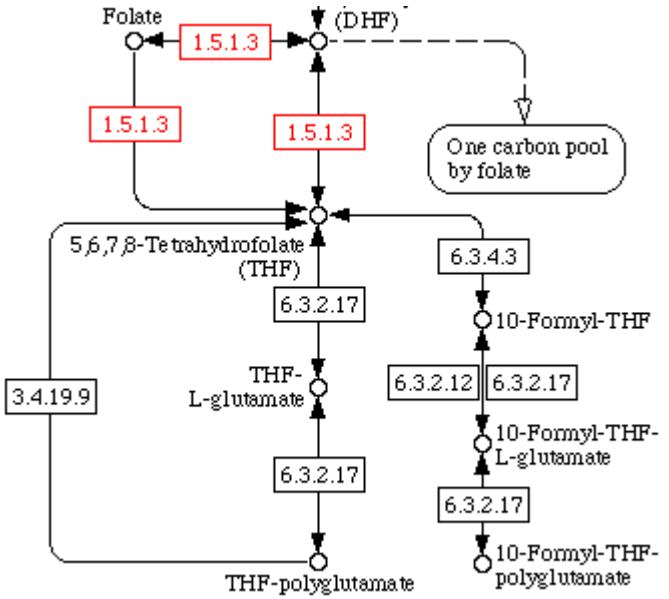
ΕΧΟΥΜΕ ΠΟΛΛΕΣ ΑΠΟ ΔΑΥΤΕΣ!!!

Ακολουθία

…
LHYFRAQTVGKIMVVGRRT…

3D-δομή

Λειτουργία



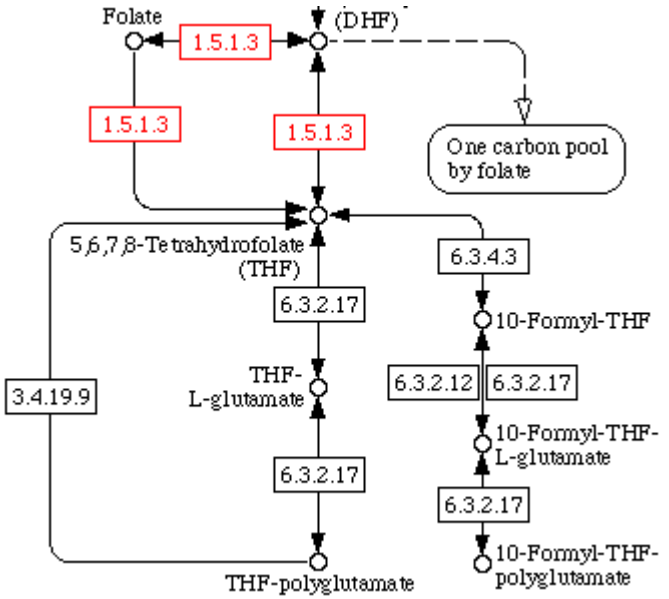
Ακολουθία

…
LHYFRAQTVGKIMVVGRRT…

?

3D-δομή

?



?

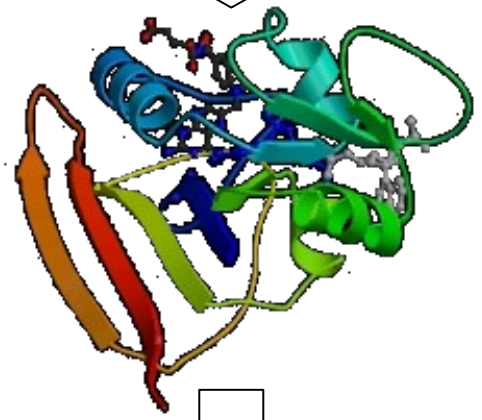
Λειτουργία

Ακολουθία

…
LHYFRAQTVGKIMVVGRRT…

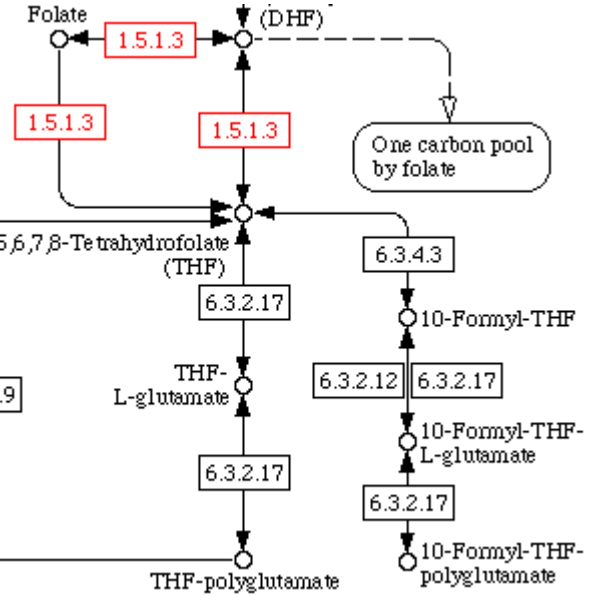
?

3D-δομή



?

Λειτουργία

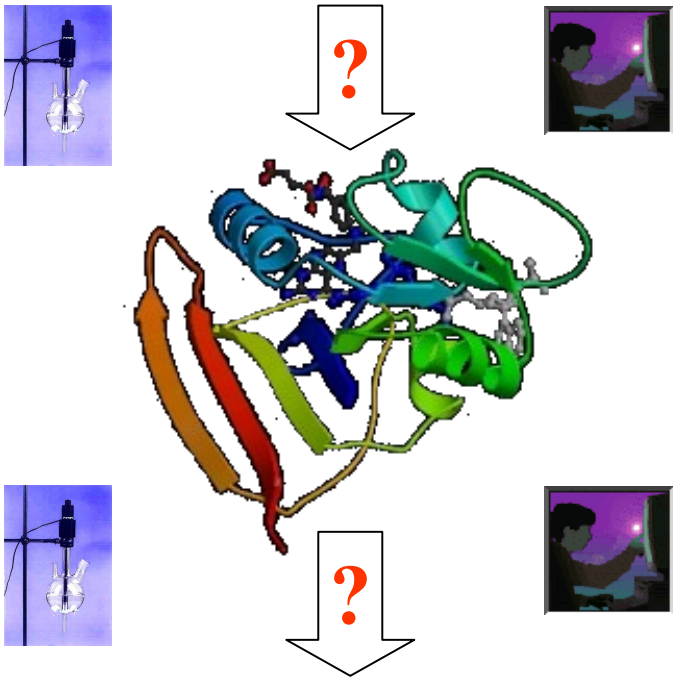


?

