BIOINFORMATIKA V PRAXI – CVIČENÍ 2

SEQUENCE ALIGNMENT

STUDIJNÍ MATERIÁLY

Studijní materiály předmětu **C2130 Úvod do chemoinformatiky a bioinformatiky**, přednáška **Sequence alignment**.

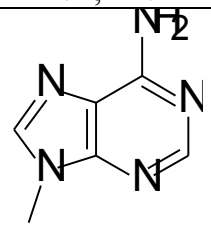
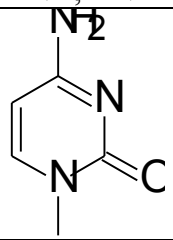
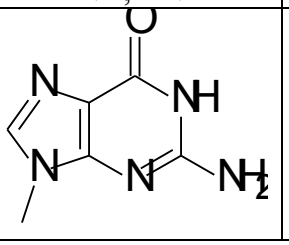
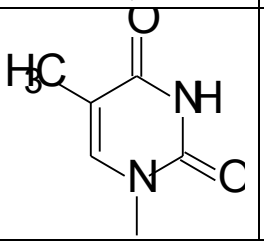
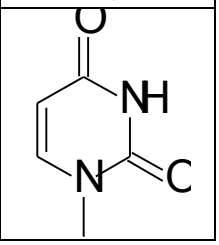
ÚVOD

Sekvence v biochemii

Při práci s biologickými makromolekulami (nukleové kyseliny, proteiny, sacharidy) hovoříme často o jejich sekvenci. Pod tímto pojmem rozumíme pořadí a identitu jednotlivých stavebních prvků, z nichž se makromolekula skládá (v případě sacharidů i typ vazby mezi sousedními jednotkami). Pro jednotlivé stavební prvky existují obvykle třípísmenné zkratky, v bioinformatice však častěji používáme jednopísmenné zkratky. V tomto předmětu se budeme zabývat jen problematikou nukleových kyselin a proteinů. V případě sacharidů je celá situace komplikovaná množstvím různých stavebních jednotek a možností větvení řetězce. S tím souvisí větší náročnost určení sekvence oligo-/poly-sacharidu a též menší počet dostupných sacharidových sekvencí v databázích.

Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny (DNA, RNA) jsou tvořeny kombinací čtyř prvků (nukleových bazí) spojených prostřednictvím tzv. cukr-fosfátové kostry. V případě DNA se jedná o adenin, cytosin, guanin a thymin, v případě RNA pak adenin, cytosin, guanin a uracil. Tyto báze jsou uvedeny v přiložené tabulce.

Adenin	Cytosin	Guanin	Thymin	Uracil
Ade	Cyt	Gua	Thy	Ura
A	C	G	T	U
DNA, RNA	DNA, RNA	DNA, RNA	DNA	RNA
				

