Bioinformatika

C6215 Pokročilá biochemie a její metody

Podzim 2019

Michaela Wimmerová

Osnova

- **Úvod do bioinformatiky**
  - Definice, molekulárně biologická data, databáze
  - Rozdělení databází, bioinformatická centra
- **Manipulace se sekvencemi**
  - Sekvence biomakromolekul, aminokyseliny, báze, alignment
  - Význam alignmentu, přiložení páru sekvencí a vícenásobné přiložení
- **Predikce struktury proteinů**
  - Predikce 2-D struktury proteinů, predikce 3-D struktury proteinů
  - Threading, Homology modeling, *Ab initio*
- **Proteinové rodiny**
  - Rodiny, domény, sekvenční vzory
  - Patterns, profiles, fingerprints, databáze
- **Predikce genů**
  - Predikce genů u prokaryot a eukaryot, predikční nástroje a postupy

Bioinformatika – definice

- Existuje mnoho různých definic – nejednotnost odráží dynamický rozvoj oboru.
- **Bioinformatika** – vědní disciplína, která využívá výpočetní techniku (počítače) pro shromažďování, vyhledávání, manipulaci a distribuci informací o biologických makromolekulách (DNA, RNA, proteiny). *Luscombe et al.*
- **Bioinformatika** – nová disciplína na rozhraní počítačových věd, informačních technologií, matematiky a biologie a zahrnuje studium a praktické uchovávání, vyhledávání, zobrazování, manipulaci s modelování biologických dat. *R. Pantůček*
- **Bioinformatika** (zaměření na sekvence) vs. výpočetní biologie (všechny oblasti biologie zahrnující výpočty).
- **Bioinformatika**: vývoj výpočetních nástrojů a databází + jejich aplikace

Bioinformatika – aplikace

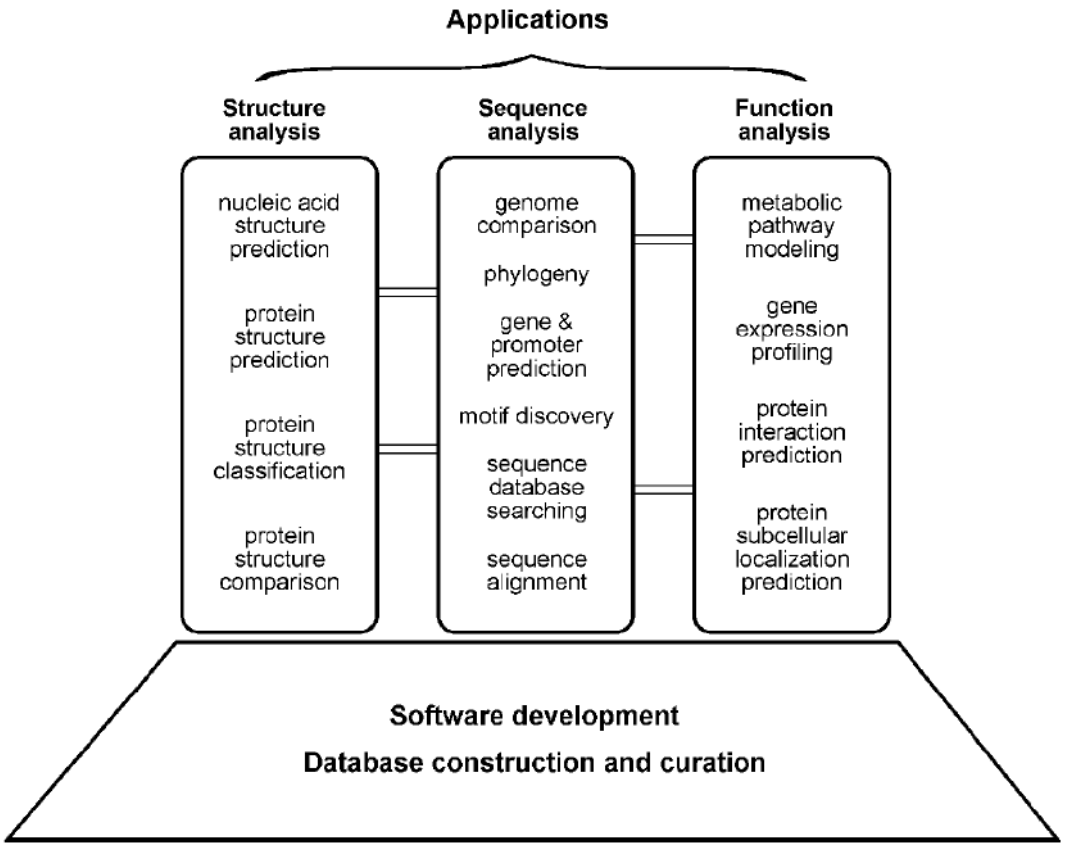


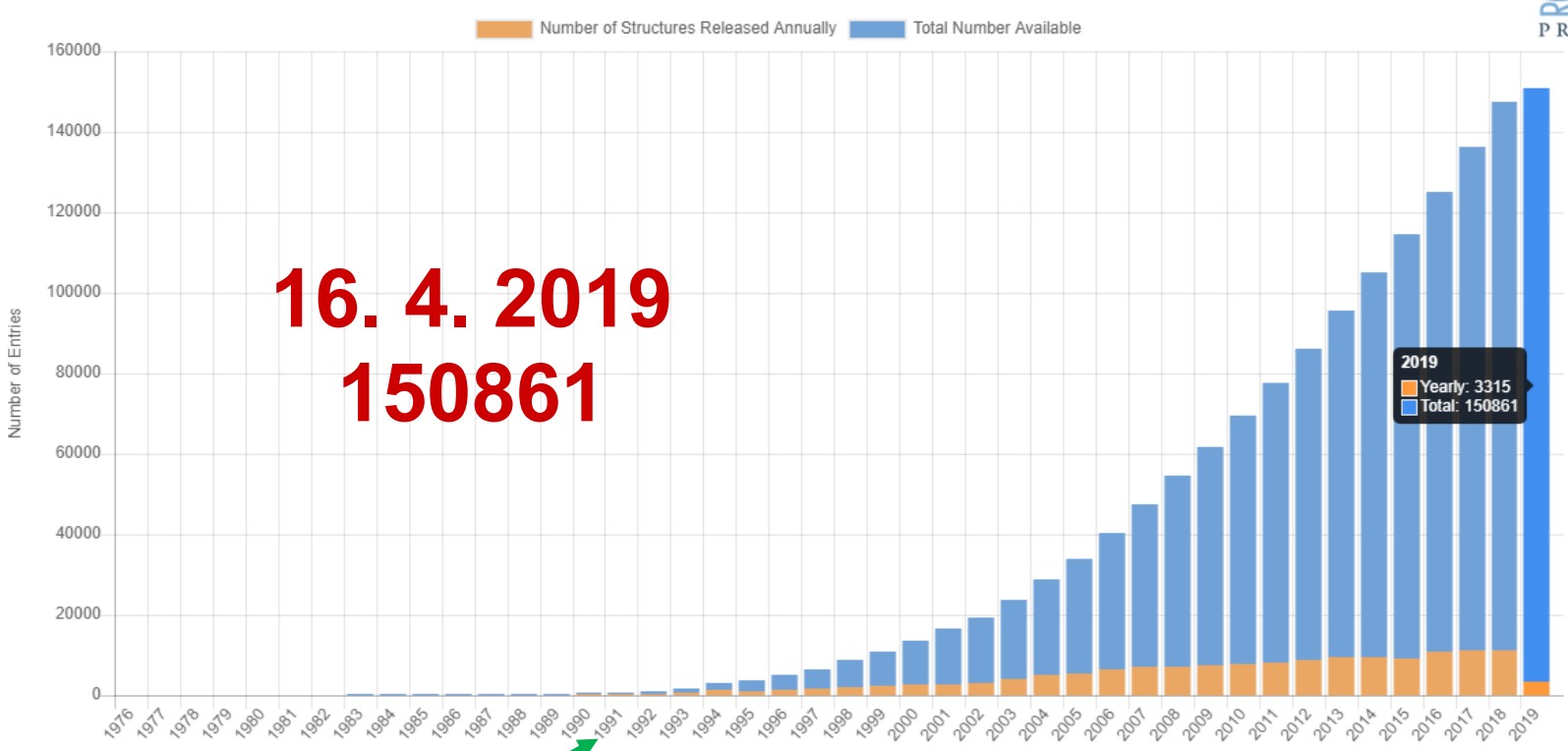
Figure 1.1: Overview of various subfields of bioinformatics. Biocomputing tool development is at the foundation of all bioinformatics analysis. The applications of the tools fall into three areas: sequence analysis, structure analysis, and function analysis. There are intrinsic connections between different areas of analyses represented by bars between the boxes.

ESSENTIAL BIOINFORMATICS,
Jin Xiong, 2006

Molekulárně biologická data, databáze

- **Molekulárně biologická data**: sekvence a struktury proteinů a nukleových kyselin, genomy, struktury (introny, exony) a funkce genů, metabolické a signální dráhy, organely...
- Rozvoj výkonných technologií (**automatické sekvencování, MALDI-TOF, NMR spektroskopie, proteinová krystalografie)** koncem minulého století vedl k **obrovskému** nárůstu množství biologických dat.
- **Nutnost organizovaného ukládání, skladování a manipulace s velkým množstvím dat vedla ke vzniku bioinformatiky.**

Molekulárně biologická data, databáze



16. 4. 2019
150861

První výskyt termínu bioinformatika

https://www.rcsb.org/stats/growth/overall

Rozdělení databází

- **Primární databáze:** anotované sekvence nukleových kyselin nebo proteinů
- **Sekundární databáze:** informace odvozené z primárních databází ve formě charakteristických vzorů sekvencí, tj. funkčních nebo strukturních motivů získaných srovnáním primárních dat (sekvencí).
- **Strukturní databáze:** struktury proteinů (nukleových kyselin) a jejich anotace.
- **Genomové databáze:** genomy organismů.
- Databáze **specializované** vs. **univerzální**

Rozdělení databází

Primární

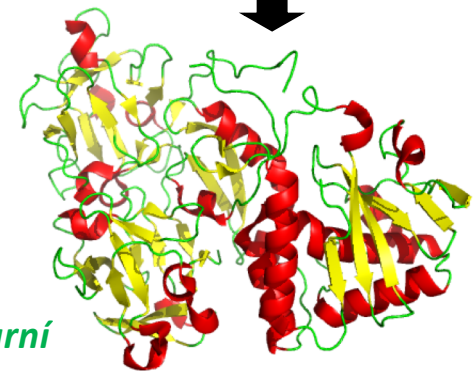
```
EDRPIKFSTEGATSQSYKQFIEALRERLRGGLIHDIPVLPDPTTLQERNRYIT
VELSNSDTESIEVGIDVTNAYVVAYRAGTQSYFLRDAPSSASDYLFTGTDQHS
LPFYGTYGDLERWAHQSRQQIPLGLQALTHGISFFRSGGNDNEEKARTLIVII
QMVAEAARFRYISNRVRVSIQTGTAFQPDAAMISLENNWDNLSRGVQESVQDT
FPNQVTLTNIRNEPVIVDSLSHPTVAVLALMLFVCNPPNIVEKSKICSSRYEP
TVRIGGRDGMCVDVYDNGYHNGNRIIMWKCKDRLEENQLWTLKSDKTIRSNGK
```

Ribosome-inactivating protein, subdomain 1

Ribosome-inactivating protein, subdomain 2

Ricin B-like lectins

Sekundární



Strukturní

Specializované

Univerzální

Rozdělení databází

Nucleic Acids Research

http://www.oxfordjournals.org/our_journals/nar/database/a/

2019: 1613 databází

[Nucleotide Sequence Databases]
[International Nucleotide Sequence Database Collaboration]
[Coding and non-coding DNA]
[Gene structure, introns and exons, splice sites]
[Transcriptional regulator sites and transcription factors]
[RNA sequence databases]
[Protein sequence databases]
[Structure Databases]
[Genomics Databases (non-vertebrate)]
[Metabolic and Signaling Pathways]
[Human and other Vertebrate Genomes]
[Human Genes and Diseases]
[Microarray Data and other Gene Expression Databases]
[Proteomics Resources]
[Other Molecular Biology Databases]
[Organelle databases]
[Plant databases]
[Immunological databases]

The 26th annual Nucleic Acids Research database issue and Molecular Biology Database Collection

Daniel J. Rigden[1,*] and Xosé M. Fernández[2]

[1]Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, UK and [2]Institut Curie, 25 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

ABSTRACT

The 2019 Nucleic Acids Research (NAR) Database Issue contains 168 papers spanning molecular biology. Among them, 64 are new and another 92 are updates describing resources that appeared in the Issue previously. The remaining 12 are updates on databases most recently published elsewhere. This Issue contains two Breakthrough articles, on the Virtual Metabolic Human (VMH) database which links human and gut microbiota metabolism with diet and disease, and Vibrism DB, a database of mouse brain anatomy and gene (co-)expression with sophisticated visualization and session sharing. Major returning nucleic acid databases include RNAcentral, miRBase and LncRNA2Target. Protein sequence databases include UniProtKB, InterPro and Pfam, while wwPDB and RCSB cover protein structure. STRING and KEGG update in the section on metabolism and pathways. Microbial genomes are covered by IMG/M and resources for human and model organism genomics include Ensembl, UCSC Genome Browser, GENCODE and Flybase. Genomic variation and disease are well-covered by GWAS Catalog, PopHumanScan, OMIM and COSMIC, CADD being another major newcomer. Major new proteomics resources reporting here include iProX and jPOSTdb. The entire database issue is freely available online on the NAR website (https://academic.oup.com/nar). The NAR online Molecular Biology Database Collection has been updated, reviewing 506 entries, adding 66 new resources and eliminating 147 discontinued URLs, bringing the current total to 1613 databases. It is available at http://www.oxfordjournals.org/nar/database/c.

entirely new databases account for 64 (Table 1) while 92 cover resources that have previously appeared in the Issue and now return with updates. The remaining 12 papers are updated on databases last published elsewhere (Table 2). The usual categorization is again used: after reports from the major resource collections at the U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI), the European Bioinformatics Institute (EBI) and the BIG Data Center at the Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences there are these groupings: (i) nucleic acid sequence and structure, transcriptional regulation; (ii) protein sequence and structure; (iii) metabolic and signaling pathways, enzymes and networks; (iv) genomics of viruses, bacteria, protozoa and fungi; (v) genomics of human and model organisms plus comparative genomics; (vi) human genomic variation, diseases and drugs; (vii) plants and (viii) other topics, such as proteomics databases. Many interdisciplinary databases defy easy categorization, encouraging readers to browse the whole issue. The NAR online Molecular Biology Database Collection, classifies databases more finely using 15 categories and 41 subcategories, and can be found at http://www.oxfordjournals.org/nar/database/c.

Among the major global centers, the NCBI (1) reports on new and expanded literature resources, including PubMed Labs (2) a new interface to PubMed, and new sequence database search options. The EBI paper (3) reports on the new databases Single Cell Expression Atlas and PDBe-Knowledgebase. The latter encompasses FunPDBe, an initiative to better harness structural bioinformatics methods and international collaborators to annotate the protein structural data in PDBe. An interesting facility reported by the BIG Data Center paper (4) is their BIG Search which not only scans across the Center's many resources but accesses indexes from non-Center partner databases on topics as diverse as lncRNAs, plant transcription factors and autophagy-related proteins.

Major returning resources in the 'Nucleic acid databases' section include miRBase (5) which focuses on criteria to

https://academic.oup.com/nar/issue/47/D1

EBI/NCBI/DDBJ

Instituce zabývající se shromažďováním, správou a poskytováním dat a informací a vývojem analytických nástrojů.

EBI

Evropský institut pro bioinformatiku

European Bioinformatics Institute

NCBI

Národní centrum pro biotechnologické informace

NCBI
National Center for Biotechnology Information

National Center for Biotechnology Information

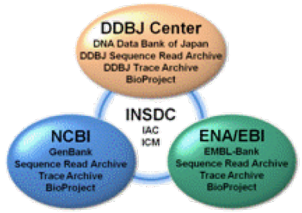
DDBJ Center

DDBJ
DNA Data Bank of Japan

The DNA Data Bank of Japan Center

http://www.ebi.ac.uk/ — http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ — http://www.ddbj.nig.ac.jp/

ENA ⟷ GenBank ⟷ DDBJ



EBI

The European Bioinformatics Institute in 2018: tools, infrastructure and training

Charles E. Cook*, Rodrigo Lopez, Oana Stroe, Guy Cochrane, Cath Brooksbank, Ewan Birney and Rolf Apweiler

European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK

Received October 03, 2018; Revised October 19, 2018; Editorial Decision October 19, 2018; Accepted November 11, 2018

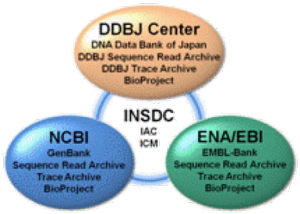
ABSTRACT

The European Bioinformatics Institute (https://www.ebi.ac.uk/) archives, curates and analyses life sciences data produced by researchers throughout the world, and makes these data available for re-use globally (https://www.ebi.ac.uk/). Data volumes continue to grow exponentially: total raw storage capacity now exceeds 160 petabytes, and we manage these increasing data flows while maintaining the quality of our services. This year we have improved the efficiency of our computational infrastructure and doubled the bandwidth of our connection to the worldwide web. We report two new data resources, the Single Cell Expression Atlas (https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/), which is a component of the Expression Atlas; and the PDBe-Knowledgebase (https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pdbe-kb), which collates functional annotations and predictions for structure data in the Protein Data Bank. Additionally, Europe PMC (http://europepmc.org/) has added preprint abstracts to its search results, supplementing results from peer-reviewed publications. EMBL-EBI maintains over 150 analytical bioinformatics tools that complement our data resources. We make these tools available for users through a web interface as well as programmatically using application programming interfaces, whilst ensuring the latest versions are available for our users. Our training team, with support from all of our staff, continued to provide on-site, off-site and web-based training opportunities for thousands of researchers worldwide this year.

resources (https://w
archival resources s
searchers and know
resources through cu
are available through
cessible using applic
that provide users w
access. Additionally,
through web interfa
analyse their own da
EBI and other public
infrastructure in gre

A fundamental te
data, tools and infras
and that data are re
structured and stanc
people and machine
of a worldwide infra
and many of our re
partners around the
Continued internati
ing that the life scie
access archiving and
of data submitted to
the globe. EMBL-EI
ture (https://www.eli
actively engaged in
global infrastructure

We continuously
sultation with our us
advances in research
provide those users
take their work. In th
data resources, descr
troduced this year ar



NCBI

Database resources of the National Center for Biotechnology Information

Eric W. Sayers*, Richa Agarwala, Evan E. Bolton, J. Rodney Brister, Kathi Canese, Karen Clark, Ryan Connor, Nicolas Fiorini, Kathryn Funk, Timothy Hefferon, J. Bradley Holmes, Sunghwan Kim, Avi Kimchi, Paul A. Kitts, Stacy Lathrop, Zhiyong Lu, Thomas L. Madden, Aron Marchler-Bauer, Lon Phan, Valerie A. Schneider, Conrad L. Schoch, Kim D. Pruitt and James Ostell

National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA

Received September 19, 2018; Revised October 17, 2018; Editorial Decision October 18, 2018; Accepted October 18, 2018

ABSTRACT

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) provides a large suite of online resources for biological information and data, including the GenBank® nucleic acid sequence database and the PubMed database of citations and abstracts published in life science journals. The Entrez system provides search and retrieval operations for most of these data from 38 distinct databases. The E-utilities serve as the programming interface for the Entrez system. Augmenting many of the web applications are custom implementations of the BLAST program optimized to search specialized data sets. New resources released in the past year include PubMed Labs and a new sequence database search. Resources that were updated in the past year include PubMed, PMC, Bookshelf, genome data viewer, Assembly, prokaryotic genomes, Genome, BioProject, dbSNP, dbVar, BLAST databases, igBLAST, iCn3D and PubChem. All of these resources can be accessed through the NCBI home page at www.ncbi.nlm.nih.gov.

INTRODUCTION

NCBI overview

The National Center for Biotechnology Information (NCBI), a center within the National Library of Medicine at the National Institutes of Health, was created in 1988 to develop information systems for molecular biology. Since Genes, Proteins and Chemicals (Table 1). NCBI provides facilities for submitting and downloading data, analysis and visualization software, educational events and materials about NCBI products, and software and services to support an expanding developer community. These services, along with all other data resources, are available through the NCBI home page at www.ncbi.nlm.nih.gov/. In most cases, the data underlying these resources and executables for the software described are available for download at ftp.ncbi.nlm.nih.gov.

This article provides a brief overview of the NCBI Entrez system of databases, followed by a summary of resources that were either introduced or significantly updated in the past year. More complete discussions of NCBI resources can be found on the home pages of individual databases, on the NCBI Learn page (www.ncbi.nlm.nih.gov/learn/), or in the NCBI Handbook (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143764/).

The Entrez system

Entrez (1) is an integrated database retrieval system that provides access to a diverse set of 38 databases that together contain 2.5 billion records (Table 1 and Figure 1). Links to the web portal for each of these databases are provided on the Entrez global search page (www.ncbi.nlm.nih.gov/search/). Entrez supports text searching using simple Boolean queries, downloading of data in various formats, and linking records between databases based on asserted relationships. The LinkOut service expands the range of links to include external resources, such as organism-specific genome databases. The records retrieved in Entrez can be displayed in many formats and downloaded singly

DDBJ

DDBJ update: the Genomic Expression Archive (GEA) for functional genomics data

Yuichi Kodama*, Jun Mashima, Takehide Kosuge and Osamu Ogasawara*

DDBJ Center, National Institute of Genetics, Shizuoka 411-8540, Japan

Received September 14, 2018; Revised October 03, 2018; Editorial Decision October 08, 2018; Accepted October 09, 2018

ABSTRACT

The Genomic Expression Archive (GEA) for functional genomics data from microarray and high-throughput sequencing experiments has been established at the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) Center (https://www.ddbj.nig.ac.jp), which is a member of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) with the US National Center for Biotechnology Information and the European Bioinformatics Institute. The DDBJ Center collects nucleotide sequence data and associated biological information from researchers and also services the Japanese Genotype–phenotype Archive (JGA) with the National Bioscience Database Center for collecting human data. To automate the submission process, we have implemented the DDBJ BioSample validator which checks submitted records, autocorrects their format, and issues error messages and warnings if necessary. The DDBJ Center also operates the NIG supercomputer, prepared for analyzing large-scale genome sequences. We now offer a secure platform specifically to handle personal human genomes. This report describes database activities for INSDC and JGA over the past year, the newly launched GEA, submission, retrieval, and analysis services available in our supercomputer system and their recent developments.

INTRODUCTION

The DNA Data Bank of Japan (DDBJ, https://www.ddbj.nig.ac.jp) (1) is a public nucleotide sequence database established at the National Institute of Genetics (NIG, https://www.nig.ac.jp). Since 1987, the DDBJ Center has been collecting annotated nucleotide sequences as its traditional database service. This endeavor is conducted in collaboration with GenBank (2) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and with the European Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) (4), and its product database is called the International Nucleotide Sequence Database (INSD).

Within the INSDC framework, the DDBJ Center also services the DDBJ Sequence Read Archive (DRA) for raw sequencing data and alignment information from high-throughput sequencing platforms (5), BioProject for sequencing project metadata, and BioSample for sample information (1,6). This comprehensive resource of nucleotide sequences and associated biological information complies with INSDC policy guaranteeing free and unrestricted access to data archives (7).

In July 2018, the DDBJ Center launched a new public database, the Genomic Expression Archive (GEA, https://www.ddbj.nig.ac.jp/gea), which collects functional genomics data from microarray and high-throughput sequencing experiments. Besides the Gene Expression Omnibus (GEO) at the NCBI (8) and ArrayExpress at the EBI (9), the GEA issues accession numbers to functional genomics experiments, whose data are associated with metadata in a structured and standardized MAGE-TAB format (10), and public GEA data will be indexed by ArrayExpress. For publications under review, submitters can allow journal reviewers anonymous access to private GEA data cited in their manuscripts. With the GEA launch, the DDBJ Center now covers the archiving of sequences with functional annotation (traditional database) and molecular abundance (GEA).

In addition to these unrestricted-access databases, the DDBJ Center also services a controlled-access database, the Japanese Genotype–phenotype Archive (JGA, https://www.ddbj.nig.ac.jp/jga), in collaboration with the National Bioscience Database Center (NBDC, https://biosciencedbc.jp/en/) at the Japan Science and Technology Agency (1,11). The JGA stores genotype and phenotype data from human individuals who have signed consent agreements authorizing data usage for specific research only. The NBDC provides guidelines and policies for sharing human-derived data (https://humandbs.biosciencedbc.jp/en/guidelines) and reviews data submission and usage re-

Strukturní databáze

- **PDB – Protein Data Bank.** Databáze obsahuje experimentálně získané struktury proteinů, nukleových kyselin a komplexů informačních biomakromolekul.