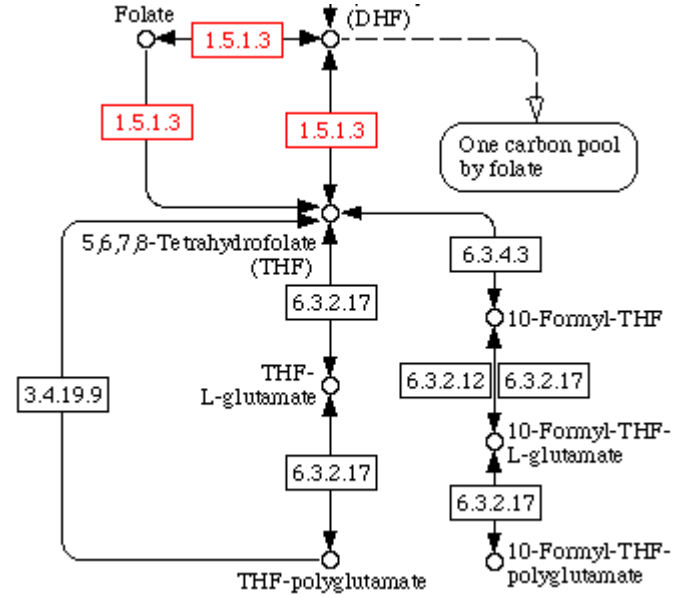
Ακολουθία

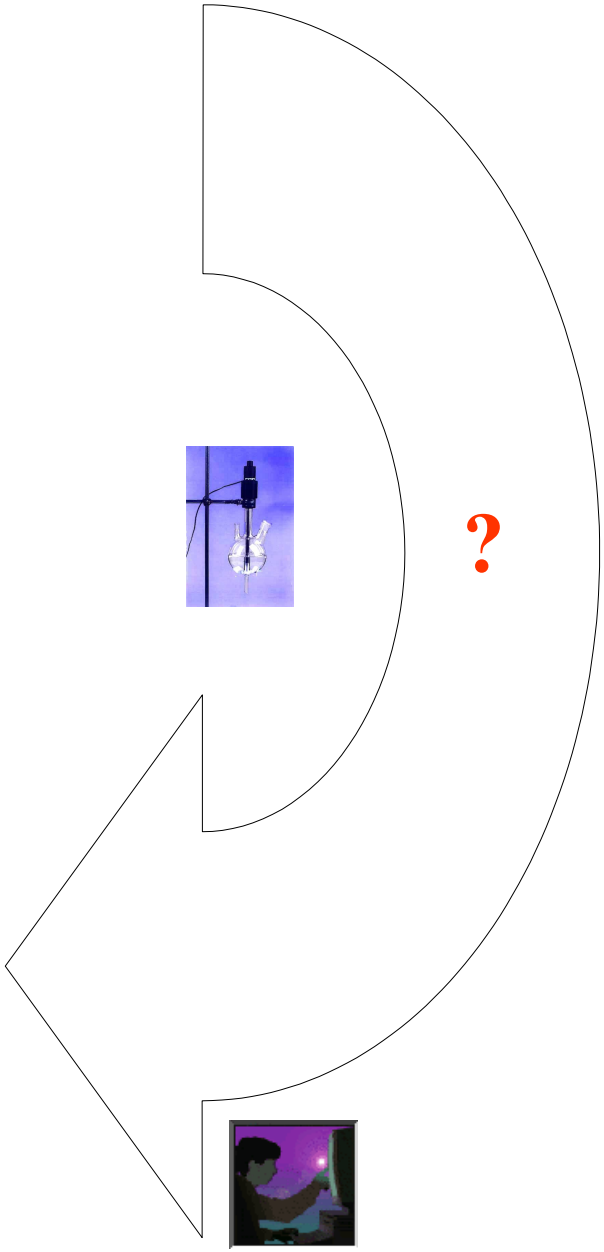
…
LHYFRAQTVGKIMVVGRRT…

3D-δομή



Λειτουργία

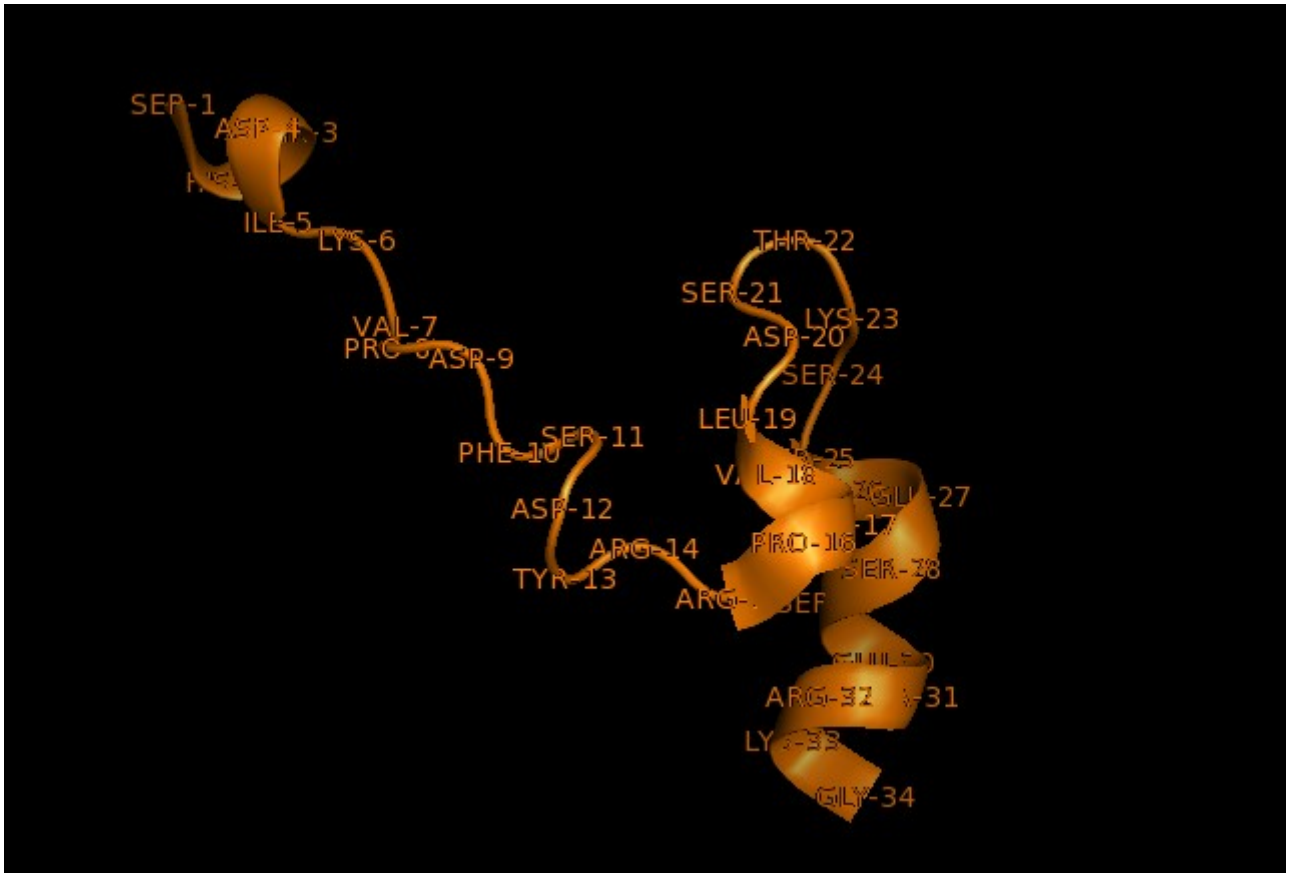




Πρόγνωση της τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής

INPUT

>X-factor hypothetical protein
SHTDIKVPDFSDYRRPEVLD
STKSSKESSEARKGFSY



Πρόγνωση της δομής πρωτεϊνών

- Συγκριτική Προτυποποίηση – Comparative (Homology) Modeling
- Threading (“Αρμάθιασμα”)
- Πρόγνωση από πρώτες αρχές - *ab initio*

