Oznamy

- DÚ 2 je na stránke, odovzdať do 4.12.
- Termíny na konci semestra
  – DÚ3 streda 18.12., správy zo journal clubu piatok 20.12.

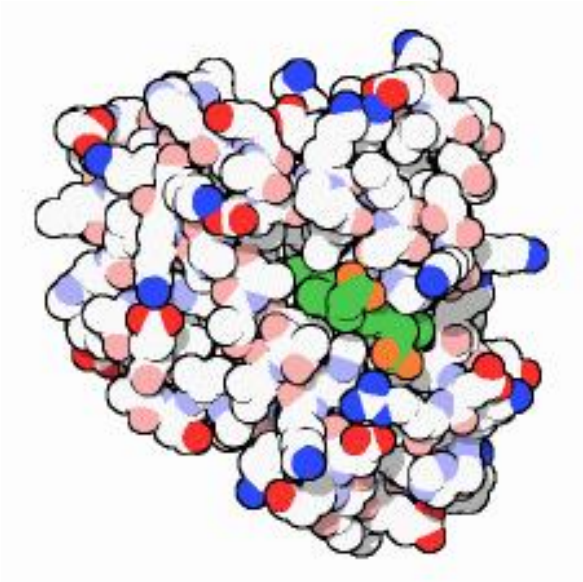
Správa zo journal clubu

- Pochopiteľná pre študentov tohto predmetu (inf aj bio)
- Vysvetlite pojmy, ktoré sú nad rámec tohto predmetu
- Netreba pokryť všetko, môžete využiť aj iné zdroje
- Podrobne vysvetliť aspoň jednu bioinformatickú metódu a aspoň jeden biologický výsledok (alebo overovanie správnosti metódy na dátach)
- Ako článok súvisí s učivom preberaným na predmete
- Nájdite zopár citujúcich prác, ktoré výsledky využili alebo vylepšili
- Rozsah cca 1-2 strany na osobu, jeden ucelený text
- Píšte vlastnými slovami, citujte zdroje
- V správe vymenujte členov skupiny, ktorí sa podieľali na jej spísaní, dostanú rovnako bodov
- Pdf odovzdať cez Moodle (stačí 1 za skupinu)

Štruktúra a funkcia proteínov

Broňa Brejová

27.11.2024



Proteíny

Reťazce 20 rôznych aminokyselín s rôznymi chemickými vlastnosťami:

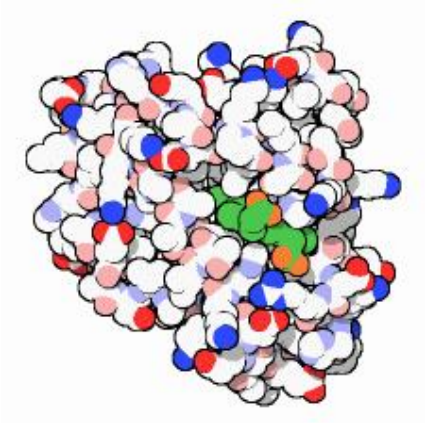
Aminokyselina	Postranný reťazec	Jeho vlastnosti
Alanín (A)	-CH3	hydrofóbny
Arginín (R)	-(CH2)3NH-C(NH)NH2	bázický
Asparagín (N)	-CH2CONH2	hydrofilný
Kyselina asparágová (D)	-CH2COOH	kyslý
Cysteín (C)	-CH2SH	hydrofóbny
Kyselina glutámová (E)	-CH2CH2COOH	kyslý
Glutamín (Q)	-CH2CH2CONH2	hydrofilný
Glycín (G)	-H	hydrofilný
Histidín (H)	-CH2-C3H3N2	bázický
Izoleucín (I)	-CH(CH3)CH2CH3	hydrofóbny
Leucín (L)	-CH2CH(CH3)2	hydrofóbny
Lyzín (K)	-(CH2)4NH2	bázický
Metionín (M)	-CH2CH2SCH3	hydrofóbny
Fenylalanín (F)	-CH2C6H5	hydrofóbny
Prolín (P)	-CH2CH2CH2-	hydrofóbny
Serín (S)	-CH2OH	hydrofilný
Treonín (T)	-CH(OH)CH3	hydrofilný
Tryptofán (W)	-CH2C8H6N	hydrofóbny
Tyrozín (Y)	-CH2-C6H4OH	hydrofóbny
Valín (V)	-CH(CH3)2	hydrofóbny