Experimental Method	Proteins	Nucleic Acids	Protein/NA Complex	Other	Total
X-Ray	126296	2005	6525	8	134834
NMR	11040	1278	259	8	12585
Electron Microscopy	2215	31	784	0	3030
Other	253	4	6	13	276
Multi Method	128	5	2	1	136
Total	139932	3323	7576	30	150861

- **NDB – Nucleic Acid Database**

PDB formát

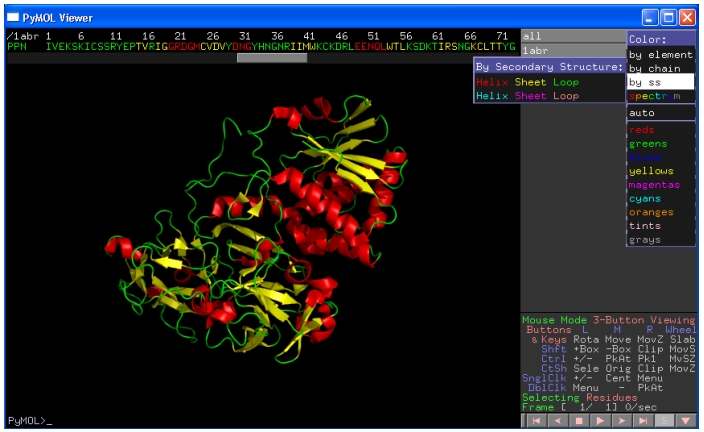
The ATOM records present the atomic coordinates for standard amino acids and nucleotides. They also present the occupancy and temperature factor for each atom. Non-polymer chemical coordinates use the HETATM record type. The element symbol is always present on each ATOM record; charge is optional.

Changes in ATOM/HETATM records result from the standardization atom and residue nomenclature. This nomenclature is described in the Chemical Component Dictionary (ftp://ftp.wwpdb.org/pub/pdb/data/monomers).

Record Format

COLUMNS	DATA TYPE	FIELD	DEFINITION
1 - 6	Record name	"ATOM "	
7 - 11	Integer	serial	Atom serial number.
13 - 16	Atom	name	Atom name.
17	Character	altLoc	Alternate location indicator.
18 - 20	Residue name	resName	Residue name.
22	Character	chainID	Chain identifier.
23 - 26	Integer	resSeq	Residue sequence number.
27	AChar	iCode	Code for insertion of residues.
31 - 38	Real(8.3)	x	Orthogonal coordinates for X in Angstroms.
39 - 46	Real(8.3)	y	Orthc
47 - 54	Real(8.3)	z	Orthc
55 - 60	Real(6.2)	occupancy	Occup
61 - 66	Real(6.2)	tempFactor	Tempe
77 - 78	LString(2)	element	Eleme
79 - 80	LString(2)	charge	Charg

```
ATOM      2  CA  GLU A   1      64.373  11.709  60.583  1.00 79.99           C
ATOM      3  C   GLU A   1      63.512  10.438  60.597  1.00 79.31           C
ATOM      4  O   GLU A   1      63.540   9.685  61.574  1.00 79.23           O
ATOM      5  CB  GLU A   1      63.805  12.754  59.603  1.00 79.36           C
ATOM      6  CG  GLU A   1      62.880  13.819  60.228  1.00 78.52           C
ATOM      7  CD  GLU A   1      61.525  13.275  60.676  1.00 78.50           C
ATOM      8  OE1 GLU A   1      60.915  12.482  59.923  1.00 77.14           O
ATOM      9  OE2 GLU A   1      61.064  13.659  61.776  1.00 77.48           O
ATOM     10  H1  GLU A   1      66.078  10.648  60.914  1.00 20.00           H
ATOM     11  H2  GLU A   1      65.776  10.893  59.265  1.00 20.00           H
ATOM     12  H3  GLU A   1      66.387  12.177  60.222  1.00 20.00           H
```



PyMol

Osnova

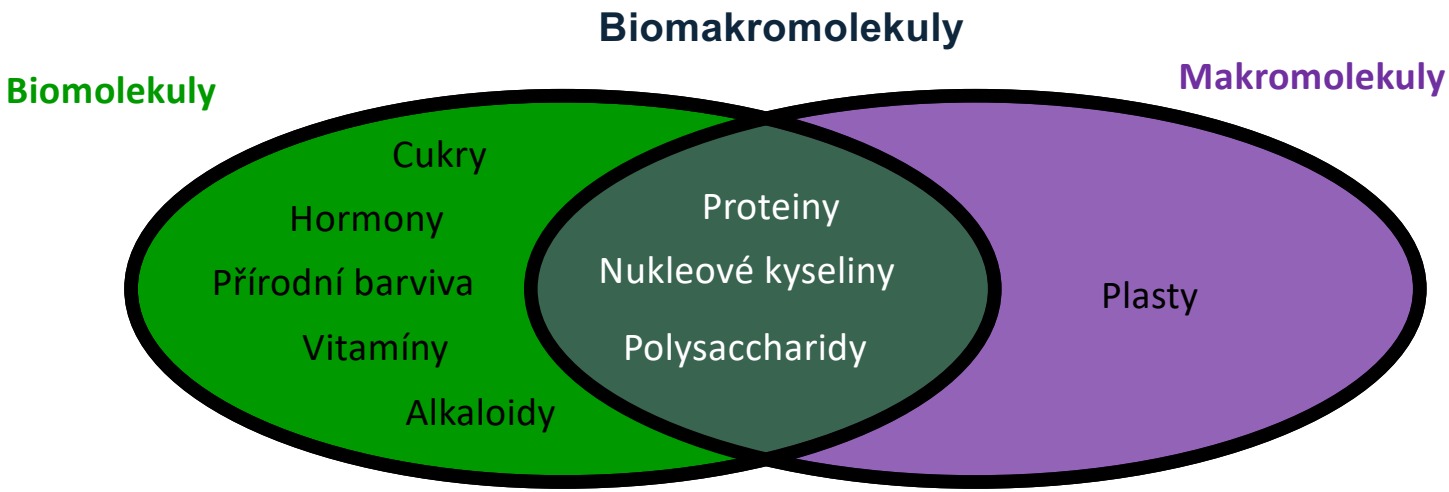
- **Úvod do bioinformatiky**
  - Definice, molekulárně biologická data, databáze
  - Rozdělení databází, bioinformatická centra
- **Manipulace se sekvencemi**
  - Sekvence biomakromolekul, aminokyseliny, báze, alignment
  - Význam alignmentu, přiložení páru sekvencí a vícenásobné přiložení
- **Predikce struktury proteinů**
  - Predikce 2-D struktury proteinů, predikce 3-D struktury proteinů
  - Threading, Homology modeling, *Ab initio*
- **Proteinové rodiny**
  - Rodiny, domény, sekvenční vzory
  - Patterns, profiles, fingerprints, databáze
- **Predikce genů**
  - Predikce genů u prokaryot a eukaryot, predikční nástroje a postupy

Biomakromolekuly

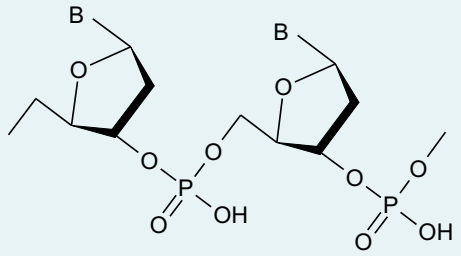
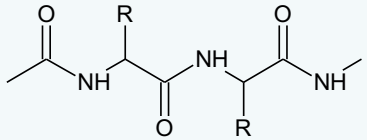
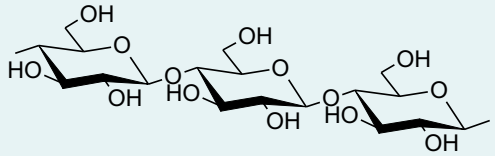
Biomolekuly jsou přirozenou součástí živých organismů.

Velké molekuly. Typické malé molekuly jsou tvořeny několika atomy až několika sty atomů. Makromolekuly tvoří tisíce až miliony atomů.

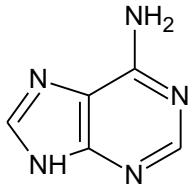
Základní stavební jednotky hmoty. Jsou tvořeny atomy, které navzájem spojují kovalentní vazby.



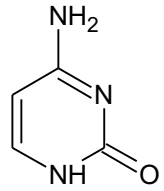
Sekvence biomakromolekul

Makromolekula	Stavební jednotky	Typ vazby	Schéma
Nukleová kyselina	Nukleotidy	Esterová	
Protein	Aminokyseliny	Peptidová	
Polysacharid	Monosacharidy	Glykosidická	

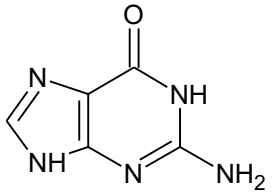
Nukleové báze



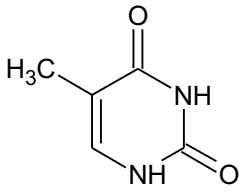
Adenine



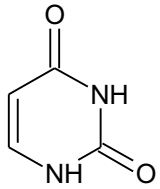
Cytosine



Guanine



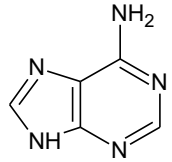
Thymine



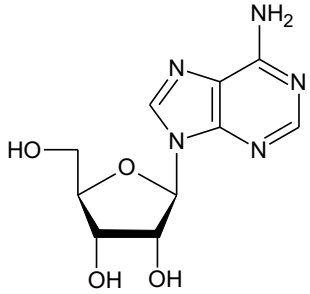
Uracil

adenin	cytosin	guanin	thymin	uracil
A	C	G	T	U

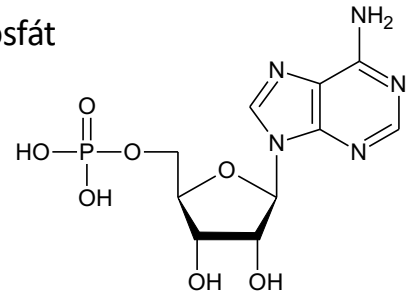
Nukleová báze
Adenin



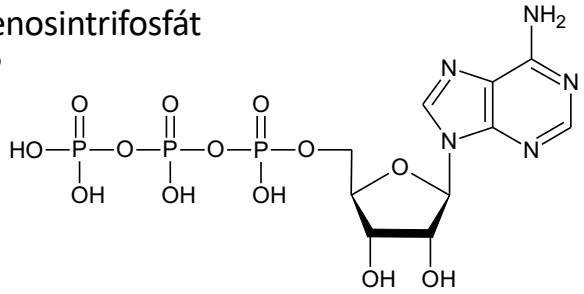
Nukleosid
Adenosin



Nukleotid
Adenosinmonofosfát
AMP



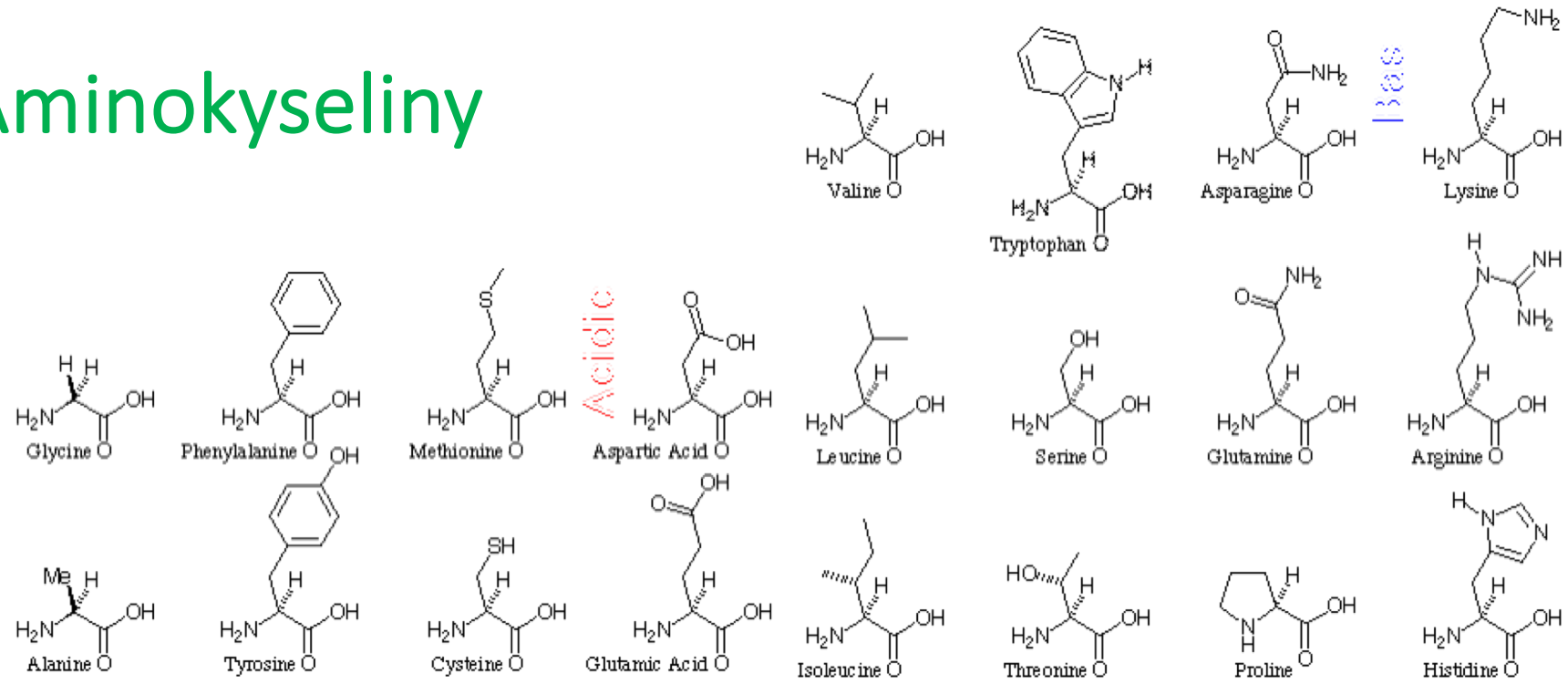
Nukleotid
Adenosintrifosfát
ATP



Při základních manipulacích se sekvencemi v bioinformatice uvažujeme vždy pouze Watson-Crickovo párování bazí

(neplatí pro 3D predikce a struktury)

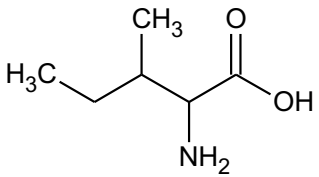
Aminokyseliny



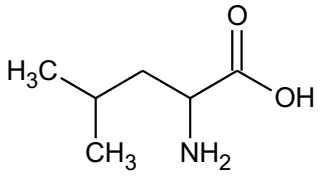
glycin	alanin	valin	leucin	izoleucin	asparagová kys.	asparagin	glutamová kys.	glutamin	arginin	lysin	histidin	fenylalanin	serin	threonin	tyrozin	tryptofan	methionin	cystein	prolin	selenocystein	pyrolysin
Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Asp	Asn	Glu	Gln	Arg	Lys	His	Phe	Ser	Thr	Tyr	Trp	Met	Cys	Pro	Sec	Pyr
G	**A**	**V**	**L**	**I**	**D**	**N**	**E**	**Q**	**R**	**K**	**H**	**F**	**S**	**T**	**Y**	**W**	**M**	**C**	**P**	**U**	**O**

Aminokyseliny

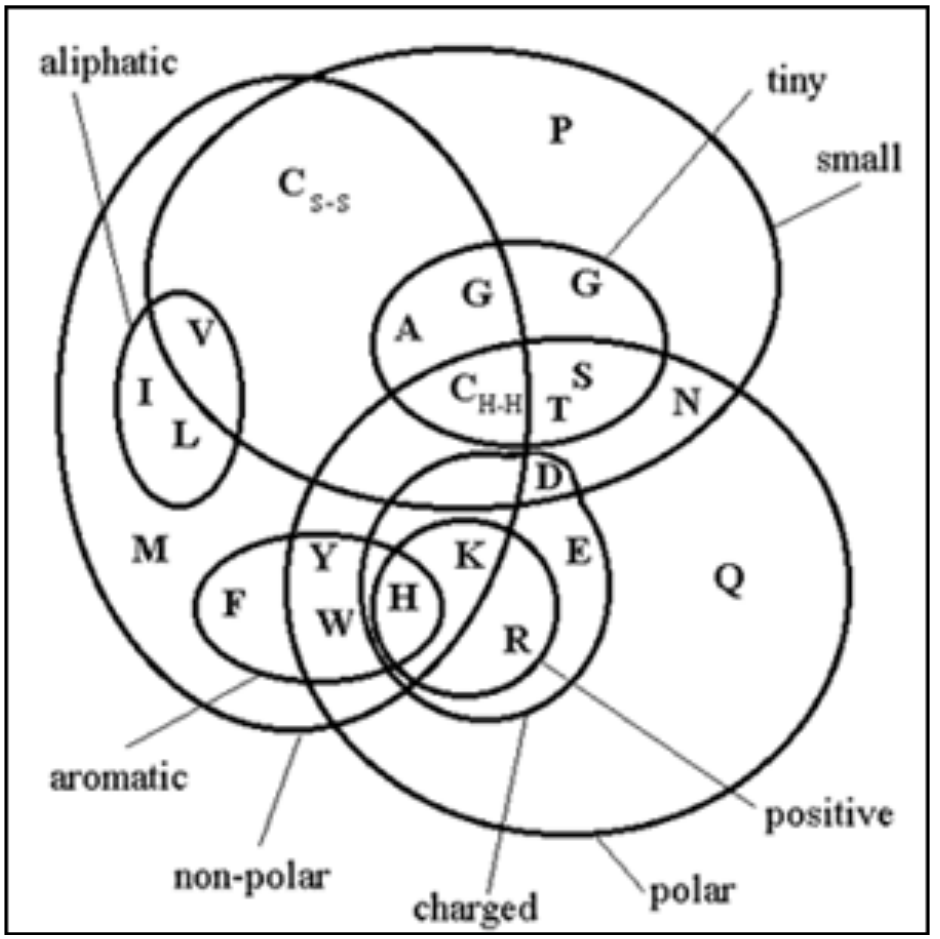
Aminokyseliny s podobnými vlastnostmi mohou plnit v proteinu stejné funkce – bývají vzájemně zastupitelné



Isoleucine

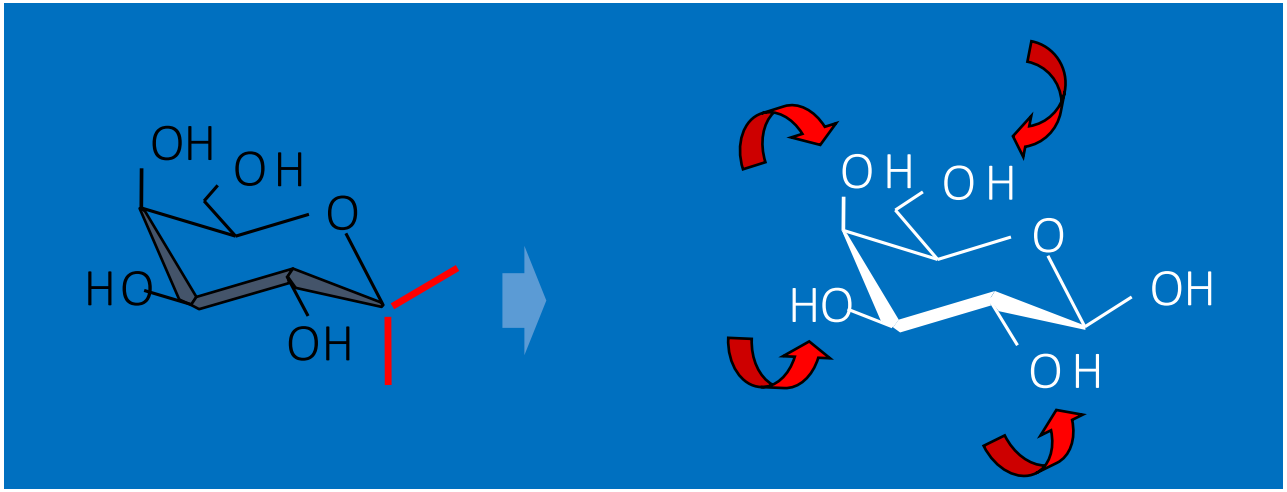


Leucine



Polysacharidy

Komplikované sekvence – alignment se neprovádí



	Hexasaccharides	Hexapeptides
Nb Isomers	> 10^{12} (for 6 hexopyranoses)	64 10^{6} (20 amino acids)

Polysacharidy

Komplikované sekvence – alignment se neprovádí

Polymer	**Protein**	**Nukleová kyselina**	**Polysacharid**
Počet druhů základních stavebních jednotek	20 (22)	4 (DNA) 4 (RNA)	desítky
Počet typů vzájemných vazeb	1	1	2 x 4 (pro hexosu)

Práce se sekvencemi

- Vyskytuje se shodná/podobná sekvence (protein/DNA) v databázi?
- Jak podobné jsou podobné sekvence?
- Jsou podobné, shodné, odlišné?
- **Alignment** – srovnání (**přiložení**) dvou či více sekvencí (aminokyselinových, nukleotidových) na základě jejich vzájemné podobnosti.