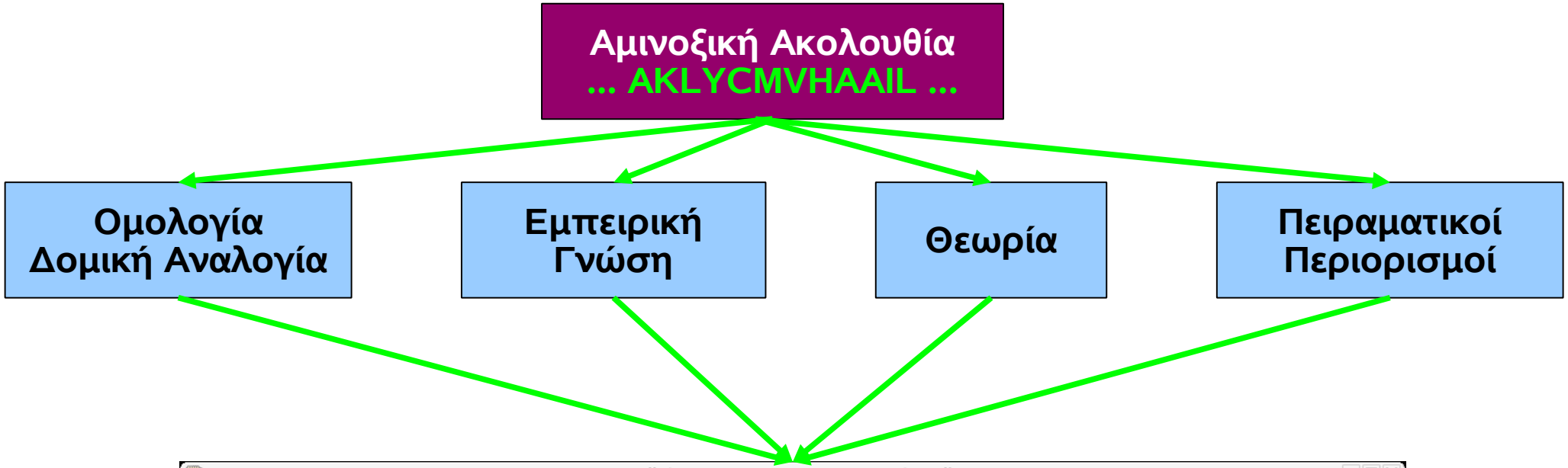
Πρόγνωση της δομής πρωτεϊνών

- ΠΡΟΒΛΗΜΑ:
  - Έχω την ακολουθία μιας νέας πρωτεΐνης
- Ερωτήματα
  - Γνωστό δίπλωμα ?
    - ΝΑΙ: μπορώ να βρώ τις λεπτομέρειες ?
    - ΟΧΙ: ποιο είναι τότε ?
- Γιατί με απασχολεί όμως ??

Αναγκαιότητα

- Δυσκολία πειραματικού προσδιορισμού
  - Επίπονη – Χρονοβόρα – Ακριβή – Εγγυημένη(?)
  - Τεράστιο πλήθος πρωτεϊνών (π.χ. Genome Projects)
  - Δύσκολη αυτοματοποίηση
- Γνώση 3D-δομής
  - Λειτουργία
  - Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων
  - Σχεδιασμός & Μηχανική Πρωτεϊνών
  - Πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων
  - …

Αφηρημένη γενική προσέγγιση



1H7W.pdb (~/Documents/COURSES/BIO650) - gedit

File Edit View Search Tools Documents Help

New Open Save Print Undo Redo Cut Copy Paste Find Replace

1H7W.pdb

```
ATOM      1  N   ALA A   2     121.541  61.214  47.411  1.00 38.90           N
ATOM      2  CA  ALA A   2     120.185  61.701  47.814  1.00 37.73           C
ATOM      3  C   ALA A   2     119.796  61.155  49.192  1.00 36.28           C
ATOM      4  O   ALA A   2     120.015  59.983  49.472  1.00 37.48           O
ATOM      5  CB  ALA A   2     119.162  61.259  46.773  1.00 39.01           C
ATOM      6  N   PRO A   3     119.183  61.988  50.057  1.00 33.46           N
ATOM      7  CA  PRO A   3     118.775  61.558  51.405  1.00 30.18           C
ATOM      8  C   PRO A   3     117.989  60.246  51.436  1.00 25.97           C
ATOM      9  O   PRO A   3     117.571  59.733  50.399  1.00 25.25           O
ATOM     10  CB  PRO A   3     117.918  62.724  51.904  1.00 31.77           C
ATOM     11  CG  PRO A   3     118.461  63.897  51.167  1.00 33.31           C
```

Ln 1363, Col 1 INS

… είναι εφικτό ??

- Τα καλά νέα:
  - "Η θερμοδυναμική υπόθεση" (C. Anfinsen)

This hypothesis states that the three-dimensional structure of a native protein in its normal physiological milieu (solvent, pH, ionic strength, presence of other components such as metal ions or prosthetic groups, temperature, etc.) is the one in which the Gibbs free energy of the *whole system* is lowest; that is, that the native conformation is determined by the totality of interatomic interactions and hence by the amino acid sequence, in a *given environment.*

STUDIES ON THE PRINCIPLES THAT GOVERN THE FOLDING OF PROTEIN CHAINS

Nobel Lecture, December 11, 1972
by
CHRISTIAN B. ANFINSEN

- Τα άσχημα νέα:
  - Ο τρόπος δεν είναι πάντα προφανής
  - Δεν υπάρχει αναλυτική σχέση ακολουθίας-δομής

Συγκριτική προτυποποίηση
(aka Comparative or Homology Modeling)

