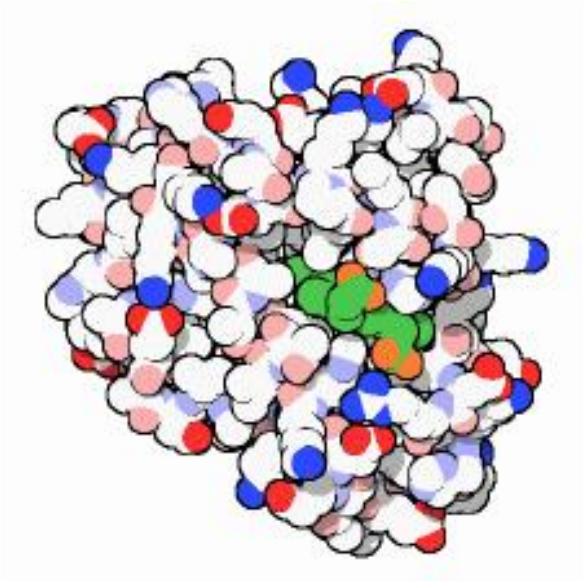
Oznamy

- Budúci utorok: odovzdanie DÚ2, zverejnenie DÚ3
- Termíny na konci semestra
  – DÚ3 utorok 13.12., správy zo journal clubu piatok 16.12.

Štruktúra a funkcia proteínov

Broňa Brejová

24.11.2022



Proteíny

Reťazce 20 rôznych aminokyselín s rôznymi chemickými vlastnosťami:

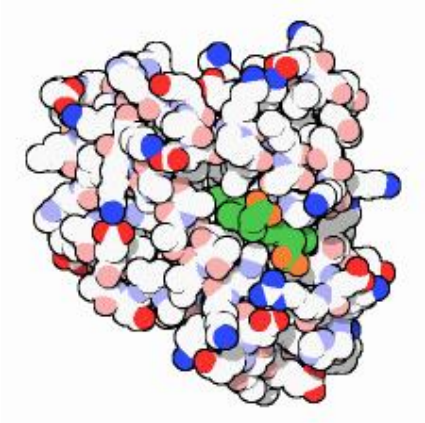
Aminokyselina	Postranný reťazec	Jeho vlastnosti
Alanín (A)	-CH3	hydrofóbny
Arginín (R)	-(CH2)3NH-C(NH)NH2	bázický
Asparagín (N)	-CH2CONH2	hydrofilný
Kyselina asparágová (D)	-CH2COOH	kyslý
Cysteín (C)	-CH2SH	hydrofóbny
Kyselina glutámová (E)	-CH2CH2COOH	kyslý
Glutamín (Q)	-CH2CH2CONH2	hydrofilný
Glycín (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

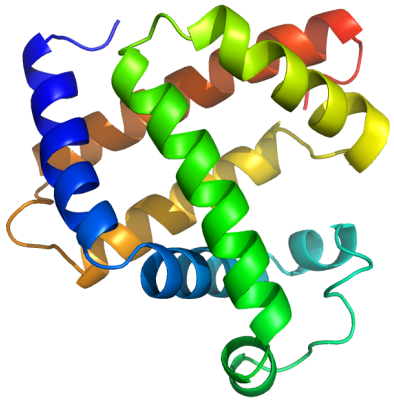
Štruktúra proteínov

- **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)
  menej presná, vhodná na veľké proteínové komplexy
- Náročný a drahý proces
- Databáza štruktúr PDB
  198 000 proteínových štruktúr
  (UniProt má 230 miliónov sekvencií)

Určovanie štruktúry proteínov ako bioinformatický problém

(protein structure prediction, protein folding)

Vstup: sekvencia proteínu

Výstup: 3D pozície atómov alebo aminokyselín

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

Praktické prístupy k určovaniu štruktúry proteínu

Pre daný proteín X:

- Pozrieme do PDB, či má X **známu štruktúru**
- Ak nič, hľadáme **proteín podobný na** X v PDB (BLAST)
  X má asi podobnú štruktúru (**homology modelling**)
- Ak nič, hľadáme vzdialenejšie homológy senzitívnejšími prístupmi,
  cez **profily** (táto prednáška)
- Ešte vzdialenejšie homológy sa dajú hľadať technikou **protein threading**
- V posledných rokoch veľké pokroky v predpovedaní štruktúry pomocou
  hlbokých neurónových sietí, ktoré využívajú veľké počty nájdených
  homológov
- **Predpovedané štruktúry** sa tiež dajú nájsť v databázach