ATGTCTACTCCTGGAGCACAGCAAGTCCTCTTCCGCACCGGAATTGCCGCGGTCAACTCAACCAACCATCTCCGTGTTTACTTCCAGGATGTCTATG
GCAGTATTCGCGAGAGTCTCTACGAGGGCAGCTGGGCTAACGGCACCGAAAAGAACGTTATCGGCAATGCTAAGCTTGGCAGCCCTGTGGCCGC
GACTTCTAAGGAGCTGAAGCATATCCGTGTCTACACCCTCACTGAAGGAAACACCCTACAGGAGTTCGCCTACGACTCCGGAACCGGATGGTACAA
CGGCGGGCTGGGCGGTGCAAAGTTCCAAGTCGCACCCTACTCTCGCATTGCTGCCGTGTTCCTAGCCGGAACAGATGCATTGCAGTTGCGAATCTA
TGCACAGAAGCCAGATAACACAATCCAGGAGTATATGTGGAACGGCGATGGCTGGAAGGAGGGCACCAACCTGGGAGGTGCTCTCCCCGGCACT
GGAATCGGAGCCACCTCCTTCCGCTATACCGACTACAATGGCCCAAGCATCCGGATCTGGTTCCAAACTGACCTCAAACTCGTCCAAAGAGCCTAC
GACCCGCACAAAGGCTGGTACCCGGACCTCGTCACCATCTTTGACAGGGCACCGCCACGTACGGCCATTGCAGCCACCAGCTTTGGAGCCGGCAA
CAGTTCCATCTACATGCGTATCTACTTTGTCAATTCGGACAACACTATCTGGCAGGTCTGCTGGGACCACGGCAAGGGCTATCACGACAAGGGAAC
CATCACCCCAGTCATTCAGGGCTCGGAGGTCGCCATTATCAGCTGGGGCAGTTTCGCCAATAACGGGCCGGATCTGCGTCTGTACTTTCAGAATGG
AACATACATTAGTGCTGTGAGCGAGTGGGTTTGGAATCGGGCACATGGGTCGCAGTTGGGCAGAAGTGCTCTTCCTCCTGCTTGA

ATGGCTGATTCTCAAACGTCATCCAACCGCGCCGGCGAATTCTCGATTCCGCCGAATACCGATTTCCGCGCGATTTTCTTCGCGAATGCCGCCGAGC
AACAGCACATCAAATTGTTCATCGGCGACAGCCAGGAACCCGCCGCGTATCACAAGCTGACGACGCGCGACGGCCCGCGCGAAGCCACGCTGAAT
TCCGGCAACGGCAAGATCCGTTTCGAGGTGTCGGTGAACGGCAAGCCGTCGGCGACCGACGCGCGTCTCGCGCCGATCAACGGCAAGAAGTCGG
ACGGCTCGCCGTTCACGGTCAACTTCGGGATCGTCGTGTCGGAAGACGGCCACGACAGCGACTACAACGACGGCATCGTCGTGCTCCAGTGGCCG
ATCGGCTGA

ATGCTGGTGATTGTGGATGCCGTTACCCTGCTGAGCGCCTATCCGGAAGCCAGCCGTGATCCGGCCGCCCCGACCGTGATTGATGGTCGCCACCTG
TATGTTGTTAGCCCGGGCGATGCCGCGCAGCTGGGCCATAACGATAGCCGTCTGTTTACCGGTCTGAGCCCGGGTGATCAGCTGCATCTGCGCGA
AACCGCGCTGGCGCTGCGCGCGGAAGTGAGCGTGCTGTTTATTCGCTTTGCCCTGAAAGATGCCGGCATTGTTGCCCCGATCGAACTGGAAGTGC
GTGATGCCGCCACCGCCGTTCCGGATGCGGATGATCTGCTGCATCCGAGCTGTCGTCCGCTGAAAGATCATTATTGGCGCAGCGATGTGCTGGCG
GCGGGCGCGACCACCTGTACCGCCGATTTTGCGGTGTGCGATCGTGATGGCACCGTGAGCGGTTATTTTCGTTGGGAAACCAGCATTGAAATTGC
GGGCAGCCAGCCGGATACCAAACAGCCGGGCTTTAAACCGAGCAGCGATCGCAATGGCAACTTTAGCCTGCCGCCGAATACCGCCTTTAAAGCGA
TCTTCTATGCGAACGCGGCGGATCGTCAGGATCTGAAACTGTTTATTGATGATGCGCCGGAACCGGCCGCCACCTTTGTGGGTAACAGCGAAGAT
GGTGTGCGTCTGTTTACCCTGAATAGCAAAGGTGGTAAAATTCGTATTGAAGCGAGCGCGAACGGCCGTCAGAGCGCGACCGATGCCCGTCTGGC
GCCGCTGAGCGCGGGCGATACCGTGTGGCTGGGCTGGCTGGGCGCGGAAGATGGTGCCGATGCGGATTATAATGATGGCATTGTTATTCTGCAG
TGGCCGATTACCTAA

ATGTCGAGCGTTCAAACCGCTGCCACTTCGTGGGGAACCGTACCGTCGATCCGTGTGTACACGGCCAATAATGGCAAGATCACCGAGCGATGCTG
GGACGGGAAGGGGTGGTACACCGGTGCCTTCAACGAGCCCGGCGATAACGTCTCCGTAACCAGCTGGCTGGTCGGCAGCGCGATCCATATCCGC
GTCTATGCAAGCACCGGCACCACGACCACGGAGTGGTGCTGGGACGGCAACGGCTGGACCAAGGGCGCCTACACCGCCACGAACTGA

ATGCCGCTGCTGAGCGCCAGTATCGTGAGCGCGCCGGTGGTGACCAGCGAAACCTATGTGGATATTCCGGGCCTGTATCTGGATGTTGCGAAAGC
CGGTATCCGTGATGGCAAACTGCAGGTTATCCTGAATGTGCCGACCCCGTATGCGACGGGCAATAACTTTCCGGGTATTTATTTTGCGATCGCCAC
CAACCAGGGCGTGGTGGCGGATGGTTGCTTTACGTATAGTAGCAAAGTGCCGGAAAGTACGGGCCGTATGCCGTTTACCCTGGTTGCGACCATTG
ATGTGGGTAGCGGTGTTACCTTCGTGAAAGGTCAGTGGAAATCTGTTCGCGGCTCTGCGATGCATATTGATAGCTATGCAAGCCTGAGTGCGATTT
GGGGCACCGCGGCACCGAGTTCTCAGGGTTCTGGTAACCAGGGTGCGGAAACGGGTGGCACCGGTGCCGGTAATATTGGTGGCGGCGGTGAAC
GTGATGGCACCTTTAATCTGCCGCCGCATATTAAATTCGGTGTTACCGCGCTGACCCACGCGGCGAACGATCAGACCATTGATATTTATATTGATGA
TGATCCGAAACCGGCAGCCACCTTTAAAGGCGCGGGCGCGCAGGATCAGAACCTGGGTACCAAAGTGCTGGATTCTGGCAATGGCCGTGTTCGC
GTTATCGTTATGGCGAACGGCCGTCCGAGCCGCCTGGGTTCTCGTCAGGTGGATATTTTTAAAAAATCTTATTTCGGTATTATTGGCTCTGAAGATG
GTGCGGATGATGATTATAACGATGGCATCGTGTTTCTGAACTGGCCGCTGGGCTAA

ATGCCGCTCCTGAGCGCCAGTATCGTGAGCGCGCCGGTGGTGACCAGCCAAACCTATGTGGATATTCCGGGCCTGTATCTGGATGTTGCGAAAGC
CGGTATCCGTGATGGCAAACTGCAGGTTATCCTGAATGTGCCGACCCCGTATGCGACGGGCAATAACTTTCCGGGTATTTATTTTGCGATCGCCAC
CAACCAGGGCGTGGTGGCGGATGGTTGCTTTACGTATAGTAGCAAAGTGCCGGAAAGTACGGGCCGTATGCCGTTTACCCTGGTTGCGACCATTG
ATGTGGGTAGCGGTGTTACCTTCGTGAAAGGTCAGTGGAAATCTGTTCGCGGCTCTGCGATGCATATTGATAGCTATGCAAGCCTGAGTGCGATTT
GGGGCACCGCGGCACCGAGTTCTCAGGGTTCTGGTAACCAGGGTGCGGAAACGGGTGGCACCGGTGCCGGTAATATTGGTGGCGGCGGTAAGCT
TGCGGCCGCACTCGAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

Práce se sekvencemi

- Vyskytuje se shodná/podobná sekvence (protein/DNA) v databázi?
- Jak podobné jsou podobné sekvence?
- Jsou podobné, shodné, odlišné?
- **Alignment** – srovnání (**přiložení**) dvou či více sekvencí (aminokyselinových, nukleotidových) na základě jejich vzájemné podobnosti.

```
MSTPGAQQVLFRTGIAAVNLTNHLRVYFQDVYGSIRESLYEGSWANGTEKNVIGNAKLGSPVAATSKEL
KHIRVYTLTEGNTLQEFAYDSGTGWYNGGLGGAKFQVAPYSRIAAVFLAGTDALQLRIYAQKPDNTIQE
YMWNGDGWKEGTNLGGALPGTGIGATSFRYTDYNGPSIRIWFQTDDLKLVQRAYDPHKGWYPDLVTIFD
RAPPRTAIAATSFGAGNSSIYMRIYFVNSDNTIWQVCWDHGKGYHDKGTITPVIQGSEVAIISWGSFAN
NGPDLRLYFQNGTYISAVSEWVWNRAHGSQLGRSALPPA

MADSQTSSNRAGEFSIPPNTDFRAIFFANAAEQQHIKLFIGDSQEPAAYHKLTTRDGPREATLNSGNGK
IRFEVSVNGKPSATDARLAPINGKKSDGSPFTVNFGIVVSEDGHDSDYNDGIVVLQWPIG

MLVIVDAVTLLSAYPEASRDPAAPTVIDGRHLYVVSPGDAAQLGHNDSRLFTGLSPGDQLHLRETALAL
RAEVSVLFIRFALKDAGIVAPIELEVRDAATAVPDADDLLHPSCRPLKDHYWRSDVLAAGATTCTADFA
VCDRDGTVSGYFRWETSIEIAGSQPDTKQPGFKPSSDRNGNFSLPPNTAFKAIFYANAADRQDLKLFID
DAPEPAATFVGNSEDGVRLFTLNSKGGKIRIEASANGRQSATDARLAPLSAGDTVWLGWLGAEDGADAD
YNDGIVILQWPIT

MSSVQTAATSWGTVPSIRVYTANNGKITERCWDGKGWYTGAFNEPGDNVSVTSWLVGSAIHIRVYASTG
TTTTEWCWDGNGWTKGAYTATN

MPLLSASIVSAPVVTSETYVDIPGLYLDVAKAGIRDGKLQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVV
ADGCFTYSSKVPESTGRMPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQGS
GNQGAETGGTGAGNIGGGGERDGTFNLPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQ
NLGTKVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGSRQVDIFKKSYFGIIGSEDGADDDYNDGIVFLNWPLG

MPLLSASIVSAPVVTSQTYVDIPGLYLDVAKAGIRDGKLQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVV
ADGCFTYSSKVPESTGRMPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQGS
GNQGAETGGTGAGNIGGGGKLAAALEIKRASQPELAPEDPEDVEHHHHHH
```

Význam alignmentu

- Identifikace sekvence v databázi
- Hledání podobných sekvencí v databázi
- Detekce mutací
- Hledání konzervovaných částí sekvence
- Odhalování příbuzenských vztahů
- Předpověď funkce makromolekuly
- Předpověď vyšších struktur

```
LPPNTAFKAIFYANAADRQDLKLFIDDAPEPAATFVGNSEDGVRL--FTLNSKGGKIRIE
IPPNTDFRAIFFANAAEQQHIKLFIGDSQEPAAYHKLTTRDGPRE--ATLNSGNGKIRFE
LPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQNLGTKVLDSGNGRVRVI
LPPNIAFGVTALVNSSAPQTIEVFVDDNPKPAATFQGAGTQDANLNTQIVNSGKGKVRVV
lPPn-aFg---lanaad-QtiklfidD-p-PAAtfkgag-----l-t-tlnSgnGkiRve

ASANGRQSATDARLAPLSAGD------TVWLGWLGAEDGADADYNDGIVILQWPIT
VSVNGKPSATDARLAPINGKKSDGSPFTVNFGIVVSEDGHDSDYNDGIVVLQWPIG
VMANGRPSRLGSRQVDIFKKS--------YFGIIGSEDGADDDYNDGIVFLNWPLG
VTANGKPSKIGSRQVDIFKKT--------YFGLVGSEDGGDGDYNDGIAILNWPLG
vsaNGrpSat--R---ifkks------tvyfGivgsEDGaDaDYNDGIviLqWPig
```

Typy alignmentu

Pairwise alignment – dvě sekvence

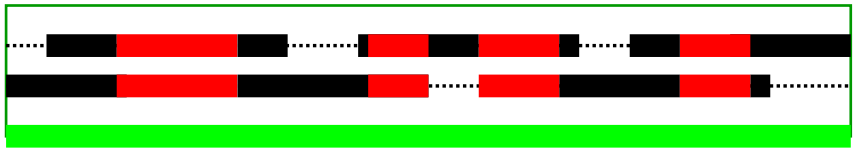
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM

Multiple sequence alignment – více sekvencí

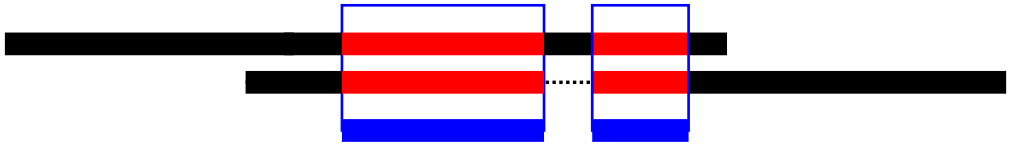
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM
WLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAMWLAKALKYLMETAQASSISTELARHHPRAVDAKRKSEMKRKTAM

Pairwise alignment

- Srovnání dvou sekvencí.
- Sekvence mohou být přiloženy v celé své délce (**global alignment**) nebo jen v určitém regionu (**local alignment**).



Vychází z předpokladu, že obě srovnávané sekvence jsou víceméně shodné v celé své délce. Alignment k sobě přikládá celé sekvence (od počátku do konce) a to včetně částí, které si příliš neodpovídají.



Hledá úseky dvou sekvencí, které si podle zvolených kritérií dobře odpovídají. Nesnaží se zahrnout celé sekvence, pokud si jejich některé části neodpovídají.

Algoritmy

- Témeř výhradně se užívají **heuristické algoritmy** – nalezení výsledku v dostatečně krátkém čase.
- Vývoj algoritmů je prováděn v návaznosti na srovnávání výsledků s tzv. zlatým standardem – alignment na základě známých 3D struktur.

FASTA formát

>**název**(␣popis dle vlastní volby)↵
SEKVENCESEKVENCESEKVENCESEKVENCESEKVENCESEKVENCE↵

POVINNÉ VOLITELNÉ

http://emboss.sourceforge.net/docs/themes/SequenceFormats.html

```
>AFL
MSTPGAQQVLFRTGIAAVNLTNHLRVYFQDVYGSIRESLYEGSWANGTEKNVIGNAKLGSPVAATSKELKHIRVYTLTEGNTLQ
EFAYDSGTGWYNGGLGGAKFQVAPYSRIAAVFLAGTDALQLRIYAQKPDNTIQEYMWNGDGWKEGTNLGGALPGTGIGATSFRY
TDYNGPSIRIWFQTDDLKLVQRAYDPHKGWYPDLVTIFDRAPPRTAIAATSFGAGNSSIYMRIYFVNSDNTIWQVCWDHGKGYH
DKGTITPVIQGSEVAIISWGSFANNGPDLRLYFQNGTYISAVSEWVWNRAHGSQLGRSALPPA

>BC2LA
MADSQTSSNRAGEFSIPPNTDFRAIFFANAAEQQHIKLFIGDSQEPAAYHKLTTRDGPREATLNSGNGKIRFEVSVNGKPSATD
ARLAPINGKKSDGSPFTVNFGIVVSEDGHDSDYNDGIVVLQWPIG

> BC2LD
MLVIVDAVTLLSAYPEASRDPAAPTVIDGRHLYVVSPGDAAQLGHNDSRLFTGLSPGDQLHLRETALALRAEVSVLFIRFALKD
AGIVAPIELEVRDAATAVPDADDLLHPSCRPLKDHYWRSDVLAAGATTCTADFAVCDRDGTVSGYFRWETSIEIAGSQPDTKQP
GFKPSSDRNGNFSLPPNTAFKAIFYANAADRQDLKLFIDDAPEPAATFVGNSEDGVRLFTLNSKGGKIRIEASANGRQSATDAR
LAPLSAGDTVWLGWLGAEDGADADYNDGIVILQWPIT

>RSL
MSSVQTAATSWGTVPSIRVYTANNGKITERCWDGKGWYTGAFNEPGDNVSVTSWLVGSAIHIRVYASTGTTTTEWCWDGNGWTK
GAYTATN

>gi|444369855|ref|ZP_21169562.1| fucose-binding lectin II [Burkholderia cenocepacia
K56-2Valvano]
MPLLSASIVSAPVVTSETYVDIPGLYLDVAKAGIRDGKLQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVVADGCFTYSSKVPEST
GRMPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQGSGNQGAETGGTGAGNIGGGGERDGTFNLPPH
IKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQNLGTKVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGSRQVDIFKKSYFGIIGS
EDGADDDYNDGIVFLNWPLG

>gi|283806765|pdb|2WQ4|A Chain A
MPLLSASIVSAPVVTSQTYVDIPGLYLDVAKAGIRDGKLQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVVADGCFTYSSKVPEST
GRMPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQGSGNQGAETGGTGAGNIGGGGKLAAALEIKRA
SQPELAPEDPEDVEHHHHHH
```

Jak poznat dobré přiložení?

```
MAM--UZDOST--STAROSTISHAMIZ--NOSTIRATOLESTI
|||    ||||  |||||         |  ||          |||
MAMRA--DOSTZESTARO--------ZITNO---------STI
```

18 shod

```
1 MAMUZDOST--STAROSTISHAMIZNOSTIRATOLESTI   37
  ||| .||||  ||||       . |    |  | . |||
1 MAMRADOSTZESTAR-------O-Z----I--TNO-STI   24
```

17 shod, 3 podobnosti

```
1 MAMUZDOST--STAROSTISHAMIZNOSTIRATOLESTI   37
  ||| .||||  |||||...:.                |||
1 MAMRADOSTZESTAROZITNO--------------STI   24
```

15 shod, 6 podobností

Scoring matrix (skórovací matice)

- Dvě sekvence považujeme za **příbuzné**, vycházejí-li ze společného předka; pak dobu potřebnou k jejich evoluci můžeme odvodit z množství rozdílů mezi nimi
- **Záměna** aa je častější než inserce/delece. Pravděpodobnost změny jedné aminokyseliny na jinou je **přímo úměrná podobnosti** obou aminokyselin.
- **Matice** vzniká přiřazením hodnoty (pravděpodobnosti) jednotlivým dvojicím aminokyselin v závislosti na jejich vzájemné „zastupitelnosti“ – pravděpodobnosti substituce

Substituční skórovací matrice

víceméně dva typy:

1. založené na záměnnosti genetického kódu nebo vlastností aminokyselin
2. odvozené z **empirických** studií aminokyselinových substitucí (přesnější)

Nejvíce používané jsou empirické matrice PAM a BLOSUM

PAM – Point Accepted Mutation

Constructed by Margaret Dayhoff in 1978.

Zahrnuje pravděpodobnost záměny jedné aminokyseliny v druhou během evoluce

Předpokládá, že každá další mutace nezávisí na předchozí.

Odvozena z globálního alignmentu rodin proteinů
(Podobnost sekvencí v rodině > 85%, vypočtena na základě 1572 změn v aminokyselinovém složení v 71 proteinových rodinách))

- vysoká spolehlivost alignmentu
- vysoká pravděpodobnost, že záměna aminokyseliny je dána jedinou mutací

Vypočtena pravděpodobnost s jakou jedna AA se změní na jakoukoliv jinou

PAM1 reflektuje průměrnou záměnu 1% všech aminokyselinových pozic

PAM250 (20% identita) je odvozena od PAM1
její 250-tinásobnou multiplikací (250 mutací na 100 aminokyselin)

Vyšší číslo PAM matrice znamená větší evoluční vzdálenost

k vysvětlení

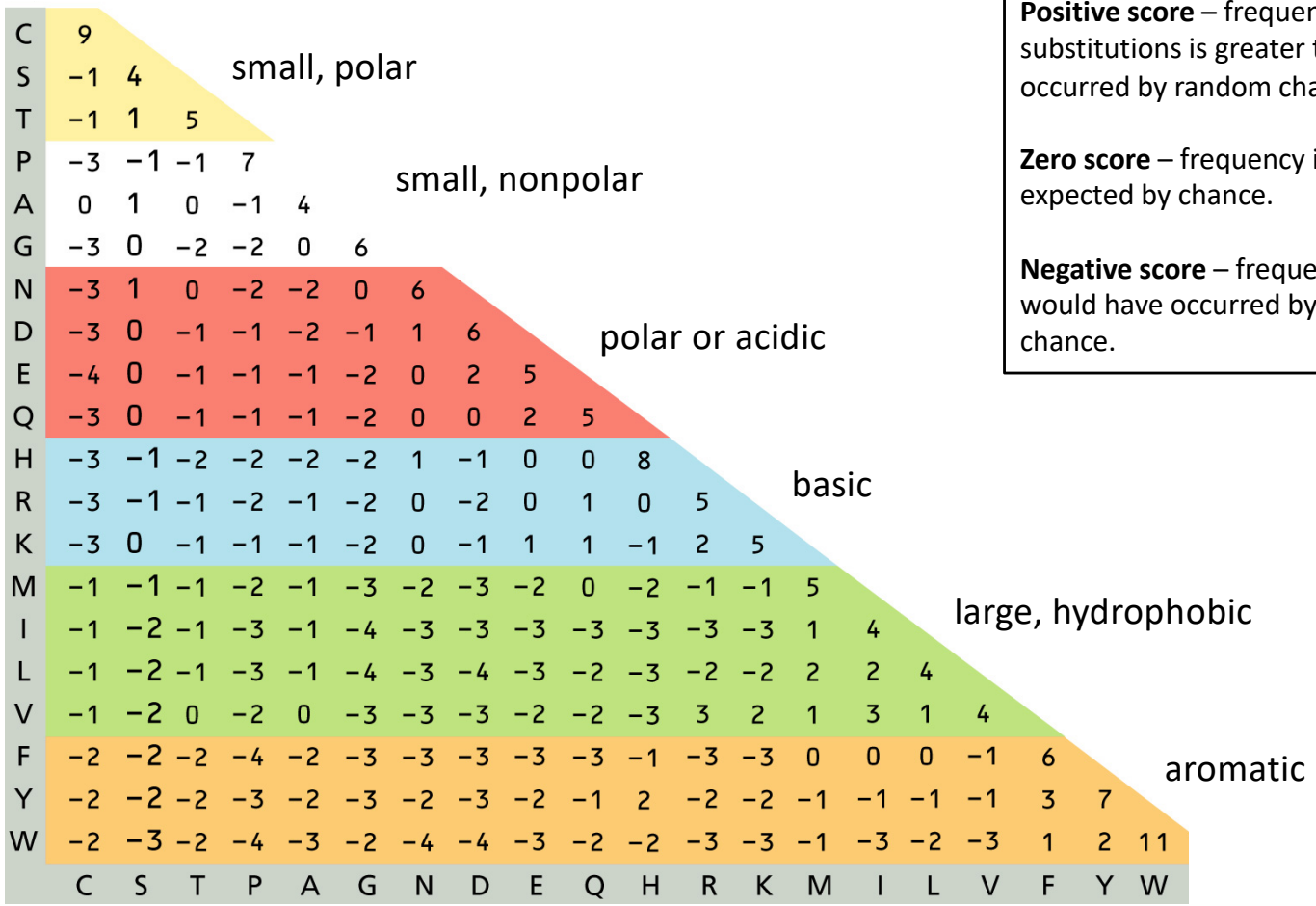
PAM 1 matice

	A	R	N	D	C
A	9867	2	9	10	3
R	1	9913	1	0	1
N	4	1	9822	36	0
D	6	0	42	9859	0
C	1	1	0	0	9973

All entries $\times 10^4$

k vysvětlení

PAM250 matrice



	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
C	9																			
S	−1	4																		
T	−1	1	5																	
P	−3	−1	−1	7																
A	0	1	0	−1	4															
G	−3	0	−2	−2	0	6														
N	−3	1	0	−2	−2	0	6													
D	−3	0	−1	−1	−2	−1	1	6												
E	−4	0	−1	−1	−1	−2	0	2	5											
Q	−3	0	−1	−1	−1	−2	0	0	2	5										
H	−3	−1	−2	−2	−2	−2	1	−1	0	0	8									
R	−3	−1	−1	−2	−1	−2	0	−2	0	1	0	5								
K	−3	0	−1	−1	−1	−2	0	−1	1	1	−1	2	5							
M	−1	−1	−1	−2	−1	−3	−2	−3	−2	0	−2	−1	−1	5						
I	−1	−2	−1	−3	−1	−4	−3	−3	−3	−3	−3	−3	−3	1	4					
L	−1	−2	−1	−3	−1	−4	−3	−4	−3	−2	−3	−2	−2	2	2	4				
V	−1	−2	0	−2	0	−3	−3	−3	−2	−2	−3	3	2	1	3	1	4			
F	−2	−2	−2	−4	−2	−3	−3	−3	−3	−3	−1	−3	−3	0	0	0	−1	6		
Y	−2	−2	−2	−3	−2	−3	−2	−3	−2	−1	2	−2	−2	−1	−1	−1	−1	3	7	
W	−2	−3	−2	−4	−3	−2	−4	−4	−3	−2	−2	−3	−3	−1	−3	−2	−3	1	2	11

Positive score – frequency of substitutions is greater than would have occurred by random chance.

Zero score – frequency is equal to that expected by chance.