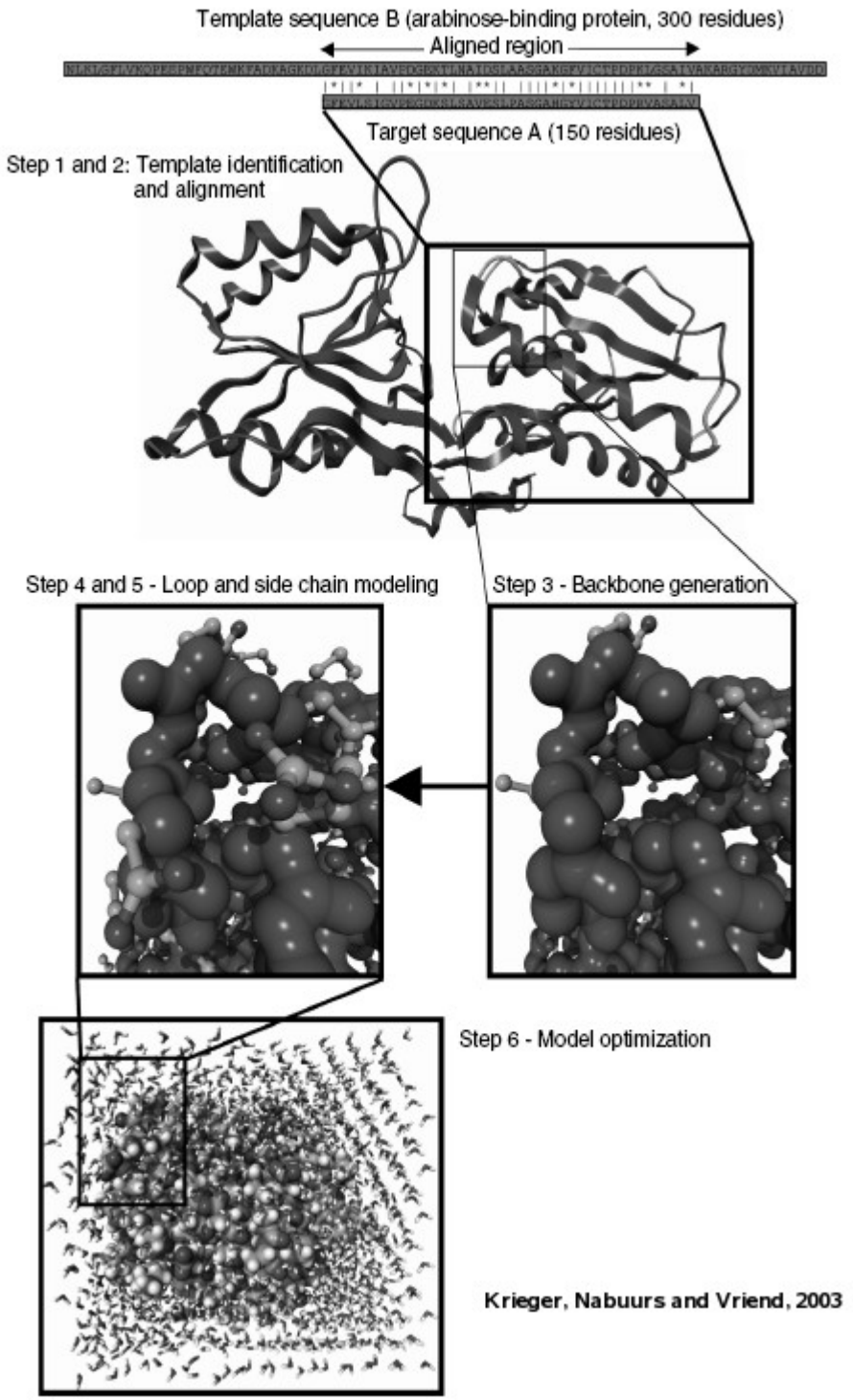
- Ξεκάθαρη σχέση με προσδιορισμένη δομή
  - Ομοιότητα στο επίπεδο της αλληλουχίας

- Βασικές Αρχές
  - Φυσικά η Θερμοδυναμική Υπόθεση
  - (Πολύ) όμοιες ακολουθίες αναμένουμε να διπλώνουν με τον ίδιο τρόπο
  - Η δομή περισσότερο συντηρημένη από ακολουθία

Συγκριτική προτυποποίηση
(aka Comparative or Homology Modeling)

1. Εντοπισμός κατάλληλης δομής-μήτρας (template) και αρχική στοίχιση (seq) [αν δεν βρω?]
2. Βελτίωση της στοίχισης (seq)
3. Κατασκευή κύριας αλυσίδας
4. Προτυποποίηση θηλιών
5. Προτυποποίηση πλευρικών αλυσίδων
6. Βελτιστοποίηση μοντέλου
7. Επικύρωση μοντέλου

Σε κάθε βήμα υπάρχουν εναλλακτικοί τρόποι προσέγγισης


Template sequence B (arabinose-binding protein, 300 residues)
Aligned region
Target sequence A (150 residues)
Step 1 and 2: Template identification and alignment
Step 4 and 5 - Loop and side chain modeling
Step 3 - Backbone generation
Step 6 - Model optimization
Krieger, Nabuurs and Vriend, 2003

1. Εντοπισμός κατάλληλης δομής-μήτρας (template) - στοίχιση

- Βασιζόμαστε στις υπάρχουσες μεθοδολογίες (DP, BLASTP, FASTA – μη βιάζεστε, στα επόμενα ...)
- Αναζήτηση έναντι των ακολουθιών εγγραφών της PDB
- Δυνητικά σε 2 βήματα
- Κρίσιμα σημεία
  - Επιλογή 1(??) δομής-μήτρας [κριτήρια??]
  - Στοίχιση στο επίπεδο ακολουθίας