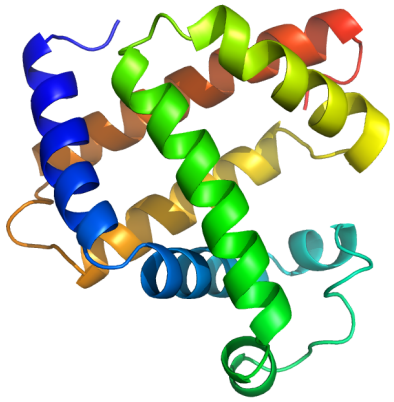
Štruktúra proteínov

- **Primárna štruktúra:** sekvencia aminokyselín
- **Sekundárna štruktúra:** pravidelné útvary

  alfa-hélix, beta-skladaný list (beta sheet)
- **Terciálna štruktúra:** presné 3D rozloženie atómov
- **Kvartérna štruktúra:** interakcia viacerých proteínov v komplexe

Myoglobín, prvý proteín so známou štruktúrou [Kendrew et al 1958]





Experimentálne určovanie štruktúry

- RTG kryštalografia (X-ray crystalography)
  vyžaduje proteín v kryštalickej forme
- NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
  hlavne používaná na kratšie proteíny
- Cryo-EM (cryogenic electron microscopy)
  vhodná na veľké proteínové komplexy, rastúca popularita
- Náročný a drahý proces
- Databáza štruktúr PDB
  228 000 proteínových štruktúr (83% X-ray)
  (UniProt má 250 miliónov sekvencií)

Určovanie štruktúry proteínov ako bioinformatický problém

(protein structure prediction, protein folding)

Vstup: sekvencia proteínu X

Výstup: 3D pozície atómov alebo aminokyselín

(1) Ab initio metódy

- Nájdi štruktúru s najnižšou voľnou energiou
- Vzorce na približný výpočet energie založené na fyzike
  — sily medzi atómami v proteíne a okolitom roztoku
- Veľmi ťažký výpočtový problém
  — simulácia molekulárnej dynamiky
  — optimalizačné metódy, napr. gradientová metóda, simulované žíhanie
- Používané na malé proteíny a zlepšenie približných štruktúr

Určovanie štruktúry proteínov ako bioinformatický problém

(protein structure prediction, protein folding)

Vstup: sekvencia proteínu X

Výstup: 3D pozície atómov alebo aminokyselín

(1) Ab initio metódy

(2) Metódy založené na homológii

Hľadáme homológy proteínu X, t.j. podobné proteíny

Štruktúra sa väčšinou evolučne mení pomalšie ako sekvencia

ak niektorý homológ má známu štruktúru, aj X má asi podobnú

Určovanie štruktúry proteínov bolo dlho považované za otvorený problém,

ktorý nevieme bioinformaticky riešiť, ak sa nedá použiť metóda (2)

Určovanie štruktúry proteínov ako bioinformatický problém

(protein structure prediction, protein folding)

Vstup: sekvencia proteínu X

Výstup: 3D pozície atómov alebo aminokyselín

(1) Ab initio metódy

(2) Metódy založené na homológii

(3) Metódy založené na hlbokých neurónových sieťach

Od roku 2018 veľký pokrok

Hlavne program AlphaFold od firmy DeepMind/Google

Nobelova cena za chémiu 2024: dvaja z autorov, Demis Hassabis a John Jumper

(a David Baker za návrh nových proteínov)