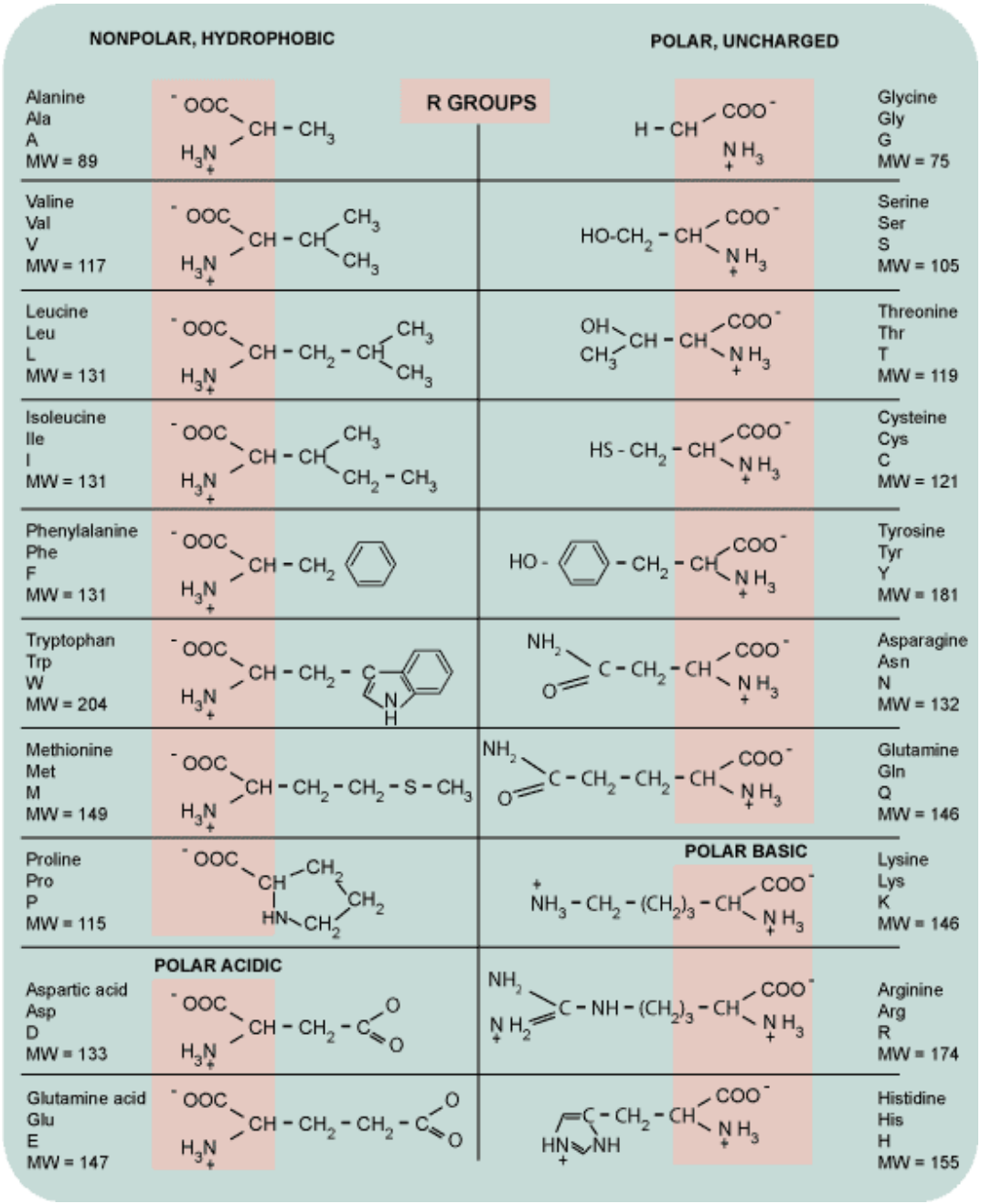
Pozn.: Používaní zkratek a názvů pro různé části nukleových kyselin (nukleotidy, nukleosidy, báze) je poměrně komplikované. V případě zájmu lze detailní doporučení názvoslovné komise nalézt např. na stránkách: http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/naabb.html

Sekvenci nukleové kyseliny zapisujeme v pořadí **od 5'-konce** (nukleotid s volnou OH skupinou na 5. uhlíku) směrem k 3'-konci (nukleotidu s volnou OH skupinou na uhlíku číslo 3). V tomto směru je také v živých organismech DNA resp. RNA syntetizována.

Proteiny

Proteiny jsou sestaveny z 20 standardních aminokyselin (21, počítáme-li selenocystein) – viz tabulka. Dle různých charakteristik můžeme proteinogenní aminokyseliny rozdělit do několika skupin – nejčastěji rozlišujeme aminokyseliny nabité (kyselé a bazické), nenabité

polární, hydrofobní a malé (s krátkým postranním řetězcem). Při analýze proteinových sekvencí obvykle neuvažujeme možné posttranslační modifikace, jako je např. hydroxylace či glykosylace.



Není-li uvedeno jinak, zapisujeme sekvenci proteinů od N-konce (volná NH_2- skupina) k C-konci (volná COOH- skupina). Tento směr je opět totožný se směrem, v němž je protein v živém organismu syntetizován.