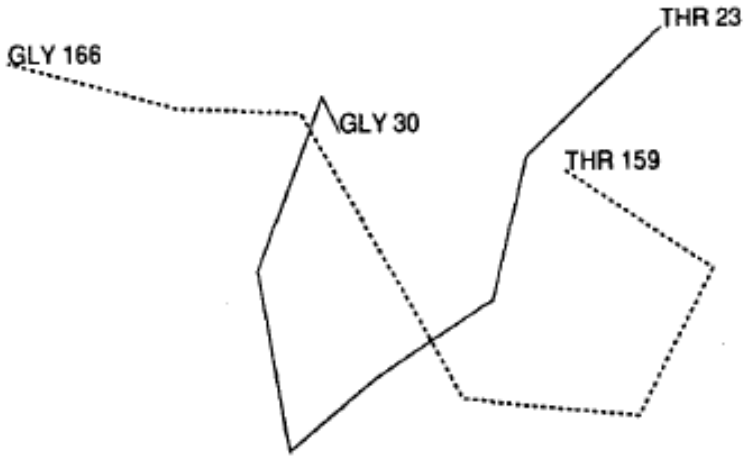
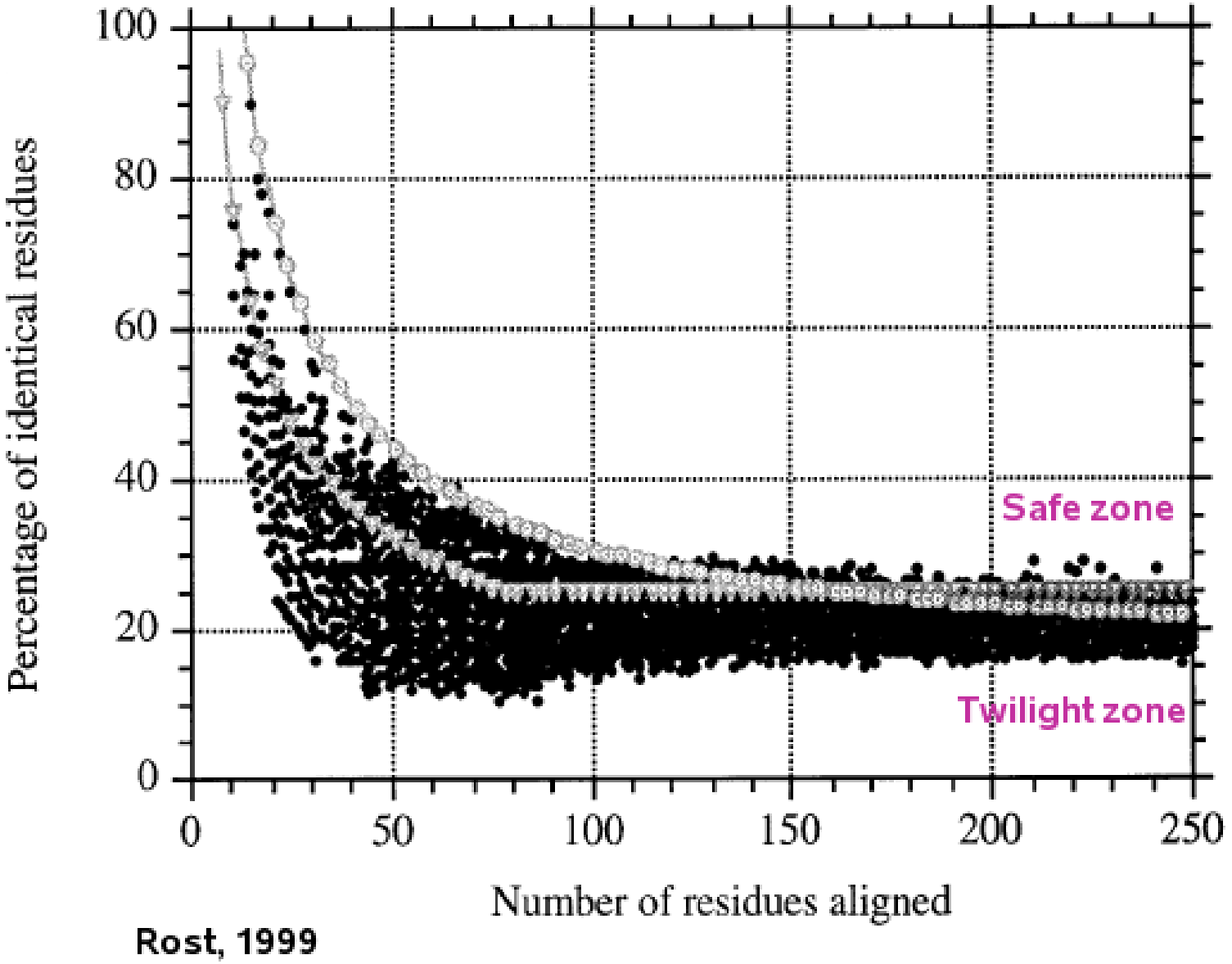


TABLE I. Homology Threshold for Different Alignment Lengths*

Alignment length L (number of residues)	Homology threshold t (% residue identity)
<10	–
10	79.6
12	71.9
14	65.9
16	61.2
18	57.2
20	53.9
22	51.1
24	48.7
26	46.6
28	44.7
30	43.0
35	39.4
40	36.6
45	34.2
50	32.3
55	30.6
60	29.1
65	27.8
70	26.7
80	24.8
>80	24.8

Fig. 1. The structural meaning of sequence similarity depends strongly on the length of alignments. In this extreme example, two short peptides have sequence similarity normally sufficient for structural homology (75% identical residues), yet their structures are very different. Residues 159–166 of a subtilisin protease (dashed line, data set 2SBT[7]) and residues 23–30 of an immunoglobulin (solid line, data set 3FAB[8]) have 6 out of 8 identical residues (TGSSSTVG/TGSSSNIG), but differ by 4.7 Å rms deviation in C(α) positions. Secondary structures are also very different (LTTSLLLL/ELLTTSST where T, H-bonded turn; S, geometrical turn; E, part of beta strand; L, extended loop). Protein fragments as stereo C(α) traces.

Sander and Schneider, 1993

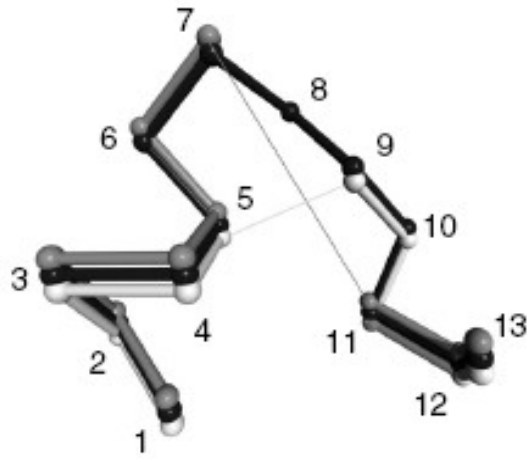

Percentage of identical residues
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
Number of residues aligned
Safe zone
Twilight zone