Najnovšie prístupy: hlboké neurónové siete

- Súťaž CASP raz za dva roky
- V roku 2018 a 2020 vyhral AlphaFold od firmy DeepMind/Google.
  V roku 2020 AlphaFold2 vyhral s veľkým náskokom.
  2/3 predpovedaných štruktúr mali vysokú presnosť.
  Využíva nové prvky, aj existujúce prístupy.
  V roku 2022 väčšina metód inšpirovaná AlphaFold2.
- Kľúčová myšlienka využitá aj pred AlphaFold-om: **detekcia ko-evolúcie**
  - k skladanému proteínu zarovnaj veľké množstvo homológov
    (aj bez známych štruktúr)
  - hľadaj dvojice pozícií, ktoré sa menia súčasne
  - takéto dvojice sú potenciálne v kontakte

Najnovšie prístupy: hlboké neurónové siete

- **AlphaFold 1 (2018):**

  (1) Predikcia vzdialeností amino kyselín pomocou neurónovej siete

  (2) Hľadanie štruktúry, ktorá dobre sedí so vzdialenosťami
  a fyzikálnym modelom využitím štandardnej numerickej optimalizácie
  (gradientové metódy) [animácia]

- **AlphaFold 2 (2020):**

  kombinuje oba kroky do jednej neurónovej siete,
  ktorá sa opakovane spúšťa na svojich výsledkoch

- **AlphaFold 3 (2024):**

  Iná neurónová sieť,
  umožnuje skladať aj komplexy kombinujúce viac proteínov,
  alebo proteín a inú molekulu (DNA, RNA, ióny, a pod.)

Limitácie programu AlphaFold

Vyplývajú z dostupných dát pre trénovanie

- Nedá sa využiť na proteíny bez homológov (napr. umelo vytvorené alebo tie, ktoré rýchlo mutujú, napr. protilátky)
- Nie je úplne presný v predpovedaní vplyvu mutácie na štruktúru
- Predpovedá jednu štruktúru, ale veľa proteínov má viacero možných polôh
- Flexibilnejšie časti proteínov (disordered) sú často predpovedané s nízkou spoľahlivosťou (vyznačenou vo výsledkoch ako low confidence)
- AlphaFold3 nevie spracovať všetky typy molekúl viažúcich proteíny

Praktické prístupy k určovaniu štruktúry proteínu

Pre daný proteín X:

- Pozrieme do PDB, či má X známu štruktúru
- V databázach môžeme nájsť aj štruktúru pre X od AlphaFold
- Môžeme spustiť AlphaFold na X
- Môžeme hľadať homológy X so známou štruktúrou

Hľadanie homológov proteínu

Dôležité pre rôzne účely:

– určenie približnej štruktúry a funkcie proteínu

– štúdium evolúcie proteínu

– vstup pre AlphaFold

Videli sme:

– dynamické programovanie

– heuristické zrýchlenia (BLAST a spol.)

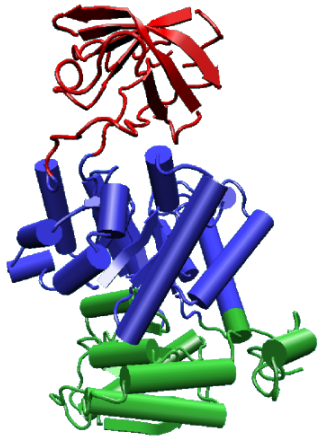
– skórovacie matice (BLOSUM)

Nevedia nájsť vzdialenejšie homológy

Dnes si ukážeme prístupy založené na **pravdepodobnostných profiloch**

Proteínové domény a rodiny

Doména (domain)



- Časť proteínu s nezávislou štruktúrou
- Veľa proteínov sa skladá z viacerých domén
- Domény sa tiež v proteínoch preskupujú počas evolúcie

Rodina (family)

- Skupina proteínov/domén s podobnou sekvenciou, štruktúrou, funkciou
- Ak poznáme štruktúru jedného člena rodiny, môžeme predpokladať, že ostatné majú podobnú