Negative score – frequency is less than would have occurred by random chance.

k vysvětlení

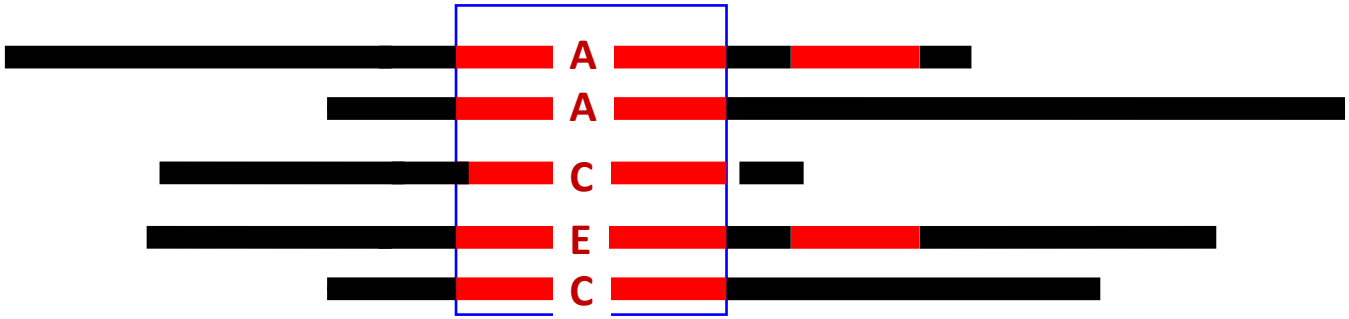
BLOSUM (Blocks Amino Acid Substitution)

- 1992, Henikoff and Henikoff
- database BLOCKS – používá koncept „bloků“ k identifikaci proteinových rodin
- **sekvenční motiv**
  - konzervovaný aminokyselinový úsek conserved stretch of amino acids spojený se specifickou funkcí proteinu
- **sekvenční blok**
  - spárované motivy ze stejné proteinové rodiny bez mezer
- BLOSUM matrice byly vytvořeny na základě substitučních vzorů více než > 2 000 bloků (< 60 residuí) z 500 skupin proteinů

- nebere v potaz evoluci

k vysvětlení

- BLOSUM62 – znamená, že ke konstrukci matrice byly použity proteiny s průměrnou identitou 62%.




```
A - C = 4
A - E = 2
C - E = 2
A - A = 1
C - C = 1
```

- výskyt každého AMK páru v každém sloupci každého bloku je sečten
- čísla získána ze všech bloků slouží pro výpočet BLOSUM matricí

k vysvětlení

Odlišné substituční matrice jsou pro odlišné účely

Matrix	Best use	Similarity (%)*
Pam40	Short highly similar alignments	70-90
PAM160	Detecting members of a protein family	50-60
PAM250	Longer alingments of more divergent sequences	~30
BLOSUM90	Short highly similar alignments	70-90
BLOSUM80	Detecting members of a protein family	50-60
BLOSUM62	Most effective in finding all potential similarities	30-40
BLOSUM30	Longer alingments of more divergent sequences	<30

Číslování BLOSUM jde v obráceném pořadí oproti PAM (čím menší číslo, tím odlišnější sekvence byly použity)

- BLOSUM matice pracují obvykle lépe než PAM pro lokální vyhledávání podobností (Henikoff & Henikoff, 1993)
- Pro porovnání blízce příbuzných proteinů by se měla používat nižší číslo PAM a vyšší BLOSUM, pro vzdálenější vyšší číslo PAM a nižší BLOSUM
- Pro prohledávání databází je nejběžnější BLOSUM62

k vysvětlení

Mezery (gaps)

- Mezery umožňují alignment sekvencí, kdy v jedné z nich došlo k deleci. Zvyšují však také možnost alignmentu náhodných sekvencí. Jejich přítomnost je proto vždy „**penalizována**“, často více než substituce.
- Čím nižší je penalizace mezer, tím lepší (dokonalejší) bude alignment, ovšem **z biologického hlediska může jít o nesmysl**.
- Jednotlivé programy obvykle penalizují **přítomnost mezery** (gap open) a také zvyšují penalizaci s **délkou mezery** (gap ext).

Krátká mezera:

```
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCC-ATTTAGTTCGCTC
|||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCCGATTTAGTTCGCTC
```

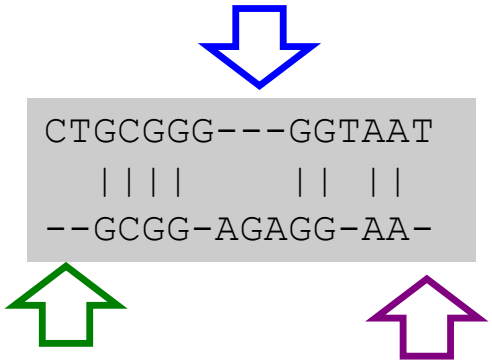
Dlouhá mezera:

```
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCC--------------------ATTTAGTTCGCTC
|||||||||||||||||||||||||                      ||||||||||||
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCATTTAGTTCGCTC
```

Příčiny vzniku mezer:

- **Bodová mutace** (velmi častá příčina)
- Nepřesný crossover při meióze (inzerce nebo delece řetězce bází)
- DNA slippage během replikace (vzniká repetice – opakující se sekvence v řetězci)
- Inzerce retroviru
- Translokace DNA mezi chromozomy

Mezery nacházíme na **začátku** řetězce, **uprostřed** nebo na jeho **konci**.



Mezery (gaps)

- Mezery umožňují alignment sekvencí, kdy v jedné z nich došlo k deleci. Zvyšují však také možnost alignmentu náhodných sekvencí. Jejich přítomnost je proto vždy „**penalizována**“, často více než substituce.
- Čím nižší je penalizace mezer, tím lepší (dokonalejší) bude alignment, ovšem **z biologického hlediska může jít o nesmysl**.
- Jednotlivé programy obvykle penalizují **přítomnost mezery** (gap open) a také zvyšují penalizaci s **délkou mezery** (gap ext).

Krátká mezera:

```
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCC-ATTTAGTTCGCTC
|||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCCGATTTAGTTCGCTC
```

Dlouhá mezera:

```
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCC--------------------ATTTAGTTCGCTC
|||||||||||||||||||||||||                      ||||||||||||
ATCTTCAGTGTTTCCCCTGTTTTGCCCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCATTTAGTTCGCTC
```

Vysoká penalizace mezer:

Hledání sekvencí velmi striktně zaměřených na podobnost s hledanou sekvencí - najde oblasti velmi příbuzných sekvencí

Nízká penalizace mezer:

Hledání podobností mezi sekvencemi vzdáleně příbuzných.

Skóre

Každé dvojici sekvencí je ve výsledku přiřazeno číslo – **skóre**, které **určuje míru** jejich **podobnosti**

1. identita (identity)
2. podobnost (similarity)
3. mezery (gaps)

Čím vyšší je skóre, tím vyšší je podobnost.
Podle použité matice může být skóre i záporné.

AAEECCDDEEF
AADDKKKEFGG

Ve chvíli, kdy zafixujeme pozici dvou sekvencí, pak můžeme snadno vypočítat skóre pro dané přiložení (příklad BLOSUM 62):

```
A A E E C C D D E E F
A A D D K K K E F G G
4+4+2+2-3-3-1+2-3-2-3        = -1
```

```
A A E E C C D D - - E E F
A A - - - - D D K K K E F G G
4+4         +6+6    +1+5+6        = 32
```

```
A A E E C C D D - - E E F
A A - - - - D D K K K E F G G
   -10-1-1-1   -10-1            = -24
```

Celkové skóre 32 – 24 = 8

```
A A E E C C D D E E F
A A - - - - D D K K K E F G G
4+4-10-1-1-1+6+6+1+1-3        = 6
```

Skóre

```
1 MAMUZDOST--STAROSTISHAMIZNOSTIRATOLESTI   37
  ||| .|||| |||| . | | | . |||
1 MAMRADOSTZESTAR-------O-Z----I--TNO-STI   24
```

Gap_penalty: 1

Extend_penalty: 2

Score: 55

```
1 MAMUZDOST--STAROSTISHAMIZNOSTIRATOLESTI   37
  ||| .|||| |||||...:. |||
1 MAMRADOSTZESTAROZITNO---------------STI   24
```

Gap_penalty: 12

Extend_penalty: 2

Score: 4

Alignment DNA

U nukleových kyseliny nemá smysl posuzovat podobnost:

Frekvence mutací všech bází je obdobná, takže nejjednodušší hodnocení je: shoda (1), neshoda (0)

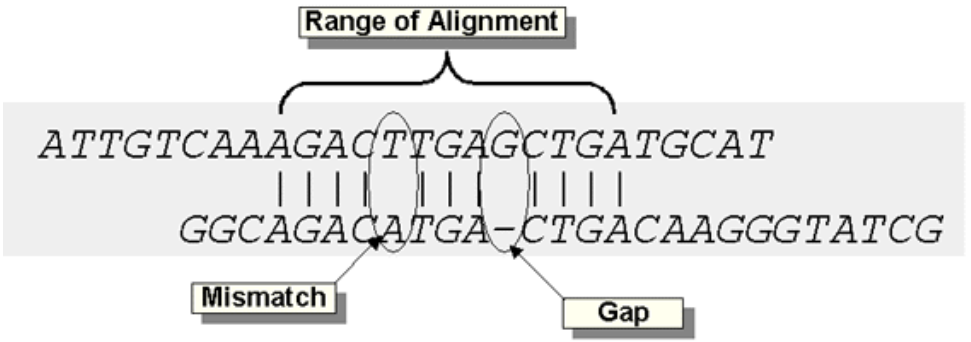
tím se nerozliší výborný alignment krátkých a mizerný dlouhých sekvencí:
proto **penalizace záměn,** např.:

match score +5

mismatch score -4

gap penalty: opening -10, extending -2

Každé dvojici sekvencí je ve výsledku přiřazeno číslo – **skóre**, které **určuje míru** jejich **podobnosti**



$S = \sum(\text{identities, mismatches}) - \sum(\text{gap penalties})$

$\text{Score} = \text{Max}(S)$

Čím vyšší je skóre, tím vyšší je podobnost.
Podle použité matice může být skóre i záporné.

Přesto:

Jak statisticky významné je skóre?

Pokud je podobnost dostatečně významná lze usuzovat na společné evoluční vztahy . Ale co je DOSTATEČNĚ?

závisí na typu sekvence a její délce

- Pravděpodobnost, že dvě rezidua v nepříbuzných sekvencích jsou identické je:

  25% v NA, 5% v proteinech

- Vliv délky sekvence
  - čím kratší sekvence, tím větší je šance, že alignment je dán náhodnou shodou. Čím delší, tím je méně pravděpodobné, že je stejná úroveň podobnosti výsledkem náhody.
  - kratší sekvence vyžadují vyšší cut-off pro zjištění příbuznosti než u delších sekvencí

Multiple sequence alignment - MSA

(mnohonásobné sekvenční přiložení)

Multiple alignment slouží k:

- Nalezení „diagnostického vzoru“ (diagnostic patterns) na jehož základě jsou **charakterizovány proteinové rodiny**
- Odhalení či dokázání **homologie** mezi novou sekvencí a sekvencemi v databázích
- Určení vzájemné příbuznosti sekvencí v rámci skupiny – tvorba **fylogenetických stromů**
- **Predikci** sekundární a terciární **struktury** nových proteinů
- Navržení primerů (oligonukleotidů) pro PCR

Multiple sequence alignment - MSA

(mnohonásobné přiložení)

- Dynamické programování (dynamic programming) – rozšíření pairwise alignmentu - náročné na paměť a čas, nevhodné pro více než 3-4 sekvence (n=rozměrný prostor)

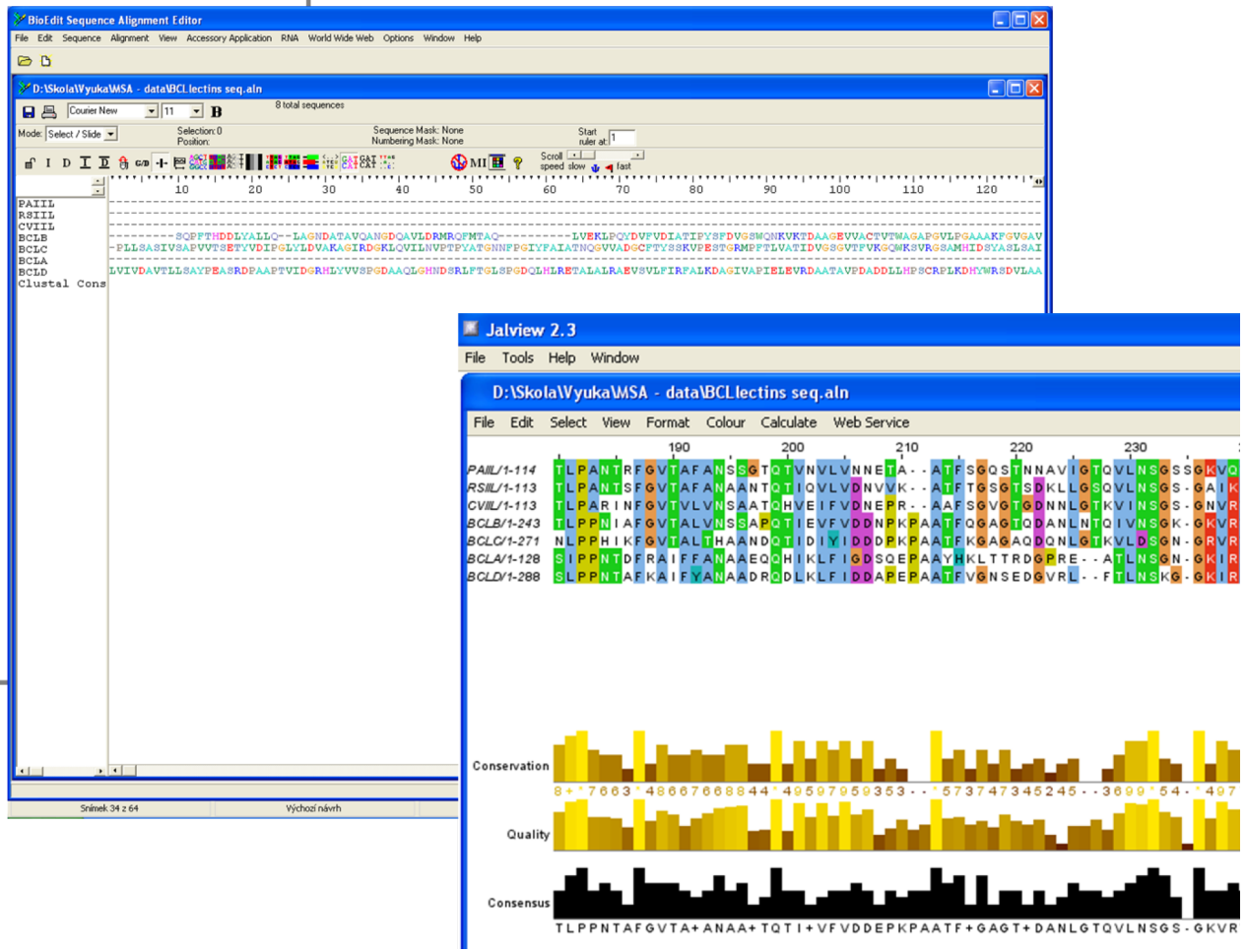
- **Progresivní alignment** (progressive sequence alignment) – nejčastěji používaný k vytvoření alignmentu; využívá fylogenetické informace – hierarchický, nejdříve identifikuje nejpodobnější sekvence a následně inkorporuje ostatní

- Iterativní alignment (iterative sequence alignment) – odstraňuje problémy progresivního alignmentu, který je závislý na prvotním přiložení nejpodobnějších sekvencí pomocí opakování alignmentu pro podskupiny sekvencí následující po globálním alignmentu

- Hledání motivů – nalezení částí konzervovaných sekvenčních motivů pomocí globálního přiložení a následně „hodnocení“ těchto úseků nezávisle na celé sekvenci

Výstup

```
CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment


PAIIL           ------------------------------------------------------------
RSIIL           ------------------------------------------------------------
CVIIL           ------------------------------------------------------------
BCLB            ---LVEKLPQYDVFVDIATIPYSFDVGSWQNKVKTDAAGEVVACTVTWAGAPGVLPGAAA
BCLC            AIATNQGVVADGCFTYSSKVPESTGRMPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDS
BCLA            ------------------------------------------------------------
BCLD            LRETALALRAEVSVLFIRFALKDAGIVAPIELEVRDAATAVPDADDLLHPSCRPLKDHYW


PAIIL           ----------------------------------------------------------ATQGVFT
RSIIL           ----------------------------------------------------------AQQGVFT
CVIIL           ----------------------------------------------------------AQQGVFT
BCLB            KFGVGAVVN----------------YFSKATPQPVQPAPVP--------TGGGERDGIFT
BCLC            YASLSAIWG----------------TAAPSSQGSGNQGAETGGTGAGNIGGGGERDGTFN
BCLA            ------------------------------------ADSQT---------SSNRAGEFS
BCLD            RSDVLAAGATTCTADFAVCDRDGTVSGYFRWETSIEIAGSQPDTKQPGFKPSSDRNGNFS
                                                                   * *.


PAIIL           LPANTRFGVTAFANSSGTQTVNVLVNNETA--ATFSGQSTNNAVIGTQVLNSGSSGKVQV
RSIIL           LPANTSFGVTAFANAANTQTIQVLVDNVVK--ATFTGSGTSDKLLGSQVLNSGS-GAIKI
CVIIL           LPARINFGVTVLVNSAATQHVEIFVDNEPR--AAFSGVGTGDNNLGTKVINSGS-GNVRV
BCLB            LPPNIAFGVTALVNSSAPQTIEVFVDDNPKPAATFQGAGTQDANLNTQIVNSGK-GKVRV
BCLC            LPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQNLGTKVLDSGN-GRVRV
BCLA            IPPNTDFRAIFFANAAEQQHIKLFIGDSQEPAAYHKLTTRDGPRE--ATLNSGN-GKIRF
BCLD            LPPNTAFKAIFYANAADRQDLKLFIDDAPEPAATFVGNSEDGVRL--FTLNSKG-GKIRI
                :*..  * .   .:::  * :.: :.:     * .      .       ::*   * ::.
```



MSA – programové balíky

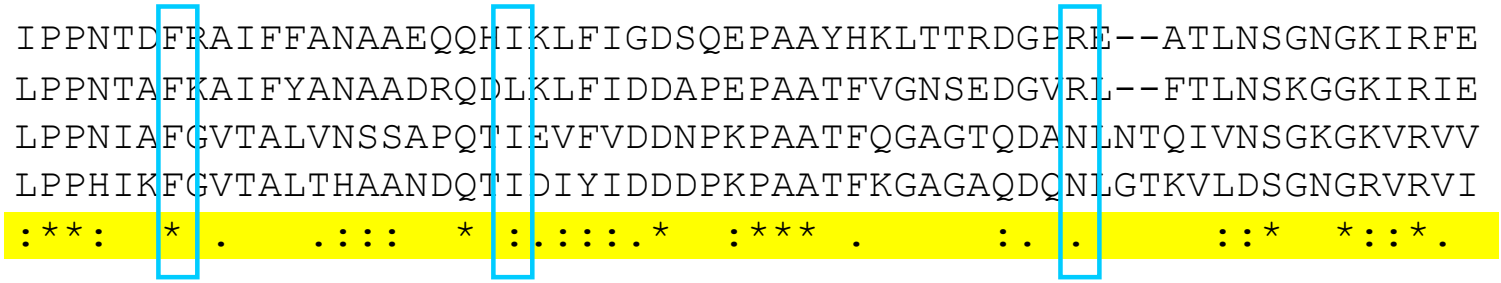
Za posledních 25 let vzniklo přes 50 MSA programových balíků
(Wallace, I. M., O'Sullivan, O., Higgins, D. G. and Notredame, C. (2006). M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. Nucleic Acids Res. **34**, 1692-1699.)

- Clustal W (Thompson et al., 1994)
- Clustal X (Thompson et al., 1997)
- Dialign2 (Morgenstern, 1999)
- T-Coffee (Notredame et al., 2000)
- MAFFT (Katoh et al., 2002)
- MUSCLE (Edgar, 2004)
- Kalign (Lassmann, 2005)

* - identické residuum ve všech sekvencích

: - silně konzervovaný sloupec

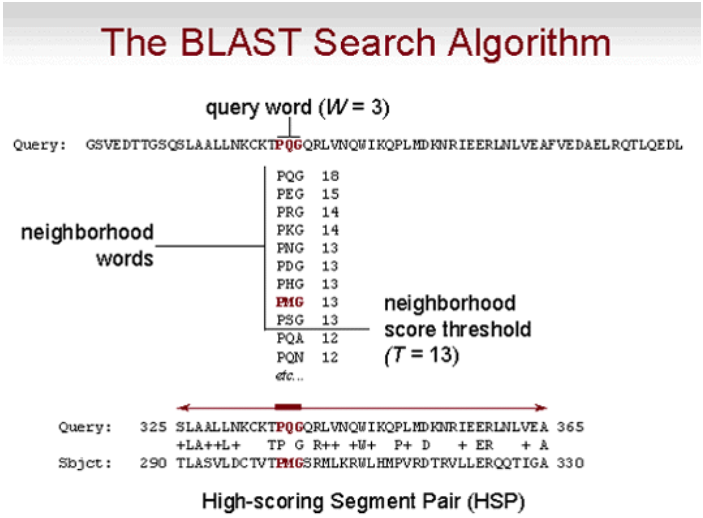
. - slabě konzervovaný sloupec

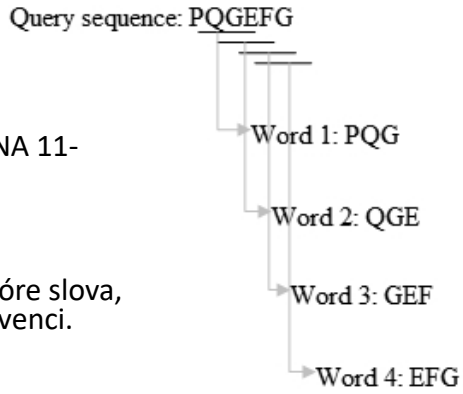


BLAST algoritmus

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

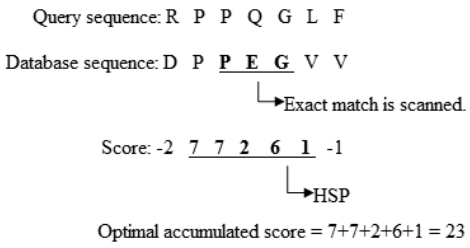
Heuristický algoritmus jehož základem je **hledání slov** (několikapísmenných sekvencí), s dostatečnou podobností (poskytují dostatečně vysoké skóre v substituční matici).



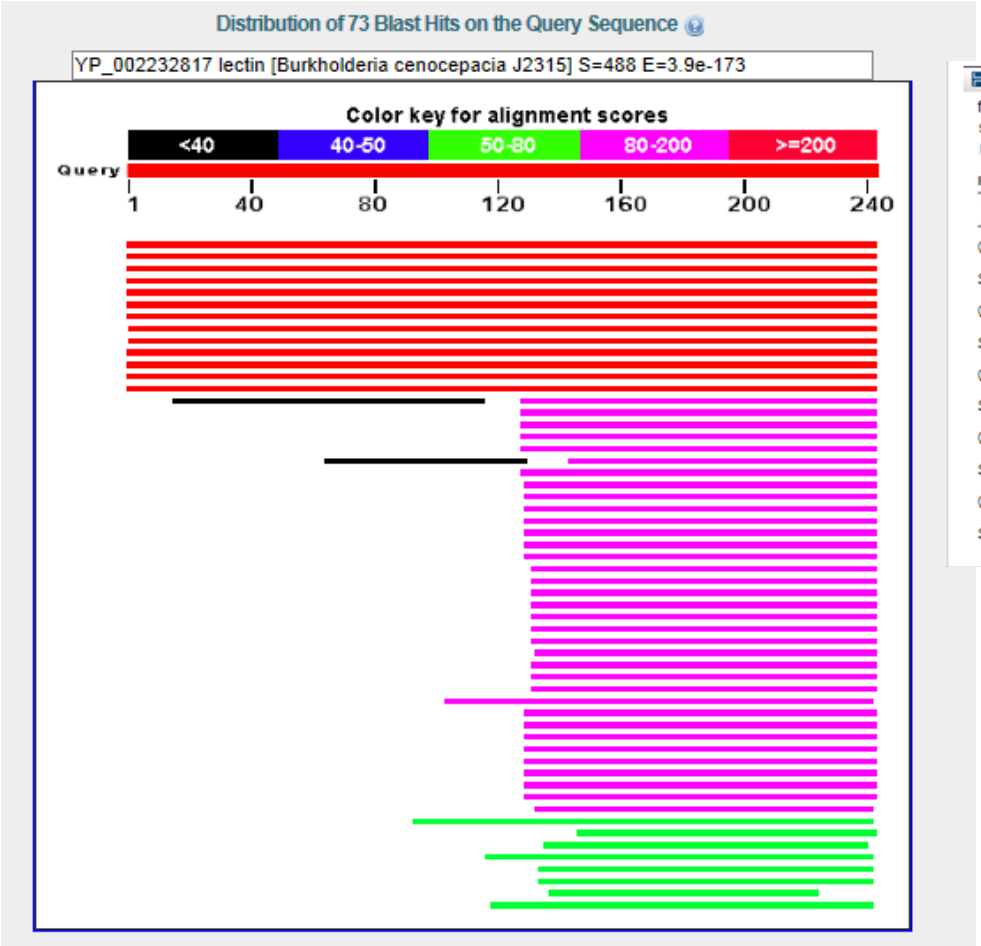


- **Tvorba k-písmenných slov ze vstupní sekvence**
  pro proteiny typicky 3-písmenných (v případě DNA 11-písmenných)
- **Porovnání slov na základě substituční matice**
  algoritmus BLAST hledá na základě vloženého skóre slova, která jsou podobná každému slovu v zadané sekvenci. Vyhovující slova jsou následně uspořádána.
- **Prohledání databázových sekvencí**
  Je hledána shoda s nalezenými vysoce podobnými slovy.
- **Rozšíření slov na segmenty**
  Přesné shody slov s databázovými sekvencemi jsou rozšiřovány oběma směry. To pokračuje dokud skóre pro tuto dvojici sekvencí je dostatečně vysoké.