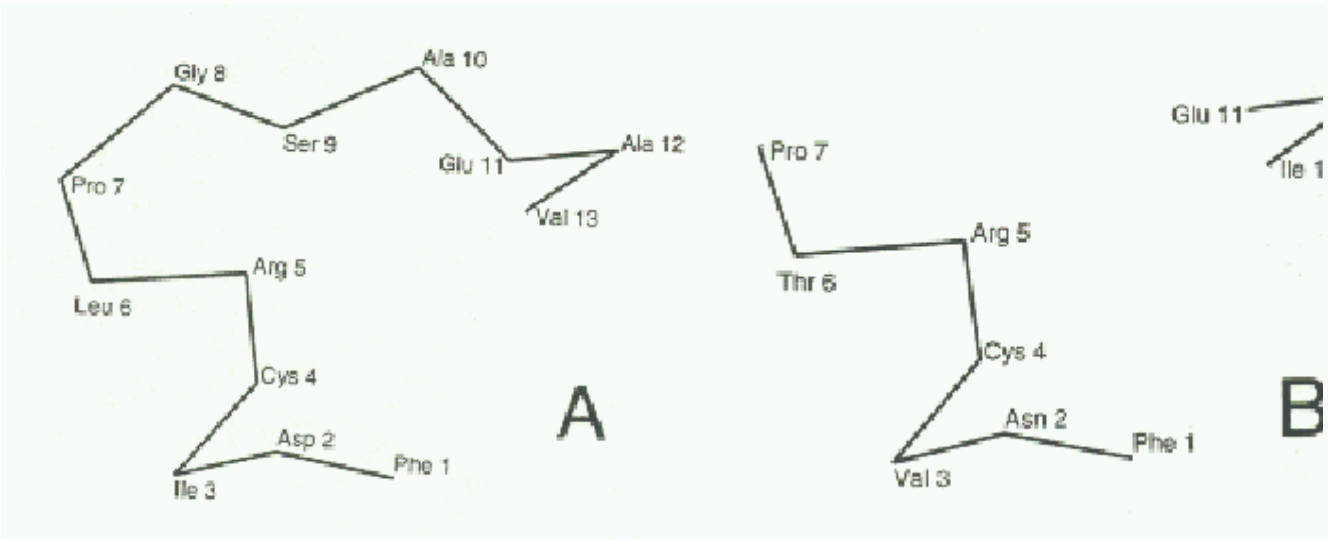
Rost, 1999

2. Βελτίωση της στοίχισης

- Δυναμικός προγραμματισμός (δείτε επόμενα)
  - Μαθηματικά βέλτιστη στοίχιση
  - Βιολογικά/Δομικά??
- Πιθανή χρήση (επιπλέον) ομόλογων
  - profile alignment
  - multiple sequence alignment
- Αξιοποίηση δομικών περιορισμών
  - Κανονικές δευτεροταγείς δομές
  - Θηλιές

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Template		**PHE**	**ASP**	**ILE**	**CYS**	**ARG**	**LEU**	**PRO**	**GLY**	**SER**	**ALA**	**GLU**	**ALA**	**VAL**
Model (bad)	1	PHE	ASN	VAL	CYS	ARG	ALA	PRO	---	---	---	GLU	ALA	ILE
Model (good)	2	PHE	ASN	VAL	CYS	ARG	---	---	---	ALA	PRO	GLU	ALA	ILE





3. Κατασκευή κύριας αλυσίδας

- “Αντιγραφή” από τη δομή-μήτρα
- Αποφυγή λαθών εγγραφών PDB
  - Εντοπισμός
    - πχ PDBREPORT: http://swift.cmbi.ru.nl/gv/pdbreport/
    - επιλογή μήτρας με τα λιγότερα σφάλματα
- Χρήση πολλαπλών μητρών
  - Πλεονεκτικό: κάλυψη μεγαλύτερου τμήματος της άγνωστης πρωτεΐνης
  - Δεν είναι πάντα απλό ...

(Εντοπισμός πιθανών σφαλμάτων)

- Μικρές αποστάσεις ατόμων
- Ασυνήθιστα μήκη/γωνίες δεσμών
- Ασυνήθιστα διαστροφομερή
- Missing atoms
- …

4. Προτυποποίηση θηλιών

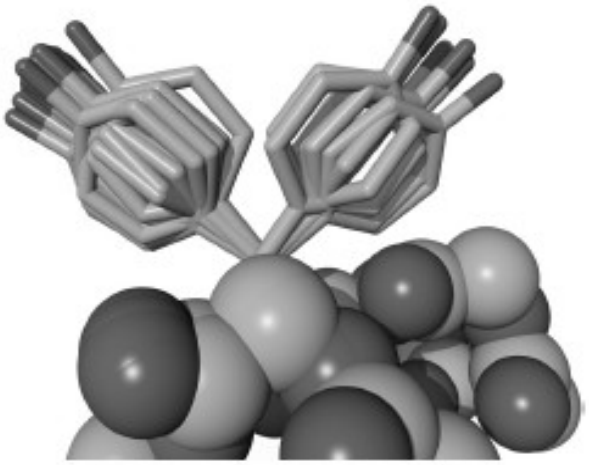
- Στοιχίσεις με κενά
  - Insertions => δεν υπάρχει δομή για τη θηλιά
  - Deletions => πρέπει να ενωθούν μη διαδοχικά κατάλοιπα
- Απαιτούνται στεροδιαταξικές αλλαγές στην κύρια αλυσίδα της μήτρας
  - όχι σε κανονικές δευτεροταγείς δομές
  - δεν είναι εύκολο να προβλεφθούν
  - υπάρχει εγγενές πρόβλημα ακόμη και χωρίς κενά
    - επιφανειακές θηλιές => κρυσταλλογραφικές επαφές
    - μέγεθος πλευρικών αλυσίδων

4. Προτυποποίηση θηλιών (II)