Proteíny ako skladačka domén

Databáza Pfam

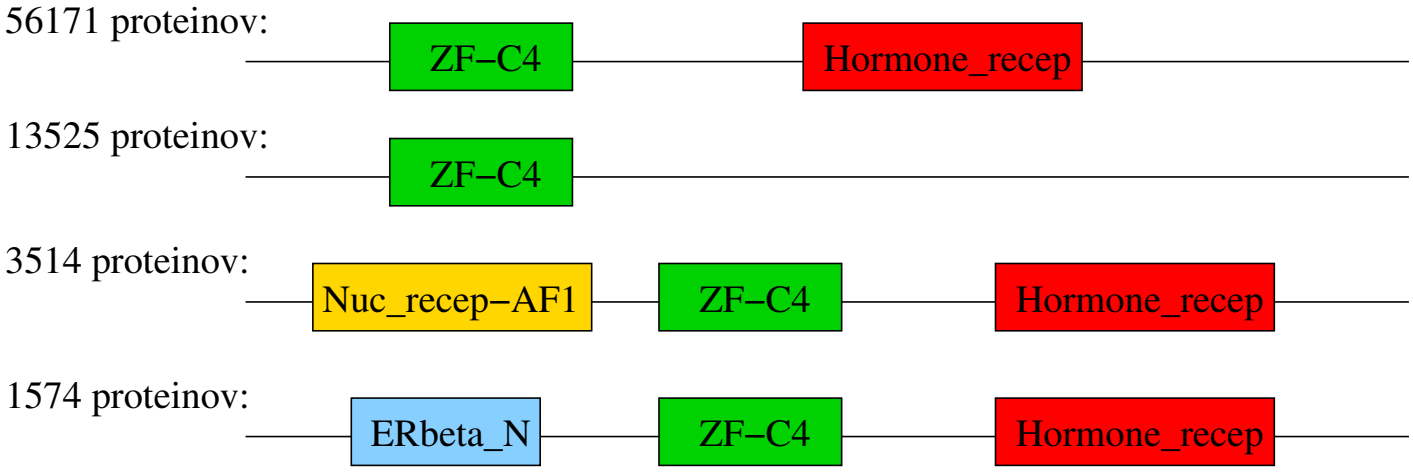
Domény v proteínoch rozdelené do viac ako 20 tisíc rodín

76% proteínov aspoň jedna známa doména

49% proteínových sekvencií pokrývajú známe domény

Príklad:

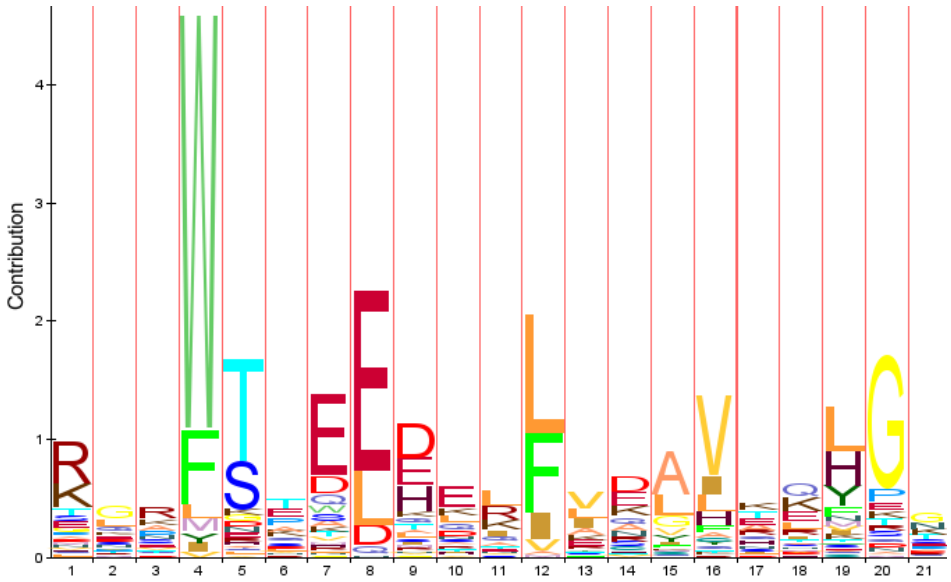
4 z 654 architektúr obsahujúcich domény Zinc finger, C4 type (Pfam)