Novější verze BLASTu (BLAST2) má mj. níže nastavenu hladinu pro hledání podobných slov, což rozšiřuje možnost nalezení vzdálenějších homologů.



Výstup z BLASTu



Download GenPept Graphics

fucose-binding lectin II [Burkholderia multivorans ATCC BAA-247]

Sequence ID: ref|ZP_15916739.1| Length: 274 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 31 to 274 GenPept Graphics

Score	Expect	Method
443 bits(1140)	4e-155	Compositional matrix adju

```
Query  2    QPFTHDDLYALLQLAGNDATAVC
            QPFTHDDLYALLQLAGNDA AVC
Sbjct  31   QPFTHDDLYALLQLAGNDAKAVC

Query  62   SFDVGSWQNKVKTDAAGEVVAC1
            SFDVGSWQNKVKTDAAG+VVAC1
Sbjct  91   SFDVGSWQNKVKTDAAGQVVAC1

Query  120  PAPVPTGGGERDGIFTLPPNIAI
             P     GGGERDG+F LPPNIAI
Sbjct  151  PDTATAGGGERDGVFNLPPNIAI

Query  180  LNTQIVNSGKGKVRVVVTANGKI
             LNTQIVNSG GKVRVVVT NGKI
Sbjct  211  LNTQIVNSGNGKVRVVVTVNGKI

Query  240  WPLG  243
             WPLG
Sbjct  271  WPLG  274
```

Download GenPept Graphics

sugar-binding lectin protein [Ralstonia solanacearum PSI07]

Sequence ID: ref|YP_003750856.1| Length: 114 Number of Matches: 1

See 3 more title(s)

Range 1: 3 to 114 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
124 bits(312)	2e-32	Compositional matrix adjust.	62/114(54%)	80/114(70%)	2/114(1%)

```
Query  130  RDGIFTLPPNIAFGVTALVNSSAPQTIEVFVDDNPKPAATFQGAGTQDANLNTQIVNSGK  189
            + G+FTLP N   FGVTA  N++   QTI+V VD+  K  ATF G+GT D  L +Q++NSG+
Sbjct  3    QQGVFTLPANTNFGVTAFANAANTQTIKVLVDNVVK--ATFSGSGTSDKLLGSQVLNSGR  60

Query  190  GKVRVVVTANGKPSKIGSRQVDIFKKTYFGLVGSEDGGDGDYNDGIAILNWPLG  243
            G V++ V+ NGKPS + S Q  +  K  F +VGSED  D DYNDGIA+LNWPLG
Sbjct  61   GAVQIQVSVNGKPSDLVSNQTILANKLNFAMVGSEDSSDNDYNDGIAVLNWPLG  114
```

Download GenPept Graphics

fucose-binding lectin PA-IIL [Pseudomonas aeruginosa ATCC 25324]

Sequence ID: ref|ZP_15618368.1| Length: 115 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 5 to 115 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
117 bits(294)	7e-30	Compositional matrix adjust.	61/113(54%)	77/113(68%)	3/113(2%)

```
Query  132  GIFTLPPNIAFGVTALVNSSAPQTIEVFVDDNPKPAATFQGAGTQDANLNTQIVNSGK-G  190
            G+FTLP N  FGVTA  NSS  QT+ V V  N + AATF G  T +A + TQ++NSG  G
Sbjct  5    GVFTLPANTQFGVTAFANSSGTQTVNVLV--NNETAATFSGQSTNNAVIGTQVLNSGSSG  62

Query  191  KVRVVVTANGKPSKIGSRQVDIFKKTYFGLVGSEDGGDGDYNDGIAILNWPLG  243
            KV+V V+ NG+PS + S QV +  +  F LVGSEDG D DYND + ++NWPLG
Sbjct  63   KVQVQVSVNGRPSDLVSAQVILTNELNFALVGSEDGTDNDYNDAVVVINWPLG  115
```

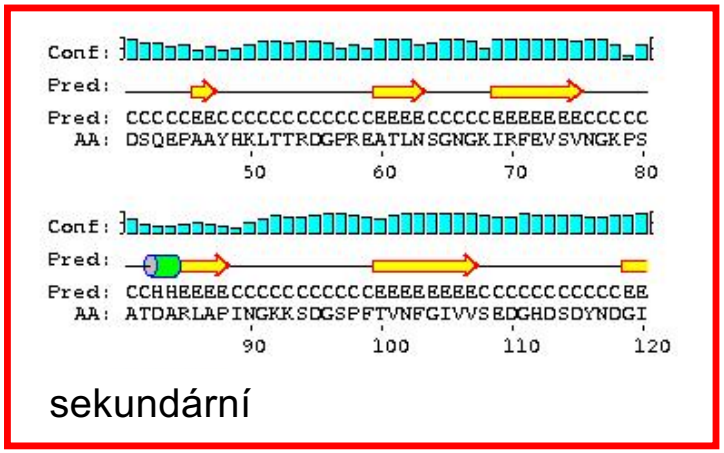
Osnova

- **Úvod do bioinformatiky**
  - Definice, molekulárně biologická data, databáze
  - Rozdělení databází, bioinformatická centra
- **Manipulace se sekvencemi**
  - Sekvence biomakromolekul, aminokyseliny, báze, alignment
  - Význam alignmentu, přiložení páru sekvencí a vícenásobné přiložení
- **Predikce struktury proteinů**
  - Predikce 2-D struktury proteinů, predikce 3-D struktury proteinů
  - Threading, Homology modeling, *Ab initio*
- **Proteinové rodiny**
  - Rodiny, domény, sekvenční vzory
  - Patterns, profiles, fingerprints, databáze
- **Predikce genů**
  - Predikce genů u prokaryot a eukaryot, predikční nástroje a postupy

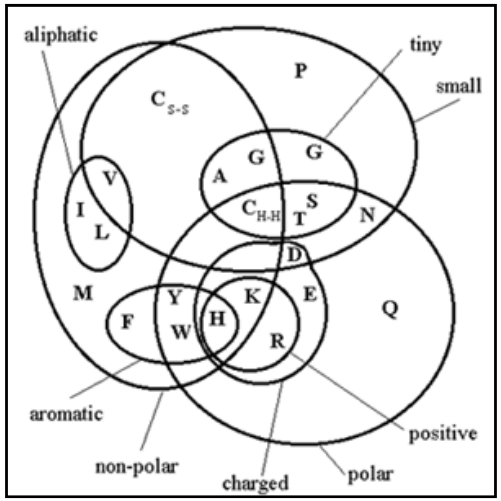
Predikce struktury proteinů

ADSQTSSNRAGEFSIPPNTDFRAIF
FANAAEQQHIKLFIGDSQEPAAYHK
LTTRDGPREATLNSGNGKIRFEVSV
NGKPSATDARLAPINGKKSDGSPF
TVNFGIVVSEDGHDSDYNDGIVVL
QWPIG

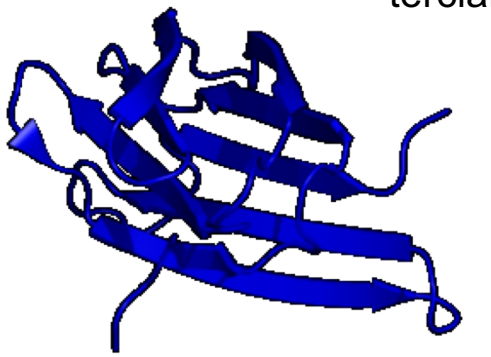
primární
(sekvence)



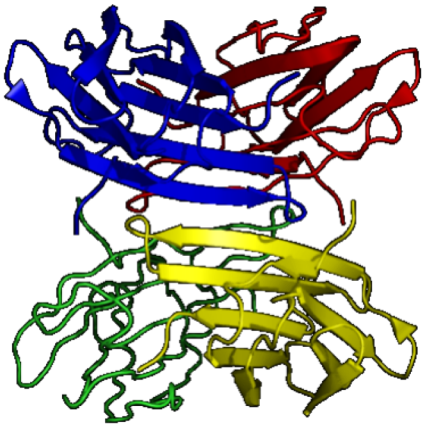
sekundární



terciární



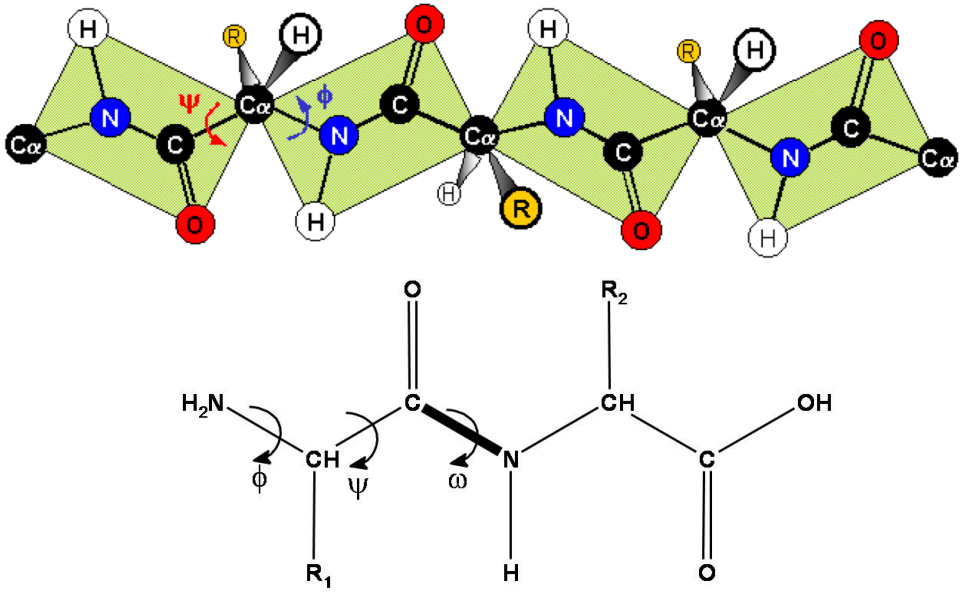
kvartérní



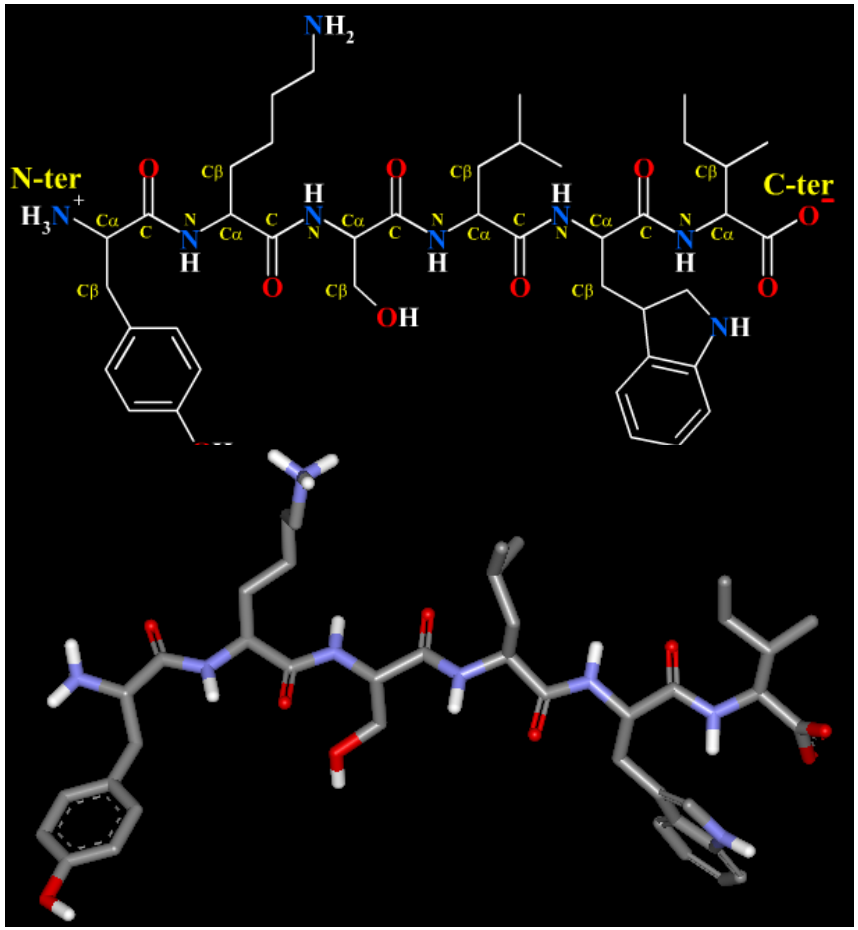
Aminokyseliny s podobnými vlastnostmi mohou plnit v proteinu stejné funkce – bývají vzájemně zastupitelné

Predikce struktury proteinů

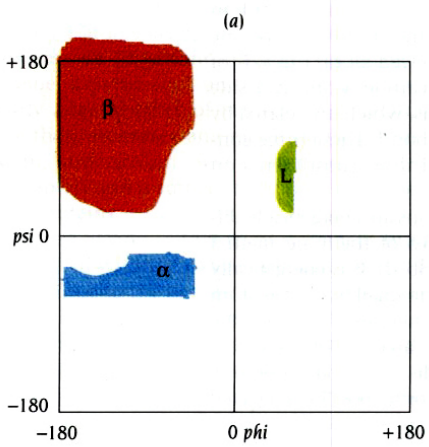
Peptidová vazba – planární

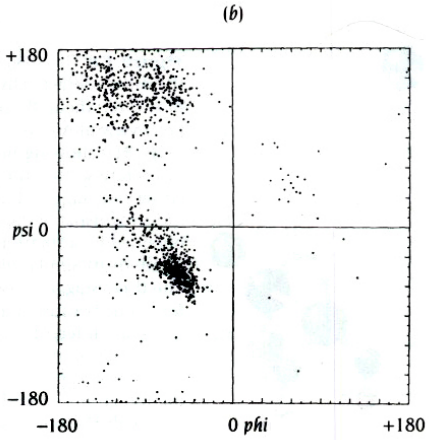


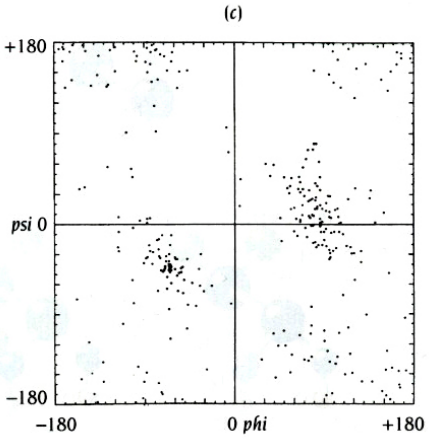
Konformaci kostry určují dva torzní úhly ϕ a ψ (úhel ω je 180°)



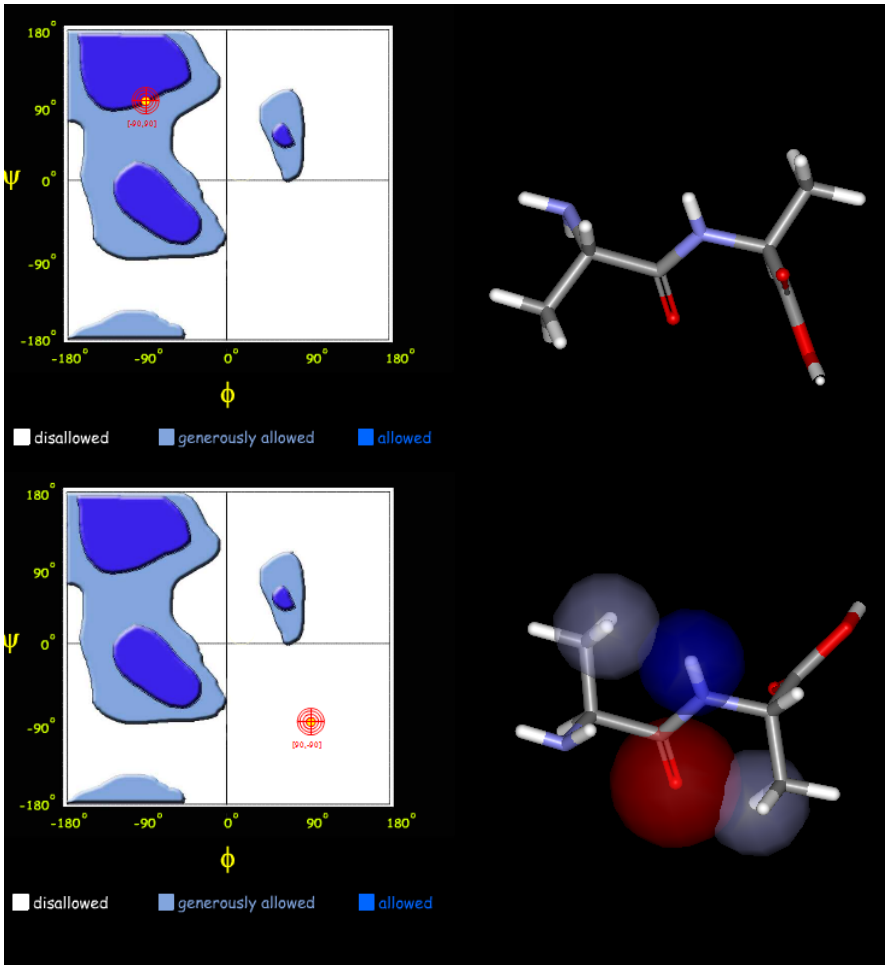
Predikce struktury proteinů







Ramachandranův diagram



Predikce 2-D struktury proteinů

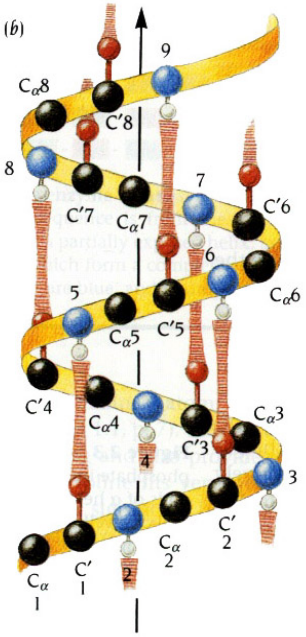
- **Stabilní** konformace **polypeptidového** řetězce.
- Důležité pro udržení proteinové 3-D struktury.
- Cca 50 % aa residuí je součástí **α-helixů** nebo **β-skládaných listů.**
- Predikce sekundárních struktur znamená **předpověď** zda residuum spadá mezi H (helix), E (list) nebo C (smyčka).
- Důležité pro klasifikaci proteinů.
- Separace domén a funkčních motivů.
- **Sekundární struktury** jsou mnohem konzervovanější než aminokyselinová sekvence.
- Předpověď sekundárních struktur předchází obvykle jako **mezikrok** při předpovědi terciární struktury při threadingových metodách.

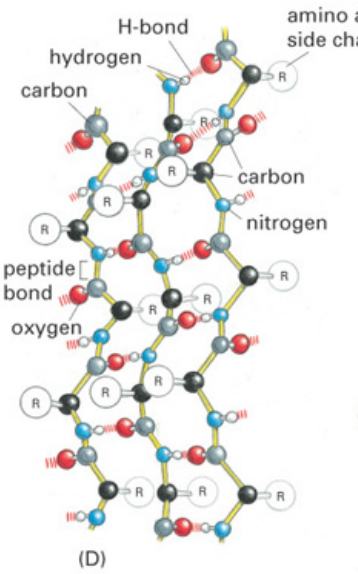
Predikce 2-D struktury proteinů

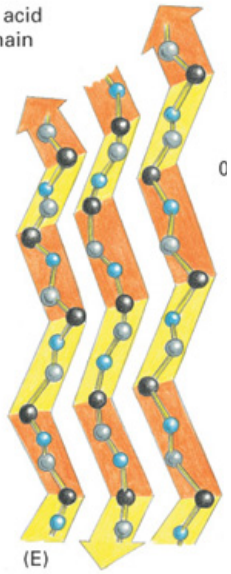
- Rozlišujeme tři základní typy
  - **H** – helix
  - **E** – β-list
  - **C/(-)** – smyčka/náhodné klubko (coil) – někdy jsou rozlišovány tyto dvě varianty

- S dobrou přesností lze určit helix (jejich tvorba je určena interakcemi „krátkého“ dosahu), u β -listu (interakce „dlouhého“ dosahu) úspěšnost určení 2D struktury klesá.

- Některé programy přidávají i číslo vyjadřující pravděpodobnost pro daný AK zbytek (např. H 60% - znamená, že s 60% pravděpodobností se jedná o helix).



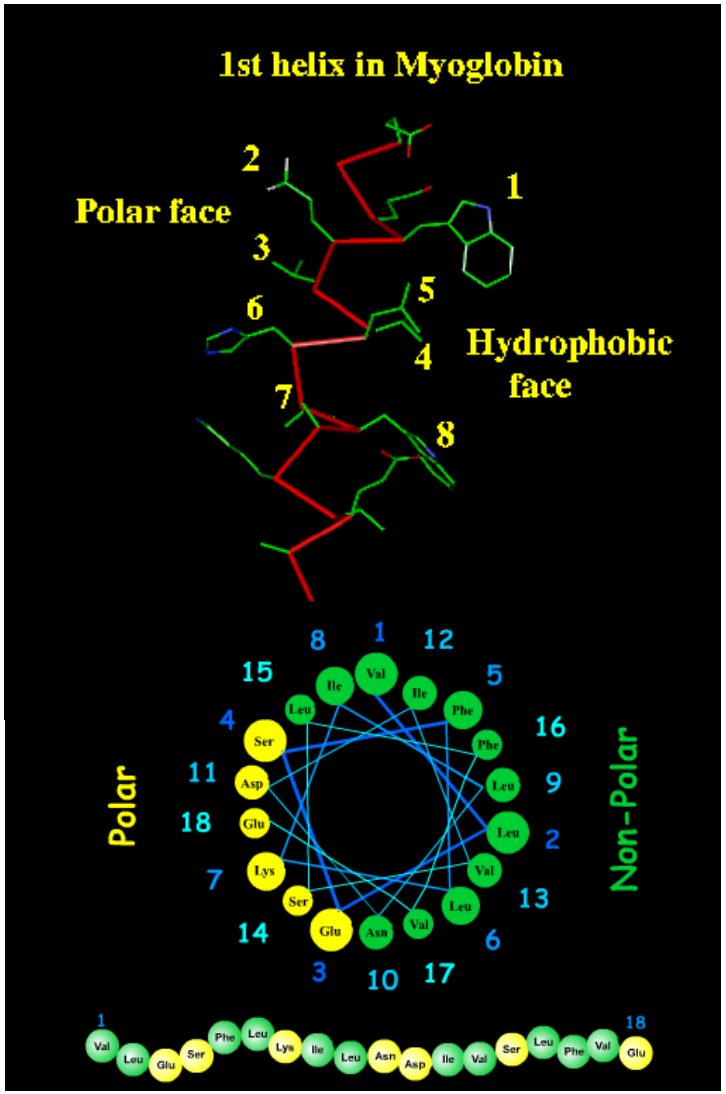




Typické znaky α -helix

Často je helix částečně exponovaný – tj. jedna strana je otočena dovnitř proteinu (hydrofobní), druhá ven (hydrofilní)

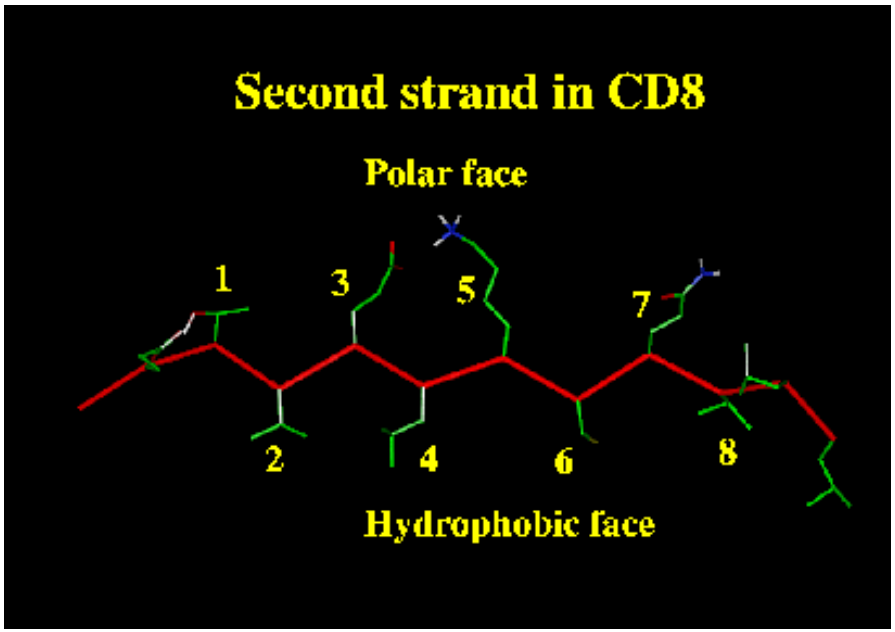
Potom pro 3.6 helix (α-helix) platí, že i, i+3, i+4 & i+7 -té reziduum míří na tutéž stranu. Jsou-li všechna hydrofobní či naopak hydrofilní = zřejmě α -helix

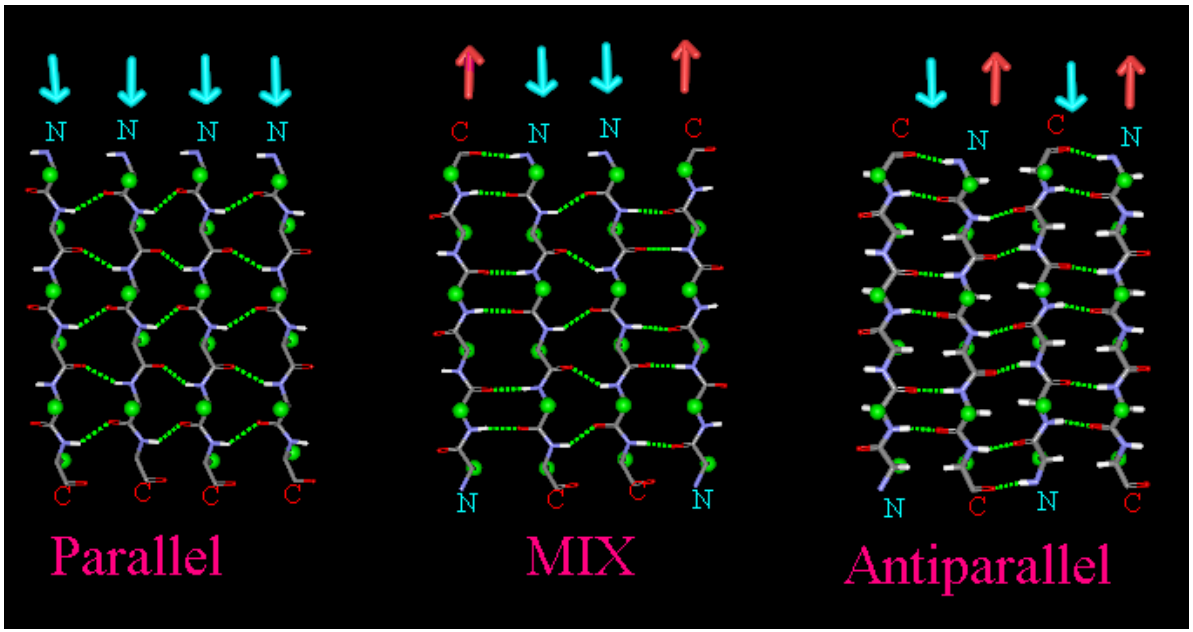


Typické znaky β –list (musí být stabilizován jinou částí polypeptidového řetězce!)