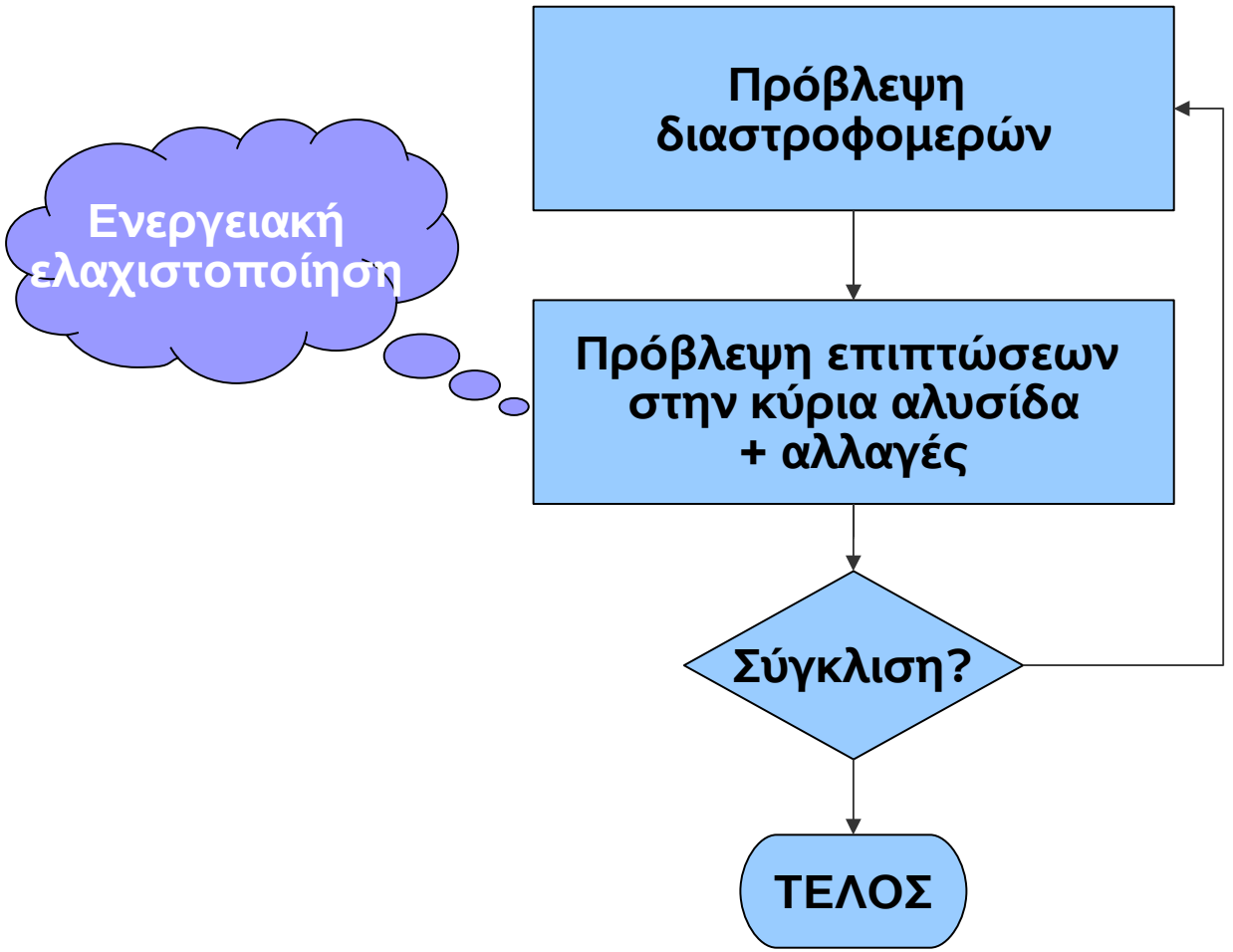
- Δύο κύριες προσεγγίσεις
  - Knowledge based
    - Αναζήτηση στην PDB για θηλιές με τα ίδια άκρα
    - Αντιγραφή της στερεοδιάταξης
  - Energy based
    - Χρησιμοποίηση *ab initio* τεχνικών (δείτε παρακάτω ??)
    - Ελαχιστοποίηση ενέργειας (Monte Carlo, Simulated annealing)
  - Αποδοτικές μόνο για μικρές θηλιές (<10aa)

5. Προτυποποίηση πλευρικών αλυσίδων

- Ύπαρξη διαστροφομερών (rotamer)
  - Διαφορετικές στερεοδιατάξεις σχετικά με την κύρια αλυσίδα
  - Συχνά ομόλογες δομές έχουν παρόμοιες χ1
- Προτιμήσεις => rotamer libraries
  - Επιρροή από γειτονικές πλευρικές αλυσίδες
  - Επιρροή στην κύρια αλυσίδα
  - Επιρροή από την κύρια αλυσίδα
- Απόδοση
  - Καλή στον υδρόφοβο πυρήνα
  - Μειωμένη σε επιφανειακά κατάλοιπα



6. Βελτιστοποίηση μοντέλου



6. Βελτιστοποίηση μοντέλου (II)

- Ελαχιστοποίηση ενέργειας
  - Στο σύνολο της δομής!!!
  - Απαιτείται ακρίβεια στη συνάρτηση ενέργειας
  - Αποφυγή “ΧΟΝΤΡΩΝ” λαθών
  - Εισαγωγή μικρών (συχνά ανεπιθύμητων) λαθών
- Χρήση δομικών περιορισμών
- Χρήση με φειδώ ...
- Χρήση τεχνικών μοριακής δυναμικής

7. Επικύρωση μοντέλου

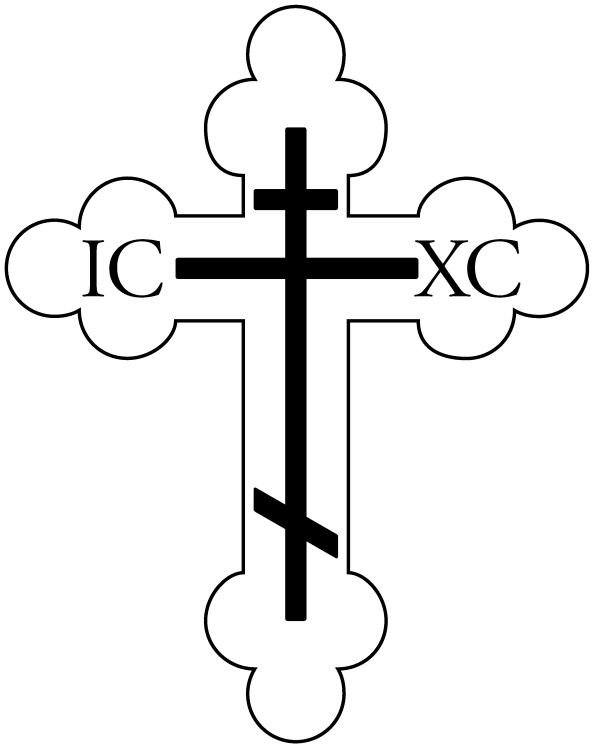
- Εντοπισμός πιθανών λαθών
  - Χρήση ενεργειακών υπολογισμών
  - Έλεγχος “κανονικότητας”
    - μήκη δεσμών
    - (επίπεδες) γωνίες δεσμών
    - δίεδρες γωνίες
    - 3D κατανομή πολικών/υδρόφοβων καταλοίπων
    - γεωμετρία ατομικών επαφών
- Το πλήθος (και η σοβαρότητα) τους εξαρτάται
    - ομοιότητα σε επίπεδο ακολουθίας
    - σφάλματα στη δομή-μήτρα

Συγκριτική προτυποποίηση: Επιδόσεις

- Πλεονεκτήματα
  - Ταχύτητα
  - Ακρίβεια (RMSD 1-3Å)
- Μειονεκτήματα
  - Ακρίβεια εξαρτώμενη της περιοχής (πχ θηλιές)
  - Εξαρτάται από την ποιότητα στοίχισης, μέγεθος PDB, αντιπροσωπευτικού δείγματος δομών
  - Προβληματική στο 'Twilight Zone', ORFans
  - Δε δίνει πληροφορία για το μηχανισμό διπλώματος
  - Όχι και τόσο απλή διαδικασία τελικά :-(

Εάν δε βρω κατάλληλη δομή?