Charakterizácia rodín proteínov

- Zarovnania medzi známymi prvkami rodiny a novým proteínom nemusia nájsť vzdialených členov
- Viacnásobné zarovnanie rodiny ukáže dôležité evolučne zachované pozície

```
MEEWSASEANLFEEALEKYGKDF
PDEWTVEDKVLFEQAFSFHGKT.
GTKWTAEENKKFENALAFYDKDT
SKNWSEDDLQLLIKAVNLFPAGT
EKPWSNQETLLLLEAIETYGDD.
ARFWTDQETLLLLEGLEMHKDD.
KPEWSDKEILLLLEAVMHYGDD.
DDTWTAQELVLLSEGVEMYS...
KKNWSDQEMLLLLEGIEMYE...
DENWSKEDLQKLLKGIQEFGAD.
EDDWSQAEQKAFETALQKYPKGT
EEAWTQSQQKLLELALQQYPKGA
EDVWSATEQKTLEDAIKKHKSSD
AMSWTHEDEFELLKAAHKFKMG.
```



Pravdepodobnostný profil rodiny

(profile, position specific score matrix PSSM)

- V zarovnaní spočítaj $e_i(x)$: frekvencia výskytu písmena x v stĺpci i
- Dostaneme model, ktorý generuje sekvenciu $x_1, x_2, \ldots, x_n$
  s pravdepodobnosťou

$$e_1(x_1) \cdot e_2(x_2) \cdots e_n(x_n)$$

- Nulová hypotéza: sekvencia bola vygenerovaná náhodne,
  kde písmeno x má frekvenciu $q(x)$
- Skóre sekvencie $x_1, \ldots, x_n$:
  logaritmus pomeru pravdepodobností v dvoch modeloch

$$\log \frac{e_1(x_1) \ldots e_n(x_n)}{q(x_1) \ldots q(x_n)}$$

(neskôr rozpíšeme na súčet dielčích skóre pre aminokyseliny)

Hračkársky príklad PSSM

- Uvažujme len leucín L a alanín A
- Majme zarovananie 10 sekvencií s počtami / frekvenciami $e_i(x)$ v tabuľke

	počty				frekvencie			
	1	2	3	4	1	2	3	4
A	2	6	9	1	0,2	0,6	0,9	0,1
L	8	4	1	9	0,8	0,4	0,1	0,9

- Nulová hypotéza $q(A) = 0{,}3$, $q(L) = 0{,}7$
- Pravdepodobnosť sekvencie LAAL
  – v profile $0{,}8 \cdot 0{,}6 \cdot 0{,}9 \cdot 0{,}9 = 0{,}3888$,
  – v nulovom modeli $0{,}7 \cdot 0{,}3 \cdot 0{,}3 \cdot 0{,}7 = 0{,}0441$
- Skóre LAAL: $\log_2(0{,}3888/0{,}0441) = 3{,}14$
  Skóre LALA: $\log_2(0{,}0048/0{,}0441) = -3{,}20$

Pravdepodobnostný profil rodiny

- $e_i(x)$: frekvencia výskytu písmena x v stĺpci i zarovnania rodiny
- $q(x)$: frekvencia výskytu písmena x v nulovom modeli
- $s_i(x) = \log \frac{e_i(x_i)}{q(x_i)}$ skóre písmena x v stĺpci i zarovnania rodiny
- Skóre sekvencie $x_1, \ldots, x_n$:

  logaritmus pomeru pravdepodobností v dvoch modeloch

$$\log \frac{e_1(x_1) \cdot \ldots \cdot e_n(x_n)}{q(x_1) \cdot \ldots \cdot q(x_n)}$$
$$= \log \left(\frac{e_1(x_1)}{q(x_1)} \cdot \ldots \cdot \frac{e_n(x_n)}{q(x_n)} \right)$$
$$= \log \frac{e_1(x_1)}{q(x_1)} + \ldots + \log \frac{e_n(x_n)}{q(x_n)}$$
$$= s_1(x_1) + \ldots + s_n(x_n)$$