U β -listu se střídají boční řetězce po 180°

pro částečně zanořený β -list platí, že každé liché reziduum je polární, každé sudé nepolární, u plně zanořeného jsou všechna nepolární… tj. residua směřující na stejnou stranu by měla mít stejný charakter





Predikce 2-D struktury proteinů
Predikční algoritmy

1. **generace: *ab-initio***, vychází z fyzikálně-chemických vlastností a ze statistiky pro jednotlivá rezidua (Chou-Fasman, GOR (Garnier, Osguthorpe, Robson))
2. **generace: *plus incorporation of more local residue interactions***, zahrnovala i vliv nejbližších AK na zkoumané reziduum – předpověď max. 60% správnost, u β -listu do 40%
3. **generace: *homology-based models***, zahrnuje navíc multiple sequence alignment a využívá skutečnosti, že 2D struktura se zachovává déle než sekvenční podobnost – až 80% spolehlivost (závisí na metodě)

Plus využití skrytých Markovových modelů a neuronových sítí

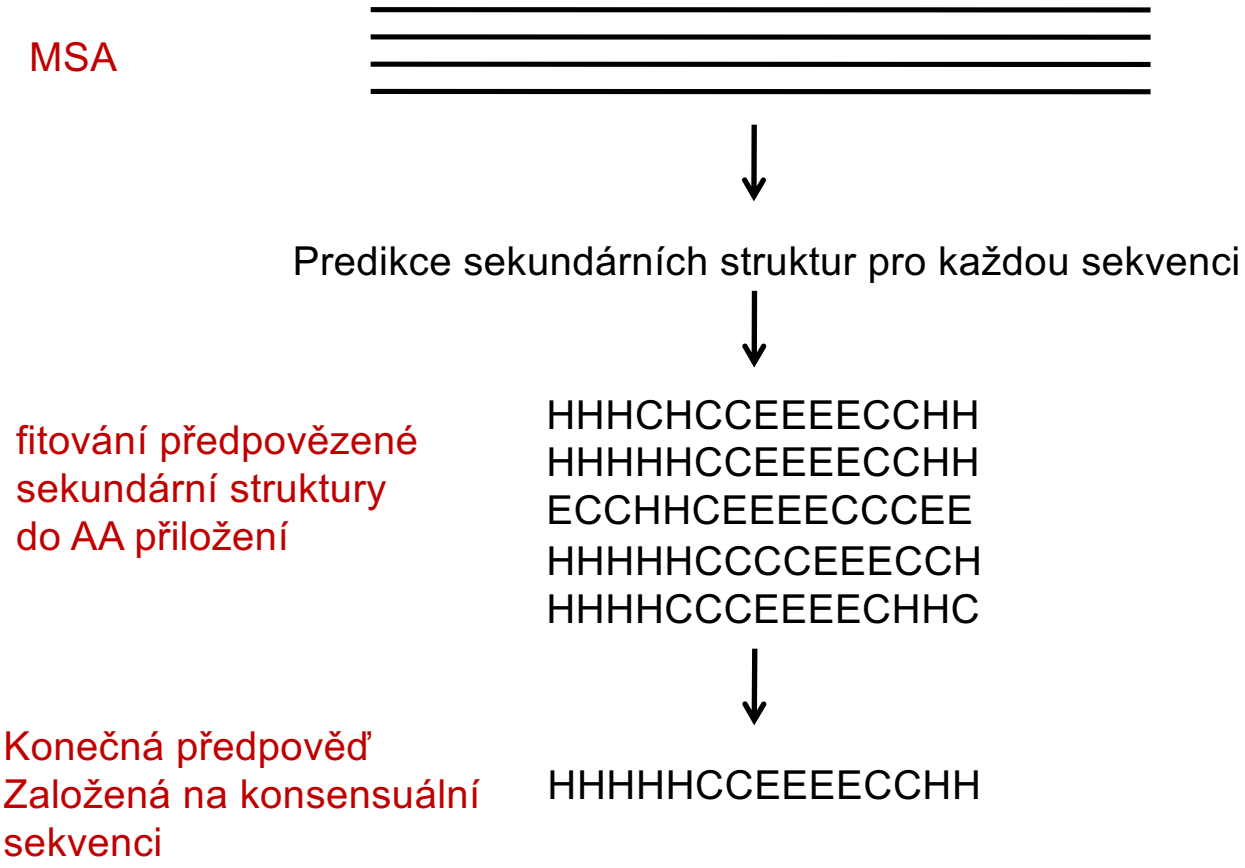
1. Generace – *ab inicio*

Relative Amino acid Propensity Values for Secondary Structure Elements Used in the Chou-Fasman Methods

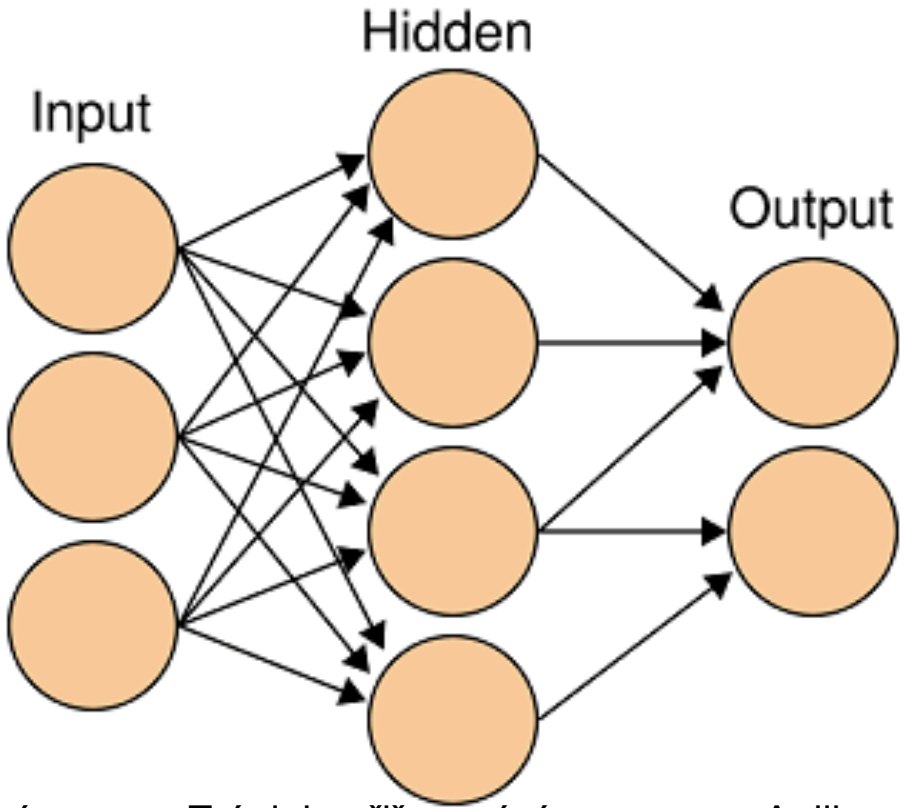
Amino Acid	(α-Helix)	P (β-Strand)	P (Turn)
Alanine	1.42	0.83	0.66
Arginine	0.98	0.93	0.95
Asparagine	0.67	0.89	1.56
Aspartic acid	1.01	0.54	1.46
Cysteine	0.70	1.19	1.19
Glutamic acid	1.51	0.37	0.74
Glutamine	1.11	1.11	0.98
Glycine	0.57	0.75	1.56
Histidine	1.00	0.87	0.95
Isoleucine	1.08	1.60	0.47
Leucine	1.21	1.30	0.59
Lysine	1.14	0.74	1.01
Methionine	1.45	1.05	0.60
Phenylalanine	1.13	1.38	0.60
Proline	0.57	0.55	1.52
Serine	0.77	0.75	1.43
Threonine	0.83	1.19	0.96
Tryptophan	0.83	1.19	0.96
Tyrosine	0.69	1.47	1.14
Valine	1.06	1.70	0.50

$$\frac{\frac{R_i(SS)}{R_t(SS)}}{\frac{\Sigma R_i}{\Sigma R_t}}$$

3. Generace - Homology-based methods



3. Generace – neuronové sítě



Sekvence se známou sek. strukturou

Trénink, přiřazování Váh jednotlivým funkcím

Aplikace nalezených algoritmů na neznámou sekvenci

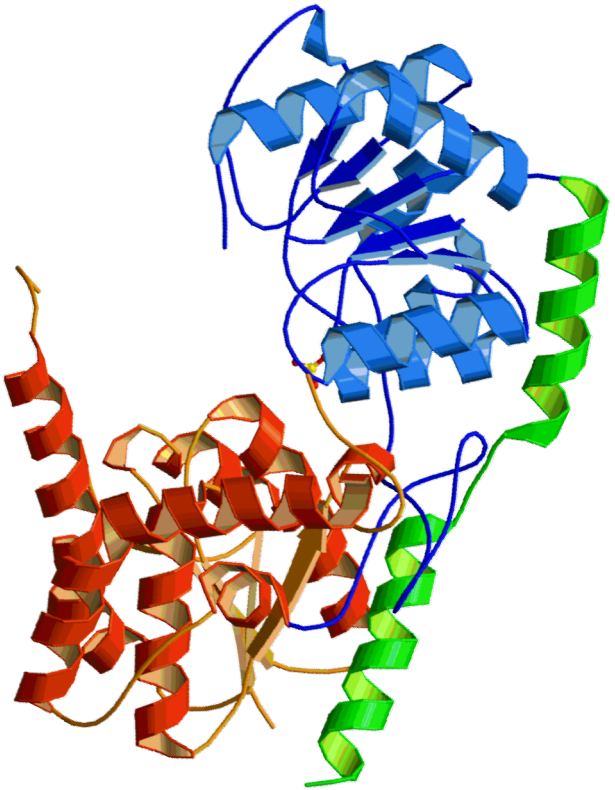
Predikce 2-D struktury proteinů
Programové balíky

- AGADIR - An algorithm to predict the helical content of peptides
- APSSP - Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server
- GOR - Garnier et al, 1996
- HNN - Hierarchical Neural Network method (Guermeur, 1997)
- HTMSRAP - Helical TransMembrane Segment Rotational Angle Prediction
- Jpred - A consensus method for protein secondary structure prediction at University of Dundee
- JUFO - Protein secondary structure prediction from sequence (neural network)
- nnPredict - University of California at San Francisco (UCSF)
- Porter - University College Dublin
- PredictProtein - PHDsec, PHDacc, PHDhtm, PHDtopology, PHDthreader, MaxHom, EvalSec from Columbia University
- Prof - Cascaded Multiple Classifiers for Secondary Structure Prediction
- PSA - BioMolecular Engineering Research Center (BMERC) / Boston
- PSIpred - Various protein structure prediction methods at Brunel University
- SOPMA - Geourjon and Deléage, 1995
- SSpro - Secondary structure prediction using bidirectional recurrent neural networks at University of California
- DLP-SVM - Domain linker prediction using SVM at Tokyo University of Agriculture and Technology

Predikce 3-D struktury/foldu proteinů

- Klasifikace proteinů
- Předpověď funkce
- Vytvoření modelu pro další studium

- **Threading - „navlékání“**
- **Homology modeling**
- ***Ab initio* metody**



Predikce 3-D struktury/foldu proteinů - Threading

• **„Navlékání“** = rozpoznání a přiřazení proteinového foldu aminokyselinové sekvenci.

• sekvence je porovnávána s databází existujících **foldů (3D profilů)** a na jejich základě jsou konstruovány 3D- modely.

• 3D profil - každému reziduu v 3D struktuře je přiřazena environmentální proměnná (obsah polárních atomů v postranním řetězci, skrytá plocha, sekundární elementy, apod.) vycházející z předpokladu, že okolí rezidua je více konzervováno než aminokyselina samotná.

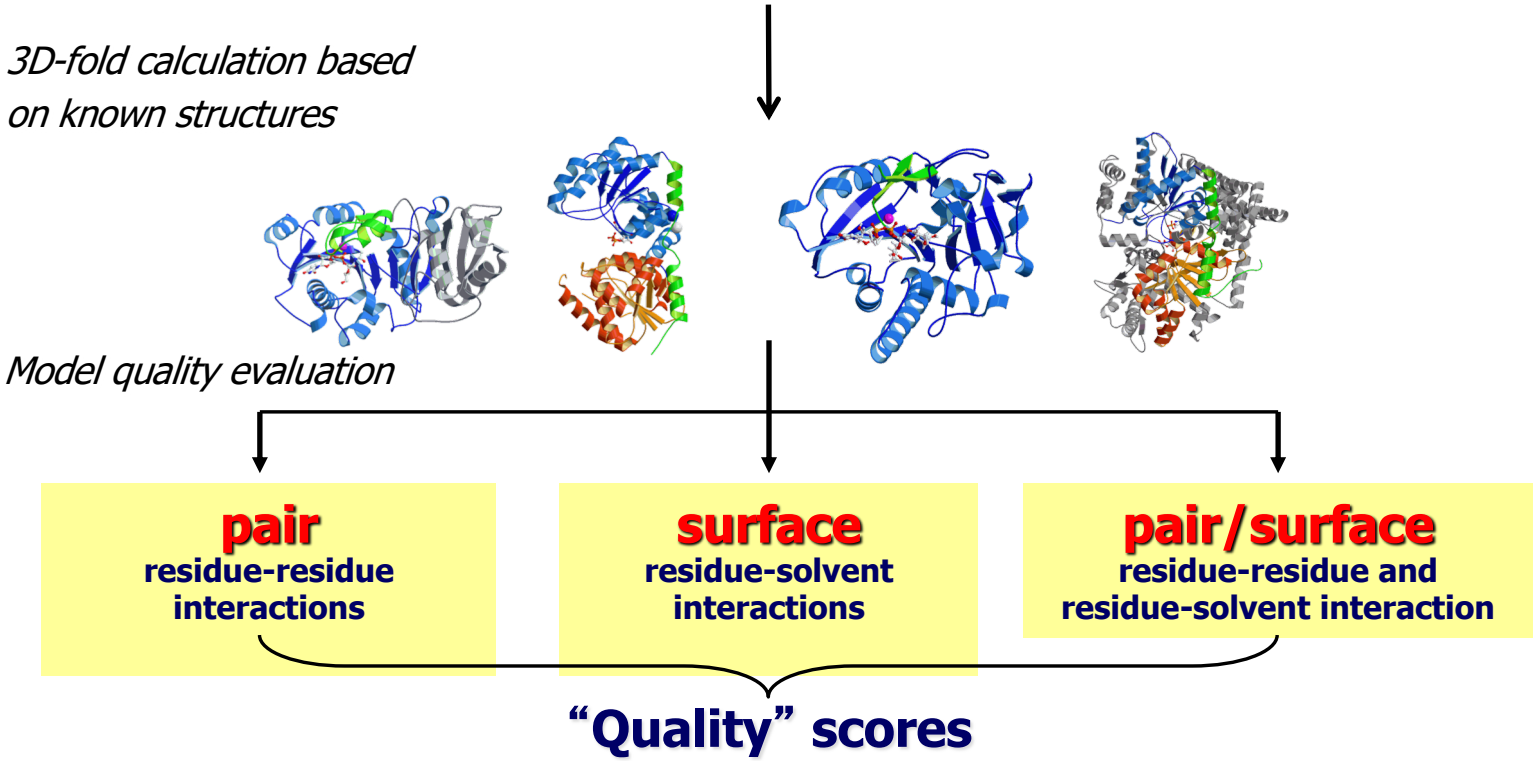
• Reziduum může být také popsáno pomocí svých interakcí.

• Výsledná kvalita modelu shoda je popsána pomocí Z-skóre nebo energie.

Často využíváme k hledání funkce neznámého proteinu a k odhadu 3D struktury

Predikce 3-D struktury/foldu proteinů - Threading

SDVDIEAGQTLVQVVNISNGETWVAIQLPAQYRSFDLVFENVSPSTSGSVLVAQMAPQSGGVYGSNYS
GSGWGNDLGGGGFYGYSEAKWMCLWPANRSGPNSKTGIYGTCKLMNLNQSNAVPSVTSNLFAPTAY
KNEPGYANVGGCCQKIRGLASSIQFAFALHGGNVPQNTDTFSGGTIKVYGWN



Predikce 3-D struktury/foldu proteinů - Homology modeling

- Přiložení cílové sekvence se sekvencí **homologního** proteinu se **známou 3D strukturou**
- Extrakce uhlíkové páteře ze struktury templátu a umístění postranních řetězců
- Modelování otoček a smyček
- Minimalizace energie
- Validace modelované struktury

MODELLER

Mostly used program in academic environment for serious homology modeling

SWISS-MODEL

An automated knowledge-based protein modelling server

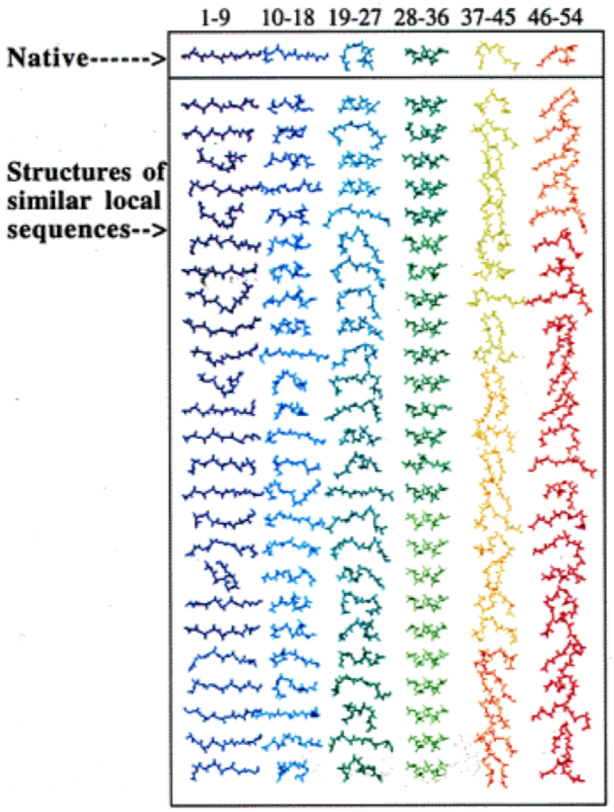
Obvykle se snažíme předpovědět skutečnou strukturu proteinu k další práci (predikce vazebných míst, dokování ligandů,…)

Predikce 3-D struktury/foldu proteinů - *Ab initio*

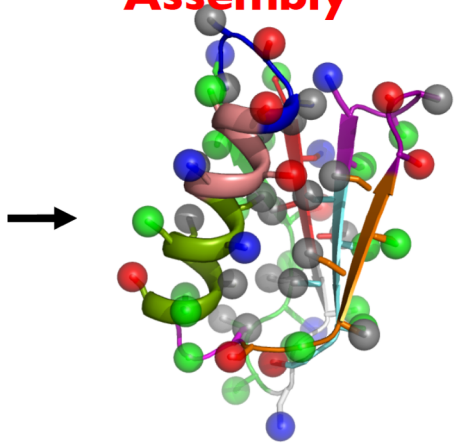
- **Přímý výpočet** nativní konformace (struktury) proteinu pouze ze sekvence.
- Nativní konformace je taková, která má ze všech možných nejnižší energii.
- Navzdory rozvoji výpočetní techniky, prohloubení znalostí o proteinech a vývoji metodiky se stále jedná o nevyřešený problém.
- **Budoucnost???**

De novo modelling with Rossetta

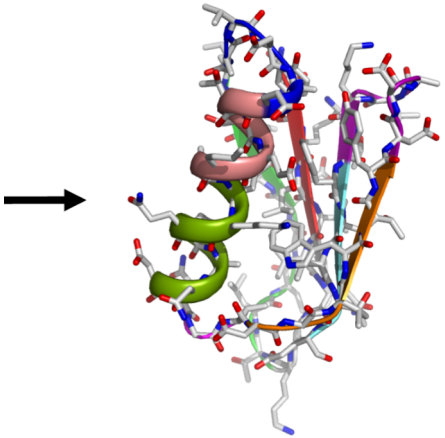
- fragments are selected from known structures
- the window-fragment matches are calculated using
  - PSI-BLAST to build a profile model of the sequence
  - the predicted secondary structure of the sequence



Stage I. Fragment Assembly



Stage II. All-atom refinement

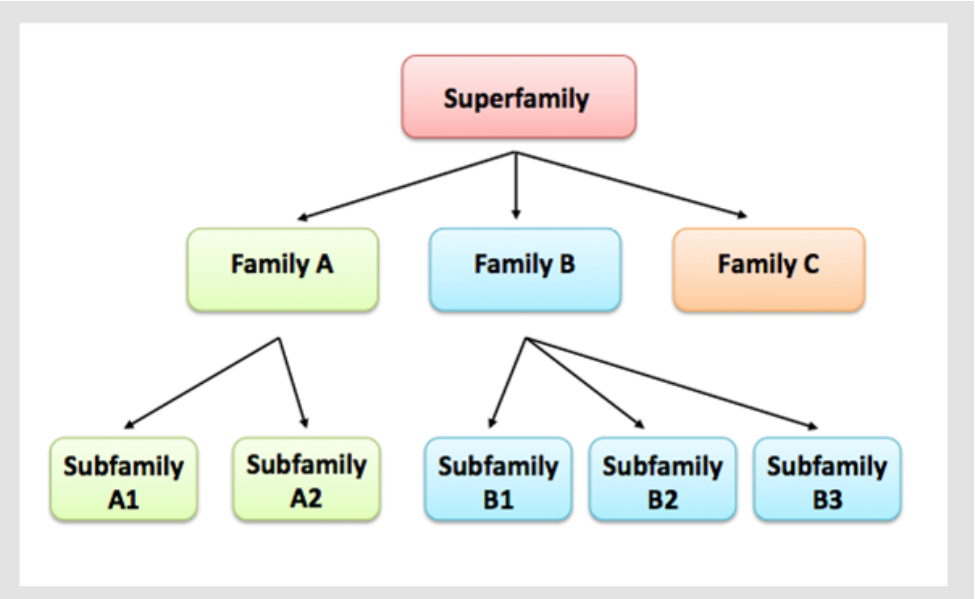


Osnova

- **Úvod do bioinformatiky**
  - Definice, molekulárně biologická data, databáze
  - Rozdělení databází, bioinformatická centra
- **Manipulace se sekvencemi**
  - Sekvence biomakromolekul, aminokyseliny, báze, alignment
  - Význam alignmentu, přiložení páru sekvencí a vícenásobné přiložení
- **Predikce struktury proteinů**
  - Predikce 2-D struktury proteinů, predikce 3-D struktury proteinů
  - Threading, Homology modeling, *Ab initio*
- **Proteinové rodiny**
  - Rodiny, domény, sekvenční vzory
  - Patterns, profiles, fingerprints, databáze
- **Predikce genů**
  - Predikce genů u prokaryot a eukaryot, predikční nástroje a postupy

Proteinové rodiny – klasifikace proteinů

- Proteiny mohou být rozděleny do skupin na základě **sekvenční** a **strukturní** podobnosti. Lze využít k predikci funkce nově identifikovaných proteinů.
- **Proteinová rodina** – skupina evolučně příbuzných proteinů (společný předek), s podobnou funkcí, strukturou a sekvencí.
- **Hierarchické uspořádání** proteinových rodin – nadrodina, rodina, podrodina.