Sekvenční přiložení (Sequence alignment)

Porovnání dvou (nebo více) sekvencí mezi sebou označujeme jako sekvenční přiložení (častěji anglicky sequence alignment). Cílem je určení vzájemné podobnosti těchto sekvencí. Vizuálním výstupem je zarovnání sekvencí tak, aby sobě odpovídající residua ležela nad sebou. Detaily viz. přednáška Sequence alignment předmětu C2130.

VYUŽITÍ SEKVENČNÍHO PŘILOŽENÍ PRO IDENTIFIKACI GENU V ONLINE DATABÁZÍCH

Pro vyhledávání v internetových databázích lze použít několik přístupů (viz. Bioinformatika v praxi – cvičení 1). Pokud máme jako vstupní údaj sekvenci genu/proteinu, využíváme hledání na základě podobnosti sekvencí. Typickou ukázkou je aplikace **BLAST** na serveru NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

ÚKOL 1

Pomocí aplikace BLAST identifikujte následující sekvence:

Sekvence 1:

Název genu/proteinu:
Číslo záznamu v databázi NCBI:
Míra shody zadané a nalezené sekvence:

Sekvence 2:

Název genu/proteinu:
Číslo záznamu v databázi NCBI:
Míra shody zadané a nalezené sekvence:

Sekvence 3:

Název genu/proteinu:
Číslo záznamu v databázi NCBI:
Míra shody zadané a nalezené sekvence:

VYHLEDÁNÍ PODOBNÝCH SEKVENCÍ A URČENÍ PŘÍBUZNOSTI

Výhodou použití sequence alignmentu je schopnost nalezení nejen shodného záznamu, ale i záznamů podobných. Tak lze na základě podobných sekvencí identifikovat i dosud neznámou sekvenci a odhadnout její „příbuzenské“ vztahy.

ÚKOL 2

Identifikujte zadanou sekvenci a nalezněte 4 další nejpodobnější sekvence. Použijte aplikaci BLAST.

Sekvence:

Číslo záznamu	Protein	Organismus	Score

Volitelný ÚKOL
Z nalezených sekvencí v úkolu 2 sestavte Multiple sequence alignment a vytvořte fylogenetický strom (phylogenetic tree).

VLIV POUŽITÉ MATICE NA VÝSLEDEK ALIGNMENTU

Jedním z parametrů, který může ovlivnit výsledek alignmentu je použitá matice. Většina programů detekuje automaticky nukleotidovou sekvenci a použije příslušnou matici, v případě proteinových sekvencí je však situace komplikovanější.

ÚKOL 3
Následující sekvence **identifikujte** a přiložte v programu **ClustalW** (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Poté proveďte alignment s použitím matice PAM, BLOSUM, Gonnet a ID a výsledky porovnejte. Která matice je použita při základním nastavení?

Sekvence 1:

Sekvence 2:

Sekvence 3:

Sekvence 4:

VLIV MEZER NA VÝSLEDEK ALIGNMENTU

Možnost vložení mezer významně zvyšuje šance na úspěšný alignment sekvencí. Při změně nastavení parametrů se mění skóre určující podobnost sekvencí a ty tak mají vliv i na určení vzájemné příbuznosti sekvencí. Při špatném nastavení pak umožňují provést alignment i u naprosto nepodobných sekvencí.

ÚKOL 4
Proveďte multiple alignment následujících sekvencí pomocí programu ClustalW. V prvním případě nastavte parametr GAP OPEN na 1, ve druhém případě na 100 a výsledky porovnejte.

Sekvence 1:

Sekvence 2:

Sekvence 3:

Gap open = 1
Počet zcela identických residuí:

Gap open = 100
Počet zcela identických residuí:

VOLITELNÝ ÚKOL

Pomocí programu ClustalW proveďte Multiple sequence alignment následujících sekvencí při základním (default) nastavení parametrů. V druhém okně prohlížeče proveďte totéž přiložení, ale nastavte parametr Gap open na hodnotu „5“. Výsledky porovnejte.