- ΑΤΥΧΗΣΕΣ!!!
- *Ab initio* και Fold recognition
- Εναλλακτικά ελάτε στο BIO650 :-)

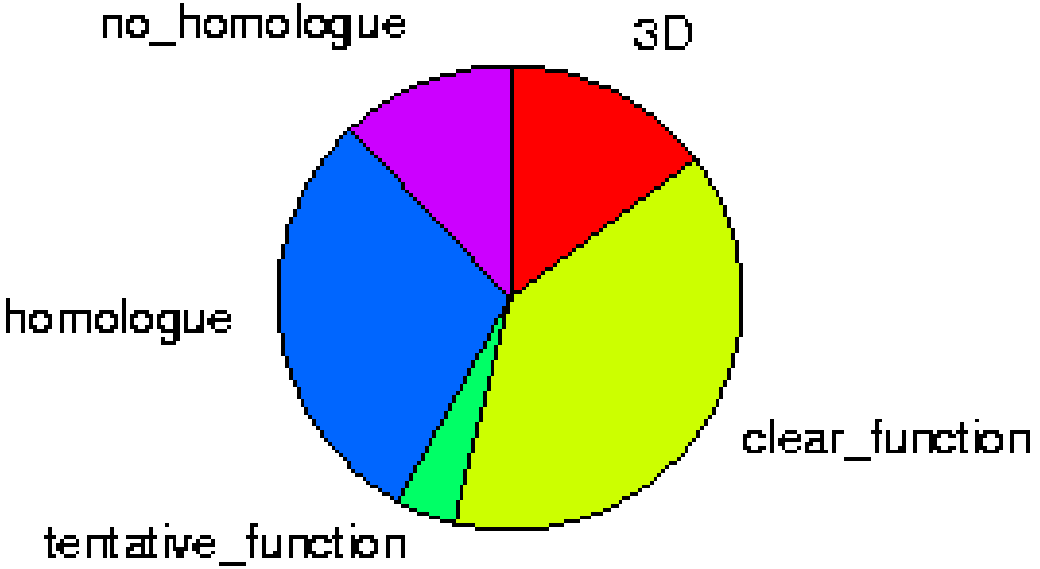


Υπολογιστική Ανάλυση Αμινοξικών Ακολουθιών

- Μέθοδοι Βασισμένοι στην Ανίχνευση Ομοιότητας (σχετικές διαλέξεις ..)
- Εμπειρικές Μέθοδοι
- Τεχνικές Μηχανικής Μάθησης
- Αυτοματοποιημένα ή «με το χέρι??»

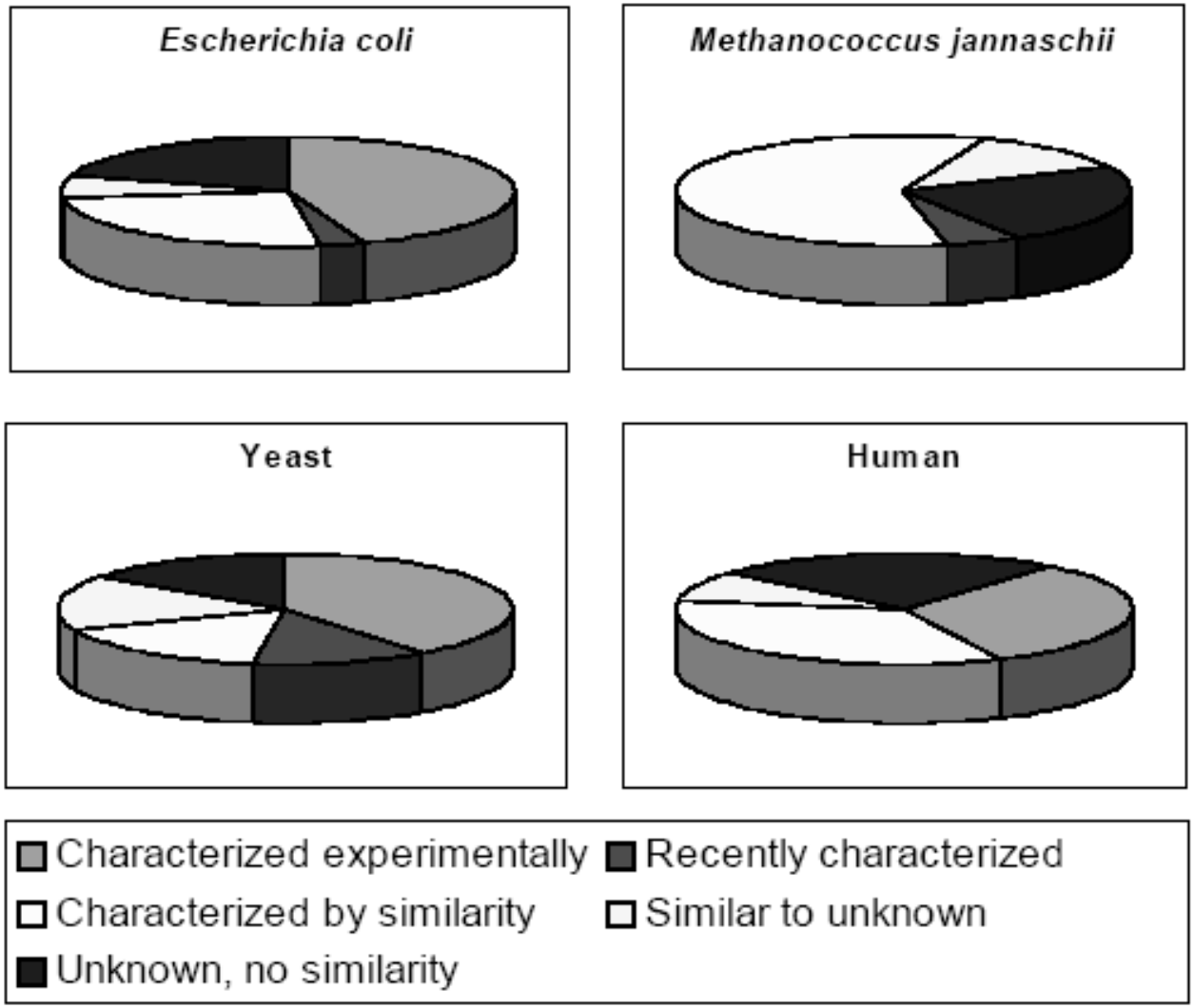
Αυτοματοποιημένα ??

Αυτοματοποιημένος Σχολιασμός βασισμένος σε ομοιότητες (σύστημα GeneQuiz, Μάϊος 2000) για τα ORFs του γονιδιώματος του Αρχαίου *Methanococcus jannaschii*.



http://jura.ebi.ac.uk:8765/ext-genequiz//genomes/mj0005/index.html

Αυτοματοποιημένα ?? (2)



Από Koonin EV and Galperin M, (2003) "Sequence – Evolution – Function: Computational Approaches in Comparative Genomics"

Πρόγνωση στοιχείων της τρισδιάστατης δομής

- Πρόγνωση δευτεροταγούς δομής σφαιρικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών
- Πρόγνωση της τοπολογίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών
  - α-ελικοειδείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες
  - διαμεμβρανικά β-βαρέλια
- Πρόγνωση πεπτιδίων-οδηγών
- Πρόγνωση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

Συζήτηση ...

Διδακτικό υλικό:

http://troodos.biol.ucy.ac.cy/BRL/courses/BIO003/index.html