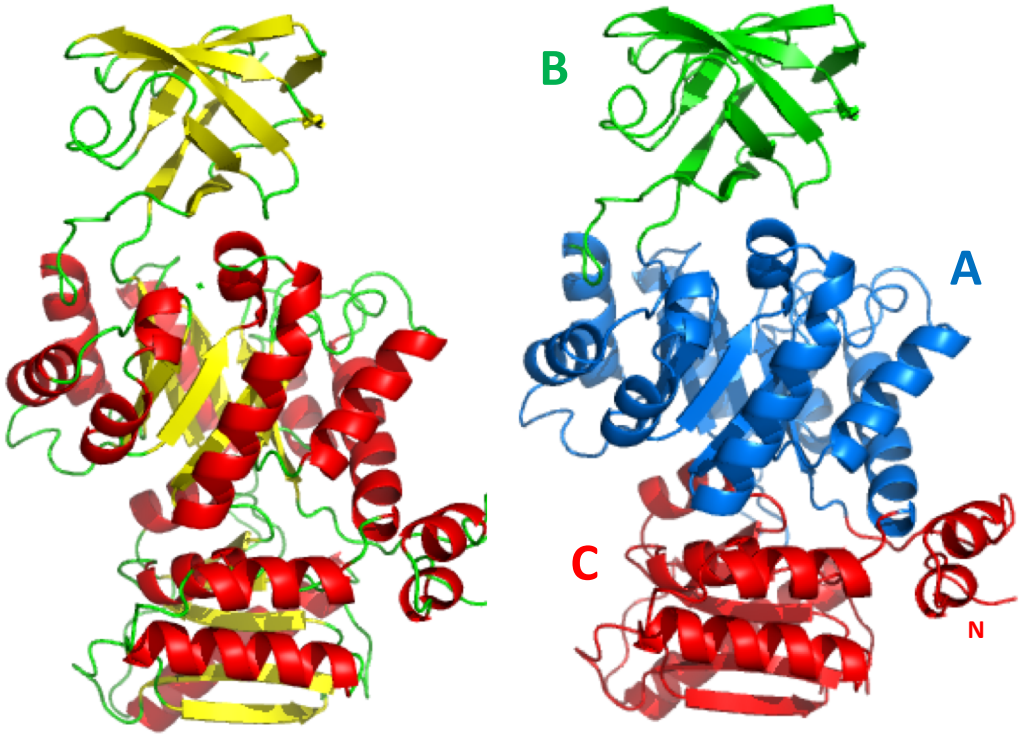
https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/protein-classification-introduction-embl-ebi-resou

Proteinové domény – klasifikace proteinů

- **Proteinové domény** jsou konzervované funkční a/nebo strukturní části proteinu. Většinou jsou nezávislé, tj. schopné správného sbalení a zachování funkce i po oddělení od zbytku proteinu.

- Určitá konkrétní doména se může vyskytovat v různých proteinech.

- **Doména vs. podjednotka**

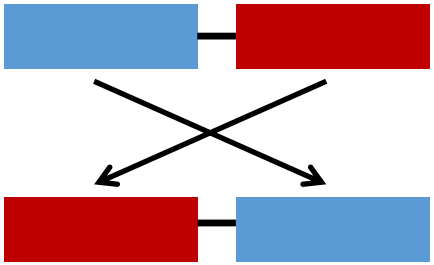


Pyruvátkinasa, tři domény + jedna krátká (A,B,C,N)

Proč detegovat domény?

PLLSASIVSAPVVTSETYVDIPGLYLDVAKAGIRDGKLQVILNVPTPYATGN
NFPGIYFAIATNQGVVADGCFTYSSKVPESTGRMPFTLVATIDVGSGVTFV
KGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQGSGNQGAETGGTGAGN
IGGGGERDGTFNLPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGA
QDQNLGTKVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGSRQVDIFKKSYFGIIGSED
GADDDYNDGIVFLNWPLG

ERDGTFNLPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQN
LGTKVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGSRQVDIFKKSYFGIIGSEDGADD
DYNDGIVFLNWPLGPLLSASIVSAPVVTSQTYVDIPGLYLDVAKAGIRDGK
LQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVVADGCFTYSSKVPESTGRMPF
TLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQGSG
NQGAETGGTGAGNIGGGGKLAAALEIKRASQPELAPEDPEDVEHHHHHH



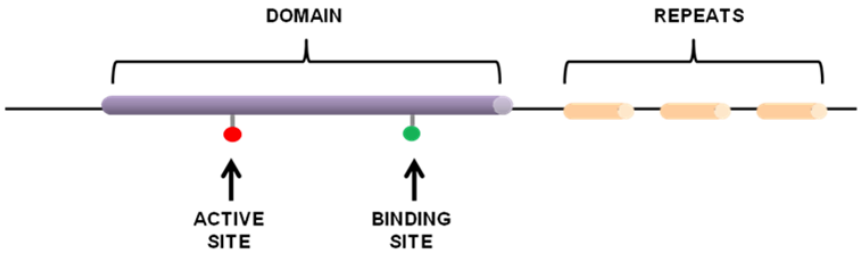
```
#
#=======================================

EMBOSS_001         1 --------------------------------------------------      0

EMBOSS_001         1 ERDGTFNLPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQ     50

EMBOSS_001         1 --------------------------------------------------      0

EMBOSS_001        51 NLGTKVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGSRQVDIFKKSYFGIIGSEDGAD    100

EMBOSS_001         1 ---------------PLLSASIVSAPVVTSETYVDIPGLYLDVAKAGIRD     35
                                    |||||||||||||||:||||||||||||||||||
EMBOSS_001       101 DDYNDGIVFLNWPLGPLLSASIVSAPVVTSQTYVDIPGLYLDVAKAGIRD    150

EMBOSS_001        36 GKLQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVVADGCFTYSSKVPESTGR     85
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
EMBOSS_001       151 GKLQVILNVPTPYATGNNFPGIYFAIATNQGVVADGCFTYSSKVPESTGR    200

EMBOSS_001        86 MPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQ    135
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
EMBOSS_001       201 MPFTLVATIDVGSGVTFVKGQWKSVRGSAMHIDSYASLSAIWGTAAPSSQ    250

EMBOSS_001       136 GSGNQGAETGGTGAGNIGGGGERDGTFNLPPHIKFGVTALTHAANDQTID    185
                     ||||||||||||||||||||
EMBOSS_001       251 GSGNQGAETGGTGAGNIGGGG----------------------------    271

EMBOSS_001       186 IYIDDDPKPAATFKGAGAQDQNLGTKVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGS    235
                           |.||:          |..|                 |:|
EMBOSS_001       272 -------KLAAA----------LEIK-----------------RAS----    283

EMBOSS_001       236 RQVDIFKKSYFGIIGSEDGADDDYNDGIVFLNWPLG    271
                      |.:         ::.||..|.:.:.       ...
EMBOSS_001       284 -QPE---------LAPEDPEDVEHHH-------HHH    302
```

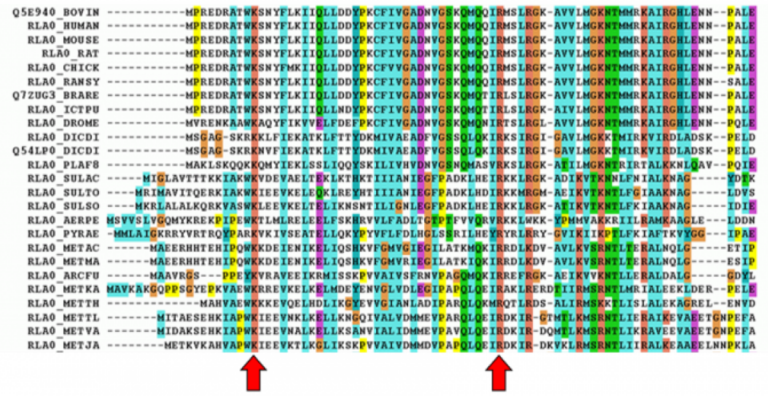
Sekvenční vzory, další charakteristiky proteinů

- **Sekvenční vzory –** skupina aminokyselin spojovaných s určitou funkcí nebo charakteristikou, může být důležitá pro celkovou funkci proteinu.

  Aktivní (katalytická) místa, vazebná místa, místa pro posttranslační modifikace, repetice.

- **Další charakteristiky proteinů („signatures“)** – na základě porovnání příbuzných proteinů (MSA) je možné vytvořit model (v matematickém smyslu slova) typický pro určitou skupinu proteinů (**patterns, profiles, fingerprints**).

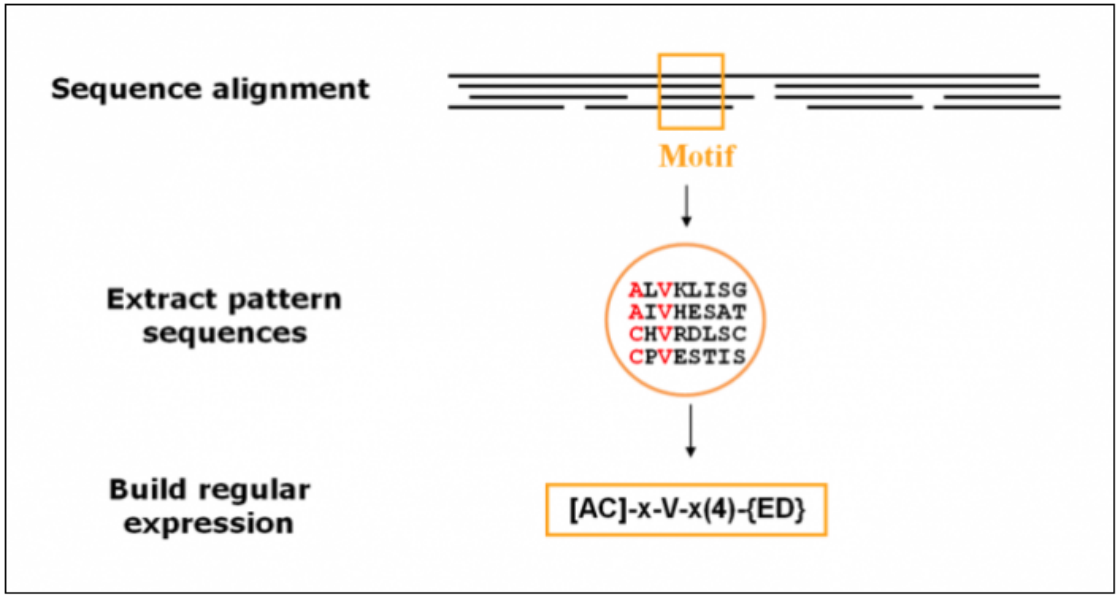




Identifikace konzervovaných aminokyselin nezbytných pro funkci proteinů pomocí MSA

„Patterns, profiles, fingerprints“

- **Patterns –** některé sekvenční vzory (aktivní místa enzymů) jsou tvořené jen několika aminokyselinami, které je možné identifikovat pomocí MSA.
- **Profiles –** odvozeny z MSA, vyhodnocením frekvence výskytu aminokyselin na každé jednotlivé pozici. Využívány k tvorbě proteinových rodin.

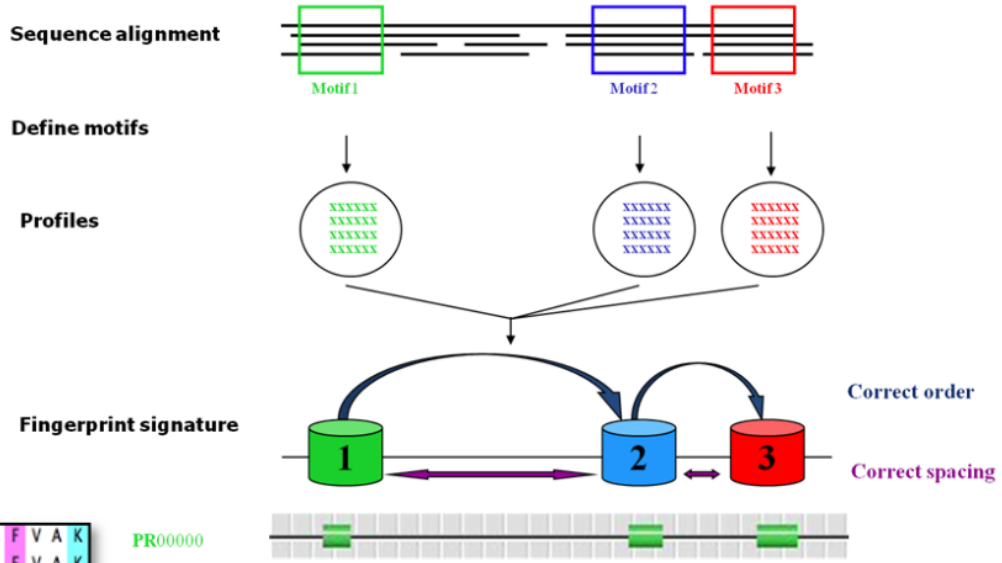


[Ala nebo Cys]-cokoliv-Val-cokoliv-cokoliv-cokoliv-cokoliv-{cokoliv kromě Glu nebo Asp}

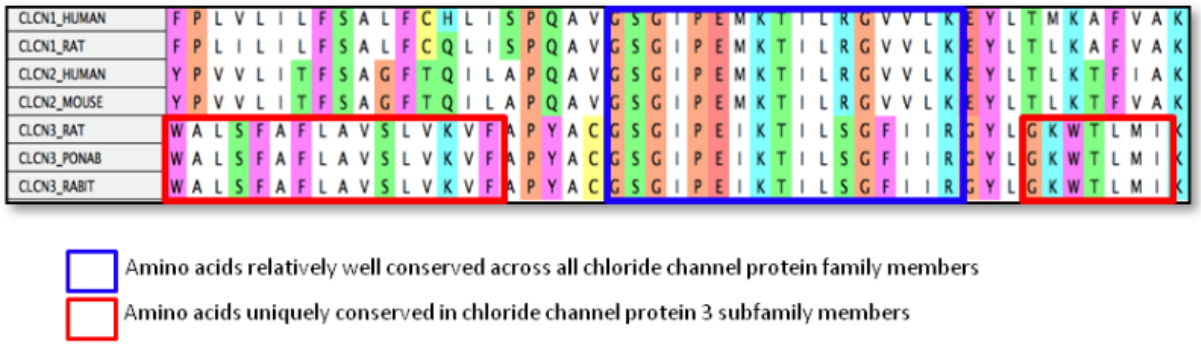
https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/protein-classification-introduction-embl-ebi-resou

„Patterns, profiles, fingerprints“

- **Fingerprints –** většina proteinových rodin je charakteristická přítomností většího množství konzervovaných úseků. Fingerprint je konkrétní počet a uspořádání těchto motivů v proteinech.



Vytvoření fingerprint



Identifikace podrodiny v rámci rodiny s využitím fingerprint

Klasifikace proteinů - databáze

CATH-Gene3D database describes protein families and domain architectures in complete genomes. Protein families are formed using a Markov clustering algorithm, followed by multi-linkage clustering according to sequence identity. Mapping of predicted structure and sequence domains is undertaken using hidden Markov models libraries representing CATH and Pfam domains. CATH-Gene3D is based at University College, London, UK.

CDD is a protein annotation resource that consists of a collection of annotated multiple sequence alignment models for ancient domains and full-length proteins. These are available as position-specific score matrices (PSSMs) for fast identification of conserved domains in protein sequences via RPS-BLAST. CDD content includes NCBI-curated domain models, which use 3D-structure information to explicitly define domain boundaries and provide insights into sequence/structure/function relationships, as well as domain models imported from a number of external source databases.

MobiDB offers a centralized resource for annotations of intrinsic protein disorder. The database features three levels of annotation: manually curated, indirect and predicted. The different sources present a clear tradeoff between quality and coverage. By combining them all into a consensus annotation, MobiDB aims at giving the best possible picture of the "disorder landscape" of a given protein of interest.

HAMAP stands for High-quality Automated and Manual Annotation of Proteins. HAMAP profiles are manually created by expert curators. They identify proteins that are part of well-conserved proteins families or subfamilies. HAMAP is based at the SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland.

PANTHER is a large collection of protein families that have been subdivided into functionally related subfamilies, using human expertise. These subfamilies model the divergence of specific functions within protein families, allowing more accurate association with function, as well as inference of amino acids important for functional specificity. Hidden Markov models (HMMs) are built for each family and subfamily for classifying additional protein sequences. PANTHER is based at at University of Southern California, CA, US.

Pfam is a large collection of multiple sequence alignments and hidden Markov models covering many common protein domains. Pfam is based at EMBL-EBI, Hinxton, UK.

PIRSF protein classification system is a network with multiple levels of sequence diversity from superfamilies to subfamilies that reflects the evolutionary relationship of full-length proteins and domains. PIRSF is based at the Protein Information Resource, Georgetown University Medical Centre, Washington DC, US.

PRINTS is a compendium of protein fingerprints. A fingerprint is a group of conserved motifs used to characterise a protein family or domain. PRINTS is based at the University of Manchester, UK.

ProDom protein domain database consists of an automatic compilation of homologous domains. Current versions of ProDom are built using a novel procedure based on recursive PSI-BLAST searches. ProDom is based at PRABI Villeurbanne, France.

PROSITE is a database of protein families and domains. It consists of biologically significant sites, patterns and profiles that help to reliably identify to which known protein family a new sequence belongs. PROSITE is base at the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Geneva, Switzerland.

SFLD (Structure-Function Linkage Database) is a hierarchical classification of enzymes that relates specific sequence-structure features to specific chemical capabilities.

SMART (a Simple Modular Architecture Research Tool) allows the identification and annotation of genetically mobile domains and the analysis of domain architectures. SMART is based at at EMBL, Heidelberg, Germany.

SUPERFAMILY is a library of profile hidden Markov models that represent all proteins of known structure. The library is based on the SCOP classification of proteins: each model corresponds to a SCOP domain and aims to represent the entire SCOP superfamily that the domain belongs to. SUPERFAMILY is based at the University of Bristol, UK.

TIGRFAMs is a collection of protein families, featuring curated multiple sequence alignments, hidden Markov models (HMMs) and annotation, which provides a tool for identifying functionally related proteins based on sequence homology. TIGRFAMs is based at the J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, US.

Databáze jsou sdruženy do integrovaného nástroje InterPro

What is InterPro?

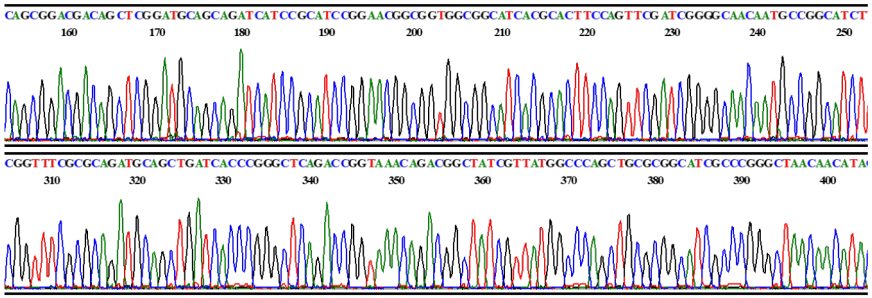
InterPro is a resource that provides functional analysis of protein sequences by classifying them into families and predicting the presence of domains and important sites. To classify proteins in this way, InterPro uses predictive models, known as signatures, provided by several different databases (referred to as member databases) that make up the InterPro consortium.

https://www.ebi.ac.uk/interpro/

Osnova

- **Úvod do bioinformatiky**
  - Definice, molekulárně biologická data, databáze
  - Rozdělení databází, bioinformatická centra
- **Manipulace se sekvencemi**
  - Sekvence biomakromolekul, aminokyseliny, báze, alignment
  - Význam alignmentu, přiložení páru sekvencí a vícenásobné přiložení
- **Predikce struktury proteinů**
  - Predikce 2-D struktury proteinů, predikce 3-D struktury proteinů
  - Threading, Homology modeling, *Ab initio*
- **Proteinové rodiny**
  - Rodiny, domény, sekvenční vzory
  - Patterns, profiles, fingerprints, databáze
- **Predikce genů**
  - Predikce genů u prokaryot a eukaryot, predikční nástroje a postupy

Predikce genů



Sekvenace

GATAGCGTAATGATCGGCTGGCTGCCGCATTTCATGCTGGTTTCCCAACGAAAATAACCGCTCACGGTGCCATCACGATCGCACACCGCAAAATCGGCGG

TACAGGTGGTCGCGCCCGCCGCCAGCACATCGCTGCGCCAATAATGATCTTTCAGCGGACGACAGCTCGGATGCAGCAGATCATCCGCATCCGGAACGGC

GGTGGCGGCATCACGCACTTCCAGTTCGATCGGGGCAACAATGCCGGCATCTTTCAGGGCAAAGCGAATAAACAGCACGCTCACTTCCGCGCGCAGCGCC

AGCGCGGTTTCGCGCAGATGCAGCTGATCACCCGGGCTCAGACCGGTAAACAGACGGCTATCGTTATGGCCCAGCTGCGCGGCATCGCCCGGGCTAACAA

CATACAGGTGGCGACCATCAATCACGGTCGGGGCGGCCGGATCACGGCTGGCTTCCGGATAGGCGCTCAGCAGGGTAACGGCATCCACAATCACCAGCAT

Surové sekvence DNA

Identifikace a anotace genů a proteinů

Table 1
Software commonly used for bacterial genome annotation and comparison

DNA level annotation		
GeneMark	http://exon.gatech.edu/genemark/	Protein gene prediction
Glimmer	http://www.genomics.jhu.edu/Glimmer/	Protein gene prediction
SHOW	http://genome.jouy.inra.fr/ssb/SHOW/	Protein gene prediction
tRNAscan-SE	http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/	tRNA gene prediction
RNAmmer	http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/	rRNA gene prediction
RepSeek	http://www.abi.snv.jussieu.fr/%98public/RepSeek/	Search for approximate repeats in complete DNA sequences
IslandPath	http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandpath/	Identification of genomic islands
Protein level annotation		
BLAST	http://www.ebi.ac.uk/blast/	Compare a novel sequence with those contained in nucleotide and protein databases
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/	Search for domains/motifs in the InterPro database
COGNITOR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitor.html	Compare a query sequence to the COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) database
PRIAM	http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/priam/	Detection of enzymatic function in a fully sequenced genome, based on all sequences available in the ENZYME database
GOAnno	http://bips.u-strasbg.fr/GOAnno/	BLAST search on the Gene Ontology database
PSORTb	http://www.psort.org/psortb/	Prediction of bacterial protein subcellular localization
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Prediction of transmembrane helices in protein sequences
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Prediction of signal peptide cleavage sites in protein sequences
Comparative genomic tools		
Mauve	http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/	Multiple genome alignments in the presence of large-scale evolutionary events
MOSAIC	http://mig.jouy.inra.fr/mig/mig_eng/presentation/project/mosaic	Define the set of backbones and loops in closely related bacterial genomes
ACT	http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT/	Comparative genome analysis and visualization tools for multiple genome alignments
CGAT	http://mbgd.genome.ad.jp/CGAT/	
MaGe	http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/	Computation of gene order conservation (syntenies) between available bacterial genomes
Pathologic	http://biocyc.org/	Metabolic network reconstruction and comparative pathway analysis
PUMA2	http://compbio.mcs.anl.gov/puma2/	Metabolic pathway reconstruction
The SEED	http://theseed.uchicago.edu/FIG/	Comparative analysis and annotation tools using the subsystem approach
STRING	http://string.embl.de/	Search Tool for the Retrieval of Interacting Proteins
PyPhy	http://www.cbs.dtu.dk/staff/thomas/pyphy/	Reconstruction of phylogenetic relationships of complete microbial genomes
HoSeqI	http://pbil.univ-lyon1.fr/software/HoSeqI/	Automatically assign sequences to homologous gene families from the HOGENOM database

Predikce genů
(Predikce *kódující* části genu)

- **Prokaryotické geny** – nepřerušované úseky DNA mezi **startovním kodonem** (ATG, GTG, TTG, CTG) a **stop kodonem** (TAA, TGA, TAG).

- **Eukaryotické geny** – Přerušovány introny. Průměrná délka exonu je 50 kodonů, některé jsou mnohem kratší. Některé introny extrémně dlouhé, geny zabírají mbp v genomové DNA. **Predikce je mnohem složitější a vzniká velké množství chyb!**

Predikce prokaryotických genů

GTATGCTGGTGATTGTGGATGCCGTTACCCTGCTGAGCGCCTATCCGGAAGCCAGCCGTGATCCGGCCGCCCCGA
CCGTGATTGATGGTCGCCACCTGTATGTTGTTAGCCCGGGCGATGCCGCGCAGCTGGGCCATAACGATAGCCGTC
TGTTTACCGGTCTGAGCCCGGGTGATCAGCTGCATCTGCGCGAAACCGCGCTGGCGCTGCGCGCGGAAGTGAGCG
TGCTGTTTATTCGCTTTGCCCTGAAAGATGCCGGCATTGTTGCCCCGATCGAACTGGAAGTGCGTGATGCCGCCA
CCGCCGTTCCGGATGCGGATGATCTGCTGCATCCGAGCTGTCGTCCGCTGAAAGATCATTATTGGCGCAGCGATG
TGCTGGCGGCGGGCGCGACCACCTGTACCGCCGATTTTGCGGTGTGCGATCGTGATGGCACCGTGAGCGGTTATT
TTCGTTGGGAAACCAGCATTGAAATTGCGGGCAGCCAGCCGGATACCAAACAGCCGGGCTTTAAACCGAGCAGCG
ATCGCAATGGCAACTTTAGCCTGCCGCCGAATACCGCCTTTAAAGCGATCTTCTATGCGAACGCGGCGGATCGTC
AGGATCTGAAACTGTTTATTGATGATGCGCCGGAACCGGCCGCCACCTTTGTGGGTAACAGCGAAGATGGTGTGC
GTCTGTTTACCCTGAATAGCAAAGGTGGTAAAATTCGTATTGAAGCGAGCGCGAACGGCCGTCAGAGCGCGACCG
ATGCCCGTCTGGCGCCGCTGAGCGCGGGCGATACCGTGTGGCTGGGCTGGCTGGGCGCGGAAGATGGTGCCGATG
CGGATTATAATGATGGCATTGTTATTCTGCAGTGGCCGATTACCTAATGGG

The table shows the 64 codons and the amino acid for each. The direction of the mRNA is 5' to 3'.

1st base	2nd base U	2nd base C	2nd base A	2nd base G
U	UUU (Phe/F) Phenylalanine	UCU (Ser/S) Serine	UAU (Tyr/Y) Tyrosine	UGU (Cys/C) Cysteine
	UUC (Phe/F) Phenylalanine	UCC (Ser/S) Serine	UAC (Tyr/Y) Tyrosine	UGC (Cys/C) Cysteine
	UUA (Leu/L) Leucine	UCA (Ser/S) Serine	UAA Ochre (*Stop*)	UGA Opal (*Stop*)
	UUG (Leu/L) Leucine	UCG (Ser/S) Serine	UAG Amber (*Stop*)	UGG (Trp/W) Tryptophan
C	CUU (Leu/L) Leucine	CCU (Pro/P) Proline	CAU (His/H) Histidine	CGU (Arg/R) Arginine
	CUC (Leu/L) Leucine	CCC (Pro/P) Proline	CAC (His/H) Histidine	CGC (Arg/R) Arginine
	CUA (Leu/L) Leucine	CCA (Pro/P) Proline	CAA (Gln/Q) Glutamine	CGA (Arg/R) Arginine
	CUG (Leu/L) Leucine	CCG (Pro/P) Proline	CAG (Gln/Q) Glutamine	CGG (Arg/R) Arginine
A	AUU (Ile/I) Isoleucine	ACU (Thr/T) Threonine	AAU (Asn/N) Asparagine	AGU (Ser/S) Serine
	AUC (Ile/I) Isoleucine	ACC (Thr/T) Threonine	AAC (Asn/N) Asparagine	AGC (Ser/S) Serine
	AUA (Ile/I) Isoleucine	ACA (Thr/T) Threonine	AAA (Lys/K) Lysine	AGA (Arg/R) Arginine
	AUG (Met/M) Methionine, *Start* [A]	ACG (Thr/T) Threonine	AAG (Lys/K) Lysine	AGG (Arg/R) Arginine
G	GUU (Val/V) Valine	GCU (Ala/A) Alanine	GAU (Asp/D) Aspartic acid	GGU (Gly/G) Glycine
	GUC (Val/V) Valine	GCC (Ala/A) Alanine	GAC (Asp/D) Aspartic acid	GGC (Gly/G) Glycine
	GUA (Val/V) Valine	GCA (Ala/A) Alanine	GAA (Glu/E) Glutamic acid	GGA (Gly/G) Glycine
	GUG (Val/V) Valine	GCG (Ala/A) Alanine	GAG (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine

Překlad DNA sekvence

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1
V C W Stop L W Met P L P C Stop A P I R K P A V I R P P R P Stop L Met V A T C Met L L A R A Met P R S W A I T I A V C L P V Stop A R V I S C I C A K P R W R C A R K
Stop A C C L F A L P Stop K Met P A L L P R S N W K C V Met P P P P F R Met R Met I C C I R A V V R Stop K I I I G A A Met C W R R A R P P V P P I L R C A I V Met A P
Stop A V I F V G K P A L K L R A A S R I P N S R A L N R A A I A Met A T L A C R R I P P L K R S S Met R T R R I V R I Stop N C L L Met Met R R N R P P P L W V T A K Met
V C V C L P Stop I A K V V K F V L K R A R T A V R A R P Met P V W R R Stop A R A I P C G W A G W A R K Met V P Met R I I Met Met A L L F C S G R L P N G

5'3' Frame 2
Y A G D C G C R Y P A E R L S G S Q P Stop S G R P D R D Stop W S P P V C C Stop P G R C R A A G P Stop R Stop P S V Y R S E P G Stop S A A S A R N R A G A A R
G S E R A V Y S L C P E R C R H C C P D R T G S A Stop C R H R R S G C G Stop S A A S E L S S A E R S L L A Q R C A G G G R D H L Y R R F C G V R S Stop W H R E
R L F S L G N Q H Stop N C G Q P A G Y Q T A G L Stop T E Q R S Q W Q L Stop P A A E Y R L Stop S D L L C E R G G S S G S E T V Y Stop Stop C A G T G R H L C G
Stop Q R R W C A S V Y P E Stop Q R W Stop N S Y Stop S E R E R P S E R D R C P S G A A E R G R Y R V A G L A G R G R W C R C G L Stop Stop W H C Y S A V A D
Y L Met

5'3' Frame 3
Met L V I V D A V T L L S A Y P E A S R D P A A P T V I D G R H L Y V V S P G D A A Q L G H N D S R L F T G L S P G D Q L H L R E T A L A L R A E V S V L F I R F A L K D
A G I V A P I E L E V R D A A T A V P D A D D L L H P S C R P L K D H Y W R S D V L A A G A T T C T A D F A V C D R D G T V S G Y F R W E T S I E I A G S Q P D T K Q P
G F K P S S D R N G N F S L P P N T A F K A I F Y A N A A D R Q D L K L F I D D A P E P A A T F V G N S E D G V R L F T L N S K G G K I R I E A S A N G R Q S A T D A R L
A P L S A G D T V W L G W L G A E D G A D A D Y N D G I V I L Q W P I T Stop W

3'5' Frame 1
P I R Stop S A T A E Stop Q C H H Y N P H R H H L P R P A S P A T R Y R P R S A A P D G H R S R S D G R S R S L Q Y E F Y H L C Y S G Stop T D A H H L R C Y P Q R W
R P V P A H H Q Stop T V S D P D D P P R S H R R S L Stop R R Y S A A G Stop S C H C D R C S V Stop S P A V W Y P A G C P Q F Q C W F P N E N N R S R C H H D R
T P Q N R R Y R W S R P P P A H R C A N N D L S A D D S S D A A D H P H P E R R W R H H A L P V R S G Q Q C R H L S G Q S E Stop T A R S L P R A A P A R F R A D
A A D H P G S D R Stop T D G Y R Y G P A A R H R P G Stop Q H T G G D H Q S R S G R P D H G W L P D R R S A G Stop R H P Q S P A Y

3'5' Frame 2
P L G N R P L Q N N N A I I I I R I G T I F R A Q P A Q P H G I A R A Q R R Q T G I G R A L T A V R A R F N T N F T T F A I Q G K Q T H T I F A V T H K G G G R F R R I I N K Q F
Q I L T I R R V R I E D R F K G G I R R Q A K V A I A I A A R F K A R L F G I R L A A R N F N A G F P T K I T A H G A I T I A H R K I G G T G G R A R R Q H I A A P I Met I F Q R T
T A R Met Q Q I I R I R N G G G G I T H F Q F D R G N N A G I F Q G K A N K Q H A H F R A Q R Q R G F A Q Met Q L I T R A Q T G K Q T A I V Met A Q L R G I A R A N N I Q V
A T I N H G R G G R I T A G F R I G A Q Q G N G I H N H Q H

3'5' Frame 3
H Stop V I G H C R I T Met P S L Stop S A S A P S S A P S Q P S H T V S P A L S G A R R A S V A L Stop R P F A L A S I R I L P P L L F R V N R R T P S S L L P T K V A A
G S G A S S I N S F R S Stop R S A A F A Stop K I A L K A V F G G R L K L P L R S L L G L K P G C L V S G W L P A I S Met L V S Q R K Stop P L T V P S R S H T A K S A
V Q V V A P A A S T S L R Q Stop Stop S F S G R Q L G C S R S S A S G T A V A A S R T S S S I G A T Met P A S F R A K R I N S T L T S A R S A S A V S R R C S Stop S
P G L R P V N R R L S L W P S C A A S P G L T T Y R W R P S I T V G A A G S R L A S G Stop A L S R V T A S T I T S I

Identifikace ORF (otevřených čtecích rámců)

ExPASy
http://web.expasy.org/translate/
ORF Finder (NCBI)
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/

Predikce prokaryotických genů

- Opravdu kóduje ORF protein?
- **ORF kóduje protein, který je podobný již dříve popsanému proteinu (prohledávání DATABÁZÍ pomocí ALIGNMENTU).**
- **ORF má typický obsah GC nebo frekvenci kodonů. Srovnání s charakteristickými vlastnostmi známých genů ze stejného organismu.**
- **Před ORF se nachází typické RBS (ribosome-binding site) nebo promotor.** Analýza signálních sekvencí pro transkripci a/nebo translaci.

Predikce eukaryotických genů

- **Rozpoznání exonů/intronů**

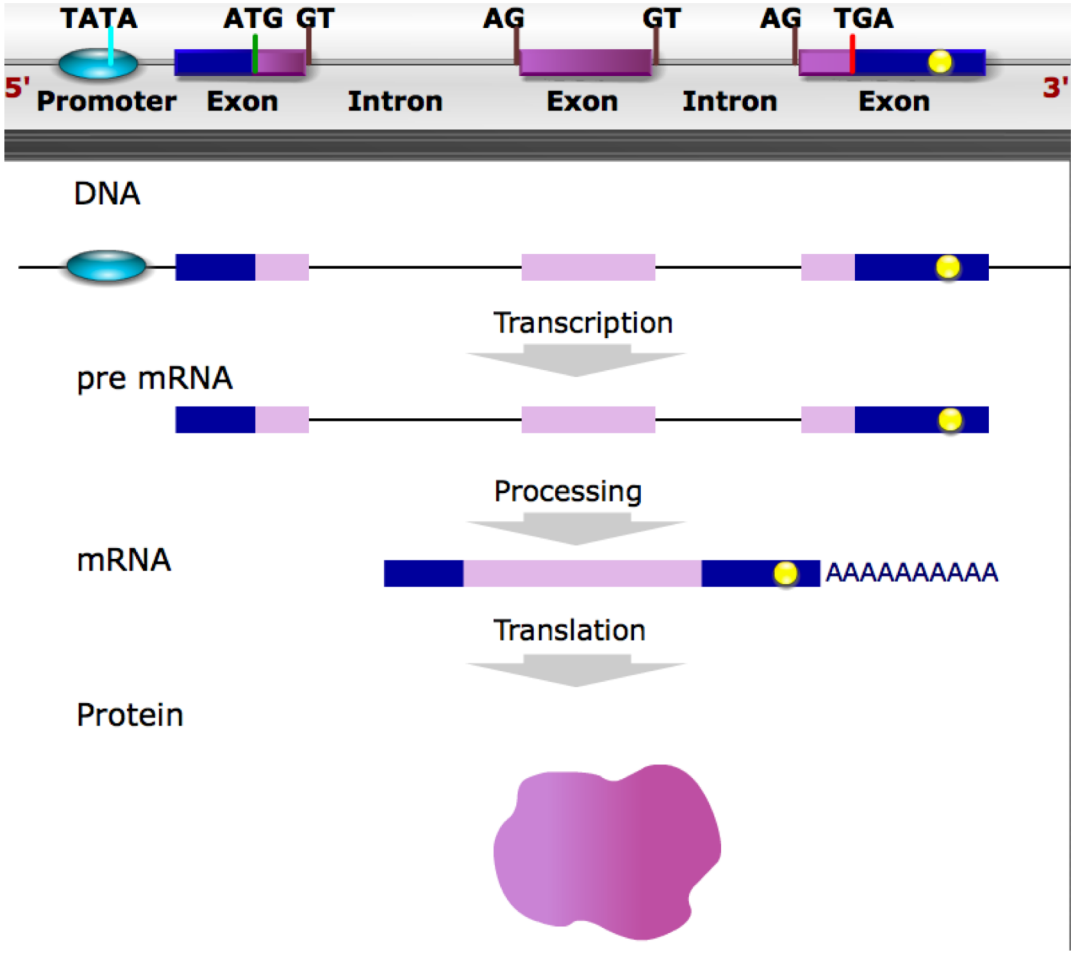
  Identifikace míst sestřihu: GT na 5´konci, AG na 3´konci.

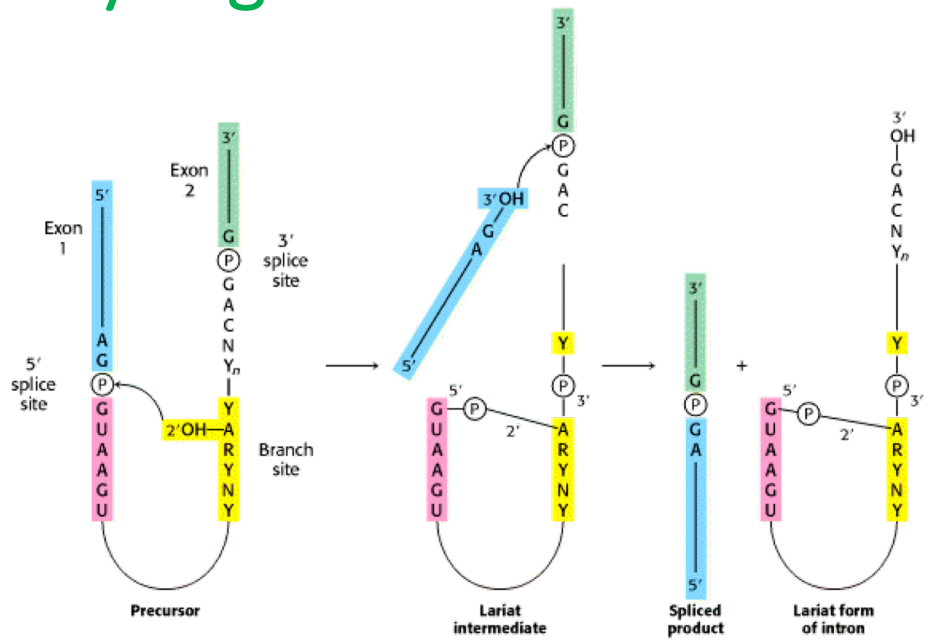
- **Chyby při rozpoznávání exonů/intronů**

  Velké množství chyb. Dlouhé introny – určeny jako intergenové úseky. Krátké intergenové useky – určeny jako introny.

Glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa
Homo sapiens

Predikce eukaryotických genů

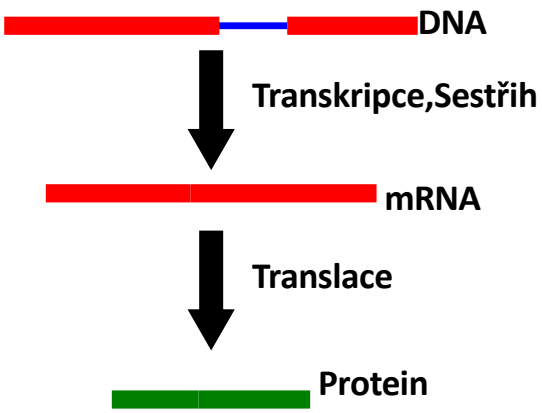




Splicing Mechanism Used for mRNA Precursors. The upstream (5′) exon is shown in blue, the downstream (3′) exon in green, and **the branch site in yellow. R stands for a purine nucleotide, Y for a pyrimidine nucleotide**, and N for any nucleotide. The 5′ splice site is attacked by the 2′-OH group of the branch-site adenosine residue. The 3′ splice site is attacked by the newly formed 3′-OH group of the upstream exon. The exons are joined, and the intron is released in the form of a lariat. [After P. A. Sharp. *Cell* 2(1985):3980.]

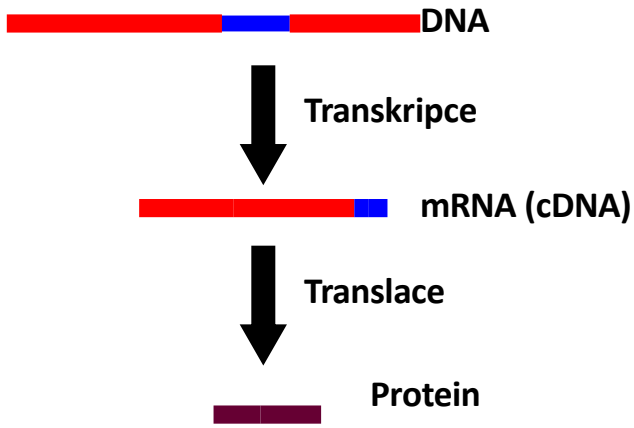
Predikce eukaryotických genů – příklad z praxe

Hypotetický gen/protein, predikovaný při anotaci genomu *Aspergillus fumigatus* Af293



MADPEVEADG ELDLEKRASA QTCKIVNVDT
YVNCRYDAKL DAGAIFGFPK GEKLTFACWK
HGDCYNGVCS WDQVTYLKTT CYVNGYFTDS
NCSSSMLSRC

Identifikace genu/proteinu na úrovni mRNA (příprava cDNA pro klonování)

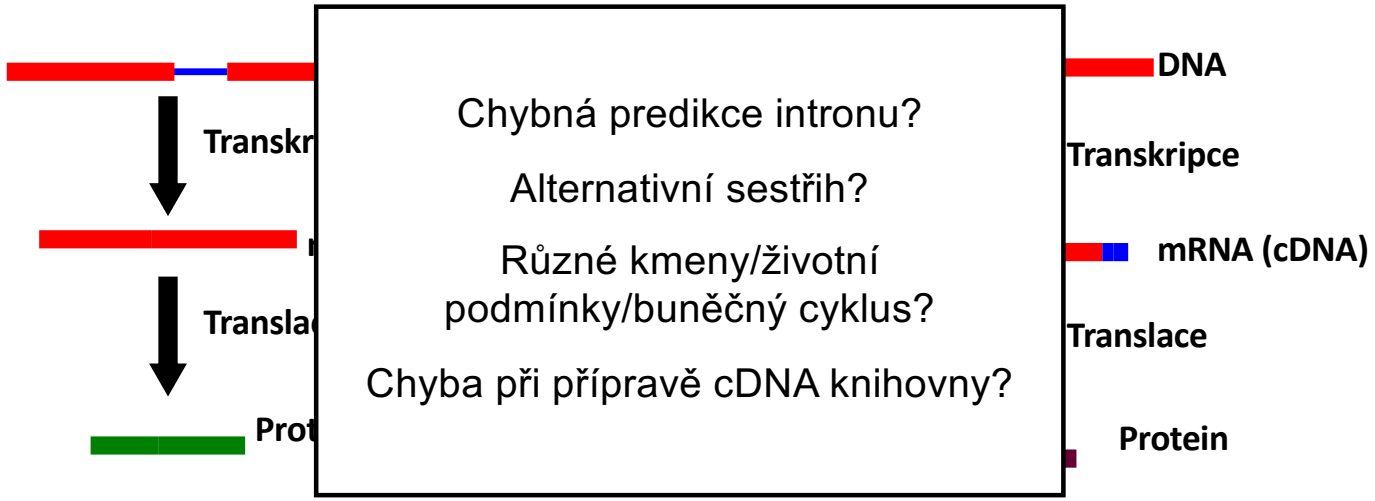


MADPEVEADG ELDLEKRASA QTCKIVNVDT
YVNCRYDAKL DAGAIFGFPK GEKLTFACWK HGDCYNGV

Predikce eukaryotických genů – příklad z praxe

Hypotetický gen/protein,
predikovaný při anotaci genomu
Aspergillus fumigatus Af293

Identifikace genu/proteinu na úrovni
mRNA (příprava cDNA pro klonování)




```
MADPEVEADG ELDLEKRASA QTCKIVNVDT
YVNCRYDAKL DAGAIFGFPK GEKLTFACWK
HGDCYNGVCS WDQVTYLKTT CYVNGYFTDS
NCSSSMLSRC
```

```
MADPEVEADG ELDLEKRASA QTCKIVNVDT
YVNCRYDAKL DAGAIFGFPK GEKLTFACWK
HGDCYNGV
```

Predikce genů – algoritmy a nástroje

- **Predikce genů na základě sekvenční homologie – vyhledávání v databázích pomocí algoritmů.**
- **Predikce genů *ab initio* – predikce na základě statistických parametrů DNA sekvence.**
- **Většina běžně používaných metod kombinuje oba dva přístupy.**

Program	Organism	Algorithm*	Website	Homology
GeneID	Vertebrates, plants	DP	http://www1.imim.es/geneid.html	
FGENESH	Human, mouse, Drosophila, rice	HMM	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind	
GeneParser	Vertebrates	NN	http://beagle.colorado.edu/~eesnyder/GeneParser.html	EST
Genie	Drosophila, human, other	GHMM	http://www.fruitfly.org/seq_tools/genie.html	protein
GenLang	Vertebrates, Drosophila, dicots	Grammar rule	http://www.cbil.upenn.edu/genlang/genlang_home.html	
GENSCAN	Vertebrates, Arabidopsis, maize	GHMM	http://genes.mit.edu/GENSCAN.html	
GlimmerM	Small eukaryotes, Arabidopsis, rice	IMM	http://www.tigr.org/tdb/glimmerm/glmr_form.html	
GRAIL	Human, mouse, Arabidopsis, Drosophila	NN, DP	http://compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm	EST, cDNA
HMMgene	Vertebrates, *C. elegans*	CHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/HMMgene/	
AUGUSTUS	Human, Arabidopsis	IMM,WWAM	http://augustus.gobics.de/	
MZEF	Human, mouse, Arabidopsis, Fission yeast	Quadratic discriminant analysis	http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/	

*DP, dynamic programming; NN, neural network; MM, Markov model; HMM, Hidden Markov model; CHMM, class HMM; GHMM, generalized HMM; IMM, interpolated MM.

Pokud Vás zajímají detaily, odkazy na použité články:

viz Učební materiály v ISu, adresář Bioinformatika/Materialy_pro_studenty (není nutno studovat ke zkoušce, pouze detailnější informace, pokud Vás zajíma něco blíže…

Aktuální kurzy (všechny JS):

C2131 Úvod do bioinformatiky (vhled do oboru)
C2132 Úvod do bioinformatiky - seminář
C2135 Bioinformatika v praxi (pokud si chcete ošahat základy bioinformatiky prakticky)
C2138 Pokročilá bioinformatika
C2139 Pokročilá bioinformatika – seminář
C3211 Aplikovaná bioinformatika (pokud Vás zajímá jaké experimentální metody jsou propojeny s bioinformatickými nástroji)