Protein threading

- Aj proteíny s pomerne odlišnou sekvenciou môžu mať podobnú štruktúru
- Môžeme skúsiť “napasovať” proteín na každú známu štruktúru
- Určitý typ zarovnania, ale pri skórovaní uvažujeme aj interakcie medzi amino kyselinami blízko v štruktúre
- Výpočtovo ťažký problém

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.
- 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

- Nedá sa využiť na proteíny bez homológov (napr. umelo vytvorené)

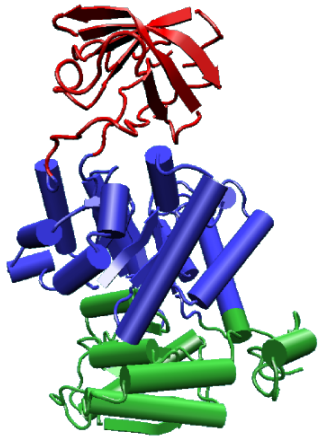
Praktické prístupy k určovaniu štruktúry proteínu

Pre daný proteín X:

- Pozrieme do PDB, či má X **známu štruktúru**
- Ak nič, hľadáme **proteín podobný na** X v PDB (BLAST)
  X má asi podobnú štruktúru (**homology modelling**)
- Ak nič, hľadáme vzdialenejšie homológy senzitívnejšími prístupmi,
  cez **profily** (táto prednáška)
- Ešte vzdialenejšie homológy sa dajú hľadať technikou **protein threading**
- V posledných rokoch veľké pokroky v predpovedaní štruktúry pomocou
  hlbokých neurónových sietí, ktoré využívajú veľké počty nájdených
  homológov
- **Predpovedané štruktúry** sa tiež dajú nájsť v databázach

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

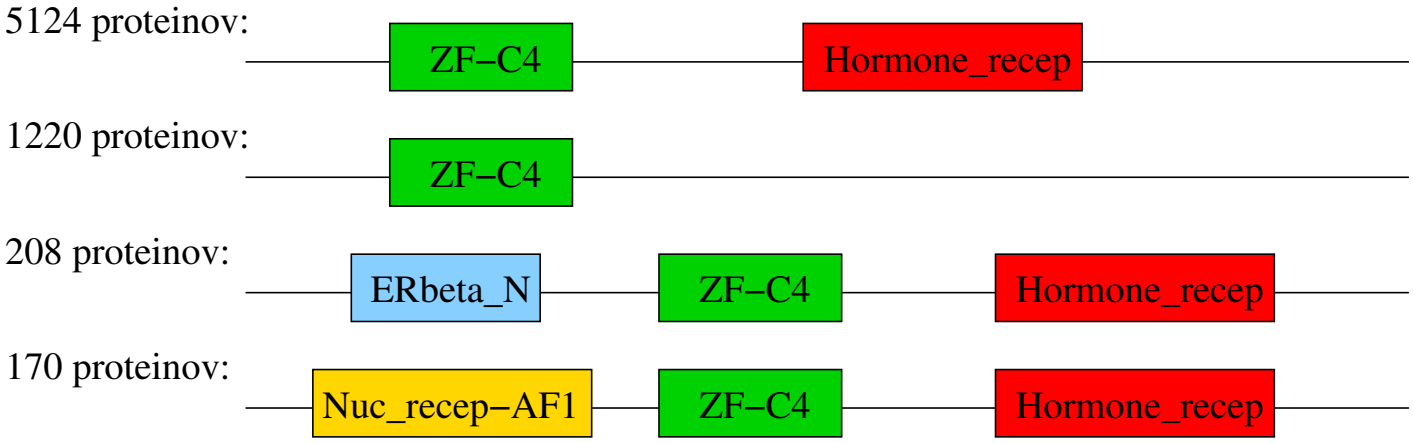
Domény v proteínoch rozdelené do viac ako 18 tisíc rodín

77% proteínov aspoň jedna známa doména

53% proteínových sekvencií pokrývajú známe domény

Príklad:

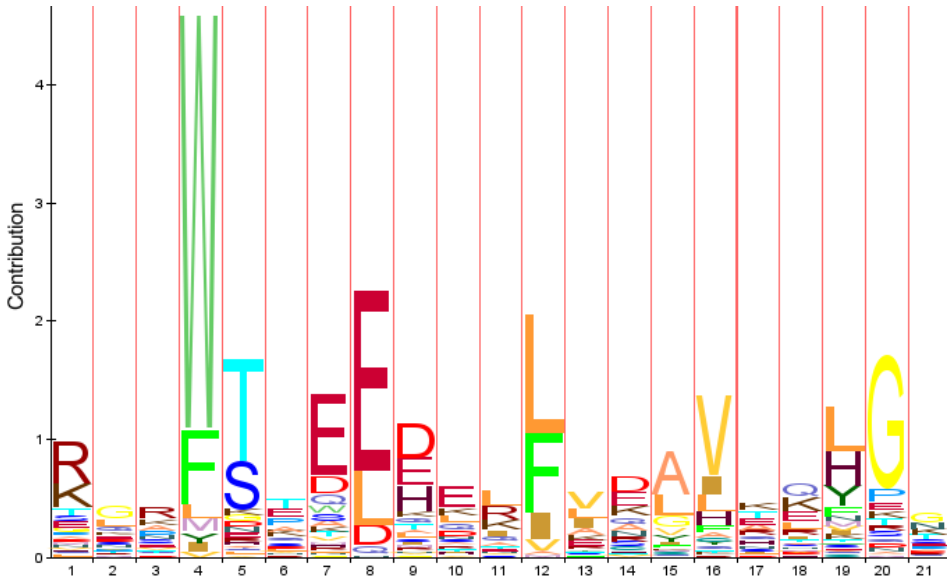
4 z 91 architektúrz obsahujúcich doménu Zinc finger, C4 type (Pfam)



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

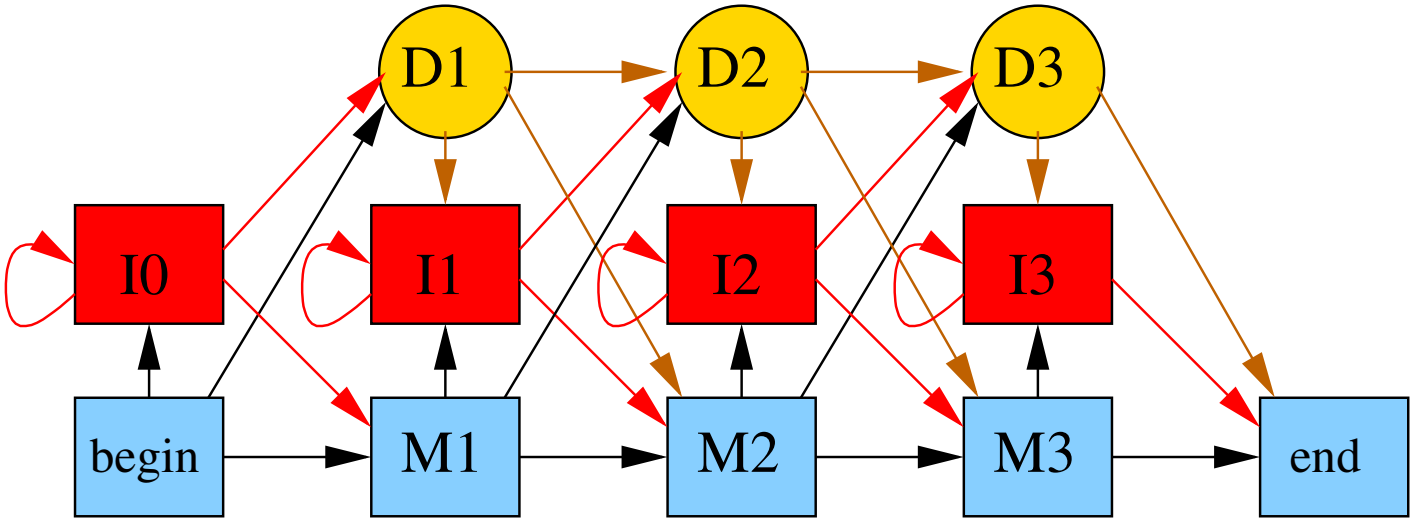
Potom postupujeme ako predtým

Profilové HMM

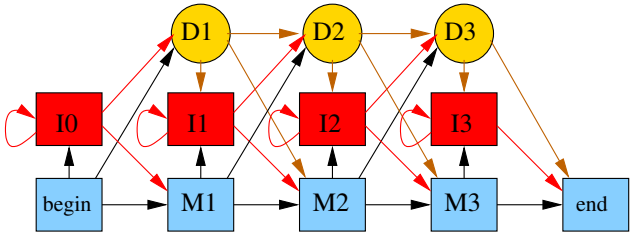
Rozšírime profil o inzercie a delécie

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

Praktické prístupy k určovaniu štruktúry proteínu

Pre daný proteín X:

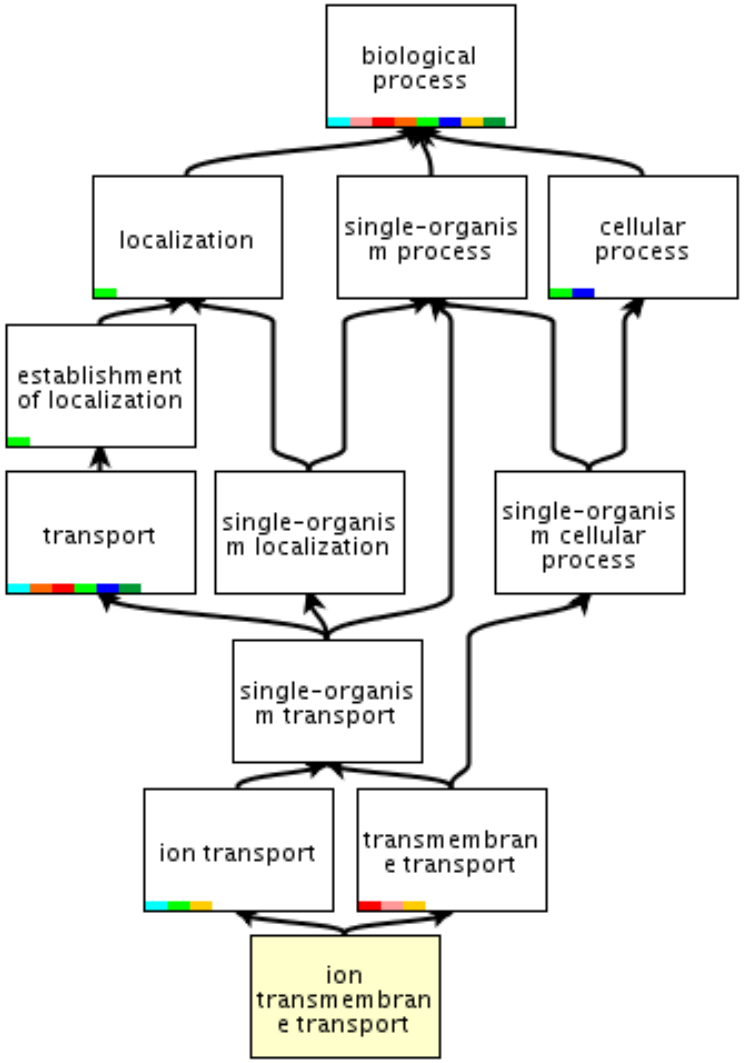
- Pozrieme do PDB, či má X **známu štruktúru**
- Ak nič, hľadáme **proteín podobný na** X v PDB (BLAST)
  X má asi podobnú štruktúru (**homology modelling**)
- Ak nič, hľadáme vzdialenejšie homológy senzitívnejšími prístupmi,
  cez **profily** (táto prednáška)
- Ešte vzdialenejšie homológy sa dajú hľadať technikou **protein threading**
- V posledných rokoch veľké pokroky v predpovedaní štruktúry pomocou
  hlbokých neurónových sietí, ktoré využívajú veľké počty nájdených
  homológov
- **Predpovedané štruktúry** sa tiež dajú nájsť v databázach

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:



Ďalšie použitia HMM a profilov na proteíny

- Určovanie sekundárnej štruktúry
- Určovanie transmembránových proteínov a signálnych peptidov
- Určovanie funkčných motívov a posttranslačných modifikácií (databáza PROSITE)

Cyclic nucleotide-binding domain signature 1:

`[LIVM]-[VIC]-x-{H}-G-[DENQTA]-x-[GAC]-{L}-x-[LIVMFY](4)-x(2)-G`