Sekvence 1:

Sekvence 2:

Sekvence 3:

Sekvence 4:

ALIGNMENT NA GENOVÉ vs. PROTEINOVÉ ÚROVNI

Často se setkáváme se situací, kdy alignment na genové úrovni není pro naše potřeby vhodný. Je tedy zapotřebí výsledné sekvence porovnat i na úrovni proteinu.

ÚKOL 5

U následujících dvojic sekvencí proveďte sequence alignment na genové úrovni (program **lalign** – http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). Tyto sekvence přeložte do sekvence aminokyselin programem **Translate** – server ExPassy (http://www.expasy.ch/tools/dna.html) a proveďte alignment těchto – přeložených sekvencí. Porovnejte množství nespárovaných nukleotidů/aminokyselin (resp. procento identity) v obou případech.

Sekvence A1

Sekvence A2

Identita nt sekvencí a1-a2:
Identita ak sekvencí a1-a2:

Sekvence B1

Sekvence B2

Identita nt sekvencí b1-b2:
Identita ak sekvencí b1-b2:

VYUŽITÍ ALIGNMENTU PRO INTERPRETACI VÝSLEDKŮ SEKVENACE

Běžným užitím sequence alignmentu je analýza výstupu po sekvenaci. Detekujeme tak mutace (inzerce, delece, substituce), které mohou mít vliv na sekvenci kódovaného proteinu – záměna aminokyseliny, posunutí čtecího rámce, vytvoření nebo odstranění STOP kodonu, atd. Můžeme aplikovat pairwise alignment nebo u více sekvencí multiple alignment.

ÚKOL 6

Následující sekvence obsahují inzerce. Určete, která z obou sekvencí je vhodnější pro budoucí práci s proteinem a proč. Pro alignment použijte vámi zvolený program (lalign, ClustalW, případně jiný).

Původní gen:

Sekvence 1:

Sekvence 2:

Vhodnější sekvence:
Důvod:

ÚKOL 7

Následující sekvence obsahují různé mutace. Určete, které z těchto sekvencí jsou použitelné pro budoucí práci s proteinem a proč. Označte nejvhodnější sekvenci.

Originální sekvence:

Sekvence 1:

Sekvence 2:

Sekvence 3:

Sekvence 4:

Sekvence	Charakter mutace z hlediska genu	Charakter mutace z hlediska proteinu	Použitelná pro další práci (ANO/NE) a proč
1			
2			
3			
4			

PROBLÉM REPETIC

Při porovnávání dvou celkově podobných sekvencí užíváme zpravidla metody globálního alignmentu. V případě sekvencí, které jsou podobné jen v určité své části (např. jedné z domén), je vhodnější použít lokální alignment. Ten má svůj význam i v případě proteinů s tzv. repeticemi, tj. opakujícími se úseky, které jsou si navzájem podobné.

ÚKOL 8

Proveďte alignment následujících dvou sekvencí programem Align (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/) s použitím algoritmu Needle (globalní alignment) a Water (lokální alignment). V obou případech nastavte parametr Gap open na 15.0 a výsledky porovnejte.

Sekvence 1

Sekvence 2

	Identické ak	Podobné ak	Mezery
Needle			
Water			

Výše uvedené sekvence jsou příkladem repetic, tj. opakujících se podobných (homologních) úseků v rámci jedné sekvence. Přítomnost repetic lze zjistit/ověřit programem **RADAR** (http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/).

ÚKOL 9

V sekvencích z úkolu 8 detekujte repetice pomocí programu Radar. Uveďte počet repetic zjištěných u každé sekvence:

Sekvence 1:
Sekvence2:

Sekvenci s více repeticemi rozdělte na jednotlivé repetice a proveďte multiple alignment pomocí programu ClustalW. Která z residuí jsou v repeticích konzervována (zcela, částečně)? Využijte tzv. consensus.