Hračkársky príklad PSSM

- Majme zarovananie 10 sekvencií s počtami / frekvenciami $e_i(x)$ v tabuľke

	počty				frekvencie			
	1	2	3	4	1	2	3	4
A	2	6	9	1	0,2	0,6	0,9	0,1
L	8	4	1	9	0,8	0,4	0,1	0,9

- Nulová hypotéza $q(A) = 0{,}3$, $q(L) = 0{,}7$
- Skóre alanínu v prvom stĺpci $s_1(A) = \log_2(0{,}2/0{,}3) = -0{,}58$
  skóre leucínu v prvom stĺpci $s_1(L) = \log_2(0{,}8/0{,}7) = 0{,}19$
- Dostávame tabuľku skór

	1	2	3	4
A	-0,58	1,00	1,58	-1,58
L	0,19	-0,81	-2,81	0,36

- Skóre LAAL je $0{,}19 + 1 + 1{,}58 + 0{,}36 = 3{,}13$
  Skóre LALA je $0{,}19 + 1 - 2{,}81 - 1{,}58 = -3{,}2$

Pseudocounts

Ak na niektorej pozícii určitá amino kyselina nebola pozorovaná, mala by v modeli pravdepodobnosť 0

	1	2	3	4
A	2	6	9	0
L	8	4	1	10

Aby sme sa vyhli tomuto problému, pridáme ku každému políčku najskôr nejakú malú hodnotu, **pseudocount**, napr. 0,5:

	1	2	3	4
A	2,5	6,5	9,5	0,5
L	8,5	4,5	1,5	10,5

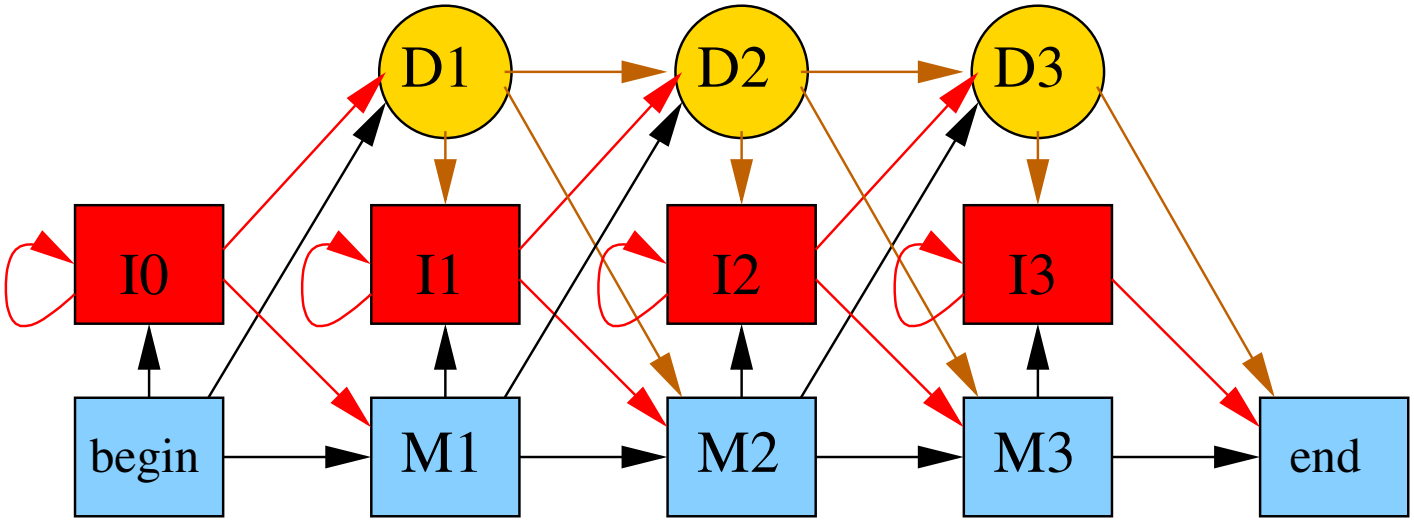
Potom postupujeme ako predtým

Profilové HMM

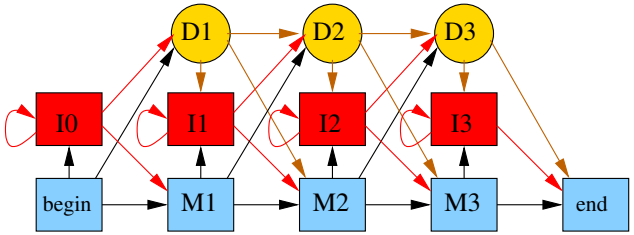
Rozšírime profil o inzercie a delécie

PSSM profil ako HMM:

Profilové HMM: match state, insert state, delete state



Konštrukcia profilového HMM



- Začneme z viacnásobného zarovnania
- Stĺpcom s málo medzerami priradíme match stavy,
  ostatné budú v insert stavoch
- V každom stĺpci zrátame $E_i(a)$: počet výskytov a
- Pravdepodobnosť emisie $e_i(a) = \frac{E_i(a)}{\sum_b E_i(b)}$
- Pridáme “pseudocounts”, aby sme nemali nulové položky
  $e_i(a) = \frac{E_i(a)+c}{\sum_b (E_i(b)+c)}$
- Pravdepodobnosti prechodu nastavíme podľa medzier v zarovnaní
- Veľmi podobné sekvencie môžeme použiť s menšou váhou

Použitie profilov a profilových HMM

Odkiaľ vziať profily/profilové HMM?

- Databáza Pfam: rodiny domén reprezentované ako profilové HMM
- PSI-Blast: PSSM iteratívne zo skupiny podobných proteínov
- PSSM sa používajú aj na reprezentáciu motívov v DNA
  (napr. väzobné miesta transkripčných faktorov)

Nájdi výskyty profilu v proteínovej sekvencii

- Podobné problému lokálneho zarovnania
- PSSM profily: dynamické programovanie, penalta za medzery
- Profilové HMM: Viterbiho algoritmus (mierne modifikovaný)

Výsledné skóre alebo pravdepodobnosť sa použije na rozhodnutie, či proteín patrí do rodiny

Štruktúra proteínov, zhrnutie

(protein structure prediction, protein folding)

Vstup: sekvencia proteínu X

Výstup: 3D pozície atómov alebo aminokyselín

(1) Ab initio metódy

(2) Metódy založené na homológii

(3) Metódy založené na hlbokých neurónových sieťach

Praktické prístupy k určovaniu štruktúry proteínu X

- Pozrieme do PDB, či má X známu štruktúru
- V databázach môžeme nájsť aj štruktúru pre X od AlphaFold
- Môžeme spustiť AlphaFold na X
- Môžeme hľadať homológy X so známou štruktúrou
  resp. domény v X pomocou profilov

Využitie proteínových štruktúr

- Presnejšie definovanie domén v databázach ako Pfam
- Skúmanie efektu mutácií na štruktúru / funkciu
- Modelovanie interakcií medzi proteínmi, proteínových komplexov
- Objavovanie nových liečiv, ktoré sa budú viazať na určitý proteín
- Dizajn umelých proteínov s vhodnými vlastnosťami

Funkcia proteínu

- Pre niektoré proteíny určená laboratórne
- Na ďalšie proteíny prenášame bioinformaticky pomocou podobnosti sekvencie, prítomnosti domén, polohy v genóme a ďalších dát
- Swissprot/Uniprot zhromažďuje údaje o funkcii proteínov
- Klasifikácia proteínov pomocou Gene ontology (GO)
  Príklad pojmu v GO:
  Accession: GO:0034220
  Name: ion transmembrane transport
  Ontology: biological_process
  Definition: A process in which an ion is transported from one side of a membrane to the other by means of some agent such as a transporter or pore.
  Comment: Note that this term is not intended for use in annotating lateral movement within membranes.

Gene ontology (GO)

Hierarchická štruktúra pojmov: